



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESISTENCIA A LOS
ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*
CAUSANTES DE INFECCIONES NOSOCOMIALES”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

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

PRESENTA:

Q.F.B. MARÍA ELENA BELLO LÓPEZ

ASESOR DE TESIS:

D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

PUEBLA, PUE., MÉXICO

ENERO, 2015

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**.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) con el número de becario 469558.

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

Este trabajo recibió fondos del proyecto "Epidemiología molecular de la resistencia microbiana a los antibióticos β -lactámicos en bacterias Gram negativas y Gram positivas de interés médico y alimentario" **CB-2012-01-178942. Fondo SEP-CONACyT**.

La alumna realizó una estancia la Universidad de la Rioja, Logroño, España, en el marco de la convocatoria de **BECAS MIXTAS 2014 - MZO2015 MOVILIDAD EN EL EXTRANJERO (290842) CONACyT**. Y gracias al apoyo que recibió de la **Dirección del Posgrado en Microbiología**, de la **Dirección del Instituto de Ciencias (ICUAP)** así como de la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Reconocimiento especial a la **Dra. Carmen Torres Manrique** del grupo de investigación de Ecología Molecular de la Resistencia a Antimicrobianos y Seguridad Alimentaria, del Departamento de Agricultura y Alimentación; Área: Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de la Rioja, Logroño, España, por aceptarme para realizar la estancia en su laboratorio y facilitarme los recursos necesarios para los experimentos que se llevaron a cabo en este trabajo.

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

Y al **Dr. Ulises Garza Ramos**, del Departamento de Resistencia Bacteriana, del Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México, por compartir la metodología para el estudio del integron con duplicación.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, por aceptarme una vez más en su equipo de trabajo, por su dedicación y esfuerzo para dirigir este proyecto, por la confianza que depositó en mi y por todo el apoyo que me brindó para poder lograr una de mis más anheladas metas, muchas gracias doctora por siempre alentarme a continuar y espero haber contribuido para seguir estudiando a las misteriosas *Pseudomonas*.

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, porque junto con la doctora Pati fueron determinantes para la realización de este trabajo, por el apoyo que me brindó y por los comentarios y sugerencias para concluir con éxito esta tesis.

Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio** por su experiencia, sus conocimientos y por la atención de compartir su laboratorio. Mi reconocimiento a su grupo de trabajo en especial a la **M.C. Liliana Martínez** por sus consejos.

Al **D.C. Ricardo Carreño López** por su disposición, por compartir su experiencia y por los consejos que me brindó para llevar a cabo este estudio.

A la **D.C. Margarita María de la Paz Arenas** por dedicar su tiempo a la revisión de esta tesis, por sus comentarios y sugerencias.

A la **Dra. Carmen Torres** por permitirme realizar la estancia en su laboratorio y lograr grandes avances para la culminación de mi tesis, por compartir su experiencia, por su sencillez como profesionista y como persona, gracias también a su familia por recibirme con calidez en su casa y su país.

A la **Dra. Yolanda Sáenz** por compartir tus conocimientos acerca de "nuestras queridas *Pseudomonas*", gracias Yoly, por darme ánimo para estudiar los integrones y espero que haya más coincidencias, éxito en todo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres: **María Elena y Juan** por ser los pilares de mi vida, por su amor y su apoyo incondicional, me faltan palabras para agradecerles todo.

A mis hermanos: **Isabel, Martha y Juan** por su cariño, por consentirme tanto y por apoyarme en cada momento, gracias también a **Lupita, Rubén y Gustavo** porque son parte esencial de mi familia.

A mis sobrinos: **Karen, Rubén, Nohemí, Angélica, Diana, Juanito y Alexis** por llenar mi vida.

Infinitas gracias, porque cada logro que consigo también es de ustedes.

A mis amigos: **Dulce, Tatiana, Lucio, Lety, Justo, Misael, Sagrario, Luis** y a sus familias por su amistad sincera, por estar conmigo y por hacerme partícipe de momentos significativos en su vida, siempre es importante saber que se cuenta con personas tan valiosas como ustedes.

A **Abraham y Ángel "Inge"** porque me han enseñado que las metas se logran con perseverancia, esfuerzo y paciencia, y que cada obstáculo que se presente en la vida se puede superar.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: **Gerardo "FF"** por estar conmigo en las buenas y no tan buenas, por ayudarme y por haber compartido conmigo experiencias inolvidables, gracias por tu amistad. **Claus**, gracias por el buen equipo que formamos para estudiar a las temibles *Pseudomonas*. A **Andrea, Aime, Nancy, Caro, Migue, Enrique y Alex** por haber sido excelentes compañeros durante estos dos años, éxito en sus proyectos personales y profesionales.

Al **M.C.B. Sergio Romero Romero** por ayudarme a realizar el modelaje de las proteínas, gracias Sergito por motivarme a estudiarlas más a fondo, por ser un gran ser humano y un ejemplo a seguir.

A **Lilia, Tania, Marycruz, Esme, Ángeles y Arturo** "Los compas", mis compañeros de generación que llegaron a Puebla con su cajita de ilusiones, deseo que todas se les concedan, gracias por los momentos alegres y las parrandas, por enseñarme que no hay que tomarse la vida tan enserio.

A **Paula, Carmencita, Andrea, Rocío, Miriam, Sara, Marina, Vanesa, Dani, Enrique y Filipe** muchas gracias por recibirme con calidez en su país, por su paciencia y su disposición para enseñarme las técnicas en el labo, por los cafecitos de las mañanas, los kalimotxos, los riojanitos, las salidas por la Laurel, las peras, los paseos, etc... también a **Elena y Sergio** por su cordialidad; gracias a todos, son excelentes personas y ya cuentan con una nueva amiga mexicana.

A **Rashmi** por tu espontaneidad y alegría que contagia, **Grazielle** "que chuli", **Hee Song** mi querida peregrina y **Akira** por los momentos divertidos que compartimos junto con los otros estudiantes en la residencia, por las cenas comunitarias y por haber hecho de mi estancia en Logroño una aventura.

A **Hussein Chalhoub** que aunque no tuvimos mucho tiempo para convivir en persona me ofreciste tú amistad, por permitirme conocer tu cultura, por compartir tus conocimientos y por ayudarme a entender las porinas, te deseo mucha suerte en todo.

A mis compañeros del hospital **Leti, Karla, Magali, Alicia, Eliud, Química Lupita Jiménez** y **Químico Romano** por su amistad, por impulsarme a superarme y lograr mis objetivos, y a la **Química Alejandra Carrillo** por despertar en mi el interés por la microbiología.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tratamiento para infecciones causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2 Mecanismos de resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.3 Papel de los Integrones en la diseminación de la resistencia.....	4
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Antecedentes generales.....	6
2.2 Antecedentes específicos.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. OBJETIVO GENERAL.....	12
4.1 Objetivo particular.....	12
4.2 Objetivos específicos.....	12
5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.....	13
6. MATERIAL Y METODOS.....	14
6.1 Cepas de estudio.....	14
6.1.1 Cepas control y cepa receptora para conjugación.....	15
6.2 Métodos de sensibilidad a antibióticos.....	15
6.2.1 Perfil de resistencia por el método de Kirby-Baüer.....	15
6.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria por el método de dilución en agar.....	17
6.2.3 Prueba de detección de Carbapenemasas de Clase A y Metallo- β -lactamasas.....	18
6.3 Métodos de Extracción de DNA.....	18
6.3.1 Extracción de DNA por el método de hervido.....	18
6.3.1 Extracción de DNA usando el Kit Instagen Matrix (Roche).....	19
6.3.3 Cuantificación de DNA.....	19
6.4 Amplificación de genes de resistencia por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	20
6.4.1 Caracterización de Integrones Clase 1 mediante la estrategia de “primer walking” y amplificación de regiones variables.....	24
6.4.2 Visualización de productos de PCR.....	26
6.4.3 Secuenciación de los productos de PCR.....	26
6.4.4 Análisis de las secuencias.....	27
6.5 Experimentos de conjugación.....	28

