



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

“Detección de genes *ampC* y estudio de integrones en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:
QBC. TEOLINCACIHUATL AYALA NUÑEZ

ASESOR DE TESIS:
D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

PUEBLA, PUE.

ENERO 2017

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**.

La alumna fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) con el número de becario 339252.

El proyecto 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-NAT15-G y No. LOZP-NAT16-G**.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A los miembros de la Comisión Revisora:

Dra. Patricia Lozano Zarain

Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia

Dr. Miguel Castañeda Lucio

Dra. María Cristina González Vázquez

Por los consejos para hacer de esta tesis una mejor versión.

A la **D. C. Patricia Lozano Zarain**, gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por confiar en mí, por siempre aconsejarme y apoyarme en este proyecto. Por la dedicación y por el tiempo dado a este trabajo, por enseñarme a dar siempre el extra, por motivarme, por ser un ejemplo a seguir.

A la **D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, gracias por su tiempo y dedicación en el transcurso de este proyecto. Por sus comentarios en cada tutorial, por aceptarme en el laboratorio, por abrir las puertas de su casa y pasar momentos agradables. El recuerdo será entrañable.

A la **D. C. Margarita María de la Paz Arenas**, gracias por su tiempo, sus consejos siempre constructivos y por su amable disposición en ayudar a la culminación de este proyecto.

Al D. C. Miguel Castañeda Lucio, agradecida por su amabilidad al atenderme, por su tiempo y consejos, por abrirme las puertas de su laboratorio, por transmitir su amor por la ciencia, por esa sonrisa que lo caracteriza. Gracias.

A la **Dra. Yolanda Sáenz** por su apoyo en el estudio de los integrones.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A DIOS

“Confía en el Señor de todo corazón, y no en tu propia inteligencia. Reconócelo en todos tus caminos, y él allanará tus sendas”. Proverbios: 3, 5-6.

A mis **padres, Isabel Núñez Castillo y Teófilo Ayala Cuevas**, gracias por confiar en mí, por respetar mis decisiones y siempre apoyarme. Gracias por tanto amor.

A mis **hermanos, Julio Cesar, Diana Eloisa e Isabel**, “mis miñitus” por demostrarme apoyo incondicional, palabras de apoyo y recibirme siempre con los brazos abiertos, y enseñarme que la distancia separa cuerpos, no corazones.

A mis amigas incondicionales **Yadira y Haydee**, gracias por siempre estar, por el amor y por las palabras de apoyo.

A mis hermanas de vida **Aime y Tatiana**, momentos inolvidables, bendecida por su amor y amistad.

A mis roomies **Silvia, Cristi y Selene**, los colores de mi vida en estos años lejos de casa, bendecida por su existencia y su amistad, la cual seguirá y seguirá y seguirá y seguirá...

A **Enrique**, mi kikito, te amaré y te recordaré siempre, gracias por tu amistad, por las aventuras vividas, **por cuidarme**, agradecida de haberte conocido. Éxito en tu vida, sé de mas que lo tendrás.

A **Jessy**, la pequeña del laboratorio, la #ladyplásmidos, por que sin duda, el trabajo en el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin tu compañía, gracias por tu amistad, que vengan muchos éxitos más.

A **Era**, por la compañía y las palabras de apoyo. Éxito en tus proyectos, tienes un gran pequeño motivador.

A **Alma**, por la amistad y la confianza, eres una gran mujer, gran ejemplo a seguir, te admiro.

A **Elena**, por tu amabilidad y la disposición en enseñarme a estudiar los integrones, gracias por tu tiempo y consejos. ¡¡¡¡¡SUBE ESAAAA MONTAÑA!!!!

A **Edwin, Alex, Cris, Gerardo, Emilio, Marisol, Lalo, Angélica, Yessenia, Omar, Caro, Yazmín, Andrea**, por la amistad y la confianza, ánimo, bendiciones!

INFINITAS GRACIAS

ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES	I
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	II
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	III
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mecanismos de resistencia.	2
1.2 El papel de los integrones en la resistencia antimicrobiana.	8
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Antecedentes generales.	16
2.2 Antecedentes específicos.	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVO GENERAL	23
4.1 Objetivos específicos	23
5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1 Cepas de estudio.	25
6.2 Cepas control.	25
6.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en placa.	25
6.4 Extracción de DNA por el método de ebullición.	26
6.5 Cuantificación de DNA.	27
6.6 Amplificación de genes en estudio por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	27
6.7 Estudio de integrones de clase 1 mediante la amplificación de la región variable (RV) y mediante la técnica de <i>"primer walking"</i> .	28
6.7.1 Digestión enzimática.	30
6.8 Visualización de productos de PCR.	30
6.9 Purificación de los productos de PCR para su secuenciación.	30
6.10 Análisis de secuencias.	30

7. RESULTADOS	32
7.1 Identificación de genes tipo <i>ampC</i> plasmídicos en cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos.	32
7.2 Determinación de la CMI en cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos.	32
7.3 Determinación de la estructura de integrones de clase 1 en algunas cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	33
7.3.1 Amplificación de la región variable en cepas de <i>P. aeruginosa</i> del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla.	33
7.3.2 Amplificación de la región variable en cepas de <i>P. aeruginosa</i> del C.M.N. "20 de Noviembre".	34
7.3.3 Determinación de la estructura de los integrones de clase 1 mediante la técnica de "primer walking".	40
8. DISCUSIÓN	44
9. CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Casetes génicos de resistencia a antibióticos y de función desconocida.	12
2	Relación entre casetes génicos de función desconocida con proteínas putativas.	13
3	Regiones promotoras descritas en los integrones de clase 1.	14
4	Integrones de clase 1 reportados en la base de datos INTEGRALL.	19
5	Puntos de corte para la CMI recomendados por el CLSI (2015) para <i>P. aeruginosa</i> .	26
6	Antibióticos y concentraciones a determinar para la CMI en <i>P. aeruginosa</i> .	26
7	Componentes utilizados para la amplificación de genes mediante PCR.	27
8	Oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR utilizados para amplificar los genes de tipo <i>ampC</i> .	27
9	Oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR utilizados en el estudio de integrones.	28
10	Oligonucleótidos utilizados en el mapeo de integrones.	29
11	CMI de 5 cepas de <i>P. aeruginosa</i> provenientes del C.M.N. "20 de Noviembre".	32
12	Regiones Variables de 44 cepas de <i>P. aeruginosa</i> provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla.	33
13	Datos de las cepas Ps89 y Ps91 de <i>P. aeruginosa</i> provenientes del C.M.N. "20 de Noviembre".	37
14	Datos de las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps95 y Ps39 de <i>P. aeruginosa</i> provenientes del C.M.N. "20 de Noviembre".	39
15	Combinación de oligonucleótidos utilizados para el mapeo del integrón de la cepa Ps84 del C.M.N. "20 de Noviembre".	40
16	Datos de las cepas Ps74, Ps81 y Ps94 de <i>P. aeruginosa</i> provenientes del C.M.N. "20 de Noviembre".	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Sistema de expresión y represión del gen <i>ampC</i> .	4
2	Entorno genético de enzimas de tipo pAmpC.	5
3	Estructura de un integrón.	9
4	Estructura de un integrón de clase 1.	10
5	Estructura de un integrón de clase 2.	10
6	Casete génico de resistencia.	11
7	Sitio de recombinación <i>attC</i> .	14
8	Integrón portador del gen <i>bla_{DHA-1}</i> .	18
9	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de la RV de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> del C.M.N. "20 de Noviembre".	35
10	Estructura parcial del integrón encontrado en la cepa Ps84 del C.M.N. "20 de Noviembre".	35
11	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión enzimática de la RV con EcoRI de las cepas Ps89 y Ps91 del C.M.N. "20 de Noviembre".	36
12	Estructura del integrón In51 encontrado en las cepas Ps89 y Ps91 del C.M.N. "20 de Noviembre".	37
13	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión enzimática de la RV con EcoRI de las cepas Ps24, Ps35, Ps62 y Ps95 del C.M.N. "20 de Noviembre".	38
14	Estructura del integrón encontrado en las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps95 del C.M.N. "20 de Noviembre".	38
15	Estructura de los integrones encontrados en las cepas Ps74, Ps81 y Ps94 del C.M.N. "20 de Noviembre".	41
16	Integrones de clase 1 inusuales o atípicos.	47

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AN	Amikacina
ATM	Aztreonam
BLEE	β -Lactamasa de Espectro Extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CB	Carbenicilina
CF	Cefalotina
CG	Casete génico
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMN	Centro Médico Nacional
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
EMA	Enzima modificadora de aminoglucósidos
FEP	Cefepime
GM	Gentamicina
IAAS	Infecciones asociadas a la atención en salud
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IPM	Imipenem
MDR	Multidrogorresistente
MEM	Meropenem
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MβL	Metalo- β -lactamasa
NET	Netilmicina
NOR	Norfloxacina
OFX	Ofloxacina
OMS	Organización Mundial de la Salud
pAmpC	AmpC plasmídicas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PIP	Piperacilina
PT	Pulsotipo
rpm	Revoluciones por minuto
SXT	Trimetoprim/Sulfametoxazol
RV	Región Variable
TIC	Ticarcilina
TIM	Ticarcilina/Ácido clavulánico
TZP	Piperacilina/Tazobactam
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad Formadora de Colonia
3'-CS	Segmento 3' conservado
5'-CS	Segmento 5' conservado
BLEE	β -Lactamasa de Espectro Extendido
μg	Microgramo
μL	Microlitro

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo oportunista causante de infecciones graves y difíciles de tratar debido a que presenta diversos mecanismos de resistencia a antimicrobianos, como la expresión de diversas enzimas y elementos movilizables como los integrones, los cuales dificultan el tratamiento en el paciente. El objetivo de este trabajo fue buscar enzimas plasmídicas de tipo AmpC en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (RC) y estudiar integrones de clase 1 en algunas cepas de *P. aeruginosa* RC, provenientes de dos hospitales de México. Se estudiaron 16 cepas de *P. aeruginosa* RC provenientes del Centro Médico Nacional (C.M.N.) “20 de Noviembre” de la Ciudad de México, recibidas durante el período del 2009 y 44 cepas de *P. aeruginosa* RC provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, recibidas durante el período del 2013-2015. El estudio de la presencia de β -lactamasas plasmídicas de tipo AmpC, se realizó en 16 cepas de *P. aeruginosa* RC del C.M.N. “20 de Noviembre” y en 15 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, se buscaron los genes *bla*_{CMY}, *bla*_{MOX}, *bla*_{FOX}, estando ausentes en las cepas analizadas. Se realizó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en las cepas Ps24, Ps35, Ps47, Ps74, Ps95, (provenientes del C.M.N. “20 de Noviembre”); presentando CMI altas para los antibióticos evaluados (ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GN), amikacina (AN), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), meropenem (MEM) e imipenem (IMP)), sin embargo la cepa Ps74 presentó sensibilidad a AN (8 $\mu\text{g/ml}$), CIP (1 $\mu\text{g/ml}$) y MEM (1 $\mu\text{g/ml}$), y presentó sensibilidad intermedia a IMP (4 $\mu\text{g/ml}$). El estudio de integrones, se realizó en 44 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, seleccionadas de acuerdo a su fenotipo, genotipo de resistencia y mediante campos pulsados (PFGE). Se amplificó región variable, y se obtuvieron diversos pesos (de 500 a 3000 pares de bases, aproximadamente). De las 16 cepas del C.M.N. “20 de Noviembre”, tres cepas presentaron integrones truncos (ausencia del segmento 3' conservado) y otras tres, ya habían sido estudiadas. Las otras 10 cepas presentaron integrones con diversos casetes génicos (*bla*_{oxa-2}, *aadA1*, *aadA6*, *aacA4*, *gcuD* y una proteína hipotética), predominando genes de resistencia a aminoglucósidos, relacionados con las altas CMI a GN (>512 $\mu\text{g/mL}$) y AN (512 $\mu\text{g/mL}$) que presentaron algunas cepas. Se encontraron 6 conformaciones distintas de integrones de clase 1 y solo una de ellas ya ha sido reportada, Se identificó el promotor P1 (promotor débil) en los integrones de las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps74, Ps81, Ps94 y Ps95, mientras que las cepas Ps81 y Ps94 también acarrean en promotor P2 (promotor fuerte). Es importante destacar la presencia de los promotores ya que nos da una idea del grado de expresión de los casetes génicos de resistencia a antimicrobianos, los cuales son de gran relevancia en la clínica, por otra parte y no menos importante, la presencia de casetes génicos como “*gcuD*” y de proteínas hipotéticas, empieza a tomar importancia en la clínica ya que se han relacionado con procesos de supervivencia y adaptación bacteriana. Este trabajo pone de manifiesto la variabilidad de casetes génicos que acarrean los integrones de clase 1, así como su versatilidad en la diseminación, resalta la importancia de conocer los mecanismos de resistencia en cepas hospitalarias, para así implementar medidas de contención para la resistencia bacteriana.

palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, AmpC plasmídica, integrones, casete génico.

1. INTRODUCCIÓN

Infección intrahospitalaria, es un concepto que ha evolucionado recientemente a ser llamadas infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), representan un problema de salud pública y son un indicador de la calidad de la prestación y gestión del servicio. Estas infecciones, tienen un origen multifactorial, que esta dado por los 3 componentes que forman la cadena de la infección, a saber: los agentes infecciosos, el hospedero y el medio ambiente. En los agentes infecciosos hay que tener en cuenta su origen, sus atributos para producir enfermedad, la estabilidad de su estructura antigénica, así como su capacidad de resistencia múltiple a los antimicrobianos. En el caso de las bacterias, esta última propiedad se pone más de manifiesto por la presencia de una serie de elementos genéticos de origen tanto cromosomal como extracromosomal, que las hacen adquirir resistencia a los antimicrobianos (Álvarez, 2010; Nodarse, 2002).

La multirresistencia antimicrobiana ha emergido como un problema sanitario mundial que requiere de máxima atención. En 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primer informe global sobre las amenazas de la resistencia a los antibióticos, y en los últimos años, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, por sus siglas en inglés Infectious Diseases Society of America), definió ESKAPE a seis microorganismos como patógenos de alta prioridad por representar problemas clínicos o de salud pública relevantes y no contar con nuevas moléculas en desarrollo para su tratamiento. Los incluidos fueron: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Klebsiella pneumoniae* y otras enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, algunos autores cambiaron el término anterior por "ESCAPE" (*E. faecium*, *S. aureus*, *C. difficile*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* spp.), para resaltar la importancia de *Clostridium difficile* e incorporar no sólo a *Enterobacter* spp. sino también a otras *Enterobacteriaceae* spp. (*Escherichia coli* y *Proteus* spp.) (Abdo, 2014; Labarca y Araos, 2009; Zilahi *et al.*, 2016).

P. aeruginosa es una bacteria gramnegativa, ubicua, no fermentadora, que pocas veces forma parte de la microbiota del ser humano. La capacidad de sobrevivir en medios con nutrientes mínimos y tolerar una variedad de condiciones físicas le ha permitido persistir tanto en la comunidad como en los hospitales; en estos últimos es considerado uno de los

patógenos oportunistas más importantes en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), asociado frecuentemente a infecciones de tejidos blandos, neumonías, bacteriemia y meningitis, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Díaz *et al.*, 2009).

P. aeruginosa presenta un desafío terapéutico serio para el tratamiento de las infecciones adquiridas en la comunidad y nosocomiales, y la selección del antimicrobiano adecuado para iniciar el tratamiento es esencial para optimizar el resultado clínico. Desafortunadamente, la selección del antimicrobiano más adecuado se complica por la capacidad de *P. aeruginosa* de desarrollar resistencia a múltiples clases de antimicrobianos, incluso durante el curso del tratamiento de una infección. Los antimicrobianos con efecto antipseudomónico comprenden aminoglucósidos (amikacina, gentamicina), cefalosporinas de 3^{ra} (ceftazidima, cefoperazona) y 4^{ta} generación (cefepime), monobactámicos (aztreonam), carbapenémicos (imipenem, meropenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y penicilinas de amplio espectro (ticarcilina, carbenicilina, ticarcilina/ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina/tazobactam, mezlocilina) (Lister *et al.*, 2009; Zambrano y Herrera, 2004).

1.1 Mecanismos de resistencia.

P. aeruginosa puede desarrollar resistencia a los antimicrobianos, ya sea a través de la adquisición de los genes de resistencia en elementos genéticos móviles o a través de procesos mutagénicos que alteran la expresión y/o función de los mecanismos cromosómicamente codificados (Lister *et al.*, 2009).

La resistencia adquirida a los carbapenémicos resulta de la presencia de distintos mecanismos, que incluyen la inactivación enzimática y la disminución de la concentración del antimicrobiano. La importancia de cada mecanismo de resistencia es variable y en muchos casos coexisten más de un mecanismo (Santella *et al.*, 2011).

La inactivación enzimática está mediada por la sobre-expresión de enzimas de tipo AmpC o por la producción de carbapenemasas. *P. aeruginosa* posee una cefalosporinasa AmpC cromosómica inducible que es parte de la clase molecular C. Usualmente esta enzima se expresa en niveles basales y confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación, cefamicinas (cefoxitin y cefotetán), aztreonam

e inhibidores de β -lactamasas. Sin embargo, la producción de esta enzima se puede incrementar por la inducción o desrepresión del gen *ampC*. La sobreexpresión a través de la inducción ocurre durante la exposición de la bacteria a β -lactámicos e inhibidores como cefoxitin, imipenem y ácido clavulánico, siendo un proceso reversible después de remover el agente inductor. Mientras que la des-represión se produce cuando alguna de las proteínas involucradas en la regulación de su expresión se ve alterada por mutaciones cromosómicas, haciendo que la cefalosporinasa se produzca de forma constitutiva en altos niveles, aun, en la ausencia de un β -lactámico inductor (Diaz *et al.*, 2009; Santella *et al.*, 2011) (Figura 1).

Por otro lado, desde 1989 se han reportado en aislados nosocomiales y no nosocomiales de todo el mundo, enzimas de tipo AmpC plasmídicas (pAmpC). Las enzimas de tipo pAmpC se han agrupado en ocho grupos, incluyendo más de 90 alelos de CMY, 10 variantes de FOX, 8 variantes de DHA y MOX, 5 de MIR y el ACC, y CFE-1 y LAT- 1 (<http://www.lahey.org/Studies/>) (Cejas *et al.*, 2012; Jacoby, 2009).

Una gran variedad de elementos genéticos han estado implicados en la movilización de estas enzimas en plásmidos. La secuencia de inserción *ISEcp1* (o versiones truncadas de los mismos) se asocia con muchos alelos de CMY incluyendo CMY-2, CMY-4, CMY-5, CMY-7, CMY-12, CMY-14, CMY-15, CMY-16, CMY-21, CMY-31 y CMY-36, así como las β -lactamasas ACC-1 y ACC-4. Otros genes se encuentran adyacentes a la secuencia de inserción *ISCR1* que participa en la movilización de genes, por lo general, en integrones de clase 1 (Jacoby, 2009) (Figura 2).

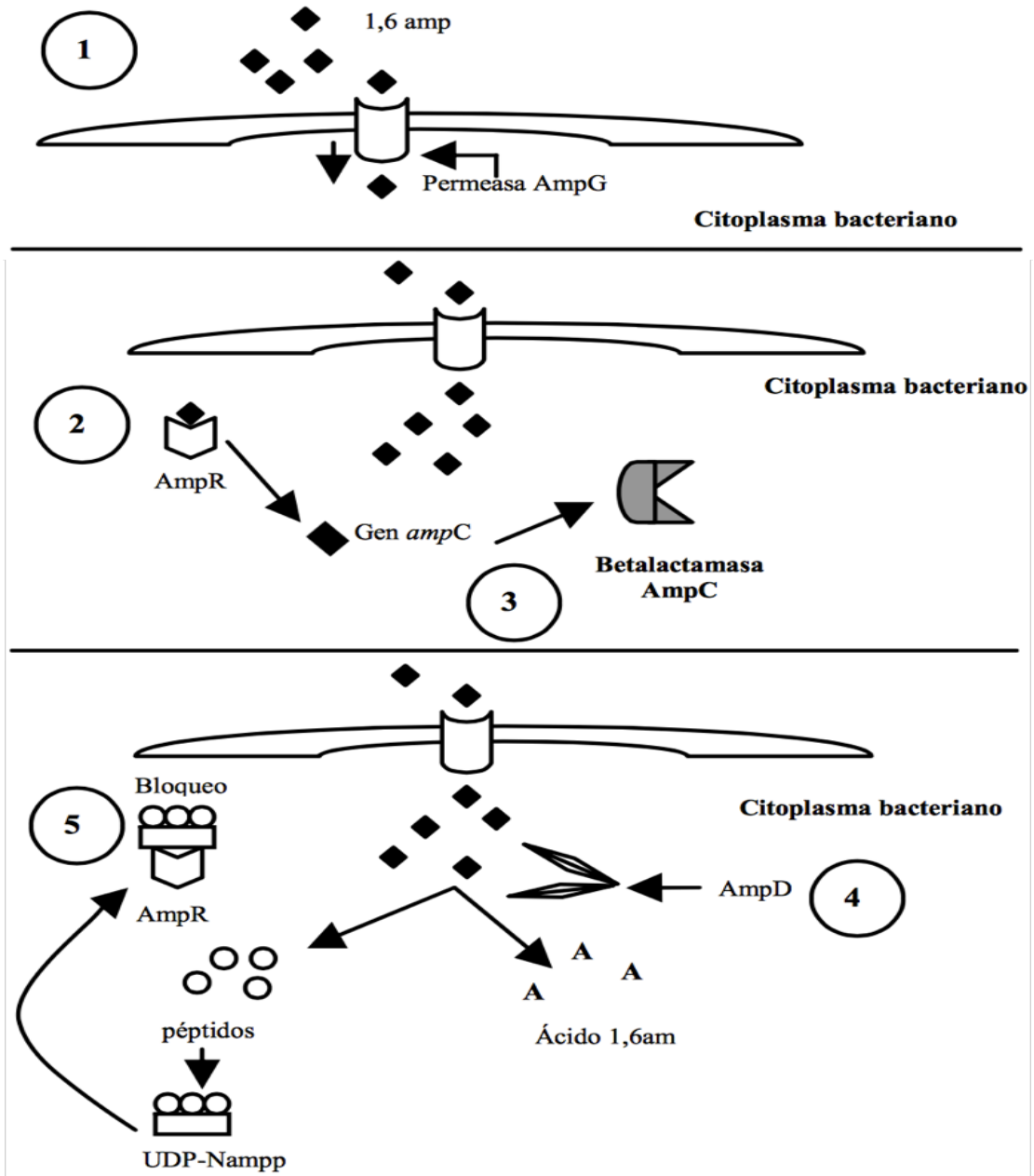


Figura 1. Sistema de expresión y represión del gen *ampC*. **1:** los 1,6 anhidromuropéptidos (1,6 amp) ingresan al citoplasma a través de la permeasa AmpG. **2:** una vez en el interior se unen al activador transcripcional AmpR iniciándose la transcripción del gen *ampC*. **3:** se produce la enzima AmpC. **4:** sistema represor; la amidasa AmpD escinde a los 1,6 amp hasta péptidos y ácido 1,6 anhidromurámico (ácido 1,6 am). **5:** los péptidos son reusados para la formación de UDP-*N*-acetilmuramilpentapéptido (UDP-Nampp), el cual se une a AmpR, bloqueándolo. En consecuencia, se reprime la transcripción del gen *ampC* (Tomado de Martínez, 2009).