6.6 Determinación de la secuencia tipo (MLST) de algunas cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
6.7 Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE).....	31
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Identificación los genes que codifican para serín-β-lactamasas, (<i>shv</i> , <i>tem</i> , <i>ctx</i> , <i>per</i> y <i>bel</i>) y algunas variantes de metalo-β-lactamasas (<i>vim</i> , <i>imp</i> y <i>ndm</i>).....	33
7.2 Amplificación de los genes conservados de integrones clase 1 (<i>intl1</i> , <i>qacEΔ1</i> y <i>sul1</i>) en <i>P. aeruginosa</i>	33
7.3 Determinación de la estructura de los integrones de algunas cepas de interés.....	36
7.3.1 Integrones de las cepas no portadoras de carbapenemasas aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre	36
7.3.2 Integrones de las cepas portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre	40
7.3.3 Integrones de las cepas portadoras de la metalo-β-lactamasa IMP-18 aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla.....	42
7.4 Análisis de la transferencia de genes de resistencia mediante conjugación.....	43
7.5 Análisis genético por electroforesis en campos pulsados (PFGE).....	45
7.6 Genotipificación por MLST de algunas cepas de estudio.....	46
7.7 Análisis de los reguladores de Bombas de Expulsión de la cepa Ps52.....	46
7.8 Análisis del gen codificante de la porina <i>OprD</i> de las cepas Ps52 y Ps36.....	47
8. DISCUSIÓN.....	52
9. CONCLUSIONES.....	61
10. PERSPECTIVAS.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Cepas usadas como controles positivos y cepa receptora para conjugación	15
2	Puntos de corte del CLSI, 2013 para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
3	Puntos de corte de CMI para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de acuerdo al CLSI, 2013	17
4	Antibióticos probados en la determinación de CMI	18
5	Componentes para la enzima Máxima Hot Start Taq DNA Polimerase (ThermoScientific)	20
6	Componentes para la enzima BIOTAQ™ DNA Polimerasa (Bioline)	21
7	Componentes para la enzima KAPA Taq HotStart DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS)	21
8	Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los diferentes genes de resistencia	22
9	Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los Reguladores de Bombas de Expulsión y la porina OprD	23
10	Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de reacción de PCR empleados para el estudio de integrones	25
11	Secuencia nucleotídica de los cebadores para el estudio de integrones por "primer walking"	26
12	Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los genes "housekeeping" para MLST	29
13	Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para secuenciar los genes "housekeeping" para MLST	30
14	Datos obtenidos de las cepas Ps09, Ps22, Ps39, Ps84 no portadoras de carbapenemasas aisladas del Hospital C.M.N. 20 de Noviembre	38
15	Datos obtenidos de las cepas Ps52 y Ps36 portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre	41
16	Datos obtenidos de las cepas E06 y E52 aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla	42
17	Cepas probables transconjugantes de la cepa Ps52	44
18	Datos de las cepas Ps52, PU21 y TC _{3A} -Ps52	44
19	Perfil alélico y secuencia tipo de las cepas portadoras de carbapenemasas	46
20	Datos obtenidos de las cepas Ps52 y Ps36	48
21	Resumen de las características de las cepas de estudio y sus mecanismos de resistencia	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Representación esquemática de un integrón de clase 1 y un modelo para la adquisición del gen casete	5
2	Amplificación de genes característicos de integrones clase 1 para las diversas cepas de estudio	34
3	Porcentaje de cepas que amplificaron para los genes característicos de los integrones clase 1	34
4	Prueba fenotípica para detección de metalo- β -lactamasas y carbapenemasas clase A	36
5	Esquema de los integrones encontrados en las cepas Ps09, Ps22, Ps39, Ps84 no portadoras de carbapenemasas aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre	39
6	Amplificación de la región variable tipo 1 del integrón de las cepas Ps52 y Ps36 portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre	41
7	Esquema del integrón encontrado en las cepas Ps52 y Ps36 portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre	42
8	Esquema de los integrones encontrados en las cepas E06 y E52 aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla	43
9	Resultado de la Electroforesis en Campos Pulsados de las cepas de estudio	45
10	Modelado de la proteína de la porina OprD de las cepas PAO1, Ps36 y Ps52	49
11	Modelo de comparación de las porinas estudiadas	49

ABREVIATURAS

AN	Amikacina
ATM	Aztreonam
APB	Ácido 3-aminofenilborónico
BET	Bromuro de Etidio
BLEE	β -Lactamasa de Espectro Extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CB	Carbenicilina
CF	Cefalotina
CIP	Ciprofloxacino
CL	Colistin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
C.M.N.	Centro Médico Nacional
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMA	Enzima modificadora de aminoglucósidos
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
IPM	Imipenem
MEM	Meropenem
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MLST	Multilocus sequence typing
mM	Milimolar
NET	Netilmicina
NOR	Norfloxacina
OFX	Ofloxacina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PIP	Piperacilina
pM	Picomol o Picomolar
Rpm	Revoluciones por minuto
SXT	Trimetoprim/Sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TIC	Ticarcilina
TIM	Ticarcilina/Ácido clavulánico
TZP	Piperacilina/Tazobactam
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad Formadora de Colonia
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los principales patógenos nosocomiales y cuenta con diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos como son la adquisición y diseminación de genes de resistencia a través de plásmidos e integrones y la presencia de mutaciones en algunos genes clave. El objetivo de este trabajo fué estudiar molecularmente algunos de éstos mecanismos, para lo cual se seleccionaron 27 cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* de pacientes con infección nosocomial del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" de la Cd. de México, durante el periodo 2007-2009, el 96% de las cepas fueron resistentes a los 22 antibióticos de diferentes familias que se probaron en estudios anteriores, el 19% mostró resistencia a colistina, antimicrobiano de último recurso terapéutico. El 59% portó genes de resistencia tales como *ges-1*, 7% *ges-11*, 4% *oxa-1*, 70% *oxa-2*, 100% *oxa-50*, 59% *aac-(3')-IIa*, 48% *acc-(6')-Ib* y estuvieron ausentes los genes *imp-1*, *vim-1*, *gim-1*, *spm-1*, *pse-1*, *veb-1*, *kpc-2*, *oxa-10*, *oxa-11*, *oxa-13*, *oxa-40*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*. En este trabajo se buscaron mediante PCR genes que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos: *ctx-m*, *shv*, *tem*, *per*, *bel*, algunas variantes de *imp*, *vim*, y *ndm*, de los que no se obtuvo amplificado; también se buscaron los genes conservados de los integrones clase 1, resultando que el 93% presento *intI1*, 89% *qacEΔ1* y *sul1*. Se estudiaron los integrones de ocho cepas: las cepas Ps09 y Ps39 se les determinó su relación genética por PFGE y contienen el mismo integrón, mientras que las cepas Ps22 y Ps84 portan integrones diferentes y se observó que no están relacionadas genéticamente. Las cepas Ps52 y Ps36 que había sido parcialmente estudiada resultaron ser la cepa ST309 y portan el mismo integrón con estructura: 5'-3': *intI1*, *aac-(6')-33*, *ges/ges*, *aacA4*, *oxa-2*, *addA1*, *qacEΔ1*, *sul1* y la cepa Ps36 también porta el integrón *intI1*, *aac-(6')-33*, *ges-11*, *drfA1*, *qacEΔ1*, *sul1* (Ayala, 2013) que se continuarán estudiando ya que no han sido reportados. Los experimentos de conjugación de las cepas Ps52 y Ps36 fueron negativos. La cepa Ps52 presentó CMI para meropenem de 512μg/mL y la cepa Ps36 de 256μg/mL, los demás antibióticos fueron iguales. En el análisis de los reguladores de bombas de expulsión, la cepa Ps52 presentó dos *mexR*: (Val126Glu), *nfxB*: (Silvestre) en comparación de los cuatro que presentó la cepa Ps36 (Ayala, 2013). El gen de la porina *oprD* de la cepa Ps52 se secuenció parcialmente y se completó en la cepa Ps36 ambas presentaron cambios aminoácídicos en los diferentes *loops*, específicamente los *loops* 2 y 3 implicados con la resistencia a imipenem y tienen el llamado *loop* 7-corto que afecta la sensibilidad a meropenem, además de que la cepa Ps52 presentó nueve cambios aminoácídicos más que la cepa Ps36 que afectan el *loop* 6. Se estudiaron dos cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, las cuales portaban el gen *imp-18*, la cepa E06 fué ST308 y su integrón está parcialmente secuenciado; la cepa E52 fué ST385 y el integrón está completamente secuenciado. Ambas estructuras no han sido reportadas. En este trabajo se evidencia la diversidad de mecanismos de resistencia que presentan las cepas de *P. aeruginosa*, siendo un organismo difícil de erradicar en el ambiente hospitalario, por lo tanto este tipo de estudios de epidemiología molecular se deben llevar a cabo para conocer el tipo de bacterias circulantes en cada hospital y contribuir con las estadísticas mundiales.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, integrones, reguladores de bombas de expulsión, porina OprD.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social, además de constituir un desafío para las instituciones de salud y del personal médico responsable en las unidades donde se llegan a presentar. Son de gran importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad, se suma el incremento de los días de hospitalización y los costos de atención, así como de años de vida saludables perdidos por muerte prematura o vividos con discapacidades (RHOVE, 2012)(Tapia, 1999).

Actualmente el término de infección nosocomial se ha redefinido y ahora este tipo de infecciones se denominan Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), y son consideradas por el CDC desde el punto de vista epidemiológico como: todo cuadro clínico, localizado o sistémico, que es el resultado de una reacción adversa debida a la presencia de uno o varios agentes infecciosos o sus toxinas, sin evidencia de que estuviese presente o en fase de incubación en el momento del ingreso hospitalario (Horan *et al.*, 2008).

Los agentes etiológicos de las infecciones nosocomiales incluyen bacterias, virus, hongos y parásitos, en ese orden de frecuencia. Los agentes bacterianos más comúnmente aislados y que a su vez son los más estudiados, son principalmente el denominado grupo "ESCAPE" bacterias de origen nosocomial multirresistentes causantes de un gran problema de salud pública, por la dificultad para su tratamiento, dentro de este grupo se encuentran *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y las Enterobacterias (Peterson, 2009).

Pseudomonas aeruginosa es un importante agente causal de este tipo de infecciones, adquiridas principalmente en unidades de cuidados críticos que pueden ser particularmente severas en pacientes inmunocomprometidos provocando cuadros de neumonía asociada a ventilación mecánica, bacteriemia,

infecciones de tracto urinario, piel y tejidos blandos, además de que también puede ser aislada en superficies, material quirúrgico, catéteres, sondas, soluciones desinfectantes y jabones (Livermore, 2002; Meletis, *et al.*, 2012) siendo un microorganismo difícil de erradicar, ya que es capaz de adaptarse y sobrevivir en cualquier ambiente.

1.1 Tratamiento para infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

El tratamiento para este tipo de infecciones incluye diversos antibióticos, entre los que se encuentran carboxipenicilinas como carbencilina y ticarcilina, ureidopenicilinas como piperacilina, cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima), carbapenémicos (imipenem, meropenem), monobactams (aztreonam), aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, tobramicina) y quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino). Debido a la resistencia que se ha visto que presenta este microorganismo se ha recurrido al uso de viejos antibióticos como una alternativa para el tratamiento, uno de ellos es colistina, que es una combinación de las Polimixinas B y E, que actualmente es utilizada como último recurso para tratar infecciones causadas por bacterias multirresistentes (Döring *et al.*, 2000; Page *et al.*, 2009).

1.2 Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es uno de los microorganismos más difíciles de tratar debido a que presenta diferentes mecanismos de resistencia, (Henrichfreise *et al.*, 2007) dentro de los que se encuentran: la permeabilidad de la membrana externa, la sobreexpresión de la β -lactamasa cromosómica AmpC así como de los diversos sistemas de expulsión pertenecientes a la familia RND de los que hasta la fecha se han descrito cuatro MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ, y MexXY-OprM, que están bien caracterizados y se sabe que contribuyen a la resistencia cruzada a los antimicrobianos piperacilina, ticarcilina, ceftazidima, cefepime, meropenem, quinolonas y aminoglucósidos. (Evans *et al.*, 1998; Tulkens, 2000).

La pérdida ó modificación de la porina OprD es el mecanismo más común de resistencia a carbapenémicos y se asocia con la resistencia a imipenem y

reducción de la susceptibilidad a meropenem pero también se ha visto que permite la entrada de aminoácidos básicos y dipéptidos que contienen un residuo básico (Li *et al.*, 2012). La estructura monomérica de esta porina consta de 16 láminas β antiparalelas que forman un cilindro con cortos giros en la cara periplásmica (que presentan de 2 a 9 residuos) y ocho largos *loops* en la cara externa de la célula siendo el *loop* 3 el más largo de todos y el que se pliega dentro del poro formando la constricción (Ochs *et al.*, 2000).

Otro mecanismo puede deberse a la presencia de Enzimas Modificadoras de Aminoglucósidos (EMA) como los son las adeniltransferasas, fosfotrasferasas y acetiltransferasas (Vakulenko *et al.*, 2003) Las EMA frecuentemente encontradas en *P. aeruginosa* son: AAC-(6')-II (resistencia a la gentamicina, netilmicina y tobramicina), AAC(3)-I (resistencia a la gentamicina), AAC(3)-II (resistencia a la gentamicina, netilmicina y tobramicina), AAC(6')-I (resistencia a la tobramicina, netilmicina y amikacina) y ANT(2')-I (resistencia a la gentamicina y tobramicina) (Miller *et al.*, 1997).

Específicamente para resistencia a quinolonas se encuentran las proteínas Qnr que pertenecen a los pentapéptidos repetidos, que se definen por la repetición en tándem de cinco aminoácidos, según los siguientes motivos semiconservativos: (Ser, Thr, Ala o Val)-(Asp o Asn)-(Leu o Phe)-(Ser, Thr o Arg)-(Gly) se cree que producen la inhibición de la DNA girasa mediante la competencia con el DNA por la unión a esta enzima, reduciendo así las oportunidades de unión de la quinolona a su diana que es el complejo girasa-DNA (Rodríguez *et al.*, 2008), de igual manera se pueden presentar mutaciones en los genes que codifican para la DNA girasa (*gyrA*) y topoisomerasa IV (*parcC*) las cuales juegan un papel importante en la resistencia a fluoroquinolonas como ciprofloxacino, norfloxacino y ofloxacino (Nakano *et al.*, 1997).

Finalmente otro mecanismo importante es la presencia de carbapenemasas, β -lactamasas clase B ó metalo- β -lactamasas y de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que pueden ser transferidas por medio de plásmidos, transposones e integrones y tienen alto impacto clínico sobre el

tratamiento antimicrobiano en hospitales alrededor del mundo (Weldhagen *et al.*, 2003) además, la reciente aparición de BLEE con actividad carbapenemasa tales como KPC y GES sumado a la detección simultanea de MBL en la misma cepa añade más complejidad y preocupación a los patrones de resistencia de este microorganismo (Naas *et al.*, 2008; Villegas *et al.*, 2007).

1.3 Papel de los Integrones en la diseminación de la resistencia

Los integrones son elementos genéticos que han despertado gran interés debido a que son un sistema natural de captura y plataforma de montaje de genes de resistencia a los antimicrobianos, son considerados pieza clave en la difusión y propagación de genes de resistencia y la rápida evolución de la resistencia a una amplia gama de antibióticos. No son móviles por sí mismos, pero con frecuencia se hallan en transposones ó en plásmidos, por lo que su movilidad horizontal está asegurada, como se constata por su amplia difusión entre las distintas bacterias (Sabaté y Prats, 2002)(Guangchao y Li, 2013). Los integrones se han clasificado en 9 clases según la secuencia de su integrasa (identidad de aminoácidos 40-60%) (Partridge *et al.*, 2000). Los de clase 1, 2 y 3 presentan casetes de resistencia a antibióticos, los de las clases 4, 5, 6 y 7 contienen casetes que no codifican para la resistencia a los antibióticos, el integrón de la clase 8 no presenta ningún casete, el de la clase 9 contiene un sólo casete de resistencia a antibióticos (Carattoli, 2001; Clark *et al.*, 2000; Henwood, 2001).

Los de clase 1 son los más comunes y se caracterizan por la presencia de dos segmentos conservados, el extremo 5'- conservado (5'-CS) que contiene el gen *int1*, el sitio de recombinación *attI* y el promotor. El extremo 3'-conservado (3'-CS) que contiene los genes *qacEΔ1* que confiere resistencia a amonios cuaternarios y *sul1* que confiere resistencia a sulfonamidas, estos 2 genes, no son casetes(Carattoli, 2001; Mazel, 2006; Sabaté y Prats, 2002) (Figura 1)

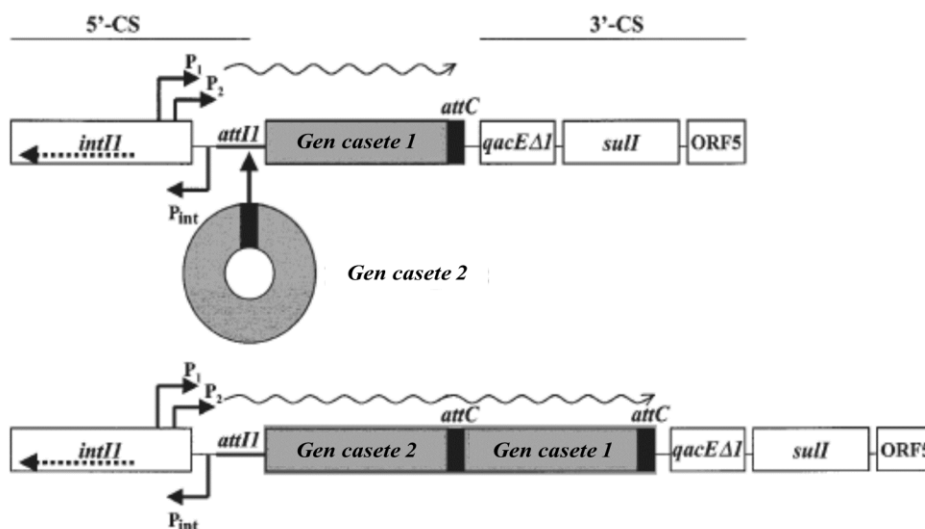


Figura 1. Representación esquemática de un integrón de clase 1 y un modelo para la adquisición del gen casete. Los genes casete de resistencia son insertados dentro del integrón como se indica en los cuadros grises, attI1 y attC son sitios de recombinación. P₁ y P₂ son promotores asociados integrón. P_{int} es el promotor del gen de la integrasa (*intI1*). Los genes *qacEΔ1* y *sulI* en el 3'-CS confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfonamidas, respectivamente (Modificado de Caratolli, 2001).

Los integrones clase 2 también se ha descrito y se dice proceden de la familia del Tn7, el cual tiene en el extremo 5-CS una integrasa defectuosa *intI2*, homóloga en un 50% con *intI1* y adyacentes a esta se encuentran tres genes casete integrados (*dhfrI- sat- aadA1*) (Recchia y Hall, 1995).

Los integrones clase 3 contienen el gen *intI3* que muestra una identidad del 60.9% con el gen de *intI1*; se describió por primera vez un integron de esta clase portando el gen *imp* y *aacA4*, y el segundo informe se asoció con el gen *ges-1* en la cepa de *Klebsiella pneumoniae* FFUL 22K, hasta la fecha los integrones clase 3 han sido descritos en *Acinetobacter spp.*, *Alcaligenes*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Salmonella spp* y *Serratia marcescens*. (Arakawa et al., 1995; Yu et al., 2013).

2. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes generales

La emergencia en todo el mundo de cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos en los hospitales y la comunidad sigue siendo un problema de preocupación científica, especialmente las infecciones causadas por especies de *Pseudomonas*, en particular *P. aeruginosa*, el cual es un patógeno oportunista con resistencia inherente a muchos antibióticos y desinfectantes incluyendo penicilinas, ceftazidima, carbapenemas, aminoglucósidos y ciprofloxacino (Dundar *et al.*, 2010) Y que además es capaz de obtener material genético, sobre todo genes de resistencia, provenientes de otros géneros bacterianos (Livermore, 2002).

Alrededor del mundo ha habido un número creciente de β -lactamasas que se han reportado en *P. aeruginosa*, sobre todo de algunas que únicamente se habían descrito en Enterobacterias, como es el caso de las BLEE tipos CTX-M, SHV, TEM y otras como PER, BEL, VIM, IMP que inicialmente se describieron en *Pseudomonas* y que ahora son portadas por diferentes géneros bacterianos. (Bonnet, 2003; Weldhagen *et al.*, 2003).

La primera β -lactamasas tipo TEM-1, se describió en una cepa clínica de *Escherichia coli*, en 1965. Actualmente existen 221 variantes de este gen reportadas las cuales se encuentran en la página www.lahey.org. TEM-2 fue la primera reportada en *P. aeruginosa* (Lowbury *et al.*, 1969) y confiere resistencia a cefalosporinas de espectro ampliado tales como cefotaxima y ceftazidima, y aztreonam pero normalmente no confiere resistencia a las cefamicinas y carbapenemas. TEM-42 ha sido la segunda reportada en este microorganismo únicamente encontrada en una cepa en París (Mugnier *et al.*, 1996).