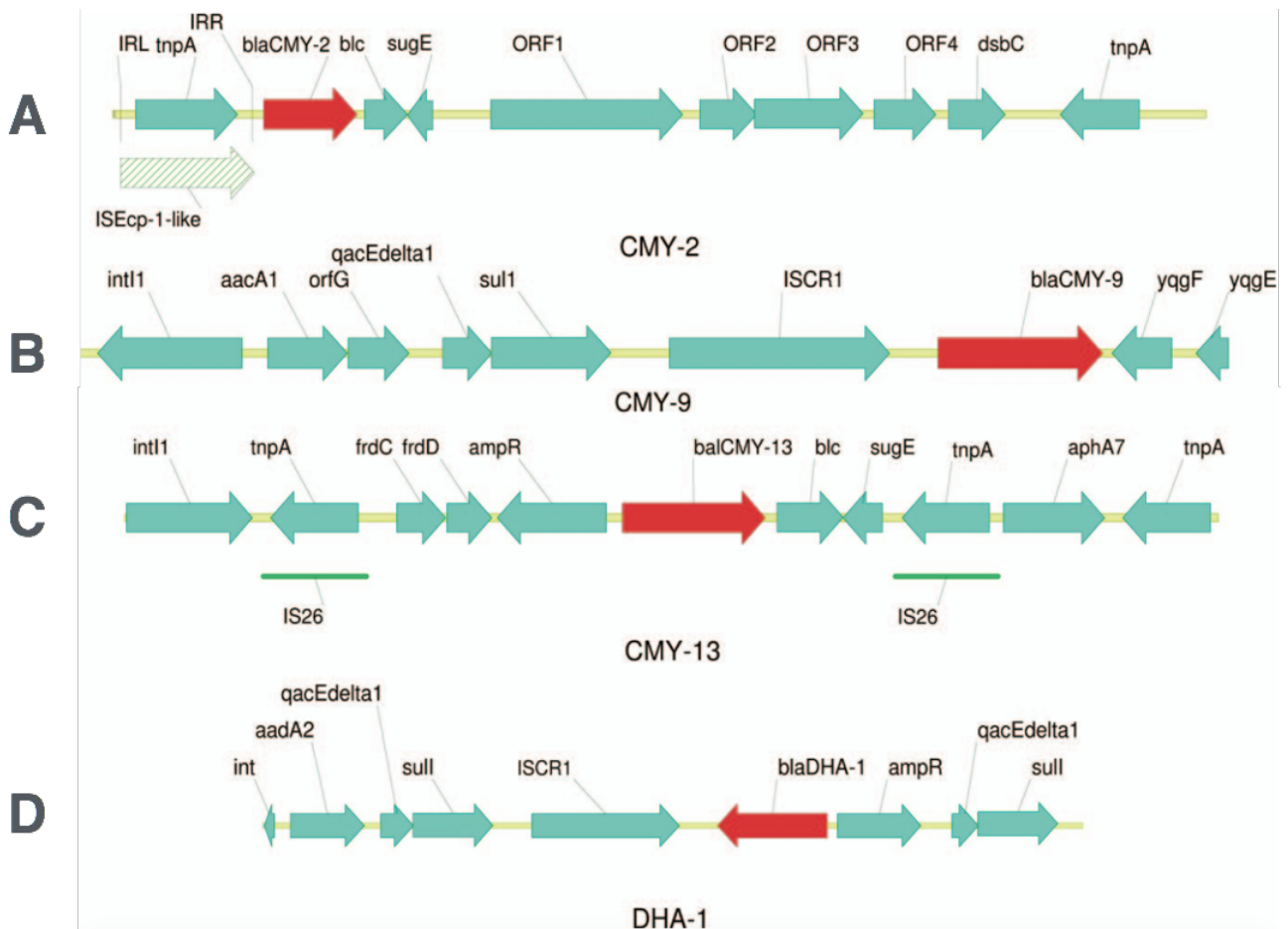


Figura 2. Entorno genético de enzimas de tipo pAmpC. **A.** CMY-2 encontrada en *Salmonella entérica* serovar Newport. **B.** CMY-9 encontrada en *E. coli*. **C.** CMY-13 encontrada en *E. coli*. **D.** DHA-1 encontrada en *Salmonella enteritidis* (Modificado de Jacoby, 2009).

Otras β -lactamasas con actividad carbapenemasa, son las β -lactamasas de clase A y se dividen en cinco grupos, de los cuales sólo se han descrito enzimas GES y KPC hasta la fecha en *P. aeruginosa*. Las carbapenemasas tipo KPC se describieron por vez primera en *K. pneumoniae*, y se han ido detectando periódicamente y en diferentes variantes. En *P. aeruginosa* han sido detectadas sólo dos variantes: KPC-2 en una cepa clínica en Colombia, y KPC-5, en Puerto Rico. Por otra parte, aunque todas las enzimas GES son β -lactamasas de espectro extendido, tres de ellas también muestran actividad razonable frente a los carbapenémicos (GES-2, GES-4 y GES-5). En *P. aeruginosa* se han detectado las variantes GES-2 y GES-5, siempre de codificación plasmídica insertados en integrones (Nicolau y Oliver, 2010; Poole, 2011).

Otro grupo de enzimas son las llamadas carbapenemasas de clase B o M β L. 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*. En *P. aeruginosa* VIM-2 es la M β L más diseminada y asociada a elementos móviles como casetes génicos, los cuales están insertados en integrones de clase 1 (Díaz *et al.*, 2009).

Las β -lactamasas tipo OXA se detectan, sobre todo, en *A. baumannii*, habitualmente como casetes génicos en integrones situados en plásmidos o transposones, aunque también, en ciertos casos, asociadas a secuencias de inserción. La primera OXA con actividad carbapenemasa fue descrita en 1993 en una cepa de *A. Baumannii*, la cual en un inicio se le denominó ARI-1 y, posteriormente fue renombrada como OXA-23. Este tipo de enzimas también se han encontrado en *P. aeruginosa* (Nicolau y Oliver, 2010).

Como se ha descrito anteriormente, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de expresar una gran variedad de enzimas codificadas por genes que se encuentran en el cromosoma de la bacteria o en elementos extracromosómicos. La mayoría de estas enzimas se incluyen en el grupo de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), oxacilinasas, carbapenemasas y las β -lactamasas de tipo AmpC, que en general hidrolizan a los antibióticos β -lactámicos; sin embargo, hay otro grupo de enzimas que lo conforman las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA), de las que se conocen 3 grupos en función del tipo de reacción química por la que modifican a estos antibióticos (Díaz *et al.*, 2009; Martínez-Martínez, 2006):

- Aminoglucósido-acetiltransferasas (AAC), que acetilan grupos amino utilizando como cofactor la acetilcoenzima A. La acetilación se puede llevar a cabo en cualquiera de los grupos amino en las posiciones 1, 2, 3, 6' y 2' de los aminoglucósidos. Las familias de enzimas 3-N-aminoglucósido acetiltransferasa [AAC(3)] con las subfamilias AAC(3)-I y AAC(3)-II, y la 6'-N-aminoglucósido acetiltransferasa, [AAC(6')] subfamilias ACC(6')-I y AAC(6')-II, son las más frecuentemente asociadas a la resistencia de aminoglucósidos en aislamientos de *P. aeruginosa* (Díaz *et al.*, 2009; Mella *et al.*, 2004).

- Aminoglucósido-adeniltransferasas (AAD), enzimas conocidas como nucleotidiltransferasas (ANT), adenilan ciertos grupos hidroxilos. La adenilación en aminoglucósidos como estreptomina y gentamicina en aislamientos de *P. aeruginosa* se realiza por medio de nucleotidiltransferasas, cuyo representante es la enzima ANT(2'')-I, que inactiva a gentamicina y a tobramicina. Otras enzimas como la ANT(3'') da resistencia a estreptomina, y ANT(4')-II da resistencia a amikacina, tobramicina e isepamicina (Díaz *et al.*, 2009; Mella *et al.*, 2004).
- La inactivación de los aminoglucósidos también se puede realizar por procesos de fosforilación llevados a cabo por las fosfotransferasas, enzimas que modifican el 3'-OH de estos antibióticos. Varias enzimas APH(3') han sido descritas en *P. aeruginosa*. La enzima APH(3')-VI que confieren resistencia a amikacina e isepamicina, la APH(2'') que confiere resistencia a gentamicina y a tobramicina, y las APH(3')-I y II; estas dos últimas son las predominantes en aislamientos clínicos resistentes a kanamicina y a neomicina (Díaz *et al.*, 2009; Mella *et al.*, 2004).

Por otro lado, la disminución de la concentración del antimicrobiano en el periplasma puede deberse al déficit en la expresión de proteínas de la membrana externa, OprD, o a la sobreexpresión de sistemas de eflujo de tipo MexAB-OprM y MexXY-OprM, habitualmente expresados en los aislados de *P. aeruginosa* (Santella *et al.*, 2011).

Una de las porinas más estudiadas en *P. aeruginosa* es la porina OprD, ya que parece servir como portal de entrada preferido para los carbapenémicos, y la pérdida de la función de la porina OprD en la membrana externa disminuye significativamente la susceptibilidad a los carbapenémicos disponibles en *P. aeruginosa*. Sin embargo, el impacto de la deficiencia de la porina OprD en la potencia de estos carbapenémicos no siempre incrementa las concentraciones mínimas inhibitorias por encima del punto de interrupción susceptible, y mecanismos de resistencia adicionales (bombas de eflujo y/o carbapenemasas) pueden ser necesarios para proporcionar la resistencia a los carbapenémicos (Lister *et al.*, 2009).

Mientras que la pérdida de porinas como OprD, representa una barrera eficaz para evitar el ingreso del fármaco en la célula bacteriana, una disminución en la

acumulación de drogas también se puede lograr a través del transporte activo de bombas asociadas a la membrana. Estas bombas son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma, y del periplasma bacteriano, compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos. La expresión de estas bombas puede ser permanente (expresión constitutiva) o intermitente (expresión que puede inducirse). Estas bombas son consideradas el mecanismo principal de resistencia intrínseca a los antimicrobianos en *P. aeruginosa*. Los sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY, son los más importantes en *P. aeruginosa*, siendo MexAB-OprM la primera bomba descrita en este microorganismo y es capaz de expulsar una gran cantidad de antimicrobianos entre los que se encuentran fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas y sulfonamidas, pero en especial β -lactámicos como: carboxipenicilinas, aztreonam, ceftazidima, cefotaxime; y carbapenémicos como meropenem y panipenem, pero no imipenem (Díaz *et al.*, 2009; Lister *et al.*, 2009; Suárez *et al.*, 2006).

También es habitual que las cepas multiresistentes de *P. aeruginosa* sean resistentes a las quinolonas, lo que depende de las ya mencionadas bombas de expulsión y de otro mecanismo de resistencia el cual se encuentra relacionado con mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, que codifican la subunidad A de la topoisomerasa II (ADN girasa) y IV, respectivamente. Además, *P. aeruginosa* es capaz de adquirir nuevos determinantes de resistencia mediante transferencia horizontal. Entre los determinantes adquiridos, normalmente en forma de casetes génicos situados en integrones y a su vez localizados en transposones o plásmidos que permiten su movilidad, destacan las β -lactamasas, incluyendo las de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas, pero también las EMA (Lambert, 2002; Martínez-Martínez y Calvo, 2010; Nicolau y Oliver, 2010).

1.2 El papel de los integrones en la resistencia antimicrobiana.

Los integrones por sí solos no son móviles; por el contrario, logran la movilidad solamente cuando están vinculados a un elemento genético móvil. Todos los integrones están compuestos por tres componentes principales: un promotor orientado para la expresión de los genes capturados (P_c , P_2), un sitio de recombinación primario (*attI*) situado río abajo del promotor y un gen que codifica para la integrasa (*intI*), el cual tiene su propio promotor (P_{int}) (Carattoli, 2001; Di Conza y Gutkind, 2010; Kung *et al.*, 2010) (Figura 3).

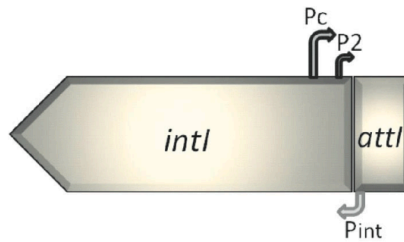


Figura 3. Estructura de un integrón (Tomada de Di Conza y Gutkind, 2010).

La integrasa, que pertenece a la familia de las tirosina-recombinasas, es la que cataliza la recombinación entre las secuencias específicas. Es por ello que las bacterias que poseen integrones tienen la posibilidad de incorporar genes que se encuentran en el citoplasma bacteriano bajo la forma de casetes génicos (CG) (Di Conza y Gutkind, 2010).

Los integrones se han definido con base a la homología de las proteínas de la integrasa (40-60% de identidad de aminoácidos). Los integrones de clase 1 representan la estructura más común y se caracterizan por la presencia de dos segmentos conservados, el segmento 5' conservado (5'-CS) y el segmento 3' conservado (3'-CS). El 5'-CS contiene el gen *intl1*, el sitio *attI1* y el promotor, mientras que el extremo 3'-CS codifica el gen *sul1*, que confiere resistencia a sulfonamidas y el gen *qacEΔ1*, que confiere resistencia a los compuestos de amonio cuaternario utilizados como desinfectantes. Al analizar detalladamente el segmento 3'-CS se observa que el gen *qacEΔ1* es una forma trunca del gen *qacE* fusionado con un segmento no relacionado que codifica 21 aminoácidos y aun con el truncado, el gen parece funcionar parcialmente como proteína exportadora de múltiples drogas, ya que aislamientos que contienen el gen *qacEΔ1* son resistentes a bajos niveles de colorantes y a sales de amonio cuaternario. Estos segmentos conservados flanquean un segmento variable, tanto en términos de longitud y secuencia, en donde se integran los CGs de resistencia a antibióticos, particularmente. Los integrones de clase 1 son los más frecuentes, seguidos de los integrones de clase 2; asociados a transposones de la familia de *Tn3* y *Tn7*, respectivamente (Bennett, 2008; Carattoli, 2001; Coque, 2005; Di Conza y Gutkind, 2010) (Figura 4).

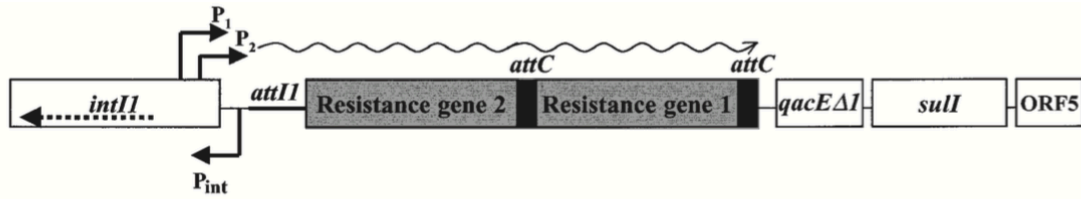


Figura 4. Estructura de un integrón de clase 1 (Tomada de Carattoli, 2001).

Los integrones de clase 2, tienen una región 5'-CS típica con las particularidades correspondientes a esta clase (*intI2*, *attI2*) y contienen tres CGs integrados: *dfrA1* (resistencia a trimetoprim), *sat2* (resistencia a estreptomicina) y *aadA1* (resistencia a espectinomicina y a estreptomicina) adyacente al gen de la integrasa defectuosa (*intI2*) y, finalmente, un marco de lectura abierto, *orfX*, de función desconocida. Mientras que en la región 3'-CS está compuesta por 5 genes (*tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD* y *tnsE*) involucrados en la transposición (Carattoli, 2001; Di Conza y Gutkind, 2010) (Figura 5).



Figura 5. Estructura de un integrón de clase 2 (Tomada de Di Conza y Gutkind, 2010).

En los integrones de clase 3, el gen de la integrasa (*intI3*) muestra una identidad del 60.9% con el gen *intI1* a nivel de aminoácidos, con sitios de recombinación atípicos. Una cuarta clase de integrón, que alberga cientos de CGs (asociados a múltiples funciones adaptativas) y asociado con el gen de la integrasa *intI4*, se ha descrito en el cromosoma de *Vibrio cholerae*. Se encontró un "integrón isla" que consiste en secuencias agrupadas repetidas separados en la mayoría de los casos por un único marco de lectura abierto (Carattoli, 2001; Coque, 2005).

La estructura de un CG está compuesta por dos componentes funcionales: una secuencia codificante, generalmente carente de promotor propio, flanqueada por secuencias palindrómicas no perfectas, que participan activamente en la recombinación sitio específica. En los CGs de resistencia a antibióticos, esta estructura es conocida como elemento de 59-bases (59-be) o, según su nomenclatura más moderna, como secuencia "attC", esta secuencia difiere tanto en

secuencia y longitud. El tamaño de los CGs es considerablemente variado y depende de la proteína que codifique y aunque estos se encuentran integrados y forman parte de un integrón o se ubican en alguna otra localización no específica, pueden existir libres como moléculas de ADN circular, cerradas de modo covalente (Figura 6). Hasta siete diferentes CGs se han descrito dentro de un único integrón de clase 1 y se conocen entre 50 – 60 CGs de resistencia. Los CGs de resistencia a antibióticos más recientemente identificados incluyen los que codifican a las M β L IMP y VIM, que confieren resistencia a imipenem y meropenem. Sin embargo, también hay CGs que confieren resistencia a muchos antibióticos diferentes, incluyendo los aminoglucósidos, cefalosporinas, cloranfenicol, penicilinas y trimetoprim (Tabla 1). Además, se han identificado varios marcos de lectura abiertos con función desconocida. Estos CGs identificados en la resistencia móvil de integrones, los cuales codifican para proteínas de función hasta ahora desconocida, se denominaban “ORF”, sin embargo en el 2009, se propuso el término “gcu” (por sus siglas en inglés: gene cassette of “unknown function”), para denominar al CG de función desconocida, pero que tienen un sitio attC (Carattoli, 2001; Di Conza y Gutkind, 2010; Partridge *et al.*, 2009) (Tabla 1).

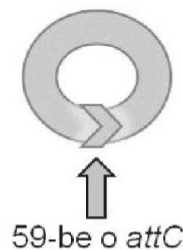


Figura 6. Casete genético de resistencia (Tomada de Di Conza y Gutkind, 2010).

Tabla 1. Casetes génicos de resistencia a antibióticos y de función desconocida.

Gen	Número de acceso (GenBank)	<i>attC</i>	Gen	Número de acceso (GenBank)	<i>attC</i>
<i>aacA1</i>	AF047479.2	118	<i>gcuA</i>	U12441.2	69
<i>aacA4</i>	U59183.1	72	<i>gcuC</i>	AF455254.1	60
<i>aacC1</i>	U90945.1	109	<i>gcuD</i>	M95287.4	60
<i>aacC4</i>	AF318077.1	108	<i>gcuD1</i>	DQ278189.1	60
<i>aadA1a</i>	X12870.1	60	<i>gcuE</i>	U12338.3	60
<i>aadA6</i>	AF140629.1	60	<i>gcuE8</i>	EU434616.1	60
<i>aadB</i>	L06418.4	60	<i>gcuF</i>	Z21672.1	60
<i>aphA15</i>	Y18050.2	108	<i>gcuF1</i>	FJ207466.1	60
<i>ges1</i>	AF355189.1	110	<i>gcuH</i>	AF047479.2	86
<i>veb1</i>	AF010416.1	133	<i>gcuI</i>	AF047479.3	77
<i>imp1</i>	D50438.1	127	<i>gcuJ</i>	AF047479.4	74
<i>imp18</i>	EF184215.1	135	<i>gcuN</i>	AJ223604.1	75
<i>vim1</i>	Y18050.2	81	<i>gcuO</i>	AJ251519.1	76
<i>vim13</i>	EF577407.1	99	<i>gcuP</i>	U90945.1	70
<i>gim1</i>	AJ620678.1	56	<i>gcuQ</i>	U90945.1	69
<i>sim1</i>	AY887066.1	88	<i>gcu1</i>	AF318077.1	117
<i>oxa2</i>	M95287.4	70	<i>gcu2</i>	AY139592.1	88
<i>oxa10</i>	U37105.2	111	<i>gcu3</i>	AY139600.1	72
<i>catB2</i>	AJ487034.1	72	<i>gcu4</i>	AJ536835.1	102
<i>catB9</i>	AF462019.1	128	<i>gcu5a</i>	AY220520.1	91
<i>cmlA1</i>	U12338.3	70	<i>gcu6</i>	AB113580.1	78
<i>cmlA8</i>	EU182575.1	70	<i>gcu7</i>	AJ634050.2	60
<i>dfrA7</i>	X58425.1	134	<i>gcu8a</i>	AJ704863.3	60
<i>dfrA27</i>	EU678897.1	82	<i>gcu9</i>	AJ784256.1	76
<i>sat2</i>	X15995.1	60	<i>gcu10</i>	AJ786649.2	73
<i>qacE</i>	U67194.4	141	<i>gcu11</i>	AB195796.1	71
<i>qacF</i>	AF034958.3	60	<i>gcu12</i>	AJ871915.1	60
<i>smr1</i>	AF406792.1	62	<i>gcu13</i>	AY907717.1	56
<i>smr2</i>	AY260546.3	60	<i>gcu14</i>	DQ236170.1	85
<i>aar2</i>	AF078527.1	114	<i>gcu15</i>	DQ278188.1	69
<i>aar5</i>	EF660563.1	60	<i>gcu16</i>	DQ278190.1	114
<i>ereA1</i>	AY183453.1	57	<i>gcu17</i>	DQ361087.2	61
<i>ereA2</i>	AF099140.1	57	<i>gcu18</i>	AM237806.1	132
<i>linF</i>	AJ561197.2	58	<i>gcu19</i>	AM237806.1	72
<i>linG</i>	DQ836009.1	58	<i>gcu20</i>	DQ520941.1	90
<i>fosF</i>	AY294333.1	93	<i>gcu21</i>	DQ522237.1	85
<i>fosH</i>	DQ342344.1	58	<i>gcu22</i>	DQ533990.1	72
<i>qnrVC1</i>	EU436855.1	126	<i>gcu23</i>	DQ533990.1	72
<i>qnrVC2</i>	AB200915.1	129	<i>gcu24</i>	DQ533990.1	72

Información tomada de Partridge *et al.*, 2009.