Las β -lactamasas SHV se encuentran localizadas en el cromosoma de *K. pneumoniae* pero también se ha visto que están asociadas con el transposon

Tn1721 y son ampliamente distribuidas entre las Enterobacterias. La variante SHV-2a fue reportada en el cromosoma de *P. aeruginosa* presumiblemente acarreada por una secuencia de inserción o transposon presente en el plásmido pMPA2a de *K. pneumoniae*. (Thierry *et al.*, 1999; Jeannot *et al.*, 2013). Mientras que las variantes SHV-12 y SHV-5 se han reportado en cepas de Tailandia y Corea (Chanawong, 2001).

BLEE CTX-M se describió por primera vez en Japón en 1986 (Matsumoto, *et al.*, 1988) y su difusión entre las especies bacterianas y en diversas partes del mundo durante la última década es de creciente preocupación. CTX-M probablemente se originó a partir de especies de *Kluyvera* y estas enzimas se encuentran principalmente en los miembros de la familia Enterobacteriaceae, asociada con el elemento de inserción ISEcp1 e integrones lo que puede facilitar su propagación. El primer reporte de una cepa clínica de *P. aeruginosa* portadora de CTX-M fue por primera vez en Holanda en 2004 y hasta el momento en *P. aeruginosa* se han descrito las variantes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-43 en hospitales de Bolivia y Brasil (Naiemi *et al.*, 2006; Picão *et al.*, 2009). Existe un reporte llevado a cabo por Qing y colaboradores en China donde estudiaron 51 aislados de ellos 9 (17.6%) fueron identificados como productores de BLEE, encontrando las variantes CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-14. En este mismo estudio se encontraron 35 (82.9%) cepas productoras de PER-1 que se obtuvieron de dos hospitales entre enero y abril de 2008 y pertenecían al mismo patrón PFGE cuyos fenotipos de resistencia y la presencia de β -lactamasas eran similares, lo que sugiere que en ese momento había un brote causado por esa clona (Qing *et al.*, 2014).

Las enzimas PER (*Pseudomonas Extended Resistance*) son BLEE y pertenecen a la clase A. Estas enzimas comparten baja homología de secuencia (25-27%) con TEM, SHV o enzimas CTX-M. BLEE tipo PER se encuentran entre las más eficientes β -lactamasas contra las cefalosporinas de amplio espectro y existen hasta el momento 8 variantes de este gen (www.lahey.org) (Rodríguez-

Noriega *et al.*, 2014). Fue detectada por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* y *Acinetobacter spp.* en Turquía (Bauernfeind, Stemplinger, Jungwirth, Mangold, *et al.*, 1996). PER-2 se detectó en un aislamiento de *Salmonella entérica* e incluso en *Vibrio cholerae* (Petroni *et al.*, 2002).

BEL (Belgium extended β -lactamase) fue aislada de *P. aeruginosa* en mayo de 2004 en Heilig Hartziekenhuis, Roeselare, Bélgica, acarreada por un integron clase 1 identificado como In120 que también contenía otros genes de resistencia (*aacA4*, *aadA5*, and *smr2*) y este formaba parte del transposon Tn1404 (Poirel y Nordmann, 2005) y presentaba un porcentaje de identidad del 50% con GES-1 y el 40% con CTX-M-2, CTX-M-3, y CTX-M-8, 35% con SHV-1, el 34% con TEM-1, y sólo el 21 y el 19% con PER-1 y VEB-1 (Glupczynski *et al.*, 2010). Recientemente Bogaerts y colaboradores informaron la presencia de cepas productoras de BEL-1 podría estar asociada con otras betalactamasas clase B como VIM-1 (Bogaerts *et al.*, 2007).

La primera carbapenemasa metalo- β -lactamasa en *P. aeruginosa* fue IMP-1, se encontró en Japón en un estudio a gran escala en aislados clínicos resistentes a carbapenémicos durante 1992-1994 (Senda *et al.*, 1996). Un total de 11% de las cepas estudiadas albergaban IMP-1, el gen se localizó en un plásmido de 36 kb y se encontró formando parte de un integron clase 1. Se ha reportado también en Enterobacterias y *Acinetobacter* (Koh *et al.*, 2004; Cornaglia *et al.*, 2011).

VIM-1 carbapenemasa se encontró en una cepa de *P. aeruginosa* aislada de la Universidad de Verona, Italia en 1997 y fue el primer representante de la familia de las metalo- β -lactamasas adquiridas y aunque tiene el 30% de identidad con las enzimas IMP tienen el mismo espectro de hidrólisis hacia imipenem y meropenem (Lauretti *et al.*, 1999) se ha encontrado también en cepas de *Acinetobacter* y *P. putida* (Fielt *et al.*, 2006).

Nueva Delhi Metallo- β -lactamasa (NDM-1), un nuevo tipo de MBL, que se informó por primera vez en *K. pneumoniae* y *Escherichia coli* se recuperó de un paciente sueco que fue ingresado en un hospital en Nueva Delhi, India (Yong *et al.*, 2009). El gen *bla_{NDM-1}* ha sido identificado en *Enterobacter cloacae*, *Proteus spp.*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, provocando que las bacterias sean resistentes a casi todos los grupos de antibióticos, incluyendo las fluoroquinolonas, aminoglucósidos y β -lactámicos (especialmente carbapenémicos), pero susceptible a colistina y a veces a tigerciclina. Este gen ha sido detectado en diferentes plásmidos que son fácilmente transferibles entre las bacterias siendo una grave amenaza para la salud pública y clínica (Rolain *et al.*, 2010). En los últimos meses la aparición y difusión de los aislados productores de NDM se han reportado en varios países incluyendo los E.U.A., México, Canadá, Suecia, el Reino Unido, Austria, Bélgica, Francia, Países Bajos, Alemania, Japón, África, Omán y Australia (Chen *et al.*, 2011).

2.2 Antecedentes específicos

En México, los mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* se han venido describiendo desde 1986; se han hecho estudios de este tipo en diversos hospitales en los que se han hallado genes *imp-15* e *imp-18*, y se ha determinado la producción simultánea de diferentes tipos de BLEE, incluida la GES-5 en asociación con VIM-2 y VIM-11 (Barrios *et al.*, 2012). En otro estudio realizado en hospitales mexicanos se reportó la presencia de los genes *imp-15*, y *vim-2* (Garza-Ramos *et al.*, 2008). Asimismo, en un paciente con fibrosis quística se encontró una cepa productora de la β -lactamasa OXA-141, todos estos genes han sido reportados formando parte de diversos integrones clase 1 (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2014). En el estado de Puebla, el grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad han realizado estudios previos con respecto a *P. aeruginosa* en el que aislaron 65 cepas provenientes de infecciones nosocomiales en el periodo 2007-2009, y se seleccionaron aquellas presentaron resistencia a 3 ó más antibióticos de familias diferentes. Con esta información se

eligieron cepas multidrogoresistentes que no provinieran del mismo paciente, resultando un total de 27 cepas, las cuales presentaron el siguiente perfil de resistencia: β -lactámicos/inhibidor 78%, de estos, Penicilinas 89%, Cefalosporinas 74%, Carbapenemas 85%, Monobactam 63%, Aminoglucósidos 85%, Fluoroquinolonas 82%, Otros 73% (Cloranfenicol, Trimetoprim-Sulfametoxazol) y Colistina 19%. Se les determinó por PCR la presencia de diversos genes de resistencia de los cuales únicamente se encontraron presentes en el 59% de los aislados el gen *ges-1*, 7% *ges-11*, 4% *oxa-1*, 70% *oxa-2*, 100% *oxa-50*, 59% *aac*-(3')-IIa, 48% *acc*-(6')-Ib y estuvieron ausentes los genes *imp-1*, *vim-1*, *gim-1*, *spm-1*, *pse-1*, *veb-1*, *kpc-2*, *oxa-10*, *oxa-11*, *oxa-13*, *oxa-40*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* (Ayala, 2013; Martínez, 2011; Valerio, 2012) (ver anexo 1).

Posteriormente Ayala, 2013 seleccionó 5 cepas: Ps09, Ps22, Ps36, Ps39, Ps84 de acuerdo a su fenotipo de resistencia y representativas de los genes que se habían identificado, para realizar el análisis de reguladores de bombas de expulsión y estudio parcial del gen la porina *OprD*, encontrando mutaciones, deleciones e inserciones que pueden estar contribuyendo a la multirresistencia de estas cepas y también determinó parcialmente la secuencia de un integrón de la cepa Ps36 formado por *intI1*, *aac*-(6')-33, *ges-11*, *aac*-(6')-Ib, *drfA1*, *qacE* Δ 1, *sul1* (Anexo 2).

3. JUSTIFICACIÓN

El constante incremento de la multirresistencia debe impulsar el estrecho seguimiento del perfil de sensibilidad-resistencia de los microorganismos causantes de infecciones asociadas a la atención de la salud (infecciones nosocomiales), frente a los antimicrobianos que se van incorporando al uso terapéutico, los estudios de este tipo llevan un auge en países desarrollados sin embargo en nuestro país son escasos; por lo tanto la importancia de este trabajo es generar conocimiento que permita la implementación de estrategias que contribuyan a disminuir el impacto en la morbi-mortalidad de los pacientes que adquieren este tipo de infecciones y contrarrestar los gastos que implica.

Pseudomonas aeruginosa es aislada con mucha frecuencia de pacientes que cursan con alguna infección de este tipo y que debido a sus características fisiológicas propias de la bacteria y al surgimiento de nuevos elementos genéticos móviles, ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia a múltiples antimicrobianos lo que dificulta el tratamiento y su erradicación de ambientes hospitalarios.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos moleculares de la resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de Infecciones Nosocomiales

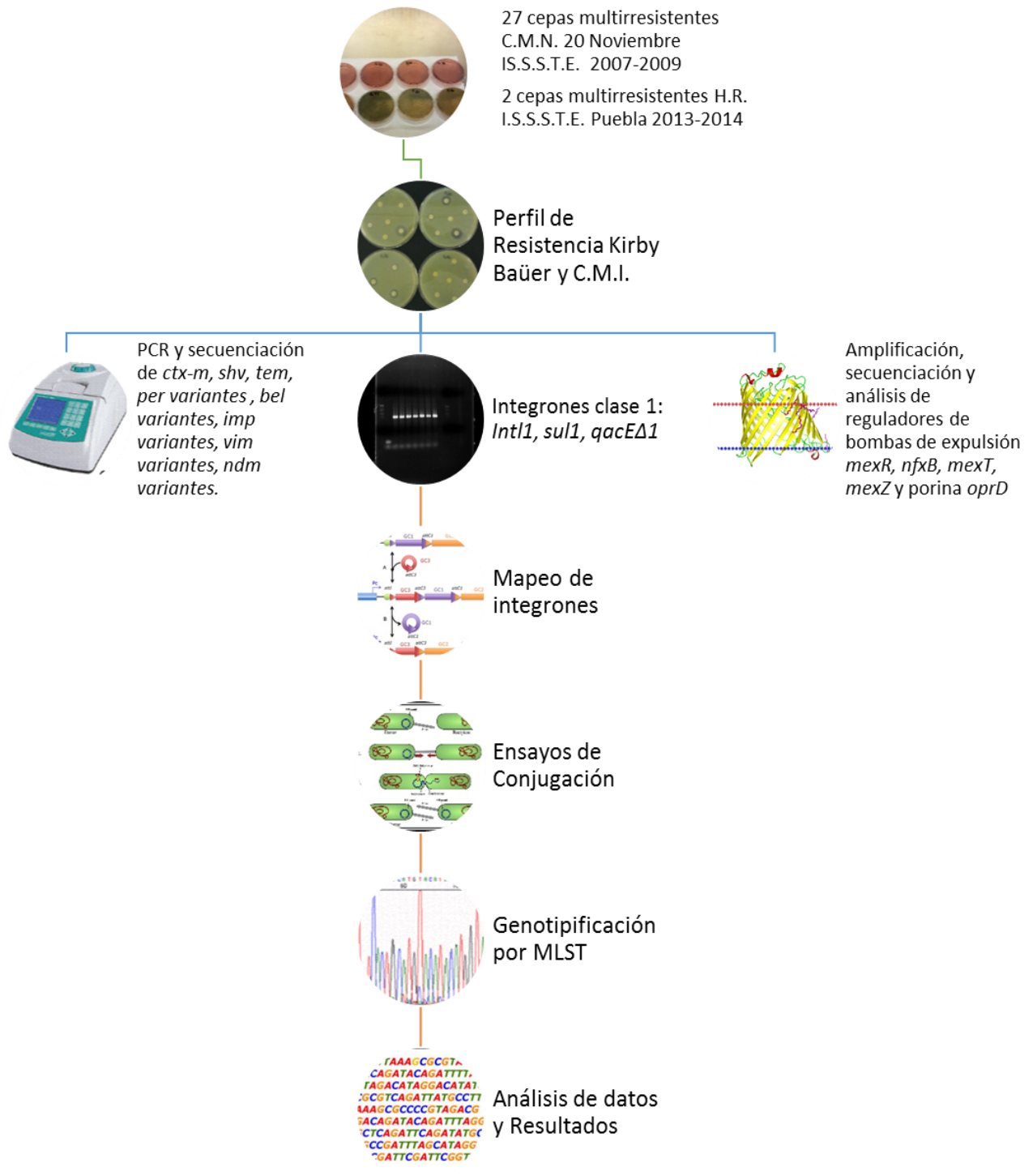
4.1 Objetivo Particular

- Estudiar la resistencia a antimicrobianos β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Objetivos Específicos

1. Identificar los genes que codifican para serín- β -lactamasas, (*shv*, *tem*, *ctx*, *per* y *bel*) y algunas variantes de metalo- β -lactamasas (*vim*, *imp* y *ndm*).
2. Amplificar los genes característicos de integrones clase 1 (*intI1*, *qacE Δ 1* y *sul1*) de las cepas de estudio.
3. Determinar la estructura de los integrones de algunas cepas de interés.
4. Analizar la transferencia de genes de resistencia mediante conjugación.
5. Realizar la genotipificación molecular por MLST de algunas cepas de interés.

5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Cepas de estudio

Se estudiaron 27 cepas multidrogorresistentes, previamente estudiadas en algunos genes, de *P. aeruginosa* procedentes de distintos sitios anatómicos de pacientes diagnosticados con infección asociada a la atención de la salud (IAAS) del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del I.S.S.S.T.E. de la ciudad de México, durante el periodo mayo-agosto 2007 y enero-abril de 2009 (Anexo 1).

Y adicionalmente se trabajaron 2 cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E Puebla, que fueron aisladas de un mismo paciente en diferente periodo de tiempo (2013 y 2014), resistentes a imipenem y meropenem y que portaban los genes *oxa-2* e *imp-18*.

Las cepas se encontraban preservadas en crioviales con caldo BHI/Glicerol (10% v) (BIOXON ®) e identificadas con número secuencial de acuerdo al cepario interno del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, se descongelaron y se sembró un inóculo de cada una en placas de agar TSA (BD Bioxon®) y se incubaron 24 horas a 37°C. Posteriormente se tomó una colonia aislada y se sembró nuevamente en placas de agar TSA y Mac Conkey (BD Bioxon®), para observar los cambios morfológicos y la producción de exopolisacárido que presentaban las colonias, se incubaron 24 horas a 37°C y se volvió a revisar el crecimiento a las 48 horas.

A 5 cepas del C.M.N. 20 de Noviembre, con el objetivo de confirmar su pureza, se les realizaron pruebas bioquímicas como citrato, MIO y O/F; también se les realizó tinción de Gram y confirmación del perfil de resistencia por Kirby Baüer (marcadas con rojo en el anexo 1).

6.1.1. Cepas control y cepa receptora para conjugación

Se usaron distintas cepas como control positivo para la amplificación de los diferentes genes de resistencia, los genes que portan estas cepas ya están secuenciados. También se usó una cepa de *P. aeruginosa* (PU21) como receptora para el ensayo de conjugación. Las características de las cepas se describen en la tabla 1:

Tabla 1. Cepas usadas como controles positivos y cepa receptora para conjugación

Número de cepa	Microorganismo	Genes secuenciados	Donada por:
IMP-15	<i>P. aeruginosa</i>	<i>imp-15</i>	Dr. Jesús Silva Sánchez
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i>	<i>vim-2</i>	Dr. Jesús Silva Sánchez
Ps36	<i>P. aeruginosa</i>	<i>int11, sul1, qacED1, ges-11, aac-(6')-Ib, oxa-2</i>	M.C. Elizabeth Valerio Calleja/ M.C. Cristal Ayala Arias
19.0	<i>E.coli</i>	<i>tem-1</i>	Biol. Gabriela Moreno Ramírez
560	<i>E.coli</i>	<i>shv-1</i>	M.C. Gerardo Cortés
SA 42	<i>K. pneumoniae</i>	<i>shv-1, ctxm, tem-1, oxa-1, aac-(3)-IIa, aac-(6')-Ib, qnrB1</i>	M.C. Gabriel Abraham González
PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	<i>mexT, mexZ, nfxB, mexR</i> y porina <i>oprD</i>	Dra. Gloria Soberón / Dr. Miguel Castañeda
PU21	<i>P. aeruginosa</i>	Usada como cepa receptora para ensayos de conjugación. Características: <i>ilv, leu, Str^r, Rif^r</i>	Dr. Jesús Silva Sánchez

- Para los genes *bel, per* y *ndm* no se tienen con controles positivos.

6.2. Métodos de sensibilidad a antibióticos

6.2.1 Perfil de resistencia por el método de Kirby-Baier

El perfil de resistencia se realizó por el método de difusión con disco, se probaron 22 antibióticos usados en el área clínica. Se partió de un cultivo puro de 24 horas que fue sembrado en agar TSA, se preparó una suspensión bacteriana en SSI y se ajustó a una turbidez 0.5 de McFarland, se inoculó homogéneamente con un hisopo estéril en una placa de agar MH (BD Bioxon®), y en seguida se colocaron los discos de antibióticos (BD BBL®). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se procedió a medir los halos de inhibición clasificando a las cepas de acuerdo a los puntos de corte propuestos por el CLSI, 2013 (Tabla 2)

Tabla 2. Puntos de corte del CLSI, 2013 para *Pseudomonas aeruginosa*.

Familia química de antibiótico	Antibiótico		Concentración (µg)	R	I	S
Penicilinas Combinación β-lactámicos/Inhibidores de β-lactamasas Cefems (Incluyendo Cefalosporinas de I, II, III y IV)	Piperacilina	PIP	100	≤14	15-20	≥21
	Ticarcilina	TIC	75	≤15	16-23	≥24
	Carbenicilina	CB	100	≤13	14-16	≥17
	Piperacilina/Tazobactam	TZP	100/10	≤14	15-20	≥21
	Ticarcilina/Ác. Clavulánico	TIM	75/10	≤15	16-23	≥24
	Cefalotina	CF	30	≤14	15-17	≥18
	Ceftazidima	CAZ	30	≤14	15-17	≥18
	Cefotaxima	CTX	30	≤14	15-22	≥23
	Ceftriaxona	CRO	30	≤13	14-20	≥21
	Cefepime	FEP	30	≤14	15-17	≥18
Monobactams	Aztreonam	ATM	30	≤15	16-21	≥22
Carbapenems Aminoglucósidos	Imipenem	IPM	10	≤15	16-18	≥19
	Meropenem	MEM	10	≤15	16-18	≥19
	Gentamicina	GM	10	≤12	13-14	≥15
	Amikacina	AN	30	≤14	15-16	≥17
	Netilmicina	NET	30	≤12	13-14	≥15
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	CIP	5	≤15	16-20	≥21
	Ofloxacino	OFX	5	≤12	13-15	≥16
	Norfloxacino	NOR	10	≤12	13-16	≥17
Otros	Cloranfenicol	C	30	≤12	13-17	≥18
	Trimetoprim con Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	10	11-15	16
	Colistina	CL	10	≤10	-	≥11

6.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria por el método de dilución en agar

Es la concentración más baja de un antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano y se determinó usando el método de dilución en agar, los puntos de corte se determinaron con base en el CLSI, 2013 y se muestran en la Tabla 3.