Durante la última década, los avances en la secuenciación del ADN han ampliado el alcance de los estudios genómicos, conduciendo al descubrimiento de integrones cromosómicos en genomas de bacterias, tales como *V. cholerae* que lleva hasta 200 CGs y que codifican para proteínas con funciones en su mayoría desconocidas. En 2016, unos investigadores realizaron la búsqueda bioinformática de diversos “ORF”, sus resultados mostraron que un total de 42 CGs tenían homología con una variedad de proteínas putativas (Oliveira-Pinto *et al.*, 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Relación entre casetes génicos de función desconocida con proteínas putativas.

Tamaño ORF (aa)	Homología (e-value)	Organismo	Número de acceso (GenBank)
50	Dihidroorotato deshidrogenasa 2 (2e-04)	<i>Methylobacterium nodulans</i> (Proteobacteria)	YP_002499706
74	Arilsulfatasa (1e-10)	<i>Pseudomonas putida</i> (Proteobacteria)	NP_943152
75	Regulador transcripcional de la familia LuxR (0.19)	<i>Conexibacter woesei</i> (Actinobacteria)	YP_003395618
80	Proteína hipotética GTP1/OBG (8e-18)	Uncultured crenarchaeote (Crenarchaeota)	ABZ08675.1
101	Fructosamina/ketosamina-3-cinasa (2e-16)	<i>Rhodothermus marinus</i> (Bacteroidetes)	YP_004825172
165	Lipoproteína asociada a peptidoglicano (0.26)	<i>Pantoea</i> sp. (Proteobacteria)	ZP_10554743
169	Proteína hipotética PE36_08006 (8e-13)	<i>Moritella</i> sp. (Proteobacteria)	ZP_01899591
201	Proteína hipotética PMI38_02963 (5e-49)	<i>Pseudomonas</i> sp (Proteobacteria)	ZP_10603583
208	Proteína hipotética mII3391 (3e-05)	<i>Mesorhizobium loti</i> (Proteobacteria)	NP_104507
224	Glicosil hidrolasa (1e-59)	<i>Algoriphagus</i> sp. (Bacteroidetes)	ZP_07720449

Información tomada de Oliveira-Pinto *et al.*, 2016.

Como se mencionó antes, los CGs a menudo sólo contienen un marco de lectura abierto y un sitio de recombinación attC. Esto significa que se basan en un promotor para la expresión externa. La expresión de estos genes de resistencia a antibióticos está bajo el control transcripcional del promotor P_c (inicialmente llamado P1 o Pant) presente en la región 5'-CS del integrón, ya que todos los casetes están integrados en la misma orientación. Se ha estudiado en detalle el promotor P_c de los integrones de clase 1 y se han encontrado 4 variantes de este promotor en integrones presentes en aislamientos clínicos. Cada una de estas variantes posee diferente fuerza promotora, lo que confiere diferentes niveles de resistencia ante la presencia del mismo gen codificante (Tabla 3). En un subgrupo de integrones de clase 1 se ha originado un segundo promotor, P2, por inserción de tres residuos de G entre los motivos preexistentes -10 y -35. Cuando P2 está presente y es activo, su fuerza es mayor que la de todas las versiones de P_c, excepto P_c fuerte. Frecuentemente, P2 activo está asociado con P_c débil y, en este caso, P2 es el principal responsable de la expresión de los genes de resistencia en integrones de clase 1 en diferentes microorganismos (Di Conza y Gutkind, 2010; Gillings, 2014).

Tabla 3. Regiones promotoras descritas en los integrones clase 1.

Fuerza	Promotor Pc				Nº de acceso (GenBank)	Frecuencia (%)
	-35	pb	-10	Fr		
Fuerte	TTGACA	17	TAAACT	++++	U12441	24.3
Híbrido 1	TGGACA	17	TAAACT	++	M95287	28
Híbrido 2	TTGACA	17	TAAGCT	++	U13880	4.4
Débil	TGGACA	17	TAAGCT	+	U49101	41.7

Fuerza	Promotor P2				Nº de acceso (GenBank)	Frecuencia (%)
	-35	pb	-10	Fr		
Activo	TTGTTA	17	TACAGT	+++	U42226	8.7
Inactivo	TTGTTA	14	TACAGT	-	DQ31578	0.6

Se indican las secuencias de las regiones promotoras -10 (también llamada Pribnow box) y -35, y el tamaño del espacio que las separan (en pb). La fuerza relativa (Fr) de los promotores frente a la versión fuerte de Pc está representada como: +++++, 100% de actividad; +++, 20-50%; ++, 10%; +, menos del 10%; -, sin actividad.

Información tomada de Di Conza y Gutkind, 2010; Jové et al., 2014.

Otra región importante de los CGs, son las regiones attC, las cuales difieren considerablemente en su secuencia y su tamaño (Tabla 1), desde unos 51 pb hasta 141 pb, y si bien son heterogéneas entre ellas, muestran características en común. Comparten una región de aproximadamente 25 pb a cada extremo que conforman las secuencias consenso, las que están repetidas e invertidas en forma imperfecta una respecto de otra, y cada una de ellas comprende un par de dominios de unión a la integrasa. Las secuencias más conservadas de los sitios de recombinación attC son heptámeros denominados “sitios core”, los cuales se muestran como secuencias palindrómicas. Uno de ellos, cuya secuencia consenso es GTTAGGC o GTTRRRY (R = purina, Y = pirimidina), está localizado río arriba del CG integrado, y el otro sitio denominado *core* inverso, identificándolo con la secuencia consenso GCCTAAC o RYYYAAC, queda ubicado río abajo del gen (Figura 7). Las diferencias entre ambas regiones aseguran que los CGs se inserten en la orientación que permita su expresión (Di Conza y Gutkind, 2010).

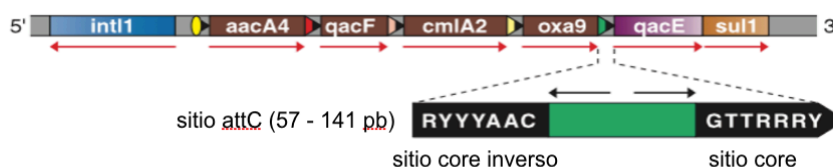


Figura 7. Sitio de recombinación attC (Modificado de Mazel, 2004).

Debido a su capacidad para capturar y asegurar la expresión de múltiples CGs de resistencia, los integrones son contribuyentes dominantes, particularmente en el desarrollo de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos. En *P. aeruginosa*, la mayoría de los integrones pertenecen a la clase 1, en el que los CGs de resistencia a antibióticos son particularmente los más comunes (Kung *et al.*, 2010).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Antecedentes generales.

Según la Sociedad Americana para las Enfermedades Infecciosas, al menos en Estados Unidos, las infecciones adquiridas en el hospital, afectan a más de 2 millones de personas, causando la muerte a 100 mil personas aproximadamente y con un costo estimado entre los 21 y los 34 billones de dólares anualmente (Cornejo y Ramirez, 2010).

En los Estados Unidos de América, *P. aeruginosa* es uno de los patógenos hospitalarios más comunes y es el segundo agente patógeno más común aislado de pacientes con neumonía asociada a la ventilación mecánica. En México, entre 1997 y 2002, la tasa de infecciones nosocomiales creció de 1 a 4.5 casos por cada 100 egresos hospitalarios. Son más frecuentes en niños menores de un año y en adultos mayores, tienen un impacto directo en la mortalidad hospitalaria y el riesgo de morir es dos veces mayor cuando un enfermo adquiere un proceso infeccioso en el hospital (Aguilar *et al.*, 2004; Gellatly y Hancock, 2013).

P. aeruginosa sigue siendo uno de los patógenos más importantes en el medio hospitalario y no sólo es naturalmente resistente a muchos antimicrobianos, sino que también tiene la capacidad distintiva a través de múltiples mecanismos para hacerse resistente a prácticamente todos los antibióticos disponibles comercialmente (Xu *et al.*, 2009).

La producción de β -lactamasas constituye el mecanismo principal de resistencia a β -lactámicos en bacterias gramnegativas. La resistencia a las 7- α -metoxi y oximiinocefalosporinas surgió inicialmente en organismos como *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa*, que sobreprodujeron la β -lactamasa AmpC cromosómica. A finales de los 80's, tanto la resistencia a cefamicinas y a oximiinocefalosporinas surgió entre especies de enterobacterias que carecen de la β -lactamasa AmpC cromosómica inducible, y poco después se comprobó que los genes *ampC* codificados en plásmidos eran responsables de este perfil de resistencia, además, en una cepa con disminución en la permeabilidad de la membrana externa, tales enzimas pueden proporcionar también resistencia a los carbapenémicos, como se ha observado con aislados clínicos de *K. pneumoniae* durante un brote en Nueva

York y en aislados individuales de *E. coli* en Reino Unido y de *K. pneumoniae* en Suecia (Cejas *et al.*, 2012; Philippon *et al.*, 2002).

Las enzimas pAmpC se han descrito en todo el mundo. Se han encontrado en África (Argelia, Túnez), Asia (India, Japón, Pakistán, Corea del Sur), Europa (Francia, Alemania, Grecia, Italia, Suecia, Reino Unido), Medio Oriente (Arabia Saudita), Estados Unidos, América del Sur y Centroamérica (Argentina, Guatemala). Al igual que con las cepas productoras de BLEE como SHV-2 o SHV-5, los viajes y la transferencia de pacientes ha permitido la importación de CMY-2 de Pakistán al Reino Unido y de Argelia a Francia, CMY-4 de la India a Suecia, de FOX-2 de Guatemala a Alemania, de ACC-1 de Túnez a Francia, y de MOX-2 de Grecia a Francia. Las β -lactamasas CMY han sido las más reportadas en todo el mundo en bacterias gramnegativas tanto de origen nosocomial y comunitario, siendo CMY-2 la más prevalente en enterobacterias (Cejas *et al.*, 2012; Philippon *et al.*, 2002; Seral *et al.*, 2012).

Los plásmidos que transportan genes codificantes para este tipo de enzimas pAmpC, a menudo llevan otros genes de resistencia, incluyendo genes de resistencia a aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim. Muchos genes de resistencia, incluyendo las β -lactamasas de clase A, B, y D de Ambler, están localizadas en CGs con el elemento 59-bases, el cual actúa como un sitio de recombinación específica para su incorporación en los integrones. El análisis de las secuencias publicadas indica que los genes de las enzimas de tipo pAmpC no están ligados al elemento 59-bases. Sin embargo, los genes estructurales y reguladores de DHA-1 en el plásmido pSAL-1 están presentes en un integrón que incluye una integrasa sitio-específico, dos copias de los genes *qacE1/sul1*, el gen *aadA2* (resistencia a aminoglucósidos) con su elemento 59-base, y un ORF341 (Figura 8). Verdet *et al.*, identificó una secuencia de 50 pb cerca del gen *bla*_{DHA-1}, la cual es prácticamente idéntica a la que está cercana a los genes *bla*_{FOX-4}, *bla*_{CMY-1}, *bla*_{CMY-8} y *bla*_{MOX-1}. Dicha secuencia podría representar un sitio de recombinación diferente al elemento 59-bases (Philippon *et al.*, 2002).

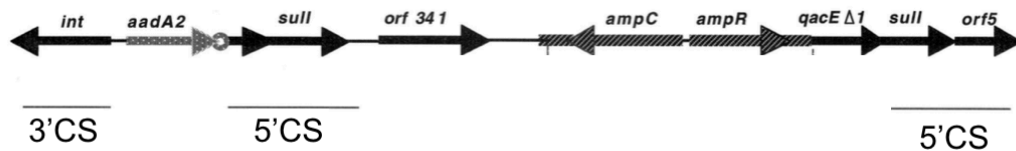


Figura 8. Integrón portador del gen *bla*_{DHA-1} (Modificado de Philippon *et al.*, 2002).

Los integrones son piezas genéticas que se descubrieron a principios de la década de los años 80's (Sabaté y Prats, 2002). Y desde entonces, estas estructuras, se han encontrado en diversas partes del mundo. Según la base de datos INTEGRALL se han reportado más de 1000 estructuras diferentes de integrones clase 1, en donde se pueden observar la gran variabilidad de CGs involucrados en la resistencia antimicrobiana y algunos de función aún desconocida. (<http://integrall.bio.ua.pt>) (Tabla 4).

En Brasil, realizaron una investigación con el propósito de verificar la presencia de integrones en 106 aislados de *P. aeruginosa* y reportaron un frecuencia del 41.5% de integrones de clase 1 y el gen con mayor frecuencia fue *aacA4* con 69.0% (Fonseca *et al.*, 2005). En África se informó que lo genes involucrados en la resistencia de *P. aeruginosa* formaban parte de la estructura de un integrón de clase 1 (Labuschagne *et al.*, 2008). En Malasia se realizó la búsqueda de integrones de clase 1 en 48 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, provenientes de 6 hospitales; los investigadores reportaron que el 68.75% de las cepas fueron multirresistentes y el 19.0% contenían integrones de clase 1, además demostraron que la mayoría de los aislamientos eran genéticamente diversos (Lim *et al.*, 2009). Otro estudio informó un integrón de clase 1 que contenía los genes *bla*_{VIM-2}, *aacA7*, *aacA4*, *aadA1* y *arr6*, en 35 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de un hospital de Túnez (Hammami *et al.*, 2010).

En México, un estudio realizado en el Hospital Civil de Guadalajara y en el Hospital Infantil de Morelia identificaron aislamientos de *P. aeruginosa* con los genes *bla*_{IMP-15} y *bla*_{IMP-18}, los cuales estaban presentes en integrones de clase 1 (In95 e In96) respectivamente (Garza *et al.*, 2008). Otro estudio realizado en México, lograron identificar 3,536 aislamientos de *P. aeruginosa* y se encontró un integrón de clase 1 (In196), el cual era portador del gen *bla*_{VIM-2} (Garza *et al.*, 2009). En 2010 en el Centro Médico Nacional La Raza, en la Ciudad de México, se describió al gen

*bla*_{IMP-18} en un nuevo integrón de clase 1 (asignándole el número In169, por el INTEGRALL) en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos obtenido de un paciente de este centro; (Sánchez *et al.*, 2010).

Tabla 4. Integrones de clase 1 reportados en la base de datos INTEGRALL.

Nº de asignación	Número de acceso (GenBank)	Nº de CGs	CGs	País	Año
In0	U49101	0		Cánada	1992
In1	M95287	4	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>gcuD</i>	Australia	1987
In2	AF071413	1	<i>aadA1a</i>	U.K.	1983
In3	U12441	2	<i>dfrB2</i> , <i>gcuA</i>	Suecia	1988
In4	HM804085	4	<i>aacC1e</i> , <i>gcuE</i> , <i>aadA2</i> , <i>cmlA1</i>	Australia	2011
In5	U38230	1	<i>aacA2</i>	Australia	1994
In6	L06822	2	<i>aacA4</i> , <i>aadA2</i>	Australia	1993
In7	L06418	1	<i>aadB</i>	Australia	1986
In8	AJ009819	2	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA1b</i>	Cánada	1987
In9	X13725.1	2	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>gcuD</i>	Alemania	1989
In10	X12618	3	<i>aadB</i> , <i>aacA2</i> , <i>aadA1b</i>	Alemania	1988
In11	AF355189	2	<i>aacC2-aacA2</i> , <i>bla</i> _{GES-1}	Francia	2002
In21	AF047479	7	<i>aadA3</i> , <i>aacA4/gcuG</i> , <i>gcuH</i> , <i>gcuI</i> , <i>gcuJ</i> , <i>gcu(KLM)</i> , <i>catB2</i>	Cánada	1992
In31	AJ223604	5	<i>bla</i> _{IMP-1} , <i>aadA4</i> , <i>catB6</i> , <i>gcuN</i> , <i>qacG</i>	Italia	1999
In41	AM180753	2	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>aacA4</i>	Italia	2006
In51	AF140629	2	<i>aadA6</i> , <i>gcuDΔ</i>	Francia	1999
In61	EU118148	3	<i>aacA29a</i> , <i>bla</i> _{VIM-17} , <i>aacA29b</i>	Grecia	2009
In71	AM183120	3	<i>bla</i> _{VIM-1b} , <i>aacA4</i> , <i>aphA15</i>	Brasil	2007
In81	AJ969235	4	<i>bla</i> _{VIM-1} , <i>aacA4</i> , <i>aphA15</i> , <i>aadA1b</i>	Italia	ND
In91	GQ139471	4	<i>bla</i> _{GES-5/aacA4} , <i>bla</i> _{OXA-17} , <i>dfrA21</i> , <i>catB3</i>	Brasil	ND
In111	AY260546	5	<i>aacA4'-22</i> , <i>bla</i> _{GES-7} , <i>smr2</i> , <i>dfrA1b</i> , <i>aadA1b</i>	Grecia	2003
In131	EU052800	2	<i>aacA4</i> , <i>aadA1a</i>	Argentina	2007
In141	FJ711659	1	<i>aadA6h</i>	ND	ND
In151	HQ386838	2	<i>catB8</i> , <i>linH</i>	China	2011
In161	HM367310	1	<i>aadB16</i>	España	2011
In171	DQ133163	1	<i>bla</i> _{CARB-1e}	Países Bajos	2006
In181	HQ170512	1	<i>dcyA</i>	Portugal	2012
In191	CP000971	1	<i>dfrA14b</i>	E.U.A.	2008
In201	CQ856538	6	<i>aacA7b</i> , <i>bla</i> _{IMP-15} , <i>qacH6</i> , <i>aadA1b</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA1b</i>	México	2010
In211	EU847537	1	<i>dfrB4</i>	Francia	2008
In221	DQ372710	1	<i>gcu149Δ</i>	Australia	2006

Información tomada de (<http://integrall.bio.ua.pt>)

2.2 Antecedentes específicos.

En el estado de Puebla, particularmente en el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas (CICM), se han realizado estudios relacionados a la resistencia antimicrobiana en cepas de *P. aeruginosa* provenientes de infecciones asociadas a la atención en salud del Centro Médico Nacional (C.M.N.) “20 de Noviembre” de la Ciudad de México y del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla. Del C.M.N. “20 de Noviembre” se obtuvieron 65 cepas de *P. aeruginosa* durante el período del 2007-2009, a las cuales se les realizó el perfil de resistencia, seleccionando 21 cepas de *P. aeruginosa* que presentaron multidrogorresistencia (MDR), aisladas del 2009. Estas cepas fueron aisladas de pacientes que se encontraban en la UCI (54.0%), y fueron obtenidas de secreciones bronquiales (52.0%), principalmente. El 91.4% de las cepas presentaron resistencia a β -lactámicos, de los cuales el 86.0% presentó resistencia a IMP y el 95.0% a MEM, el 93.6% presentó resistencia a aminoglucósidos, el 90.3% a fluoroquinolonas, el 95.0% a cloranfenicol y el 100.0% de las cepas presentaron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol. Mediante PCR se determinó la presencia de diversos genes de resistencia, el 100.0% de las cepas fueron positivas para el gen *bla*_{OXA-50}, el 90.0% para *bla*_{OXA-2}, el 67.0% para *bla*_{GES-1}, el 9.0% para el tandém *bla*_{GES-19}/*bla*_{GES-20}, el 52.0% para *aacC1* y el 57.0% para *aacA4*; también se buscaron los genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SMP}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{PSE-1}, *bla*_{VEB-1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TLA}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{BEL}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{OXA-11}, *bla*_{OXA-13}, *bla*_{OXA-40}, *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, estando ausentes. Además se les realizó la relación genética por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), en donde se mostraron 21 pulsotipos y 4 grupos genéticamente relacionados. Teniendo en cuenta todos estos datos, se procedió a realizar el estudio de integrones de clase 1. Por lo que se escogieron 16 cepas, y mediante PCR se amplificaron las regiones conservadas del integrón de clase 1 (5'-CS y 3'-CS), donde el 100.0% de las cepas presentaron la región 5'CS y solo el 85.7% presentaron ambas regiones (3'-CS y 5'-CS). Inicialmente se trabajaron con 4 cepas en el estudio de integrones. Las cepas Ps36 y Ps52, presentaron el mismo integrón con estructura 5'-3': *intl1*, *aacA42*, *bla*_{GES-19}/*bla*_{GES-20}, *aacA4*, *bla*_{OXA-2}, *aadA1*, *qacE Δ 1*, *sul1*. La cepa Ps39, presentó el integrón con estructura 5'-3': *intl1*, *bla*_{OXA-2}, *aacA4*, *aadA1*, *gcuD*, *qacE Δ 1*, *sul1*, mientras que la cepa Ps84 presentó el integrón con estructura 5'-3': *intl1*, “X”, *aacA4*, *bla*_{OXA-2}, *qacE Δ 1*, *sul1* (“X” indica que no se sabe que gen pudiera estar presente entre los genes *intl1* y *aacA4* ya que no se logró unir los genes, por lo que el estudio de este integrón continua

estudiándose) (Ayala, 2013; Bello, 2015; Juárez, 2016; Martínez, 2011; Valerio, 2012) (Anexo 1).

Por otro lado, se recibieron 75 cepas de *P. aeruginosa*, del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de la Ciudad de Puebla, provenientes de 57 pacientes, recolectadas durante el período de 2013–2015, estas cepas provenían de diversos servicios hospitalarios, predominando el servicio de Medicina Interna (47.0%), y fueron mayormente aislados de vías respiratorias bajas (37.0%), a todas las cepas se les realizó el perfil de resistencia, donde el 50.0% presentó resistencia a piperacilina, el 76.0% a ticarcilina, el 28.0% a piperacilina/tazobactam, el 53.0% a ceftazidima, el 52.0% a cefepime, el 41.0% a aztreonam, el 71.0% a imipenem, el 72.0% a meropenem, el 69.0% a gentamicina y tobramicina, el 66.0% a amikacina y el 73.0% a ciprofloxacina y norfloxacina, obteniéndose 50 cepas resistentes a carbapenémicos. Por el interés que se tiene en el laboratorio de conocer los mecanismos de resistencia que tienen las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, se procedió a realizar PFGE en estas 50 cepas, con el fin de conocer la relación clonal entre ellas, se obtuvieron 50 pulsotipos diferentes y se identificaron 5 grupos estrechamente relacionados. Con estos datos se seleccionaron 44 cepas representativas a las cuales se les determinó, mediante PCR, la presencia de diversos genes de resistencia; donde el 41.0% de las cepas fueron positivas para el gen *bla*_{IMP}, el 47.0% para *bla*_{GES}, el 80.0% para *bla*_{OXA-2}, el 6.0% para *aacC1* y el 47.0% para *aacA4*. Además se buscaron los genes que codifican para las enzimas VIM, GIM, NDM, SPM, KPC, PER, PSE, VEB, OXA-40, sin embargo no se encontraron en estas cepas. De acuerdo a los datos obtenidos, se seleccionaron 3 cepas (PE21, PE52, PE06) para el estudio inicial de integrones, la cepa PE21 presentó dos integrones de clase 1 con estructura 5'-3': *intI1*, *aadA6*, "X", *qacEΔ1*, *sul1* e *intI1*, *aacA7*, *bla*_{IMP-15}, *gcuD*, *qacEΔ1*, *sul1*, mientras que la cepa PE06 presentó un integrón de clase 1 con estructura 5'-3': *intI1*, *aacA4*, "X", *bla*_{OXA-2}, *aadA1*, *qacEΔ1*, *sul1* ("X" indica que no se sabe que gen pudiera estar presente). La cepa PE52 presentó 2 integrones de clase 1 los cuales presentaron la estructura 5'-3': *intI1*, *bla*_{IMP-18}, *aadA1b*, *bla*_{OXA-2}, *qacEΔ1*, *sul1* e *intI1*, *bla*_{IMP-56}, *aadA1b*, *bla*_{OXA-2}, *qacEΔ1*, *sul1*, estos integrones identificados en el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad se designaron con el número de In1215 e In1343, respectivamente en la base de datos del INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt>) (Bello, 2015; Juárez, 2016; López, 2015; Ramos, 2014) (Anexo 2).

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones asociadas a la atención en salud causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente y resistente a carbapenémicos representan un gran reto para el personal clínico y un grave problema de Salud Pública, ya que aumentan la estancia hospitalaria, el uso de antibióticos y los costos de los servicios. Es indiscutible la relevancia clínica de las β -lactamasas de tipo pAmpC, ya que se han reportado involucradas con otros mecanismos de resistencia. Ejemplo: presencia de β -lactamasas de tipo AmpC y mutaciones en porinas, que en conjunto amplían el rango de acción hidrolítica hacia los carbapenémicos, además esta enzimas (principalmente las plasmídicas), se asocian frecuentemente a fracasos terapéuticos, aunado a que en la actualidad no se posee un método estandarizado, para la detección fenotípica de las enzimas AmpC plasmídicas, lo que dificulta la posibilidad de interpretar fenotípicamente si se está en presencia de una AmpC cromosómica o plasmídica, lo que hace considerar a estas enzimas como un problema terapéutico emergente.

Por otra parte el estudio de integrones es importante ya que se ha reportado que existe una alta frecuencia de aislamientos clínicos con esta estructura, la cual se encuentra asociada a la resistencia a antibióticos debido a la amplia versatilidad de arreglos de cassettes génicos en la región variable y además están emergiendo nuevos genes implicados en la resistencia a antibióticos, lo que implica un alto costo el realizar la búsqueda individual de los diversos genes en este tipo de cepas.

El estudiar la diversas formas por las que *P. aeruginosa* es resistente a los antimicrobianos, ayudará a minimizar los posibles resultados falsos negativos en el laboratorio, al poner de manifiesto los genes involucrados y así poder orientar al médico en la toma de decisión del tratamiento.

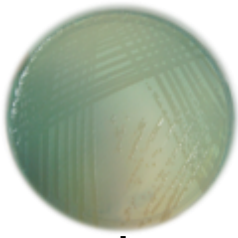
4. OBJETIVO GENERAL

Identificar genes *ampC* plasmídicos y estudiar integrones en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

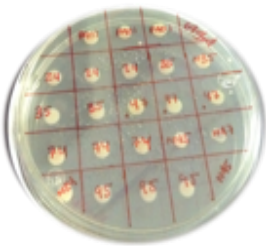
4.1 Objetivos específicos.

1. Identificar genes *ampC* plasmídicos en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.
2. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de algunas cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.
3. Estudiar la estructura de integrones de algunas cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.

5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



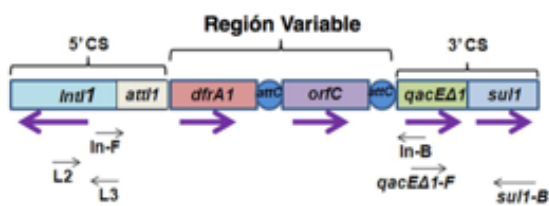
Cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos del cepario del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del CICM-ICUAP



Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos



Amplificación de genes de tipo AmpC (*bla_{CMY}*, *bla_{MOX}*, *bla_{FOX}*)



Estudio de integrones (amplificación y secuenciación de región variable, mapeo por “primer walking”)



Análisis de resultados

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cepas de estudio.

En este trabajo se incluyeron cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos causantes de infecciones asociadas a la atención en salud, provenientes de diferentes servicios hospitalarios y de distintos sitios anatómicos, de dos hospitales de México.

- Se incluyeron 16 cepas obtenidas durante el período del 2009, provenientes del C.M.N. “20 de Noviembre” previamente estudiadas (Anexo 1).
- Se incluyeron 44 cepas obtenidas durante el período del 2013–2015, provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, previamente estudiadas (Anexo 2).

Las cepas se han conservado en crioviales con caldo BHI/Glicerol (10%) (BIOXON®) a -70°C en el cepario del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del CICM-ICUAP. Posteriormente se recuperaron mediante descongelación y sembrado por estría cruzada en placas de agar Agar Soya Tripticasa (TSA) (BIOXON®) incubándose a 37°C por 24 horas.

6.2 Cepas control.

La cepa de *P. aeruginosa* Ps36 fue utilizada como control positivo para la amplificación de diferentes genes de resistencia y de genes característicos de integrones de clase 1.

6.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en placa.

La CMI se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C y se determinó usando el método de dilución en agar, siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2015 (Tabla 5).

Brevemente, de un cultivo puro de la cepa se resuspendió en un tubo con 5mL de Solución Salina Isotónica (SSI) al 0.85% y se ajustó la turbidez con un estándar de 0.5 en la escala de McFarland, la cual equivale a 1.5×10^8 UFC/mL, de este tubo se realizó una dilución 1:10 con SSI, obteniendo un inóculo de 1.5×10^7 UFC/mL, finalmente se depositaron 2µL de esta dilución en placas con agar Mueller Hinton (BD Difco®) suplementadas con el antibiótico a determinar por triplicado (Tabla 6). Una vez inoculadas las placas se esperó a que se secase el inóculo y se incubaron a 37°C de 18

a 24 horas. Por último se observó el crecimiento bacteriano y se identificó la concentración a la cual ya no hubiera crecimiento.

Tabla 5. Puntos de corte para la CMI recomendados por el CLSI (2015) para *P. aeruginosa*

ANTIBIÓTICO	Punto de corte CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
CEFTAZIDIMA (CAZ)	< 8	16	> 32
CEFEPIME (FEP)	< 8	16	> 32
MEROPENEM (MEM)	< 2	4	> 8
IMIPENEM (IMP)	< 2	4	> 8
CIPROFLOXACINA (CIP)	< 1	2	> 4
AMIKACINA (AN)	< 16	32	> 64
GENTAMICINA (GN)	< 4	8	> 16

Tabla 6. Antibióticos y concentraciones a determinar para la CMI en cepas de *P. aeruginosa*

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)											
	512	256	128	64	32	16	8	4				
CEFTAZIDIMA (CAZ)												
CEFEPIME (FEP)												
CIPROFLOXACINA (CIP)												
AMIKACINA (AN)												
GENTAMICINA (GN)												
MEROPENEM (MEM)									2	1	0.5	
IMIPENEM (IMP)									2	1	0.5	

6.4 Extracción de DNA por el método de ebullición.

Para obtener el DNA bacteriano se realizó mediante ebullición, propiciando la ruptura celular y así lograr la liberación del material genético al medio acuoso; para lo cual se sembraron las cepas a evaluar en placas de TSA (BIOXON®) y se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas. A partir de este cultivo se recolectaron colonias y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL el cual contenía 800 μL de SSI estéril (0.85%), esta mezcla se homogenizó en vórtex a alta velocidad y posteriormente se centrifugó a 13,000 r.p.m por 5 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla bacteriana se lavó 3 veces siguiendo el procedimiento anterior, al finalizar los lavados se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 800 μL de agua inyectable estéril, esta última suspensión se sometió a ebullición en baño maría por 10 minutos, después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 r.p.m. por 5 minutos, y el sobrenadante se separó en un tubo eppendorf estéril, se rotuló debidamente y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.5 Cuantificación de DNA.

A todos los lisados obtenidos se les realizó la cuantificación de DNA en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Los lisados que resultaron muy concentrados se diluyeron con agua inyectable estéril siguiendo la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ hasta ajustarlos a una concentración de 250 µg/mL.

6.6 Amplificación de genes en estudio por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la amplificación de los genes en estudio se usó la polimerasa Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific). En la tabla 7, se muestra la concentración y el volumen de los respectivos componentes para la realización de la PCR.

Tabla 7. Componentes utilizados para la amplificación de genes mediante PCR.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN AÑADIDO POR TUBO	CONCENTRACIÓN FINAL DE LA REACCIÓN
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific)	5 U/µL	0.08	0.4U
Buffer de reacción	10X	1	1X
MgCl ₂	25mM	1	1.5 mM
dNTPs	10mM	0.3	0.2mM
Primer delantero	25µM	0.3	0.75mM
Primer reverso	25µM	0.3	0.75mM
DNA		1	
Agua libre de nucleasas		Hasta 10µL	
Volumen final		10µL	

Los oligonucleótidos y condiciones de amplificación para la identificación de genes de tipo AmpC se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR utilizados para amplificar los genes de tipo *ampC*.

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de reacción	Referencia
<i>bla_{CMY}</i>	1146	CMY1-F	ACCTGGGGTAAAGCCGATA	353	95/3min 95/30seg 55/30seg 72/30seg 72/1min 10/∞ 30 ciclos	Este trabajo
		CMY1-R	CCAAACAGACAATGCTGGAGT			
		CMY2-F	GCCGTTATCTACCAGGGAAAA	986	95/3min 95/30seg 57/30seg 72/30seg 72/1min 10/∞ 30 ciclos	
		CMY2-R	TTTTCAAGAATGCGCCAG			

Continuación

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de reacción	Referencia
<i>bla_{MOX}</i> <i>bla_{FOX}</i>	1152	CMY1F	GAGCAGACCCTGTTTCGAGAT	856	95/3min	
	1149	CMY2R	GATTGGCCAGCATGACGATG		95/30seg 53/30seg 72/30seg 72/1min 10/∞ 30 ciclos	

6.7 Estudio de integrones de clase 1 mediante la amplificación de la región variable y mediante la técnica de “primer walking”.

La estructura de los integrones de clase 1 se realizó mediante la amplificación y secuenciación de la región variable, posteriormente al conocer los genes flanqueantes de la región variable, se completó la estructura del integrón mediante la técnica de “primer walking”, la cual consiste en diseñar oligonucleótidos específicos para que los fragmentos obtenidos de los CGs lleguen a solaparse y así obtener la secuencia completa (Levesqué y Roy, 1993; Sáenz *et al.*, 2010). En las tablas 9 y 10, se muestran los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR utilizados para obtener la estructura completa de los integrones de clase 1.

Tabla 9. Oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR utilizados en el estudio de integrones.

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de reacción	Referencia
Región Variable 1	Variable	rv.Int1-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variable	94°C/5min 94°C/1min 55°C/1min 65°C/8min 72°C/8min 10°C/∞ 35 ciclos	Levesqué y Roy, 1993
		rv.Int1-R	AAGCAGACTTGACCTGA			
<i>intl1</i>	1017	Int1-F	ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	564	94°C/5min 94°C/30s 52°C/30s 72°C/2min 72°C/7min 10°C/∞ 30 ciclos	Jianyu <i>et al.</i> , 2005
		Int1-R	GAAAGGTCTGGTCATACATG			
<i>sul1</i>	840	Sul1-F	TGGTGACGGTGTCCGCATTC	790	94°C/5min 94°C/30s 63°C/30s 72°C/1min 72°C/8min 10°C/∞ 30 ciclos	Mazel <i>et al.</i> , 2000
		Sul1-R	CACCTTCTCGAAACCCTCGC			

Continuación

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de reacción	Referencia
<i>qacEΔ1</i>	348	Qac-F	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	247	94°C/5min 94°C/30s 60°C/30s 72°C/1min 72°C/8min 10°C/∞ 30 ciclos	Mazel <i>et al.</i> , 2000
		Qac-R	TGAGCCCCATACCTACAAAGC			
<i>bla_{OXA-2}</i>	828	oxa2-F	TTCAAGCCAAAGGCACGATAG	703	96°C/5min 96°C/1min 61°C/1min 72°C/2min 72°C/10min 10°C/∞ 35 ciclos	Steward, 2012
		oxa2-R	TCCGAGTTGACTGCCGGGTTG			
<i>aacA4</i>	519	aac6-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	481	94°C/5min 94°C/1min 60°C/45s 72°C/45s 72°C/5min 10°C/∞ 20 ciclos	Park <i>et al.</i> , 2006
		aac6-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
<i>aadA1</i> <i>aadA6</i>	768	aadA16F	ATCGAGCGYCATCTGGAAYC	<i>aadA1</i> (866) <i>aadA6</i> (846)	94°C/5min 94°C/30s 63°C/30s 72°C/1min 72°C/8min 10°C/∞ 30 ciclos	Este trabajo
		aadA16R	ATTCAAGCCGACGCCGCTTC			

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en el mapeo de integrones.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)	Referencia
IntFRC	ACCGAAACCTTGCGCTCGT	60.1	Ayala, 2013
sulFRC	GAATGCCGACACCGTCACCA	60.3	Ayala, 2013
qacFRC	CGATAACAAGAAAAGCCAGCC	60.1	Bello, 2015
oxa2FRC	CTAGCGTGCCCTTCTTGCGCAT	70.7	Bello, 2015
oxa2RRC	AATCGTGCGGGCAATCCTTC	70.5	Bello, 2015
oxa2Fint	ATGCGGAATTCTACTGTTTGGG	70.3	Este trabajo
oxa2Rint	ACATCAGCGCTTGGTCAAGGA	70.9	Este trabajo
aac6FRC	GCCACTCATAGAGCATCGCAA	57.5	Bello, 2015
aac6RRC	AAACACGCCAGGCATTGAG	58.5	Ayala, 2013
aadA1FRC	TCGATACTTCGGCGATCACC	56.7	Bello, 2015
aadA1RRC	AGGCGAGATCACCAAGGTAG	56.3	Bello, 2015

6.7.1 Digestión enzimática.

En el caso de las cepas en que se sospechaba la presencia del mismo integrón se realizó digestión enzimática. Para esto se seleccionó una cepa representativa y se secuenció por completo, posteriormente se analizó la secuencia obtenida en la herramienta REBSites (<http://tools.neb.com/REBSites/>), con el fin de conocer la enzima de restricción más adecuada. La enzima que se utilizó fue EcoRI (Thermo Scientific®), y el protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.8 Visualización de productos de PCR.

Los productos obtenidos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% ó dependiendo del tamaño del producto a un mayor porcentaje de agarosa. Se migraron a 100V por 45 minutos. Para conocer la longitud de pares de bases (pb) de las bandas observadas se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®). Posteriormente los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio (0.5 g/L) (Sigma Life Science) durante 30 segundos y lavados durante 5 minutos con agua destilada; finalmente para la visualización de los fragmentos de ADN en los geles, se fotografiaron con un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

6.9 Purificación de los productos de PCR para su secuenciación.

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

6.10 Análisis de secuencias.

Para el análisis de las secuencias se utilizaron diversos programas:

- Para visualizar las secuencias se utilizó el programa: Flinch Tv versión 1.4.0 Geospiza.
- Parar eliminar espacios en las secuencias se utilizó el programa: Nucleic Acid Sequence Massanger: (www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassanger.htm).

- Para realizar el análisis comparativo de las secuencias se utilizó el programa: BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information site: (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).
- Para alinear las secuencias se utilizó el programa: Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).
- Para realizar la conversión de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se utilizó el programa: ExPASy-Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>).
- Para analizar la secuencia de los integrones: www.softberry.com

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de genes tipo *ampC* plasmídicos en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.

En 15 cepas de *P. aeruginosa* que presentaron la carbapenemasa IMP, provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla y en 16 cepas de *P. aeruginosa*, que presentaron multidrogorresistencia (presencia de diversas variantes de GES, OXA, EMA) provenientes del C.M.N. “20 de Noviembre”, de las cuales solo dos cepas (Ps36 y Ps52) portan la carbapenemasa GES-20 (Bello, 2015), se buscaron genes de tipo *ampC* plasmídicos (*bla_{CMY}*, *bla_{FOX}*, *bla_{MOX}*), con la finalidad de buscar otros mecanismos de resistencia presentes en estas cepas que pudieran estar relacionados con la resistencia a β -lactámicos. Se usaron oligonucleótidos para la amplificación de las diversas variantes de las β -lactamasas FOX y MOX, además se diseñaron oligonucleótidos para la β -lactamasa CMY con la finalidad de detectar la presencia de las más de 100 variantes de CMY, pero la amplificación por PCR de estos genes dieron resultados negativos en el 100% de las cepas analizadas.

7.2 Determinación de la CMI en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.

Como parte de un trabajo en general, enfocado en el estudio de los mecanismos de resistencia involucrados en la resistencia antimicrobiana, en las cepas de *P. aeruginosa* provenientes del C.M.N. “20 de Noviembre”, se realizó la determinación de la CMI en 5 cepas faltantes de estos datos, tomando en cuenta la importancia de esta prueba, se evaluaron antibióticos que se usan en el tratamiento para combatir infecciones por *P. aeruginosa*.

Tabla 11. CMI de 5 cepas de *P. aeruginosa* provenientes del C.M.N. “20 de Noviembre”.

CEPA	CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
	CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GN
Ps24	512	256	16	64	64	256	>512
Ps35	256	128	32	64	64	256	>512
Ps47	> 512	256	32	64	32	256	8
Ps74	256	256	1	4	1	8	32
Ps95	512	256	16	32	64	128	>512

Es importante conocer el grado de resistencia a los antibióticos usados en la clínica para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa*, ya que nos ayuda a comprender la relevancia clínica de los mecanismos de resistencia presentes en bacterias que circulan en los hospitales.

7.3 Determinación de la estructura de integrones de clase 1 en algunas cepas de *P. aeruginosa*.

Como se mencionó en el apartado de material y métodos, el estudio de la estructura de los integrones de clase 1 se realizó en dos pasos:

- amplificación y secuenciación de la región variable, y
- mapeo de integrones mediante la técnica de “primer walking”.

7.3.1 Amplificación de la región variable en cepas de *P. aeruginosa* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla.

Se amplificó la región variable en las 44 cepas de *P. aeruginosa* en estudio, utilizando los oligonucleótidos rv.Int1-F y rv.Int1-R descritos por Levesqué y Roy (1993) (Tabla 9); obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 12. Regiones Variables de 44 cepas de *P. aeruginosa* provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla.

CEPA	RV (pb)	CEPA	RV (pb)	CEPA	RV (pb)	CEPA	RV (pb)	CEPA	RV (pb)
PE06	> 3000 ≈ 1500	PE23	> 1500	PE47	< 1000	PE62	≈ 3000 < 2500 > 2000	PE76	> 1500
PE09	> 2000 ≈ 1500	PE24	≈ 1200	PE50	≈ 1500	PE63	> 2000 > 1500	PE83	> 2500 ≈ 2000 > 1200
PE10	> 2000 ≈ 1500	PE26	≈ 3000 > 1500	PE52	> 3000 ≈ 1500	PE64	> 3000 ≈ 2000 ≈ 1500	PE86	> 3000 > 2500 > 1200
PE15	> 2000 ≈ 1500	PE27	> 1500	PE53	> 1500	PE65	> 1500	PE87	≈ 3000 ≈ 1500
PE18	> 1200	PE28	> 2000 < 2000	PE54	≈ 1200	PE66	> 1500	PE89	> 3000 > 2000
PE19	> 1500	PE29	> 2500 > 1200	PE56	≈ 2500	PE67	> 1200	PE90	> 3000 > 2000
PE20	> 1500	PE30	> 1500	PE57	< 1000	PE68	> 3000 > 2500	PE93	> 2000 ≈ 1500
PE21	≈ 3000 > 1500	PE45	> 1500	PE59	> 2500 ≈ 1200	PE73	≈ 3000 ≈ 2000 ≈ 1500	PE96	> 2000 ≈ 1500
PE22	> 1500	PE46	≈ 1200	PE60	> 3000 > 1200	PE74	> 3000 > 2500		

Nota: Se muestra la longitud en pares de bases (pb) de las regiones variables de probable estudio.