Se partió de un cultivo puro de las cepas a evaluar, se resuspendió en un tubo con 5 mL de Solución Salina Isotónica (SSI) al 0.85%, para ajustar la turbidez con un estándar de 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente se hizo una dilución 1:10 con SSI (siendo el inóculo de 1.5×10^7 UFC/mL) depositando por triplicado 2 μ L de ésta suspensión en placas con agar Mueller Hinton suplementadas con los antibióticos a evaluar (Tabla 4), el inóculo final fue de 1.5×10^4 UFC/mL. Una vez inoculadas las placas se esperó a que seicara el inóculo y se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Finalmente se observó el crecimiento de las placas y se buscó la concentración a la cual ya no hubiera crecimiento.

Tabla 3. Puntos de corte de CMI para *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo al CLSI, 2013.

Antibiótico	Punto de corte CMI (μ g/mL)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
Ceftazidima (CAZ)	≥ 32	16	≤ 8
Cefepime (FEP)	≥ 32	16	≤ 8
Meropenem (MEM)	≥ 8	4	≤ 2
Ciprofloxacino (CIP)	≥ 4	2	≤ 1
Amikacina (AN)	≥ 64	32	≤ 16
Gentamicina (GN)	≥ 16	8	≤ 4

Tabla 4. Antibióticos probados en la determinación de CMI

Antibiótico		Concentración (µg/mL)									
CAZ	512	256	128	64	32	16	8	4			
FEP	512	256	232	128	64	32	16	8	4		
CIP	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	
GN	512	256	128	64	32	16	8	4	2		
AN	512	256	128	64	32	16	8	4			
MEM	512	256	128	64	32	16	12	8	6	4	2

CAZ: ceftazidima; FEP: Cefepime; CIP: ciprofloxacino; GN: gentamicina; AN: amikacina; MEM: meropenem. Puntos de corte CLSI, 2013.

6.2.3 Prueba de detección de Carbapenemasas de Clase A y Metallo-β-lactamasas:

La prueba consistió en hacer una suspensión 0.5 McFarland a partir de un cultivo puro e inocular una placa de agar MH en forma masiva, posteriormente se colocó un disco con 6 µL de APB (Ácido 3-aminofenilborónico 50 mg/ml, Sigma) para carbapenemasas clase A ó de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético 0.5M, pH:8.0) para metallo-β-lactamasas y se colocó a una distancia equidistante (≈1.5cm) un disco de IPM (Imipenem 10µg) y de MEM (Meropenem 10µg). La prueba se tomó como positiva si se observaba un efecto de sinergismo alrededor de los discos (Meletis, 2014)

6.3 Métodos de Extracción de DNA

6.3.1 Extracción de DNA por el método de hervido

Es la obtención de DNA bacteriano mediante ebullición propiciando la ruptura celular, permitiendo la salida del material genético al medio acuoso; para lo cual se sembró un colonia aislada de *P. aeruginosa* en placas de agar TSA (BD Bioxon®) se incubaron a 37° durante 18-24 horas, del cultivo anterior se recogió una asada (tamaño del asa mediana) se depositó en un tubo eppendorf que

contenía 800 µL de solución salina isotónica estéril (0.85%), esta mezcla se homogenizó en vórtex a alta velocidad y posteriormente se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla bacteriana se lavó 3 veces más siguiendo el procedimiento anterior, al finalizar los lavados se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 800 µL de agua inyectable estéril y se sometió a hervido en baño maría durante 10 minutos, transcurrido este tiempo se sacó el tubo y se dejó enfriar a temperatura ambiente, después se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos, y el sobrenadante se separó en un tubo eppendorf estéril y se almacenó a -20°C. Estos lisados bacterianos se usaron para la determinación de genes de resistencia y mapeo de integrones.

6.3.2 Extracción de DNA usando el Kit Instagen Matrix (Roche)

Esta técnica se utilizó durante la estancia en la Universidad de la Rioja (Estepa, 2014) es para *Pseudomonas aeruginosa* y consistió en lo siguiente:

De un cultivo puro en agar TSA de 24 horas de incubación, se tomó una colonia y se depositó en un tubo eppendorf que contenía 1 mL de agua MiliQ estéril, se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 4 minutos y se desechó el sobrenadante, la pastilla bacteriana se resuspendió con 200 µL de resina de extracción (previamente agitada) y se incubó en baño maría a 56°C durante 25 minutos, una vez transcurrido este tiempo se agitó alta velocidad durante 10 segundos, posteriormente se hirvió la mezcla a 100°C durante 8 minutos, después se volvió a agitar a alta velocidad durante 10 segundos, para finalizar se centrifugó 13,000 r.p.m. por 4 minutos, se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril y se almacenó a 4°C. Esta técnica se usó para el mapeo de integrones y la genotipificación por MLST.

6.3.3 Cuantificación de DNA

A todos los lisados se les realizó la cuantificación de DNA en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para este procedimiento se usó la aplicación del instrumento, seleccionando la opción de Ácidos Nucleicos, inicialmente el equipo

realiza un verificación automática; se limpió el lector del equipo con papel y se procedió a hacer un blanco con 2 µL de agua inyectable estéril, una vez que se activó la casilla (Measure), se procedió a la medición de los lisados, se fue limpiando el lector óptico con papel entre muestra y muestra para evitar contaminaciones. La lectura a 260nm indica la concentración de DNA teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50µg/mL de DNA de doble hebra. Y la pureza se determina por el cociente entre las absorbancias 260/280 nm. Una preparación pura de DNA daría un cociente entre 1.8 y 2.0 y si hay contaminación con proteínas o algún otro compuesto el cociente es menor. 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.

6.4 Amplificación de genes de resistencia por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de genes se usaron diversas enzimas con sus respectivos componentes estos se muestran en las tablas 5, 6 y 7

Tabla 5. Componentes para la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific)

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

Usada para la amplificación de genes de resistencia y mapeo de integrones.

Tabla 6. Componentes para la enzima BIOTAQ™ DNA Polimerasa (Bioline)

Componentes	Concentración inicial	Volumen añadido por tubo	Concentración final de la reacción
BIOTAQ™ DNA Polimerasa (Bioline)	5U/μL	0.3μL	1.5U
Buffer de reacción NH ₄ (Bioline)	10X	5μL	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50mM	1.5μL	1.5mM
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	10mM*	1μL	0.05mM
Primer Forward	25μM	1μL	0.5mM
Primer Reverse	25μM	1μL	0.5mM
DNA	---	10μL	---
Agua MiliQ estéril	---	Hasta 50μL	---
Volumen final	---	50μL	---

*Se prepararon alícuotas de trabajo de 2.5mM (25μL dNTP mix + 75μL agua MiliQ estéril)
Usada para regiones variables y mapeo de integrones.

Tabla 7. Componentes para la enzima KAPA Taq HotStart DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS)

Componentes	Concentración inicial	Volumen añadido por tubo	Concentración final de la reacción
"KAPA Taq HotStart DNA Polymerase" (KAPABIOSYSTEMS)	5U/μL	1.0μL	5.0U
KAPA Taq HotStart buffer 5X	5X	10μL	2X
MgCl ₂ (Bioline)	50mM	3μL	3mM
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	10mM*	1μL	0.05mM
Primer Forward	25μM	1μL	0.5mM
Primer Reverse	25μM	1μL	0.5mM
DNA	---	10μL	---
Agua MiliQ estéril	---	Hasta 23μL	---
Volumen final	---	50μL	---

*Se prepararon alícuotas de trabajo de 2.5mM (25μL dNTP mix + 75μL agua MiliQ estéril)
Usada para la amplificación de algunos genes "housekeeping" para MLST

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diversos genes de resistencia se concentran en la tabla 8.