En la base de datos del INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt>), se puede observar el número de casetes génicos presentes en los integrones de clase 1, el cual es muy variable. Son de mayor importancia clínica aquellos que contienen más de un casete génico, ya que contienen genes que le confieren resistencia a la bacteria a más de una familia de antibióticos. Es por ello que en el laboratorio se seleccionan para su estudio aquellas bandas que muestran una longitud mayor o igual a 1200 pb, ya que se ha observado que en longitudes de igual o mayor tamaño a 1200pb se encuentra más de un casete génico.

7.3.2 Amplificación de la región variable en cepas de *P. aeruginosa* del C.M.N “20 de Noviembre”.

Como se mencionó en antecedentes específicos, de las 16 cepas de estudio provenientes del C.M.N. “20 de Noviembre”, tres cepas (Ps25, Ps47 y Ps78) presentaron integrones truncados (Bello, 2015) (Figura 9), es decir, no presentaron la región 3´ conservada, mientras que los integrones de las cepas Ps36, Ps39 y Ps52 ya habían sido estudiados anteriormente (Ayala, 2013; Bello, 2015) (Anexo 1). Además la conformación del integrón de la cepa Ps84 quedó inconclusa en un trabajo anterior (Bello, 2015). Tomando en cuenta estos datos, se estudiaron los integrones encontrados en las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps74, Ps81, Ps89, Ps91, Ps94 y Ps95, además se retomó el estudio del integrón de la cepa Ps84, por lo que en esta parte del trabajo se analizaron 10 cepas.

La amplificación de la región variable se realizó con los oligonucleótidos rv.IntI1-F y rv.IntI1-R descritos por Levesqué y Roy (1993) (Tabla 9); obteniendo los siguientes resultados mostrados en la figura 9:

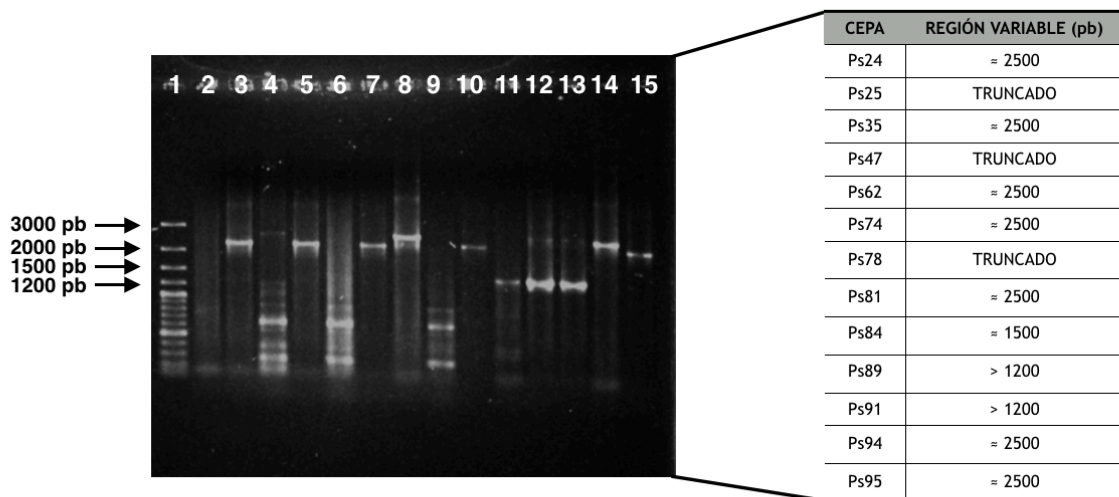


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de la RV de las cepas de *P. aeruginosa* del C.M.N. “20 de Noviembre”. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: blanco, carril 3: Ps24, carril 4: Ps25, carril 5: Ps35, carril 6: Ps47, carril 7: Ps62, carril 8: Ps74, carril 9: Ps78, carril 10: Ps81, carril 11: Ps84, carril 12: Ps89, carril 13: Ps91, carril 14: Ps94, carril 15: Ps95.

En el caso de la cepa Ps84, ya se conocía la conformación parcial de la región variable (Bello, 2015) (Figura 10), por lo que en este trabajo se buscó obtener la conformación completa del integrón de la cepa Ps84 mediante la técnica de “*primer walking*”.

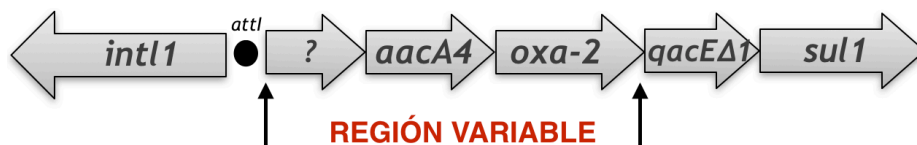


Figura 10. Estructura parcial del integrón encontrado en la cepa Ps84 del C.M.N. “20 de Noviembre” (Bello, 2015).

Las cepas Ps89 y Ps91 presentaron una banda con la misma longitud de pares de bases (Figura 9), presentaron el mismo fenotipo y un similar genotipo de resistencia, asimismo presentaron los mismos niveles de CMI (Tabla 13), por lo que se pensó que las cepas acarrean el mismo integrón. Se seleccionó la cepa Ps89 y se mandó a secuenciar la región variable al IBT-UNAM con los oligonucleótidos rv.Intl1-F y rv.Intl1-R. Al analizar los resultados obtenidos por secuenciación, se obtuvo el 100% de la secuencia nucleotídica de los genes presentes en la región variable analizada, estando presentes

los genes *aadA6* (resistencia a estreptomicina y espectinomicina) y *gcuD* (función desconocida) y se logró identificar los sitios de recombinación (ATTC) de los casetes génicos (Anexo 4). Posteriormente la secuencia de la región variable de la cepa Ps89, se analizó mediante el programa REBsites (<http://tools.neb.com/REBsites/>), con el propósito de conocer los puntos de corte realizados por la enzima EcoRI. Finalmente se purificó la región variable de las cepas Ps89 y Ps91, se amplificó el gen *aadA6*, (dando positiva la amplificación en ambas regiones variables) y se realizó la digestión enzimática con la enzima EcoRI en ambas regiones variables, obteniéndose los cortes esperados (626 pb y 711 pb) (Figura 11), por lo que se sugiere que la cepa Ps91 acarrea el mismo integrón encontrado en la cepa Ps89 (Figura 12). Cabe mencionar que esta estructura ya había sido reportada en la base de datos del INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt>), designado con el número In51.

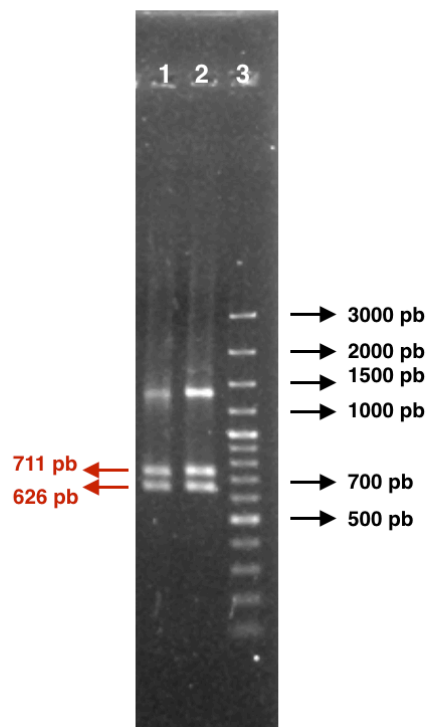


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión enzimática de la RV con EcoRI de las cepas Ps89 y Ps91 del C.M.N. “20 de Noviembre”. Carril 1: Ps89, carril 2: Ps91, carril 3: marcador de peso molecular.

Tabla 13. Datos de las cepas Ps89 y Ps91 de *P. aeruginosa* provenientes del C.M.N. "20 de Noviembre".

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)						Región Variable (pb)	Conformación del integrón 5'-3'	
						CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN			GN
Ps89	UCI	Secreción Bronquial	02-ABRIL-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla_{GES-1}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i> , <i>bla_{OXA-50}</i> , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	512	128	64	64	64	512	>512	1200	<i>intl1</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps91	UCI	Secreción Bronquial	17-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	<i>bla_{GES-1}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i> , <i>bla_{OXA-50}</i> , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i>	512	128	64	64	64	512	>512	1200	<i>intl1</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>

Se muestran en negritas los datos obtenidos en este estudio. **UCI**: Unidad de Cuidados Intensivos, **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 y **STX**: Trimetoprim/Sulfametoxazol. CLSI, 2015.



Figura 12. Estructura del integrón In51 encontrado en las cepas Ps89 y Ps91 del C.M.N. "20 de Noviembre".

Las cepas Ps24, Ps35, Ps62 y Ps95, presentaron una banda con la misma longitud de pares de bases que la encontrada anteriormente (Bello, 2015) en la cepa Ps39. La secuencia de la cepa Ps39 obtenida anteriormente, se analizó mediante el programa REBsites (<http://tools.neb.com/REBsites/>), con el propósito de conocer los puntos de corte realizados por la enzima EcoRI. Se purificó la región variable de las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps95 y Ps39, se realizó la digestión enzimática con la enzima EcoRI en las regiones variables, obteniéndose los cortes esperados (Figura 13), por lo que se sugiere que las cepas Ps24, Ps35, Ps62 y Ps95 acarrean el mismo integrón encontrado en la cepa Ps39 (Figura 14), aunque se obtuvieron otros cortes, este punto será analizado en el apartado de discusión más adelante. Además del análisis de la secuencia obtenida, se logró identificar la presencia del promotor Pc híbrido 1 (TGGACA (-35) y TAAACT (-10)) y de algunos sitios de recombinación de los casetes génicos (Anexo 5). Es importante mencionar que a pesar de acarrean el mismo integrón y poseer similar fenotipo y genotipo de resistencia, difieren entre ellas en los valores de CMI (Tabla 14). El integrón encontrado en estas cepas no se ha reportado en la base de datos del INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt>).

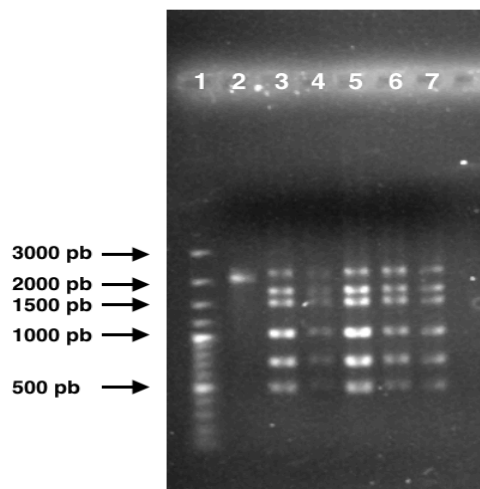


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión enzimática de la RV con EcoRI de las cepas Ps24, Ps35, Ps62 y Ps95 del C.M.N. “20 de Noviembre”. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Ps39 (región variable, sin digestión), carril 3: Ps39 (control positivo), carril 4: Ps25, carril 5: Ps35, carril 6: Ps62, carril 7: Ps95.



Figura 14. Estructura del integrón encontrado en las cepas Ps24, Ps53, Ps62, Ps95 del C.M.N. “20 de Noviembre”.

Tabla 14. Datos de las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps95 y Ps39 de *P. aeruginosa* provenientes del C.M.N. "20 de Noviembre".

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)						Región Variable (pb)	Conformación del integrón 5'-3'	
						CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN			GN
Ps24	UCI	Cultivo de sonda	04-FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	512	256	16	32	64	256	>512	≈2500	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps35	UCI	Cultivo de sonda	19-FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	256	128	32	32	64	256	>512	≈2500	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps62	UCI	Hemocultivo	FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i>	512	64	> 512	64	16	256	> 512	≈2500	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps95	TPQ/NC	Secreción Bronquial	05-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	512	256	16	32	64	128	> 512	≈2500	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps39	UCI	Secreción Bronquial	23-FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i>	256	64	32	64	16	128	512	≈2500	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>

Se muestran en negritas los datos obtenidos en este estudio. **UCI**: Unidad de Cuidados Intensivos, **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 y **STX**: Trimetoprim/Sulfametoxazol. CLSI, 2015.

Las regiones variables obtenidas de las cepas Ps74, Ps81 y Ps94, se mandaron a secuenciar con los oligonucleótidos rv.Int11-F y rv.Int11-R.

Al analizar las secuencias se identificó que los genes que flanqueaban la región variable de la cepa Ps74 son *aacA4* y *aadA1*. Se obtuvo el 40% de la secuencia nucleotídica del gen *aacA4* y el 56% de la secuencia nucleotídica del gen *aadA1*. Mientras que los genes que flanqueaban la región variable de la cepa Ps81 son *bla_{OXA-2}* y *gcuD*. Se obtuvo el 49% de la secuencia nucleotídica del gen *bla_{OXA-2}*, el 10% de la secuencia nucleotídica del gen *aadA6* y el 100% de la secuencia nucleotídica del gen *gcuD*. Finalmente los genes que flanqueaban la región variable de la cepa Ps94 son una proteína hipotética y el gen *gcuD*. Se obtuvo el 97% de la secuencia nucleotídica de la proteína hipotética, el 22% de la secuencia nucleotídica del gen *aacA4*, el 11% de la secuencia nucleotídica del gen *bla_{OXA-2}* y el 100% de la secuencia nucleotídica del gen *gcuD*.

El estudio de estos integrones se continuo mediante la técnica de “*primer walking*”, para obtener la secuencia y conformación completa.

7.3.3 Determinación de la estructura de los integrones de clase 1 mediante la técnica de “*primer walking*”.

Se realizó el mapeo de las regiones variables de las cepas Ps74, Ps81, Ps84 y Ps94, mediante la técnica de “*primer walking*”, utilizando oligonucleótidos respectivos.

En el caso del integrón de la cepa Ps84 (Figura 10), como se menciona en el apartado 7.3.2, se conocía la conformación parcial de la región variable (Bello, 2015), por lo que se realizaron diversas reacciones (Tabla 15) con el fin de obtener la estructura completa del integrón, sin embargo no se logró. Por lo que el estudio de este integrón sigue parcial.

Tabla 15. Combinación de oligonucleótidos utilizados para el mapeo del integrón de la cepa Ps84 del C.M.N. “20 de Noviembre.”

Oligonucleótido 1	Oligonucleótido 2	Tamaño del amplificado esperado (pb)	Oligonucleótido 1	Oligonucleótido 2	Tamaño del amplificado esperado (pb)
Int1-R	oxa2Rint	1875	IntFRC	oxa2Rint	1330
Int1-R	aac6-R	1270	IntFRC	aac6-R	725
Int1-R	oxa2FRC	1370	IntFRC	oxa2FRC	828
Int1-R	oxa2-R	2106	IntFRC	oxa2-R	1561
Int1-R	qacFRC	2147	IntFRC	qacFRC	1602
Int1-R	sulFRC	2489	IntFRC	sulFRC	1944
Int1-R	Sul1-R	3258	IntFRC	Sul1-R	2713
Int1-R	Qac-R	2399	IntFRC	Qac-R	1854

En el caso de los integrones de las cepas Ps74, Ps81 y Ps94, se realizaron diferentes reacciones de acuerdo a la información obtenida por la secuenciación de las regiones variables, se utilizaron oligonucleótidos y en algunos casos se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 9 y Tabla 10) tanto para amplificar como para secuenciar, logrando que los fragmentos obtenidos de los genes casete se solapen y así obtener la secuencia completa de los integrones (Figura 15).

Estas cepas presentaron diferentes estructuras de integrones (Figura 15), las cuales aun no han sido reportadas en la base de datos del INTEGRALL, al igual que la estructura encontrada en las cepas Ps24, Ps35, Ps62 y Ps95.

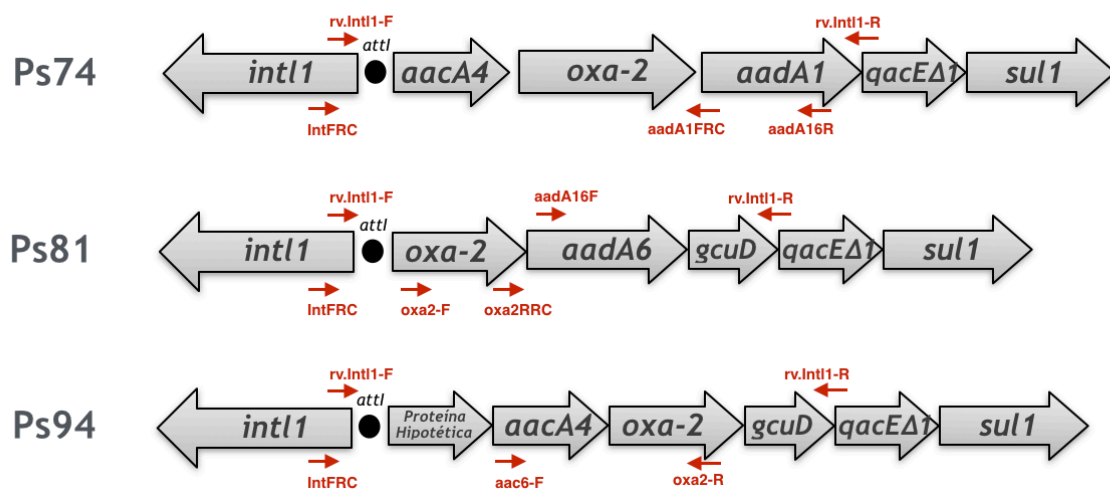


Figura 15. Estructura de los integrones encontrados en las cepas Ps74, Ps81 y Ps94 del C.M.N. “20 de Noviembre”. Las flechas indican el oligonucleótido utilizado para secuenciar.

Tabla 16. Datos de las cepas Ps74, Ps81 y Ps94 de *P. aeruginosa* provenientes del C.M.N. "20 de Noviembre".

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)						Región Variable (pb)	Conformación del integrón 5'-3'	
						CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN			GN
Ps74	UCI	Secreción Bronquial	17-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, ATM, GM, NET, SXT, C.	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i>	256	256	1	4	1	8	32	≈2500	<i>intl1</i> , <i>aacA4</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA1</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps81	TPQ	Secreción Bronquial	12-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacC1</i>	512	128	64	32	256	>512	64	≈2500	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps94	Urología	Urocultivo	30-MARZO	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i>	128	32	> 512	32	128	32	> 512	≈2500	<i>intl1</i> , proteína hipotética, <i>aacA4</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>

Se muestran en negritas los datos obtenidos en este estudio. **UCI**: Unidad de Cuidados Intensivos, **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 y **STX**: Trimetoprim/Sulfametoxazol. CLSI, 2015.

Con la secuencia obtenida de la cepa Ps74, se logró identificar la presencia del promotor Pc Híbrido 1 (TGGACA (-35) y TAAACT (-10)), el sitio de recombinación de la integrasa (*attI1*:TGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAA CAAAGTTAGGAAC), el 42% de la secuencia nucleotídica del gen *aacA4*, el 21% de la secuencia nucleotídica del gen *bla_{OXA-2}* y el 54% de la secuencia nucleotídica del gen *aadA1* (Ver Anexo 6).

Con la secuencia obtenida de la cepa Ps81, se logró identificar la presencia de dos promotores, el promotor Pc Híbrido 1 (TGGACA (-35) y TAAACT (-10)) y del promotor P2 Híbrido 2 (TTGTTA (-35) Y TACAGT (-10)); el sitio de recombinación de la integrasa (*attI1*:TGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAA CAAAGTTGGGC), el 85% de la secuencia nucleotídica del gen *bla_{OXA-2}*, el 87% de la secuencia nucleotídica del gen *aadA6* así como su región *attC* (GTCTAACAAATTCATTCAAGCCGACCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAATTCAGGCG TTAGTA) y el 100% de la secuencia nucleotídica del gen *gcuD* así como su región *attC* (CTCTAACATTTTCGGTCAAGCCGACCCGCATTCTGCGGTTCGGCTTAACTCGCCCG TAGATG) (Ver Anexo 7).

Con la secuencia obtenida de la cepa Ps94, se logró identificar la presencia de dos promotores, el promotor Pc Híbrido 1 (TGGACA (-35) y TAAACT (-10)) y del promotor P2 Híbrido 2 (TTGTTA (-35) Y TACAGT (-10)); el sitio de recombinación de la integrasa (*attI1*:TGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAA CAAA), el 97% de la secuencia nucleotídica de una proteína hipotética, el 100% de la secuencia nucleotídica del gen *aacA4*, el 42% de la secuencia nucleotídica del gen *bla_{OXA-2}* y el 100% de la secuencia nucleotídica del gen *gcuD* así como su región *attC* (CTCTAACATTTTCGGTCAAGCCGACCCGCATTCTGCGGTTCGGCTTACCTCGCCCG TTAGAT) (Ver Anexo 8).

8. DISCUSIÓN.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno intrahospitalario, con alta letalidad. En México se reporta dentro de los cinco primeros lugares en la etiología de infecciones nosocomiales (Morales y Andrade, 2006). La elección del antimicrobiano apropiado es de vital importancia en las infecciones graves causadas por *P. aeruginosa*. Conocer a que antimicrobianos son susceptibles con mayor frecuencia las cepas en cada institución, es fundamental para la elección del tratamiento empírico inicial (Zambrano y Herrera, 2004).

En este estudio se trabajaron con 2 colecciones de cepas de *P. aeruginosa*, los cuales fueron previamente estudiadas como se mencionó en antecedentes específicos. Se trabajaron con cepas que provenían del C.M.N. “20 de Noviembre” y con cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, las cuales provenían en mayor porcentaje de los servicios de Medicina Interna y de Unidad de Cuidados Intensivos, en las cuales, la resistencia antimicrobiana ha emergido como uno de los principales retos a vencer, ya que aquí se presentan los escenarios clínicos necesarios para el desarrollo de patógenos multidrogoresistentes como son, la susceptibilidad de los pacientes a infecciones bacterianas (inmunosuprimidos), el uso de terapia indiscriminada con antibióticos de amplio espectro, así como el fenómeno de presión de selección natural como factor de supervivencia bacteriana (Cornejo y Ramirez, 2010). Las cepas estudiadas fueron recolectadas principalmente de muestras de vías respiratorias como lavado bronquial, expectoración, así como de urocultivo, siendo estos sitios donde frecuentemente se aísla *P. aeruginosa*, sobre todo en infecciones respiratorias crónicas en pacientes con fibrosis quística, además de otras patologías como neumonías, bacteriemias, infección de herida quirúrgica e infecciones de vías urinarias (Fariñas y Martínez-Martínez, 2013).

Para el estudio de detección de enzimas de tipo pAmpC, se trabajaron con las 16 cepas que provenían del C.M.N. “20 de Noviembre”, ya que presentan alta resistencia a carbapenémicos y en estudios anteriores no se encontraron genes que pudieran estar relacionados con dicha resistencia. También se trabajaron con 15 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla que portaban la carbapenemasa IMP, ya que se ha reportado la presencia de esta carbapenemasa en conjunto con pAmpC, además de ser un inductor fuerte en la expresión de las enzimas de tipo AmpC (Jacoby, 2009; Lister *et al.*, 2009; Martínez, 2009). A pesar de que la presencia de estas enzimas es baja, los reportes

han ido en aumento, en 2013, Zhu *et al.*, buscaron la presencia de la β -lactamasa AmpC en plásmidos en una colección de 108 cepas de *P. aeruginosa*. Realizaron la amplificación del gen *ampC* en las 108 cepas, dando positiva la amplificación en 28 cepas. Finalmente identificaron la enzima AmpC tipo CMY-7 y ésta se encontraba en un plásmido. Cabe mencionar que, en las cepas en las que se identificó la β -lactamasa de tipo AmpC se observaron altos niveles de resistencia a diferentes antibióticos, entre ellos a los carbapenémicos. Siendo este el primer informe de la expresión de la enzima CMY-7 mediada por plásmido en *P. aeruginosa* (Zhu *et al.*, 2013). Otro grupo de trabajo en la India analizaron 329 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, y mediante PCR múltiple, detectaron 27 aislamientos que poseen el gen *bla_{CMY}* en un plásmido (Upadhyay *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que las enzimas de tipo pAmpC no se clasifican generalmente como carbapenemasas, ya que la mayoría de estas enzimas tienen actividad débil hacia los carbapenémicos. Por lo tanto, cuando una enzima AmpC se encuentra en una cepa junto con otros mecanismos de resistencia, la resistencia a los carbapenémicos puede aumentar. Sin embargo la enzima CMY-10 parece conferir resistencia a imipenem y esto es debido a una delección de tres aminoácidos que amplía de forma significativa una parte del sitio activo, esta mutación puede considerarse una estrategia molecular operativa de las β -lactamasas de clase C para extender su espectro de sustrato (Jeon *et al.*, 2015, Papp-Wallace *et al.*, 2011). Hasta el momento no ha habido reportes de la presencia de la enzima CMY-10 en *P. aeruginosa*, se ha descrito principalmente en algunas especies de enterobacterias con relevancia clínica y epidemiológica (Jeon *et al.*, 2015).

En un estudio multicéntrico realizado en España, se observó un incremento en la prevalencia de enterobacterias productoras de AmpC plasmídicas en 2007 (1,3%) respecto a 1999 (0,06%), siendo *P. mirabilis* la especie con mayor prevalencia. Desde el punto de vista epidemiológico, las AmpC plasmídicas tienen mucha mayor relevancia o trascendencia que las AmpC cromosómicas, debido a su capacidad para movilizarse, y se pueden transferir tanto en el ambiente nosocomial donde tienen un claro potencial epidémico, como en la comunidad (Calvo *et al.*, 2011). Además de que se han reportado presentes en plásmidos que acarrean consigo estructuras denominadas integrones, se ha observado que esta enzimas están cerca de los integrones de clase 1, pero no como casetes génicos (Collis y Hall, 1995; Toleman *et al.*, 2006). En este estudio, la amplificación mediante PCR de enzimas de tipo AmpC plasmídicas en el 100% de las cepas de *P. aeruginosa*, dieron resultados negativos, por lo tanto será importante el estudio de la

posible presencia de la enzima AmpC cromosómica, así como la presencia de las enzimas que están involucradas en el sistema de expresión y represión de la enzima AmpC. Sobre todo en las cepas que provienen del C.M.N. “20 de Noviembre”, ya que en este estudio y en anteriores no se han encontrado enzimas que expliquen los altos niveles de CMI a β -lactámicos y a carbapenémicos.

Por otra parte, se ha reportado que los integrones de clase 1 son muy prevalentes en aislados de *P. aeruginosa* multirresistentes; en un estudio realizado en China, se encontró que en 118 aislados de *P. aeruginosa* el 45.8% tenían integrones de clase 1 y 19.5% integrones de clase 2, (23/118) (Xu *et al.*, 2009). En Brasil de 106 aislados de *P. aeruginosa*, 44 albergaron integrones de clase 1 (41.5%) (Fonseca *et al.*, 2005). En la actualidad hay más de 1000 integrones reportados, en la base de datos del INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt>), donde podemos observar la diversidad de los casetes génicos que acarrean los integrones de clase 1, los cuales son los más ampliamente distribuidos en el ambiente hospitalario. A las 44 cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla (entre las cuales se ha encontrado que portan diferentes variantes de IMP; López, 2016), se les realizó la amplificación de la región variable de integrones de clase 1, y se obtuvieron longitudes en pares de bases (pb) muy variadas que van desde 500 pb a 3000 pb aproximadamente, posteriormente se tiene programado el estudio de los fragmentos de las regiones variables que tengan una longitud en pares de bases de igual o mayor a 1200pb, ya que en estos fragmentos se encuentran más de un casete génico (Cambray *et al.*, 2010; Gillings, 2014), todo esto con el fin de estudiar a profundidad sobre los casetes génicos que podrían albergar los integrones de clase 1 en estas cepas de *P. aeruginosa*.

En el caso de las cepas provenientes del C.M.N “20 de Noviembre”, como se mencionó en el apartado de resultados, se analizaron 10 cepas: Ps24, Ps35, Ps62, Ps74, Ps81, Ps84, Ps89, Ps91, Ps94 y Ps95. Y finalmente se identificaron 6 estructuras diferentes de integrones de clase 1, de entre las cuales solo una ha sido reportada en la base de datos del INTEGRALL (In51 en las cepas Ps89 y Ps91), y una más parece tener un arreglo atípico (cepa Ps84), por lo que se obtuvieron 4 estructuras nuevas de integrones de clase 1, las cuales presentaron arreglos distintos en la región variable a los ya reportados en la base de datos del INTEGRALL. La importancia de los integrones de clase 1 en la dinámica de la resistencia bacteriana se debe a su íntima relación con genes que generan resistencia, principalmente resistencia a antimicrobianos (Yauri *et al.*, 2016), por lo tanto, es importante la búsqueda y la difusión de este conocimiento en los hospitales, para que puedan tomar las medidas adecuadas.

En este trabajo se retomó el estudio del integrón de clase 1 de la cepa Ps84, sin embargo a pesar de las variadas reacciones que se realizaron, no se logró obtener los amplificadores esperados, por lo que se cree que estamos en presencia de un integrón inusual o atípico, es decir, un integrón con la duplicación del segmento 3'-conservado o un integrón con la integrasa en el mismo sentido que los casetes génicos (Di Conza y Gutkind, 2010; Hall *et al.*, 1994; Ploy *et al.*, 2000; Toleman *et al.*, 2006) (Figura 16). Este tipo de integrones han sido ampliamente reportados en diversos microorganismos como *Salmonella entérica* (Evershed *et al.*, 2009), *E. coli* (Valverde *et al.*, 2006) y plásmido pMAR-12 (Arduino *et al.*, 2002).

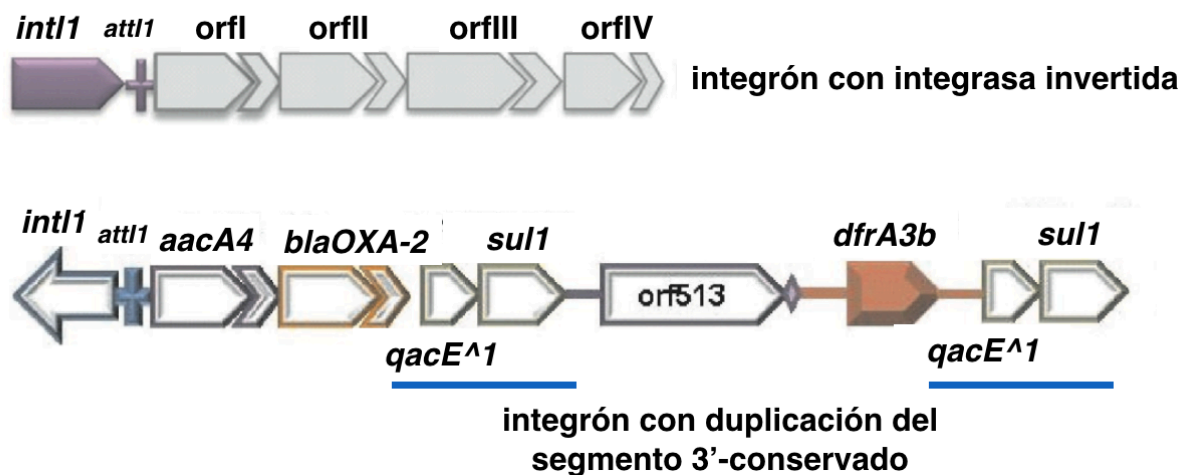


Figura 16. Integrones clase 1 inusuales o atípicos. (Modificado de Di Conza y Gutkind, 2010).

El integrón de las cepas Ps89 y Ps91, se encontró ya reportado en la base de datos del INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt>), designado con el número In51, este integrón fue encontrado por primera vez en la cepa *P. aeruginosa* JES, la cual fue aislada en 1998, en un hospital de Francia, a partir de una infección del tracto urinario de una mujer de 52 años hospitalizada en la sala de ortopedia. Los autores mencionan que el paciente probablemente había importado la cepa desde Tailandia, donde fue hospitalizada previamente y posteriormente demostraron que esta cepa alberga dos integrones (In50 e In51), los cuales parecen provenir de alguna enterobacteria y pudieron haber sido transferidos hacia *P. aeruginosa* JES a través de plásmidos y/o transposones. El integrón In51, llevaba un nuevo determinante de resistencia (*aadA6*) (Naas *et al.*, 1999). En nuestro caso las cepas Ps89 y Ps91 fueron aisladas en el 2009, a partir de una muestra de

secreción bronquial donde el paciente se encontraba en la UCI. El mapeo de la región variable se realizó en la cepa Ps91 y se sugiere la presencia del mismo integrón en la cepa Ps89, mediante digestión enzimática y se obtuvieron los pesos esperados (626 pb y 711 pb) (Figura 12), sin embargo se mantuvo la banda correspondiente a la región variable, aun cuando se aumentó el tiempo y las condiciones de reacción en la digestión enzimática mediada por la enzima EcoRI, por lo que podríamos estar en presencia de un integrón del mismo peso pero con conformación distinta, por lo que se tendría que secuenciar el fragmento que no logro digerirse para saber que estructura tienes esa región variable. La secuencia obtenida se puede ver en el Anexo 4.

El integrón encontrado en las cepas Ps24, Ps35, Ps62 y Ps95, resultó ser el mismo al encontrado anteriormente en nuestro laboratorio en la cepa Ps39 (Bello, 2015), y a pesar de que poseían entre las cepas un perfil de resistencia muy similar, y que la mayoría se aislaron de la UCI, estas cepas presentan entre ellas un patrón diferente en las CMI, cabe mencionar que estas 5 cepas no están relacionadas genéticamente de acuerdo a los datos obtenidos por el dendograma que se realizó en un estudio anterior (Juárez, 2016). De igual manera que en el integrón de las cepas Ps89 y Ps91, al realizar la digestión enzimática de la región variable, se obtuvieron la longitud en pares de bases esperados (569 pb, 780 pb y 1151 pb) (Figura 14), sin embargo se mantuvo la banda correspondiente a la región variable, aun cuando se aumentó el tiempo y las condiciones de reacción en la digestión enzimática mediada por la enzima EcoRI, por lo que podríamos estar en presencia de un integrón del mismo peso pero con conformación distinta. La secuencia obtenida se puede ver en el Anexo 5.

La cepa Ps74, presentó un integrón con tres casetes génicos de resistencia (*aacA4*, *bla_{OXA-2}* y *aadA1*) y, en estudios anteriores (Ayala, 2013; Bello, 2015), fenotípicamente no presentó resistencia a algún carbapenémico, por lo que al realizar la CMI no esperábamos resistencia o sensibilidad intermedia hacia los carbapenémicos, lo que correspondió para el antibiótico meropenem; sin embargo para el antibiótico imipenem, la cepa presentó sensibilidad intermedia, es importante mencionar estos resultados, ya que esta cepa proviene de una colección de cepas que presentan multirresistencia y sobre todo resistencia a carbapenémicos, y a pesar de que fue aislada de la UCI y durante el mismo período (2009) que las demás, presenta un fenotipo de resistencia distinto. El realizar la CMI a esta cepa refleja la importancia de esta prueba, ya que no solo nos permite saber que tan sensible o resistente es la bacteria ante un antibiótico en específico, tomando en cuenta

que las interacciones entre bacterias y antibióticos son importantes para las decisiones terapéuticas (Maciques *et al.*, 2002), sino que también nos sirve como una prueba para conocer aún más las cepas que circulan en cada servicio hospitalario, un ejercicio que nos ayudaría a detectar la probable presencia de mecanismos de resistencia (Cantón, 2010), además estos resultados reflejan la importancia de la vigilancia y el monitoreo en los servicios hospitalarios como la UCI, donde podemos encontrar cepas que requieran una terapia antimicrobiana más agresiva que otras. La secuencia obtenida se puede ver en el Anexo 6.

La cepa Ps81, al igual que la cepa Ps74, presentó tres casetes génicos, solo que en la cepa Ps81, dos de ellos son casetes génicos de resistencia (*bla_{OXA-2}* y *aadA6*), mientras que el otro confiere a un gen de función desconocida (*gcuD*). La presencia del casete génico de función desconocida en los integrones estudiados fue del 66.67% (4/6). Se sabe que la integrasa del integrón de clase 1, tiene la capacidad de capturar casetes de otras clases de integrones cromosómicos, lo que asegura que los diversos casetes génicos del medio ambiente sean accesibles a todos los integrones clase 1 (Oliveira-Pinto *et al.*, 2016). Cuando se considera todo el pool de casetes génicos, los que codifican resistencia a antibióticos corresponden a menos del 10%, siendo la mayoría casetes de función desconocida, de los cuales, el 65.0% no se les conoce homólogos y el 13.0% presenta homología con proteínas de función desconocida, mientras que el porcentaje restante codificaría para un rango de funciones amplias (la mayoría deducida por predicción con proteínas análogas), siendo las más prevalentes factores de virulencia, funciones relacionadas con fagos, sistemas toxina-antitoxina, sistemas de metilación o restricción. En general, estos casetes se han encontrado formando parte de integrones cromosómicos o superintegrones descritos en *Vibrio* spp. y en otras especies ambientales (Di Conza y Gutkind, 2010). Otro estudio metagenómico mostró que hasta un 65.0% de los casetes génicos no tienen homólogos conocidos en las bases de datos de ADN o proteínas, mientras que el 15.0% mostró homología con regiones conservadas denominándolas proteínas hipotéticas, mientras que el 20.0% restante tiene suficiente homología con proteínas caracterizadas que su función podría predecirse (Gillings, 2014). La secuencia obtenida se puede ver en el Anexo 7.

Como se mencionó anteriormente cuatro de las seis estructuras estudiadas presentarán un casete génico de función desconocida, sin embargo la cepa Ps94, además de presentar

este casete génico, también presentó una proteína hipotética la cual al realizar el análisis bioinformático en las diferentes bases de datos disponibles en la red, se encontró que esta proteína está relacionada con una bomba de expulsión de tipo ABC. Con base a un estudio realizado por Cambray *et al.*, existe una creciente evidencia de que los integrones juegan un papel importante, no sólo como principales vectores de resistencia a múltiples antibióticos, sino también como contribuyentes en la adaptación de las bacterias en una variedad de entornos (Cambray *et al.*, 2010; Oliveira-Pinto *et al.*, 2016). La secuencia obtenida se puede ver en el Anexo 8.

Por otra parte se sabe que la expresión de los genes de resistencia está marcadamente influenciada por su posición en el arreglo de casetes. Se ha encontrado que un pequeño número de casetes presentan su propio promotor; el primer caso descubierto fue el casete *cmIA*, que codifica para una proteína de eflujo en la membrana interna (resistencia a cloranfenicol). Estos casetes se transcriben, además, desde el promotor Pc (Di Conza y Gutkind, 2010). En nuestro trabajo se realizó el análisis de las secuencias obtenidas de los integrones y no se encontraron promotores individuales para los casetes génicos, sin embargo se encontraron las regiones promotoras Pc Híbrido 1 (TGGACA (-35) y TAAACT (-10)) y P2 Híbrido 2 (TTGTTA (-35) Y TACAGT (-10)). Como se ha reportado, la región promotora Pc (o alguna de sus variantes) se encuentra dentro de la secuencia que codifica para la integrasa y la región promotora P2 se encuentra cerca de la secuencia del sitio de recombinación de la integrasa (*attI1*) (Jové *et al.*, 2010) (Ver Anexo 5, 6, 7, 8).

En el caso de los integrones de las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps74, Ps81, Ps94 y Ps95, presentaron la variante Pc Híbrido 1 (TGGACA (-35) y TAAACT (-10)), cuya fuerza promotora se ha reportado que es intermedia (Jové *et al.*, 2010), mientras que los integrones de las cepas Ps81 y Ps94, también presentaron el promotor P2, el cual cuando está presente y es activo, su fuerza es mayor que la de todas las variantes de Pc, excepto Pc fuerte (Jové *et al.*, 2010). Sin embargo en las cepas Ps81 y Ps94 se encontró la variante P2 Híbrido 2 (TTGTTA (-35) Y TACAGT (-10)), el cual por tener un espacio de 14 pb entre las regiones -35 y -10, lo hace un promotor inactivo (Tabla 3) (Ver Anexo 7 y 8) (Di Conza y Gutkind, 2010; Jové *et al.*, 2010). Cuando el promotor P2 está activo, frecuentemente está asociado con la variante de Pc débil y, en ese caso, P2 es el principal responsable de la expresión de los genes de resistencia en integrones de clase 1 (Di Conza y Gutkind, 2010). Por lo anterior, se sugiere que la expresión de los CGs es mediada por el promotor Pc Híbrido 1 y por la característica del promotor, los CGs se estarían expresando débilmente.

Los integrones encontrados en este estudio poseen diversos casetes génicos (*bla*_{OXA-2}, *aadA6*, *aadA1*, *aacA4*, *gcuD*, proteína hipotética), portando en su estructura más de un casete génico, predominando los que confieren resistencia a aminoglucósidos, relacionados con las altas CMI a gentamicina (>512 µg/mL) y amikacina (512 µg/mL) que presentaron las cepas. El hecho de que muchos integrones posean más de un casete génico de resistencia, junto con el hecho de que muchos de ellos están localizados en elementos genéticos como transposones o plásmidos llevando otros determinantes de resistencia, como las β-lactamasas de tipo AmpC plasmídicas, hace que la selección a través de uno de estos determinantes de resistencia antimicrobiana seleccione a los demás, un proceso llamado selección en autostop. Los integrones de clase 1 se caracterizan por poseer una gran versatilidad, es decir, por tener la habilidad de reconocer una amplia variedad de secuencias de recombinación, así como una capacidad prácticamente ilimitada de intercambio y reserva de casetes génicos. Esta flexibilidad permite a la bacteria una rápida adaptación al flujo impredecible de los nichos ecológicos (Sabaté y Prats, 2002).

El estudio de mapeo de integrones es substancial y en la actualidad han cobrado gran importancia, no sólo por el amplio espectro de bacterias en las que han sido encontrados, sino también por su frecuente composición con casetes que codifican, a una gran variedad de genes de resistencia (Di Conza y Gutkind, 2010). Aunado a que podemos encontrar algunas variantes de genes que quizás no se logran obtener mediante el uso de oligonucleótidos universales (Bello, 2015) o mediante el análisis de restricción, además el saber qué tipo de casetes génicos están presentes en las cepas nos ayudará a entender aún más el comportamiento que tienen ante la presencia del antibiótico.

9. CONCLUSIONES

- Las 16 cepas provenientes del C.M.N. “20 de Noviembre” y las 15 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla no portan genes de tipo *ampC* plasmídicos (*bla_{CMY}*, *bla_{FOX}*, *bla_{MOX}*).
- De acuerdo a la RV digerida en las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps95 y Ps39 portan el mismo integrón, sin embargo el mapa de restricción nos indica que son portadoras de otro integrón del mismo peso pero con arreglo diferente.
- Las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps95 y Ps39, no están relacionadas genéticamente y difieren ampliamente en la CMI a meropenem, por lo que se sugiere que hay diferentes mecanismos de resistencia involucrados en cada una de las cepas analizadas.
- No se logró determinar la estructura completa del integrón de la cepa Ps84, ya que no se obtuvo la unión de la región 5'CS con la región variable.
- De acuerdo a la RV digerida en las cepas Ps89 y Ps91, portan el mismo integrón, sin embargo el mapa de restricción nos indica que son portadoras de otro integrón del mismo peso pero con arreglo diferente.
- Se encontraron 6 conformaciones distintas de integrones de clase 1
- El 100% de los integrones estudiados posee más de un casete génico de resistencia y tienen al menos un casete génico que confiere resistencia a aminoglucósidos.
- El 83% de los integrones estudiados poseen el casete génico *bla_{OXA-2}*.
- El 66% de los integrones estudiados poseen el casete génico *gcuD*, de función desconocida y cuya presencia va en aumento.
- Solo un integrón presentó una proteína hipotética, siendo relevante el hallazgo de este tipo de casetes génicos, ya que presentan homología con proteínas relacionadas con procesos de supervivencia y/o adaptación bacteriana.