Tabla 8. Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los diferentes genes de resistencia

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
bel (variantes)	852	BEL-1F	ATGAAACTGCTGCTCTACCCG	817	94°C/5 min 94°C/1 min 50°C/1 min 30 ciclos 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	Diseñados en este trabajo
		BEL-1R	CAGAAGCAATTAATAACGCC			
per-1	927	PER-1F	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	925	94°C/5 min 94°C/1 min 42°C/1 min 30 ciclos 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	Danel <i>et al.</i> , , 1995
		PER-1R	ATGAATGTCATTATAAAAGC			
per (variantes)	927	PERd-F	GCCACTGTAGGYGTWGCMT	714	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Diseñados en este trabajo
		PERd-R	GCGCRATRATRGTTCATTGGT			
ctx-m	910	KpCTX-F	TCTCCAGAATAAGGAATCCC	909	95°C/3 min 95°C/1 min 55 °C/1 min 30 ciclos 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	Bauernfeind <i>et al.</i> , 1996
		KpCTX-R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC			
tem	861	TEM1F	AGAGTATGAGTATTCAACATT	837	95°C/3 min 95°C/1 min 45°C/1 min 30 ciclos 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	Hansen <i>et al.</i> , 2004
		TEM2R	ATCTCAGCGATCTGTCTAT			
shv	871	SHV1F	GGGTTATTCTTATTGTGCT	883	96°C/15 seg 96°C/15 seg 52°C/15 seg 24 ciclos 72°C/2 min 72°C/3 min 10°C/∞	Mercier y Levesque, 1990
		SHV2R	TAGCGTTGCCAGTGCTCG			

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<i>vim</i> (variantes)	801	VIMd1-F	GATGGYGTGGTTCGCATATC	Usando 1-2: 400 Usando 1-3: 600	94°C/5 min 94°C/1 min X °C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min X1-2: 54°C 10°C/∞ X1-3: 50°C	Diseñados en este trabajo
		VIMd2-R	GAATGCGCAGCACCRGGA			
		VIMd3-R	CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA			
<i>imp</i> (variantes)	741	IMPd-F	CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG	515	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Diseñados en este trabajo
		IMPd-R	GCCADGCTACDANATTTGCGTC			
<i>ndm-1</i>	825	NDM-1F	CGGGCCGTATGAGTGATTGC	781	94°C/5 min 94°C/1 min 53°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Diseñados en este trabajo
		NDM-1R	CCAATATTATGCACCCGGTC			
<i>ndm</i> (variantes)	813	NDMv-F	AATATTATGCACCCGGTCGCG	732	94°C/5 min 94°C/1 min 54°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Diseñados en este trabajo
		NDMv-R	CATCACGATCATGCTGGCCTT			

En cada PCR se colocó un blanco el cual consistió en la misma mezcla de reacción pero sin DNA, en lugar de DNA se colocó el correspondiente volumen de agua inyectable estéril y como control positivo se utilizó el DNA proveniente del lisado bacteriano de las cepas control (genes secuenciados) (ver tabla 1).

Tabla 9. Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los Reguladores de Bombas de Expulsión y la porina OprD

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<i>mexR</i>	443	mexR-1	CGCCATGGCCCATATTGAG	637	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexR-2	GGCATTGCGCAGTAAGCGG			
<i>nfxB</i>	563	nfxB-1	CGATCCTTCTATTGCACG	939	94°C/5 min 94°C/1 min 52°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Linares <i>et al.</i> , 2005
		nfxB-2	GCCAAGTGCCAGTATCG			

mexT	1043	mexT-1	CGGTTGCAGCCTCTAGCC	1005	94°C/5 min 94°C/1 min 58°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexT-2	CGATTTTCCCGTTGCGACG			
mexZ	534	mexZ-1	AGCGGCGCGACAGTAGCATA	781	94°C/5 min 94°C/1 min 59°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexZ-2	CCGAGGACCAGCGCAGGC			
Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
oprD	1332	oprD-F	TGCTGCTCCGCAACTACTATTTTC	751	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 68°C/8 min 72°C/8 min 10°C/∞	Naenna <i>et al.</i> , 2010
		oprD-R	GTAGGCCAAGGTGAAAGTGTG			
oprD	1332	oprDlong-F	CGCCGACAAGAAGAACTAGC	1412	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007
		oprDlong-R	GTCGATTACAGGATCGACAG			
oprD	1332	oprDlong2-F	CTACGCAGATGCGACATGC	1586	94°C/5 min 94°C/1 min 64°C/1 min 30 ciclos 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	Wolter <i>et al.</i> , 2004
		oprDlong2-R	CCTTTATAGGCGCGTTGCC			

6.4.1 Caracterización de Integrones Clase 1 mediante la estrategia de “*primer walking*” y amplificación de regiones variables.

La estructura de los integrones se determinó por la estrategia de “*primer walking*” que consiste en diseñar oligonucleótidos específicos para que los fragmentos obtenidos de los genes casete se solapen y así se obtenga la secuencia completa. Otra metodología que se uso fue amplificar la región variable de los integrones clase 1 teniendo en cuenta que los extremos 5' y 3' están conservados. (Levesque y Roy, 1993; Sáenz *et al.*, 2010). Los cebadores usados se describen a continuación.

Tabla 10. Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de reacción de PCR empleados para 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
<i>int1</i>	1017	Int1-F	ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	564	94°C/5 min 94°C/30 seg 52 °C/30 seg 72°C/2 min 72°C/7 min 10°C/∞ 30 ciclos	Jianyu <i>et al.</i> , 2005
		Int1-R	GAAAGGTCTGGTCATACATG			
<i>sul1</i>	840	Sul1-F	TGGTGACGGTGTTCGGCATTG	790	94°C/5 min 94°C/30 seg 63°C/30 seg 72°C/1 min 72°C/8 min 10°C/∞ 30 ciclos	Mazel <i>et al.</i> , 2000
		Sul1-R	CACCTTCTCGGAAACCTCGC			
<i>qacEA1</i>	348	Qac-F	GGCTGGCTTTTCTTGTATCG	247	94°C/5 min 94°C/30 seg 60 °C/30 seg 72°C/1 min 72°C/8 min 10°C/∞ 30 ciclos	Mazel <i>et al.</i> , 2000
		Qac-R	TGAGCCCCATACCTACAAAGC			
<i>int2</i>	978	int2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	789	94°C/5 min 94°C/30 seg 60 °C/30 seg 72°C/1 min 72°C/8 min 10°C/∞ 30 ciclos	Mazel <i>et al.</i> , 2000
		int2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
Región Variable 1	v	rv.Int1-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	v	94°C/5 min 94°C/1 min 55 °C/1 min 65°C/8 min 72°C/8 min 10°C/∞ 35 ciclos	Levesque y Roy, 1993
		rv.Int1-R	AAGCAGACTTGACCTGA			
Región Variable 2	v	rv.Int2-F	GATGCCATCGCAAGTACGAG	v	94°C/5 min 94°C/1 min 60 °C/1 min 72°C/6 min 72°C/8 min 10°C/∞ 35 ciclos	White <i>et al.</i> , 2001
		rv.Int2-R	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTGTGA			

*v: el tamaño del amplicon es variable

Tabla 11. Secuencia nucleotídica de los cebadores para el estudio de integrones por "primer walking"

Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Referencia
intFRC	ACCGAAACCTTGCGCTCGT	60.1	Ayala, 2013
sulFRC	GAATGCCGAACACCGTCACCA	60.3	Ayala, 2013
qacFRC	CGATAACAAGAAAAAGCCAGCC	60.1	Este trabajo
aac6FRC	GCCACTCATAGAGCATCGCAA	57.5	Este trabajo
aac6RRC	AAACACGCCAGGCATTGAG	58.5	Ayala, 2013
aac(6')-Ib-seq	CGTCACTCCATACATTGCAA	62.2	Sáenz, 2010
gesFRC	AGCTTCTCAAGATCGGTC	51.4	Ayala, 2013
gesRRC	GCCTCTGTCGGTCAAGTTAT	54.5	Este trabajo
aadA1FRC	TCGATACTTCGGCGATCACC	56.7	Este trabajo
aadA1RRC	AGGCGAGATCACCAAGGTAG	56.3	Este trabajo
oxa2-FRC	CTAGCGTGCCTTCTGCGCAT	70.7	Este trabajo
oxa2-RRC	AATCGTGCGGGCAATCCTTC	70.5	Este trabajo

6.4.2 Visualización de productos de PCR

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

6.4.3 Secuenciación de los productos de PCR

Los productos amplificados se purificaron a partir del gel de agarosa con ayuda de Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM en Cuernavaca Morelos, México.

6.4.4 Análisis de las secuencias

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

(www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm).

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

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal Omega

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

La conversión de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se realizó en ExPASy-Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>).

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

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

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

6.5 Experimentos de conjugación

Se utilizó como receptora a la cepa de *P. aeruginosa* PU21 Rif^r (Rifampicina resistente) para la obtención de transconjugantes resistentes a los antibióticos Meropenem y/o Amikacina. Se sembraron las cepas donadora y receptora en placas de agar soya tripticaseína, se incubaron por 18 horas a 37°C. Posteriormente se inoculó una colonia de cada placa en un tubo con 3 mL de Caldo BHI por 6 horas a 37°C en agitación, a fin de que alcanzaran una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland. Posteriormente se mezclaron 200 µL de cultivo de la cepa donadora con 800 µL de cultivo de la cepa receptora en un tubo con 2 mL de caldo BHI y se incubaron por 18 horas a 37°C sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron diluciones 10^{-1} a 10^{-5} de las cuales se tomaron 100 µL y se depositaron sobre la superficie de placas con agar BHI suplementadas con concentraciones conocidas de los antibióticos de interés, que fueron Rifampicina (100 µg/mL), Meropenem (8 µg/mL) y Amikacina (32 µg/mL) para poder seleccionar las cepas transconjugantes. Después se extendió el inóculo con una varilla de vidrio y se incubaron a 37°C por 24 horas, finalmente se observó el crecimiento hasta por 72 horas. Cada experimento de conjugación se realizó por triplicado.

Las concentraciones fueron establecidas con base a los valores de CMI de la cepa y a los reportados en el CLSI, 2013 para *Pseudomonas aeruginosa*.

En las placas suplementadas con rifampicina debía crecer tanto la cepa receptora como las transconjugantes, mientras que en las placas suplementadas con rifampicina/meropenem/amikacina ó las placas con rifampicina/meropenem, rifampicina/amikacina, debían crecer únicamente las transconjugantes.

Una vez que se observó crecimiento en las placas se aislaron de 6 a 8 colonias transconjugantes al azar y se estudió su patrón de resistencia a los antibióticos para los cuales la cepa donadora presentó resistencia, se calculó la CMI para los mismos antibióticos de la donadora y se amplificaron los genes que estaban presentes en el integrón clase 1 de la cepa donadora.