- En los integrones encontrados en las cepas Ps81, Ps74, Ps94, Ps24, Ps35, Ps62 y Ps95, presentaron la región promotora Pc Híbrido 1.

- En el integrón encontrado en las cepa Ps81 y Ps94, también presentaron la región promotora P2 Híbrido 2.

- De acuerdo a la amplificación de la RV en la cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, poseen integrones con más de un casete génico.

10.PERSPECTIVAS

- Realizar la amplificación del gen *ampC* y buscar mutaciones que puedan estar involucradas en la elevada resistencia a β -lactámicos y carbapenémicos.
- Estudiar la RV de las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, mediante "*primer walking*".
- Determinar la CMI en la cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla.
- Continuar con el estudio del integrón de la cepa Ps84, para lograr la unión de la integrasa (región 5'-CS) con la región variable y la región 3'-CS.
- Buscar la duplicación del segmento 3'CS en la cepa Ps84, ya que es característico de integrones atípicos.
- Determinar si los integrones estudiados se encuentran en plásmidos o en cromosoma.
- Determinar la estructura del segundo integrón presente en las cepas Ps89, Ps91, así como el de las cepas Ps24, Ps35, Ps62, Ps95 y Ps39, mediante la secuenciación de la banda que no logró digerirse.
- Completar la secuencia de los integrones encontrados en las cepas Ps81, Ps74 y Ps94, para poder darles un número de asignación en la base de datos INTEGRALL ya que son nuevas conformaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdo Cuza, A. A. (2014). Multirresistencia antimicrobiana en unidades de cuidados intensivos: alerta roja. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*. 13(4): 324-332.
- Alvarez, C. A. (2010). La prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud: un reto en el mejoramiento de la seguridad del paciente. *Infectio*. 14(4): 239-240.
- Aguilar Eloy, M., Garcia-Lopez, B., Hernandez-Tezoquipa, I., & Rosas-Resendiz, M. T. (2004). Las infecciones nosocomiales: registrar para prevenir. *Revista de Enfermería IMSS*. 12(2): 89-92.
- Arduino, S. M., Roy, P. H., Jacoby, G. A., Orman, B. E., Pineiro, S. A., Centrón D. (2002). *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes orf513. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(7): 2303-2306.
- Ayala, A. C. (2013). Tesis de Maestría. 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.
- Bello, L. M. (2015). 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.
- Bennett, P. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. 153(Supl 1): 347-357.
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, C. F., Mirelis, B., Navarro, F., (2001). Procedimientos en microbiología clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2-34.
- Cambray, G., Guerout, A. M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*. 44: 141-146.
- Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32(3-4): 243–259.
- Cejas, D., Canigia Fernandez, L., Quinteros, M., Giovanakis, M., Vay, C., Lascialandare, S., y otros. (2012). Plasmid-Encoded AmpC (pAmpC) in *Enterobacteriaceae*: epidemiology of microorganisms and resistance markers. *Revista Argentina de Microbiología*. 44: 182-186.

- CLSI. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 35(3).
- Collis, C. M., Hall, R. M. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39(1): 155-162.
- Coque Gonzalez, M. T. (2005). Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(5): 251-253.
- Cornejo Avendaño, J. R., & Ramirez Rosales, A. (2010). Resistencia antimicrobiana de bacterias cultivadas en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 32(4): 127-133.
- Díaz Miguel Angel, Buelvas Francisco Alberto, Tovar Catalina. (2009). Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an armory of molecular mechanisms in order to use. *Rev. Med*. 8(2): 1-2.
- Di Conza, J. A., & Gutkind, G. O. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*. 42: 63-78.
- Evershed, N. J., Levings, R. S., Wilson, N. L., Djordjevic, S. P. & Hall R. M. (2009). Unusual class 1 integron-associated gene cassette configuration found in IncA/C plasmids from *Salmonella entérica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(6): 2640-2642.
- 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.
- Fonseca E.L., V.V. Vieira, R. Cipriano, A.C. Vicente. (2005). Class 1 integrons in *P. aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 44(4): 303-309.
- Garza-Ramos, U., Morfin-Otero, R., Sader, H. S., Jones, R. N., Hernández, E., Rodriguez-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): 2943–2946.
- Garza-Ramos, U., Tinoco, P., Rojas, T., Carrillo, B., Barajas, J. M., Suarez, S., Silva, S. J. (2009). Molecular characterization of integrón class 1 (In196) encoding the VIM-2 metallo- β -lactamase of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a hospital. *Environment Chemotherapy*. 21(5): 590-591.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. 67(3): 159–173.

- Gillings R., M. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology Molecular Biology Review*. 78(2): 257-277.
- Hall, R. M., Brown, H. J., Brookes, D. E. & Stokes, H. W. (1994). Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' end. *Journal Bacteriology*. 176: 6286-6294.
- Hammami S., V. Gautier, R. Ghazzi, A. Da Costa, S. Ben-Redjeb, G. Arlet. (2010). Diversity in VIM-encoding class 1 integrons and occasional *bla_{SHV2a}* carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *P. aeruginosa* clone from Tunis. *Clinical Microbiology and Infection*. 16(23): 189-193.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 22(1): 161-82.
- Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park K. S., Karim, A. M., Lee C. R., Jeong B. C. & Lee, S. H. (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 16: 9654-9692.
- Jové, T., Da R. S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M. C. (2010). Inverse Correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet* 6(1): e1000793.
- Juárez, Z. C. (2015). Tesis de Maestría. Estudio de la resistencia, genotipificación y relación clonal de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74(4): 621-641.
- Labarca, L. J., Araos, B. R. (2009). Resistencia antimicrobiana: problema en aumento y soluciones escasas. *Revista Chilena de Infectología*. 26(Supl 1): 8-9.
- Labuschagne C.J., G.F. Weldhagen, M.M. Ehlers, M.G. Paloma. (2008). Emergence of class 1 integron-associated GES-5-like extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44(3): 527-530.
- Lambert, P. A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 95(Supl 41): 22-26.
- 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.

- Lim K., R. Yasin, C. Yeo, S. Puthuchery, G. Balan, N. Maning, Z. Wahab, N. Ismail, E. Tan, A. Mustafa, K. Thong. (2009). Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *P. aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 42(12):197–209.
- 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.
- López G. A. (2016). Tesis de Maestría. Resistencia molecular en *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente. Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Maciques, R. R., Castro, P. B. L., Machado, S. O., Manresa G. D., (2002). Neumonía nosocomial asociada a ventilación. *Revista Cubana de Pediatría*. 74(3): 222-232.
- Martínez R. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 29: 78-83.
- Martínez-Martínez, L. (2006). Mecanismos de adquisición de resistencia a los antibióticos. *JANO*. 1(624): 75-80.
- 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* aisladas de infecciones nosocomiales. Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Martínez-Martínez, L., & Calvo, J. (2010). El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28(Supl 2): 25–31.
- Mazel, Didier. (2004). Integrons and the origin of antibiotic resistance gene cassettes. *ASM News*. 70(11): 520-525.
- Mella M., S., Sepulveda A., M., Gonzalez R., G., Bello T., H., Dominguez Y., M., Zemelman Z., R., y otros. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*. 21(4): 330-338.
- Morales Aguirre, J. J., & Andrade Velasquez, J. K. (2006). Factores asociados a mortalidad y patrones de susceptibilidad antibiótica en bacteriemias por *P. aeruginosa*. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 63: 291-300.
- Naas, T., Poirel, L. y Nordmann, P. (1999). Molecular characterisation of In51, a class 1 integron containing a novel aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette, *aadA6*, in *P. aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1489(1-2): 445-451.

- Nicolau Juan, C., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28(Supl1):19–28.
- Nodarse, H. R. (2002). Visión actualizada de las infecciones intrahospitalarias. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31(3): 201-208.
- Oliveira-Pinto, C., Costa, P. S., Reis, M. P., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. (2016). Diversity of gene cassettes and the abundance of the class 1 integron-integrase gene in sediment polluted by metals. *Extremophiles*.20(3): 283-289.
- Papp-Wallace. K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., Bonomo R. A., (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(11): 4943-4960.
- Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., & Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews*. 33: 757-784.
- Pascual, A., Joyanes, P., Martínez-Martínez, L., Conejo M. C., Hernández, G. Chaves, J. & Perea, E. J. (2001). Actividad de cuatro fluoroquinolonas frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con diferente patrón de sensibilidad a ceftazidima e imipenem. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 19: 432-434.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby. G. A. (2002). Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(1): 1-11.
- Ploy, M. C., Denis, F., Courvalin, P., Lambert, T. (2000). Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 2684-2688.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. *Frontiers in Microbiology*. 2(Supl 1): 1–13.
- 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.
- Sabaté, M., & Prats, G. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 20(7): 341–345.
- Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Torres, C. (2010). Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *E. coli* isolates of food, animal and human origins. *Veterinary Microbiology*, 144(3-4): 493–497.
- Sánchez-Martínez, G., Garza-Ramos, U. J., Reyna-Flores, F. L., Gaytán-Martínez, J., Lorenzo-Bautista, I. G., & Silva-Sanchez, 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): 235–239.

- Santella, G., Pollini, S., Docquier, J., Almuzara, M., Gutkind, G., Rossolini, G. M., y otros. (2011). Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. *Revista Panama de Salud Pública*. 30(6): 545-548.
- Seral, C., Gude, M. J. & Castillo, F. J. (2012). Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Revista Española de Quimioterapia*. 25(2): 89-99.
- Suárez, C. J., Kattán, J. N., Guzmán A. M. & Villegas M. V. (2006). Mecanismo de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*. 10(2): 85-93.
- Toleman, M. A., Bennett, P. M. & Walsh T. R. (2006). ISCR Elements: Novel Gene-capturing systems of the 21st century?. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(2): 296-316.
- Upadhyay, S., Mishra, S., Sen, M. R., Banerjee, T. & Bhattacharjee, A. (2013). Co-existence of *Pseudomonas aeruginosa* in north India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 31(3): 257-260.
- 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.
- Valverde, A., Cantón, R., Galán, J. C., Nordmann, P., Baquero, F. y Coque, T. M. (2006). In117, an unusual In0-Like class 1 integron containing CR1 and *bla*_{CTX-M-2} and associated with a Tn21-Like element. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(2): 799-802.
- Verdet, C., G. Arlet, G. Barnaud, P. H. Lagrange, and A. Philippon. (2000). A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*_(DHA-1) gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44:222–225.
- Xu, Z., Li, L., Shirliff, M. E., Alam, M. J., Yamasaki, S., & Shi, L. (2009). Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Southern China. *Journal Clinical Microbiology*. 47(1): 230-234.
- Yauri, M. F., Alcocer, I. & Rodríguez-Riglos, M. (2016). Caracterización de la región variable de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenems. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. 37(2): 31-38.

- Zambrano F., A., & Herrera A., N. (2004). Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 21(2): 117-124.
- Zhu, B., Zhang, P., Huang, Z., Yan, H. Q., Wu, A. H., Zhang G. W. & Mao Q. (2013). Study on drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid-mediated AmpC β -lactamase. *Molecular Medicine Reports*. 7: 664-668.
- Zilahi, G., Artigas, A. y Martin-Loeches, I. (2016). What's new in multidrug-resistant pathogens in the ICU?, *Annals of Intensive Care*. 6(1): 1-11

ANEXOS

Anexo 1. Características generales de las 16 cepas de *P. aeruginosa* del C.M.N. "20 de Noviembre" de la Ciudad de México.

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)							CONFORMACIÓN DEL INTEGRÓN (5'-3')
						CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GN	
Ps24	UCI	Cultivo de sonda	04-FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	512	256	16	32	64	256	> 512	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps25	UCI	Secreción Bronquial	26-FEBRERO-09	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, AN, NET, CIP, OFX, C, SXT.	<i>bla</i> _{OXA-50}	4	32	> 512	8	256	32	128	Integrón trunco, ausencia de 3'CS
Ps35	UCI	Cultivo de sonda	19-FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	256	128	32	32	64	256	> 512	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps36	UCI	Punta de catéter	17-FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	<i>bla</i> _{GES-19} , <i>bla</i> _{GES-20} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacA42</i> , <i>aadA1</i>	512	256	256	32	128	256	12	<i>intl1</i> , <i>aacA42</i> , <i>bla</i> _{GES-19} , <i>bla</i> _{GES-20} , <i>aacA4</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA1</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps39	UCI	Secreción Bronquial	23-FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i>	256	64	32	64	16	128	512	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps47	UCI	Secreción Bronquial	26-FEBRERO-09	CB, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, AN, NET, OFX, C, SXT.	<i>bla</i> _{OXA-50}	> 512	256	32	64	32	256	8	Integrón trunco, ausencia de 3'CS

Continuación

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)							CONFORMACIÓN DEL INTEGRÓN (5'-3')
						CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GN	
Ps52	UCI	Secreción Bronquial	23-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	512	256	512	32	128	256	256	<i>intI1</i> , <i>aacA42</i> , <i>bla</i> _{GES-19} , <i>bla</i> _{GES-20} , <i>aacA4</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA1</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps62	UCI	Hemocultivo	FEBRERO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i>	512	64	> 512	64	16	256	> 512	<i>intI1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps74	UCI	Secreción Bronquial	17-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, ATM, GM, NET, C, SXT.	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i>	256	256	1	4	1	8	32	<i>intI1</i> , <i>aacA4</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA1</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps78	CCV	Herida	17-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacC1</i>	512	256	512	256	128	64	128	Integrón trunco, ausencia de 3'CS
Ps81	TPQ	Secreción Bronquial	12-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacC1</i>	512	128	64	32	256	>51 2	64	<i>intI1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>

Continuación

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)							CONFORMACIÓN DEL INTEGRÓN (5'-3')
						CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	AN	GN	
Ps84	UCI	Secreción Bronquial	17-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CP, OFX, NOR, SXT, C	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i>	512	256	512	256	32	128	256	<i>intl1</i> , <i>X</i> , <i>aacA4</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps89	UCI	Secreción Bronquial	02-ABRIL-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	512	128	64	64	64	512	> 512	<i>intl1</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps91	UCI	Secreción Bronquial	17-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i>	512	128	64	64	64	512	> 512	<i>intl1</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps94	Urología	Urocultivo	30-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT, C.	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i>	128	32	> 512	32	128	32	> 512	<i>intl1</i> , proteína hipotética, <i>aacA4</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
Ps95	TPQ/NC	Secreción Bronquial	05-MARZO-09	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, IMP, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, SXT.	<i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA6</i>	512	256	16	32	64	128	> 512	<i>intl1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>gcuD</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>

Se muestran los datos de las cepas obtenidas en estudios anteriores y en este estudio (letras en negritas). **UCI**: Unidad de Cuidados Intensivos, **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 y **STX**: Trimetoprim/Sulfametoxazol. CLSI, 2015

Anexo 2. Características generales de las 44 cepas de *P. aeruginosa* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla C.M.N.

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	REGIÓN VARIABLE (pb)
PE06	Urología	Urocultivo	10-MAYO-2013	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{IMP-56} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i>	> 3000 ≈ 1500
PE09	MI	Urocultivo	18-MAYO-2013	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 2000 ≈ 1500
PE10	Hematología	Expectoración	20-MAYO-2013	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 2000 ≈ 1500
PE15	MI	Secreción Bronquial	24-JUNIO-2013	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 2000 ≈ 1500
PE18	MI	Lavado Bronquial	18-JUNIO-2013	PIP, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, C.	<i>bla</i> _{OXA-2}	> 1200
PE19	MI	Hemocultivo	04-SEPTIEMBRE-2013	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i>	> 1500
PE20	MI	Expectoración	19-AGOSTO-2013	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i>	> 1500
PE21	MI	Expectoración	20-AGOSTO-2013	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP-62} , <i>bla</i> _{GES-32} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i>	≈ 3000 > 1500
PE22	MI	Urocultivo	26-AGOSTO-2013	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i>	> 1500
PE23	UCI	Hemocultivo	25-SEPTIEMBRE-2013	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 1500
PE24	MI	Aspirado Bronquial	24-SEPTIEMBRE-2013	TIC, IMP, MEM	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	≈ 1200
PE26	MI	Expectoración	17-SEPTIEMBRE-2013	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{GES-2} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i>	≈ 3000 > 1500
PE27	MI	Expectoración	19-SEPTIEMBRE-2013	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 1500

Continuación

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO*	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	REGIÓN VARIABLE (pb)
PE28	UCI	Expectoración	18-SEPTIEMBRE-2013	TIC, CF, IMP, MEM, C, SXT.	NP	> 2000 < 2000
PE29	Angiología	Secreción de pie derecho	07-OCTUBRE-2013	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 2500 > 1200
PE30	MI	Urocultivo	17-SEPTIEMBRE-2013	TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{GES-2} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aacA4</i>	> 1500
PE45	Urología	Urocultivo	03-DICIEMBRE-2013	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 1500
PE46	MI	Lavado Broncoalveolar	04-DICIEMBRE-2013	TIC, CB, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	≈ 1200
PE47	MI	Lavado Bronquial	09-DICIEMBRE-2013	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	< 1000
PE50	Urología	Urocultivo	29-AGOSTO-2013	PIP, TIC, CB, TIM, CF, CTX, CRO, FEP, IMP, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>aacA4</i>	≈ 1500
PE52	MI	Urocultivo	14-ENERO-2014	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT.	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{IMP-56} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50}	> 3000 ≈ 1500
PE53	UCI	Lavado Bronquial	27-FEBRERO-2014	TIC, ATM, IPM, MEM, C, GM, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 1500
PE54	CE	Urocultivo	28-MAYO-2014	PIP, TIC, TZP, TIM, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	≈ 1200
PE56	MI	Lavado Bronquial	12-MAYO-2014	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, IMP, MEM, C, AN, CIP, NOR.	NP	≈ 2500
PE57	Neurología	Lavado Bronquial	23-ABRIL-2014	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	< 1000
PE59	Urología	Urocultivo	12-MAYO-2014	PIP, TIC, ATM, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>aacA4</i>	> 2500 ≈ 1200
PE60	Urología	Urocultivo	22-ENERO-2015	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES}	> 3000 > 1200
PE62	MI	Lavado Bronquial	31-JULIO-2014	PIP, TIC, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2}	≈ 3000 < 2500 > 2000
PE63	Cirugía	Urocultivo	18-AGOSTO-2014	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 2000 > 1500

Continuación

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO*	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA	REGIÓN VARIABLE (pb)
PE64	MI	Urocultivo	25-JULIO-2014	PIP, TIC, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2}	> 3000 ≈ 2000 ≈ 1500
PE65	UCIN	Hemocultivo	01-JULIO-2014	TIC, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 1500
PE66	UCIN	Hemocultivo	18-AGOSTO-2014	TIC, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 1500
PE67	MI	Catéter	11-JULIO-2014	TIC, IMP, MEM, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{OXA-2}	> 1200
PE68	MI	Tumor cerebro	06-OCTUBRE-2014	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 3000 > 2500
PE73	Urología	Urocultivo	19-DICIEMBRE-2014	PIP, TIC, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2}	≈ 3000 ≈ 2000 ≈ 1500
PE74	Urología	Urocultivo	24-DICIEMBRE-2014	TIC, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{OXA-2}	> 3000 > 2500
PE76	Cirugía	Cirugía abdominal	05-ENERO-2015	PIP, TIC, CAZ, IMP, MEM.	NP	>1500
PE83	Epidemiología	Urocultivo	05-ENERO-2015	TIC, CAZ, FEP, IMP, MEM, GN, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{IMP-62} , <i>bla</i> _{GES-26} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i>	> 2500 ≈ 2000 > 1200
PE86	UCI	Lavado Broncoalveolar	01-JUNIO-2015	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, C, GN, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>aacA4</i>	> 3000 > 2500 > 1200
PE87	Cirugía	Herida traumática (pie izquierdo)	20-MARZO-2015	PIP, TIC, CAZ, IMP, MEM, GN, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	≈ 3000 ≈ 1500
PE89	UCI	Lavado Broncoalveolar	20-ABRIL-2015	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GN, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{OXA-2}	> 3000 > 2000
PE90	MI	Urocultivo	08-ABRIL-2015	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GN, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>aacA4</i>	> 3000 > 2000
PE93	MI	Urocultivo	08-JUNIO-2015	TIC, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GN, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{IMP}	> 2000 ≈ 1500
PE96	Cirugía	Catéter	30-JULIO-2015	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, ATM, IMP, MEM, GN, AN, CIP, NOR.	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-2}	> 2000 ≈ 1500

Se muestran los datos de las cepas obtenidas en estudios anteriores y en este estudio (letras en negritas)).
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, **MI:** Medicina Interna, **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 y **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol. CLSI, 2015.

Anexo 3. Secuencia obtenida de la región variable de la cepa Ps84.

Faltan 469pb para completar el gen *aacA4*

GAGGGGGACGTCCAAGGGCTGGCGCCCTTGGCCGCCCTCATGTCAAACGTTGGG
CATTAAAGGAAAAGTTAATGGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTTCTC
TTGCCACTTTTCGCGCATGCGCAAGAAGGCACGCTAGAACTTCTGACTGGAGGAAGTT
TTTCAGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAACGCCAAGCGGA
TCGTGCCATGTTGGTTTTTATCCTGTGCGATCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATC
GACATTTCAAGATACCTCATACACTTTTTGCACTTGATGCAGGCGCTGTTTCGTGATGAG
TTCCAGATTTTTCGATGGGACGGCGTTAACAGGGGCTTTGCAGGCCACAATCAAGAC
CAAGATTTGCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTTGGGTGTATGAGCTATTTGCAA
AGGAAATTGGTGATGACAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAA

Faltan 400pb para completar el gen *bla_{OXA-2}*

Faltan 82pb para completar el gen *qacE Δ 1*

TTATCGCAATAGTTGGCGAAGTAATCGCAACATCCGCATTAAAATCTAGCGAGGGCTT
TACTAAGCTTGCCCCTTCCGCCGTTGTCATAATCGGTTATGGCATCGCATTTTATTTTC
TTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTTGCTTATGCAGTCTGGTCGGGACT
CGGCGTCGTCATAATTACAGCCATTGCCTGGTTGCTTCATGGGCAAAGCTTGATGC
GTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCTCATAATTGCT

Fragmentos secuenciados:

aacA4 (*attC*): 50pb)

core site: 21pb

bla_{OXA-2}: 428pb

qacE Δ 1: 266pb

Anexo 4. Secuencia obtenida de la RV de las cepas Ps89 y Ps91.

GATGTTATGGAGCAGCAGGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAA**GTTA**
GACATCATGAGTAACGCAGTACCCGCCGAGATTTCCGGTACAGCTATCACTGGCTCTC
AACGCCATCGAGCGTCATCTGGAATCAACGTTGCTGGCCGTGCATTTGTACGGCTCT
GCACTGGACGGTGGCCTGAAGCCATACAGTGATATTGATTTGCTGGTACTGTGGCT
GCACGGCTCGATGAGACTGTCCGACAAGCCCTGGTCGTAGATCTCTTGAAATTTCT
GCCTCCCCTGGCCAAAGTGAAGCTCTCCGCGCCTTGAAGTTACCATCGTCGTGCAT
GGTGATGTTGTCCCTTGGCGTTATCCGGCCAGACGGGAAGTCAATTCGGGGAGTG
GCAGCGTAAGGACATTCTTGCGGGCATCTTCGAGCCCGCCACAACCGATGTTGATCT
GGCTATTCTGCTAACTAAAGTAAGGCAGCATAGCCTTGCATTGGCAGGTTCCGGCCGC
AGAGGATTTCTTTAACCCAGTTCGGGAAGGCGATCTATTCAAGGCATTGAGCGACACT
CTGAAACTATGGAATTCGCAGCCGGATTGGGAAGGCGATGAGCGGAATGTAGTGCTT
ACCTTGTCTCGCATTTGGTACAGCGCAGCAACCGGCAAGATCGCACCGAAGGATATC
GTTGCCAACTGGGCAATGGAGCGTCTGCCAGATCAACATAAGCCCGTACTGCTTGAA
GCCCGGCAGGCTTATCTTGGACAAGGAGAAGATTGCTTGGCCTCACGCGCGGATCA
GTTGGCGGCGTTCGTTCACTTCGTGAAACATGAAGCCACTAAATTGCTTAGTGCCATG
CCAGTGAT**GTCTAACCAATTCATTCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAATT**
CAGGCGTTAGTACCACTGAAACCCTCCTTTATTTCCGCCATGTTTATTCAAACGGCAT
TCAGTTTCTCAAACGCTGTGCAGCGCTGGGTTTGCCGTTTCTCTGGGCTTCGCCTGG
TGCGTTACGCTGGTTTGTGGTCTTTTTGGCCTCTGGCCCTTGTGTAGCAAGCGCGA
GCAGCTATTTTTTCGTAGTGCTGTGCCGCTCGGTGGCACCGTGCCTTTTCGCAGT
TAGCGCCCGTCGCCAAGTTACGGTTATCCGTTTTGGCTTCTGG**CTCTAACATTTCGG**
TCAAGCCGACCCGCATTCTGCGGTCGGCTTAACTCGCCCGTTAGATGCACTAAGCA
C

Tamaño de la región variable: >1200 pb

Fragmentos secuenciados:

5'CS: 53pb

core site del gen aadA6: 7pb

aadA6: 846pb (**attC**: 60pb; **core site inverso**: 7pb)

Región intergénica: 7pb

core site del gen gcuD: 7pb

Región intergénica: 27pb

gcuD: 279pb (**attC**: 60pb; core site inverso: 7pb)

core site del gen gcuD: 7pb

3'CS: 17pb

Anexo 5. Secuencia obtenida de la RV de las cepas Ps24, Ps35, Ps62 y Ps95.

GCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGC
ACGAACCCAGTGGACA TAAGCCTGTTGCGTTCG TAAACT GTAATGCAAGTAGCGTATGCGCT
CACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTT
CATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCG
TTACGCCGTGGGTTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTC
GCCCTAAAACAAGTTGGGCATTAAGGAAAAGTTAATGGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTT
TCTCATTTTTTCTCTTGCCACTTTTCGCGCATGCGCAAGAAGGCACGCTAGAACGTTCTGACT
GGAGGAAGTTTTTCAGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAACGCCAA
GCGGATCGTGCCATGTTGGTTTTTGATCCTGTGCGATCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATC
GACATTCAAGATACCTCATACACTTTTTGCACTTGATGCAGGCGCTGTTTCGTGATGAGTTCCA
GATTTTTCGATGGGACGGCGTTAACAGGGGCTTTGCAGGCCACAATCAAGACCAAGATTTGC
GATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTGGGTGTATGAGCTATTTGCAAAGGAAATTGGTGATG
ACAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCAACGCCGATCCTTCGACAAGTAATG
GCGATTACTGGATAGAAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAGCAAATTGCATTTCTCAGG
AAGCTCTATCGTAACGAGCTGCCCTTCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATCTCATG
ATTGTGGAAGCCGGTTCGCAACTGGATACTGCGTGCAAAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATGG
GTTGGTGGGTAGGATGGGTTGAGTGGCCGACTGGCTCCGTATTCTTCGCACTGAATATTGAT
ACGCCAAACAGAATGGATGATCTTTTCAAGAGGGAGGCAATCGTGCGGGCAATCCTTCGCTC
TATTGAAGCGTTACCGCCAACCCGGCAGTCAACTCGGACGCTGCGCGATAAACC CGCGCA
GCGCCGGTTACTTCAACGTTAAGAGGCTACTCACGCACATCGAGGCCAGCAACCATG
AAATCAAACGTTAGGCATCACAAAGTACAGCATCGTGACCAACAGCAACGATTCCGTC
ACACTGCGCCTCATGACTGAGCATGACCTTGCATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGA
TCTCATATCGTCGAGTGGTGGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCGACACTTGCTGACGT
ACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACTCCATACATTGC
AATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGG
GGACGGATGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTCAC
TGGCGAATGCATCACA ACTGGGCAAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTG
GTTGAGTTGCTGTTCAATGATCCCAGGTCACCAAGATCCAACCGGACCCGTCGCCG
AGCAACTTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAAGCGGGGTTTGAGAGGCAAGGTAC
CGTAACCACCCAGATGGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTCTGA
GCGAACACGCAGTGTTCCTAAATGAGTAACGCAGTACCCGCCGAGATTTCCGTACA
GCTATCACTGGCTCTCAACGCCATCGAGCGTCATCTGGAATCAACGTTGCTGGCCGT
GCATTTGTACGGCTCTGCACTGGACGGTGGCCTGAAGCCATACAGTGATATTGATTT
GCTGGTTACTGTGGCTGCACGGCTCGATGAGACTGTCCGACAAGCCCTGGTCGTAG
ATCTCTTGGAATTTCTGCCTCCCCTGGCCAAAGTGAAGCTCTCCGCGCCTTGGAAG
TTACCATCGTCGTGCATGGTATGTTGTCCCTTGGCGTTATCCGGCCAGACGGGAAC
TGCAATTCGGGGAGTGGCAGCGTAAGGACATTCTTGCGGGCATCTTCGAGCCCGCC
ACAACCGATGTTGATCTGGCTATTCTGCTAACTAAAGTAAGGCAGCATAGCCTTGCA
TGGCAGGTTCCGGCCGAGAGGATTTCTTTAACCCAGTTCCGGAAGGCGATCTATTCA
AGGCATTGAGCGACACTCTGAAACTATGGAATTCGCAGCCGGATTGGGAAGGCGATG
AGCGGAATGTAGTGCTTACCTTGTCTCGCATTGGTACAGCGCAGCAACCGGCAAGA
TCGCACCGAAGGATATCGTTGCCAACTGGGCAATGGAGCGTCTGCCAGATCAACATA
AGCCCGTACTGCTTGAAGCCCGGCAGGCTTATCTTGGACAAGGAGAAGATTGCTTGG
CCTCACG°CGCGGATCAGTTGGCGGCGTTCGTTCACTTCGTGAAACATGAAGCCACT
AAATTGCTTAGTGCCATGCCAGTGATGTCTAACAAATTCATTTGGCCTGCAGGC
GCGGCGCGGCTTAACTTAGTGCCATGCCAGTGATGTCTAACAAATTCATTTGGCCTGCAGGC
AGCAAGGGGCGGGGCATAATTCTGGCGTTAGCACCATTGAAACCATCCGTTATTTGCCCCAA
CATTTTTCAAACGGCATTCAAGTTTCTCAAAGCTCCGGCAGCGTGGGGTACACAGTTTCTTCAG
GATTCCCCGGGTGGAGTTACGGCGGTCACCAGGGCCATGACATCTGTCCGGAGTGTAGCAA
GCGCGAGCGCAGCCCTGTGTAGTGGTTCTGCAGCCCGGAAGTGGCACAGCTCCTCACAGCA
GTTAGTCGAGTCACCAAGTTACCCTATTCTGTTTCTTTCCGCTCTAACATTTTCGTCAAGCTC

GACCCTCATTCTGCGGTCTGGCACAACTCGCCCGTGAG

Tamaño de la región variable: 2500 pb

Fragmentos secuenciados:

Integrasa: 234pb; **Región Promotora Pc Híbrido 1 (-35 y -10)**

Sitio de recombinación (*attI1*): 87pb

Región intergénica: 27pb

bla_{OXA-2}: 828pb (***attC***: 60pb)

Región intergénica: 136pb

aacA4: 519pb

aadA6: 847pb (***sitio core inverso***: 7pb)

Región intergénica: 96pb

gcuD: 291pb (***attC***: 60pb; ***sitio core inverso***: 7pb)

Anexo 6. Secuencia obtenida de la RV de la cepa Ps74.

TGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAACGGA
TGAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTCCGTTTCGTAAACTGTAATGCAAGT
AGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGA...

...TGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAACAAA
GTTAGGAACACAAAGTACAGCATCGTGACCAACAGCACCGATTCCGTCACACTGCCG
CTCATGACTGAGCATGACCTTGCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCG
TCGAGTGGTGGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAG
TACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACTCCATACATTGCAATGCTGAATG
GAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGG... Faltan 300pb para
completar el gen *aacA4*...GATGCCTAAC

Faltan 639pb para completar el gen *bla_{OXA-2}*

TTCTTCGCACTGAATATTGATACGCCAAACAGAATGGATGATCTTTTCAAGAGGGAGG
CAATCGTGCGGGCAATCCTTCGCTCTATTGAAGCGTTACCGCCCAACCCGGCAGTCA
ACTCGGACGCTGCGCGATAAAACCGCGCAGCGCCGGTTACT

Faltan 346pb para completar el gen *aadA1*

ACATTCTTGCAAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATTGACATTGATCTGGCTATCTTGCT
GACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACTCTT
TGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGG
AACTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCG
CATTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAGAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACT
GGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAG
GCTTATCTTGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAA
TTTGTTCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAATGTCTAACAA
TTCGTTCAAGCCGACGCCGCTTTGCGGCGCGGCTTACCTTGCCGTTAGATGCACTA
AGCACAT

Tamaño de la región variable: 2500 pb

Fragmentos secuenciados:

Integrasa: 149pb; **Región Promotora Pc Híbrido 1 (-35 y -10)**

Sitio de recombinación (*attI1*): 62pb

Región intergénica: 51pb

aacA4*:** 219pb (sitio core inverso***: 7pb)

***bla_{OXA-2}*:** (135pb- faltan 693pb iniciales)

Región intergénica: 21pb

***aadA1*:** 446pb

Región intergénica: 1pb

***sitio core inverso del gen aadA1*:** 7pb

Región intergénica: 46pb

3'CS: 20pb

Anexo 7. Secuencia obtenida de la RV de la cepa Ps81.

ATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGG
ATGAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTAAACTGTAATGCAAG
TAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAA
CGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCT
CGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTTCGATGTTTGATGTTATGGAG
CAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTGGGCATTAAGGA
AAAGTTAATGGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTTTCTCTTGCCACTT
TCGCGCATGCGCAAGAAGGCACGCTAGAACGTTCTGACTGGAGGAAGTTTTTCAGCG
AATTTCAAGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAACGCCAAGCGGATCGTGCCA
TGTTGGTTTTTGTATCCTGTGCGATCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATCGACATTCAA
GATACCTCATACACTTTTTGCACTTGATGCAGGCGCTGTTTCGTGATGAGTTCCAGATT
TTTCGATGGGACGGCGTTAACAGGGGCTTTGCAGGCCACAATCAAGACCAAGATTTG
CGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTTGGGTGTATGAGCTATTTGCAAAGGAAATTG
GTGATGACAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCAACGCCGATCCTT
CGACAAGTAATGGCGATTACTGGATAGAAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAG
CAAATTGCATTTCTCAGGAAGCTCTATCGTAACGAGCTGCCCTTTGGGTAGAACATC
AGCGCTTGGTCAAGGATCTCATGATTGTGGAAGCCGGTTCGCAACTGGATACTGCGTG
CAAAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATGGGTGGTGGGTAGGATGGGTTGAGTGGCC
GACTGGCTCCGTATTCTTCGCACTGAA...Faltan 121pb para completar el gen *bla_{OXA-2}*
...CGTTAAACATCATGAGTAACGCAGTACCCGCCGAGATTTCCGGTACAGCTATCACTG
GCTCTCAACGCCATCGAGCGTCATCTGGAATCAACGTTGCTGGCCGTGCATTTGTAC
GGCTCTGCACTGGACGGTGGCCTGAAGCCATACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACT
GTGGCTGCACGGCTCGATGAGACTGTCCGACAAGCCCTGGTCGTAGATCTCTTGAA
ATTTCTGCCTCCCCTGGCCAAAGTGAAGCTCTCCGCGCCTTGGAAGTTACCATCGTC
GTGCATGGTGTGTTGTCCCTTGGCGTTATCCGGCCAGACGGGAAGTCAATTCGGG
GAGTGGCAGCGTAAGGACATTCTTGCGGGCATCTTCGAGCCC GCCACAACCGATGTT
GATCTGGCTATTCTGCTAACTAA...Faltan 108pb para completar el gen
aadA6...AATTCGCAGCCGGATTGGGAAGGCGATGAGCGGCAATGTAGTGCTTACCTT
GTCTCGCATTTGGTACAGCGCAGCAACCGGCAAGATCGCACCGAAGGATATCGTTGC
CAACTGGGCAATGGAGCGTCTGCCAGATCAACATAAGCCCGTACTGCTTGAAGCCCG
GCAGGCTTATCTTGGACAAGGAGAAGATTGCTTGGCCTCACGCGCGGATCAGTTGGC
GGCGTTCGTTCACTTCGTGAAACATGAAGCCACTAAATTGCTTAGTGCCATGCCAGTG
ATGTCTAACCAATTCATTCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAATTCAGGCG
TTAGTACC ACTGAAACCCTCCTTTATTTTCGCCCATGTTTATTCAAACGGCATTCAAGTT
CTCAAACGCTGTGCAGCGCTGGGTTTGCCGTTTCTCTGGGCTTCGCCTGGTGGCGTT
ACGCTGGTTTGTGGTCTTTTTGGCCTCTGGCCCTTGTGTAGCAAGCGCGAGCAGCTA
TTTTTTTCGTAGTGCTGTGCCGCTCGGTGGCACCGTGCCTTTTCGCAGTTAGCGCC
CGTCGCCAAGTTACGGTTATCCGTTTTGGCTTCTGGCTCTAACATTTCCGGTCAAGCC
GACCCGCATTCTCGGGTCGGCTTAACTCGCCCGTAGATGCACTAAGCAC

Tamaño de la región variable: 2500 pb

Fragmentos secuenciados:

Integrasa: 190pb; **Región Promotora Pc Híbrido 1 (-35 y -10)**

Región intergénica: 80pb; **Región Promotora P2 Híbrido 2 (-35 y -10)**

Sitio de recombinación (*attI1*): 62pb

Región intergénica: 15pb

***bla_{OXA-2}*:** 707pb

Región intergénica: 11pb

aadA6*:** 739pb (attC***: 60pb; ***core site inverso***: 7pb)

Región intergénica: 27pb

gcuD: 279pb (**attC**: 60pb; *core site inverso*: 7pb)
Región intergénica: 10pb

Anexo 8. Secuencia obtenida de la RV de la cepa Ps94.

ATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGG
ATGAAGGCACGAACCCAG TGGACA TAAGCCTGTTCCGGTTCGTAAACTGTAATGCAAG
TAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAA
CGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTGTACAGTCTATGCCT
CGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAG
CAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTATGCATTAAGGG
GGAGTCAGTGCTCGAACCAGTAGTTCAGGAGGAAGCCACGGGATGCGGAATCGCGT
CGGTTGCCAACATTCTGGGCAAACGTA CTACAGAGATGAAGGCCGTAGCCAATGCTA
TGGGCATCCATGCTTCGGACAAATCGCTGTGGTCAGATACACAGTATGTCCGGCGTA
TGTTGTCGAGCGCAGGTGTCAAACCTCCGCTGATGAAACCCATTTGAATCTTGGG
AGGCATTGCCAATCTGGCGTTGTTGTCTATCAAGCACCATCAGGAAGAAGGCAAGG
ACTTCTGGCACTGGGTTGTATTCAAGCGCGTGGGAGGTCAACCATTTGTGCTGGATT
CGGCTAGTTACCTGCCATCCAATATCCGTCAGGATTCGACGCCATGCAGCCCAAGT
GGTTCATCGAGGTCGAAAATGCATAACAGGCGCTGTTGTCGCCGCTATCGCGGCTG
GGACGGCTTACGCTTCGCTCCAGCCGCCCAAGCTTATCGTTAGGCATCACAAAGT
ACAGCATCGTGACCAACAGCAACGATTCCGTCACACTGCGCCTCATGACTGAGCATG
ACCTTGCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCGTTCGAGTGGTGGGGCG
GAGAAGAAGCACGCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTT
TAGCGCAAGAGTCCGTCACTCCATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGT
ATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGAAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAAACC
GATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTTACTGGCGAATGCATCACAACCTGGGCAA
GGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGTTGAGTTGCTGTTCAATGATCCCGAG
GTCACCAAGATCCAAACGGACCCGTCGCCGAGCAACTTGCAGCGATCCGATGCTA
CGAGAAAGCGGGGTTTGAGAGGCAAGGTACCGTAACCACCCAGATGGTCCAGCCG
TGACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTCGAGCGAACACGCAGTGATGCCTAA

Faltan 481pb para completar el gen *bla_{OXA-2}*

AAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAGCAAATTGCATTTCTCAGGAAGCTCTATC
GTAACGAGCTGCCCTTTCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATCTCATGATTG
TGGAAGCCGGTCGCAACTGGATACTGCGTGCAAAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATG
GGTTGGTGGTAGGATGGGTTGAGTGGCCGACTGGCTCCGTATTCTTCGCACTGAAT
ATTGATACGCCAAACAGAATGGATGATCTTTCAAGAGGGAGGCAATCGTGCGGGCA
ATCCTTCGCTCTATTGAAGCGTTACCGCCCAACCCGGCAGTCAACTCGGACGCTGCG
CGATAA AACC GCGCAGCGCCGGTTACTTCAACGTTAGT ACCACTGAAACCCTCCTTT
ATTTCCGCCATGTTTATTCAAACGGCATT CAGTTTCTCAAACGCTGTGCAGCGCTGGG
TTTGCCGTTTCTCTGGGCTTCGCCTGGTGGCGTTACGCTGGTTTGTGGTCTTTTTGGC
CTCTGGCCCTTGTTAGCAAGCGCGAGCAGCTATTTTTTTCGTAGTGCTGTGCCGCC
TCGGTGGCACCGTGCTTTTCGCAGTTAGCGCCCGTCGCCAAGTTACGGTTATCCGT
TTTGGCTTCTGGCTCTAACATTTCCGGTCAAGCCGACCCGCATTCTGCGGTCCGGCTTA
CCTCGCCCGTTAGATGCACATAAGCACATAATTGCTCACAGCCAAACTATCAGGTCAAG
TCTGCTTTTATTATTTTATTATTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCCGGTG
TTGCTTATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAATTACAGCCATTGCCTGGT
TGCTTCATGGGCAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCTCATAATTG
CTGCCTTTTGTCTGCCCGATCCCATCGTG

Tamaño de la región variable: 2500 pb

Fragmentos secuenciados:

Integrasa: 149pb; **Región Promotora Pc Híbrido 1 (-35 y -10)**

Región intergénica: 80pb; **Región Promotora P2 Híbrido 2 (-35 y -10)**

Sitio de recombinación (*attI1*): 62pb

Proteína hipotética: 439pb

Región intergénica: 131pb

aacA4: 519pb (**sitio core inverso:** 7pb)

bla_{OXA-2}: 347pb

Sitio de recombinación del gen bla_{OXA-2} (attC: 33pb)

Región intergénica: 27pb

gcuD: 291pb (attC: 60pb; **sitio core inverso:** 7pb)

Región intergénica: 64pb

3'CS: 186pb

ACTIVIDADES CURRICULARES DURANTE EL POSGRADO

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS (Modalidad - Póster)

- 2016** **XXIII. Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología***. Septiembre 2016.
Tema: “Caracterización genotípica de la resistencia en cepas de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos”.
- II. Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas.** Noviembre 2016.
Tema: Presencia de casetes génicos “*gcuD*” en integrones clase 1 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente-resistentes a carbapenémicos (MDR-RC).

ASISTENCIA A CONGRESOS

- 2016** **XXIII. Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología***. Septiembre 2016, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- II. Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas. Noviembre 2016.** Noviembre 2016, Puebla, Puebla, México.
- 2015** **XL. Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica.** Mayo 2015, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

CURSOS

- 2016** **XXIII. Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología***. Septiembre 2016, Rosario, Santa Fe, Argentina.
Tema: “Introducción a la secuenciación del genoma completo”.
- XV Curso de Actualización de Integrones, VI Curso de Transferencia Horizontal Genética y ADN Móvil***. Octubre 2016. Buenos Aires, Argentina.
- 2015** **XL Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica.** Mayo 2015, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. **Tema:** “Infecciones nosocomiales”.