6.6 Determinación de la secuencia tipo (MLST) de algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

La genotipificación de las cepas consistió en amplificar siete genes "housekeeping" para lo cual se usaron dos juegos de oligonucleótidos uno para amplificar y los otros para secuenciar, la secuencia de los cebadores se obtuvo directamente de la página MLST *Pseudomonas aeruginosa* dirección: <http://pubmlst.org/paeruginosa/>. Las secuencias y las condiciones de PCR para cada gen se muestran a continuación:

Tabla 12. Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los genes "housekeeping" para MLST

Nombre del gen	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción/*Enzima empleada
<i>acsA</i>	F:	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	842	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *BioTaq
	R:	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT		
<i>aroE</i>	F:	TGGGGCTATGACTGGAAACC	825	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *KapaTaq
	R:	TAACCCGGTTTTGTGATTCTACA		
<i>guaA</i>	F:	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	940	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *BioTaq
	R:	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA		
<i>mutL</i>	F:	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	940	94°C/5 min 94°C/1 min 58°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *KappaTaq
	R:	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC		
<i>nuoD</i>	F:	ACCGCCACCCGTACTG	1042	94°C/5 min 94°C/1 min 53°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *BioTaq
	R:	TCTCGCCCATCTTGACCA		
<i>ppsA</i>	F:	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *BioTaq
	R:	GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG		
<i>trpE</i>	F:	GCGGCCAGGGTCGTGAG	811	94°C/5 min 94°C/1 min 60°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞ 30 ciclos *BioTaq
	R:	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT		

Tabla 13. Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para secuenciar los genes "housekeeping" para MLST

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

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

6.7 Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE)

Se empleó esta técnica para conocer la relación clonal entre las cepas de estudio. Se utilizó la enzima de restricción *SpeI* (10000U/ml, BioLabs, New England) y el protocolo propuesto por Rojo-Bezarez y colaboradores (2011):

✓ Preparación de insertos:

A partir de un cultivo puro de 24h en placa de BHI agar, se inocularon varias colonias en 3 ml de BHI líquido y se incubaron a 37°C/24 horas. Se centrifugó 1 ml del cultivo a 13000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA pH=8,0) y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender en 1 ml de TE. Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) al 1,5% en buffer TE y se mantuvo a 56°C. Se mezclaron 0,5 ml de la suspensión bacteriana con 0,5 ml de agarosa y se distribuyó en los moldes, preparando 3 insertos por cepa. Dejándolos solidificar unos minutos en refrigeración.

✓ Lisis bacteriana:

Se añadieron 10 ml de buffer de lisis 1 (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM EDTA pH=8,0, 1% sarcosil, 2 mg/ml proteinasa K) en cada tubo que albergaba los 3 insertos de la cepa correspondiente y se dejó incubar en un baño de agua a 56°C durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el buffer de lisis 1 y se añadieron 10 ml del buffer de lisis 2 (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM EDTA pH=8,0, 1% sarcosil, 0,1 mg/ml proteinasa K) y se dejaron nuevamente incubando durante toda la noche en el baño de agua a 56°C.

✓ Lavado de insertos:

Tras eliminar el buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados: 1) 10 ml de agua destilada estéril durante 10 min en un baño de agua a 56°C; 2) 10 ml de buffer TE durante 30 min en un baño de agua a 56°C (se repite tres veces); y 3) 10 ml de buffer TE durante 30 min a temperatura ambiente. Después del último lavado,

se cambió por última vez el buffer TE y los insertos se guardaron a 4°C (tienen una caducidad aproximada de un año).

✓ **Digestión enzimática:**

Para la digestión se utilizó la mitad de un inserto de cada cepa y un volumen final de 100 µl de la mezcla de digestión compuesta por: 2 µl de enzima *SpeI* (10U) + 1 µl BSA (100X) + 10 µl NE Buffer 4 (10X) + 87 µl agua destilada estéril. Se incubaron durante 6h en un baño de agua a 37°C.

✓ **Preparación del gel de agarosa:**

Se disolvió agarosa (Agarosa D5, Pronadisa) al 1% en TBE 0,5X, se vertió sobre el molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se rellenaron con los insertos digeridos, dejando el primero y el último de los mismos para el marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker, BioLabs), y se sellaron con agarosa de la misma concentración atemperada a 50°C.

✓ **Electroforesis:**

Se realizó en una cubeta de electroforesis CHEF-DR II (BioRad) con 2 l de TBE 0,5X suplementado con tiourea 75 µM, para evitar la degradación del DNA. Las condiciones de electroforesis empleadas fueron: 1) una rampa lineal pulsada de 5 a 15s con un gradiente de voltaje de 6V/cm a 14°C durante 10h; seguida de 2) una rampa lineal pulsada de 15 a 45s con un gradiente de voltaje de 6V/cm a 14°C durante 10h.

✓ **Tinción del gel y visualización:**

Se tiñó el gel en una solución acuosa de bromuro de etidio (20 µl / 200 ml) durante 15 min. Se visualizó en un transiluminador (Image Store 5000, UVP) y el programa ChemiGenius (GenSnap from SynGene). Posteriormente se destiñó el gel con agua destilada, hasta lograr distinguir las bandas.

7. RESULTADOS

El Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" es un hospital de tercer nivel en el que se concentra una gran población de pacientes de diferentes estados de la República Mexicana; se partió de una colección previa de 65 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de este hospital a las cuales se les había realizado el perfil de resistencia por Kirby-Bauer y amplificado algunos genes (como se describió en antecedentes) (Ayala, 2013; Martínez, 2011; Valerio, 2012). Por lo que para este estudio se seleccionaron 27 cepas multirresistentes para seguir con la búsqueda de genes relacionados con la resistencia a β -lactámicos.

7.1 Identificación de los genes que codifican para serín- β -lactamasas, (*shv*, *tem*, *ctx*, *per* y *bel*) y algunas variantes de metalo- β -lactamasas (*vim*, *imp* y *ndm*).

En las 27 cepas ya se habían buscado diversos genes de resistencia para β -lactámicos, encontrando sólo algunos de ellos [*ges 1*(59%), *oxa-1* (4%) y *oxa-2* (70%)] y a para carbapenémicos [*ges 11* (7%)] (Martínez, 2012, Valerio, 2013, Ayala, 2014). Por lo que en algunas cepas el fenotipo de resistencia que presentaban no estaba completamente explicado a nivel genotípico, por lo tanto en este trabajo se decidió buscar otro tipo de genes de β -lactamasas de tipo serín- β -lactamasas, (*shv*, *tem*, *ctx*, *per* y *bel*) y algunas variantes de metalo- β -lactamasas (*vim*, *imp* y *ndm*). Para tener una mayor probabilidad de amplificar las variantes de estos genes, se diseñaron oligonucleótidos degenerados, pero los resultados obtenidos de la amplificación por PCR de estos genes y las variantes fueron negativos en el 100% de las cepas estudiadas.

7.2 Amplificación de los genes conservados de integrones clase 1 (*intI1*, *qacE Δ 1* y *sul1*) en *P. aeruginosa*

En cuanto a la presencia de los genes característicos de los integrones clase 1, el 93% de las cepas presentaron *intI1* excepto los aislados Ps14 y Ps17, a estas cepas se les buscó la presencia del gen *intI2*, considerando que pudieran portar un integron clase 2; sin embargo no lo presentaron. La cepa Ps78 únicamente amplificó para *intI1*

y no para *qacEΔ1* y *sul1*. Y el 89% de las cepas amplificaron para los dos genes del extremo 3'-CS (Figura 2 y figura 3).

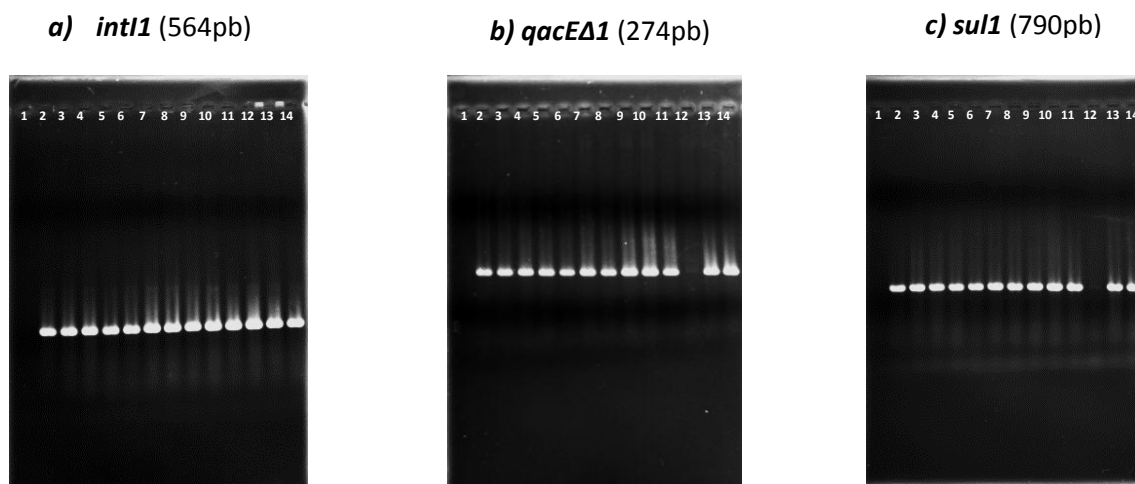


Figura 2. Amplificación de genes característicos de integrones clase 1 para las diversas cepas de estudio. Se muestran amplificadores de los genes. **a) *intl1*** (564pb) carril 1: blanco, carril 2: control positivo (Ps36), carril 3: Ps27, carril 4: Ps33, carril 5: Ps35, carril 6: Ps39, carril 7: Ps48, carril 8: Ps49, carril 9: Ps52, carril 10: Ps62, carril 11: Ps65, carril 12: Ps78, carril 13: Ps81, carril 14: Ps84. **b) *qacEΔ1*** (274pb) carril 1: blanco, carril 2: control positivo (Ps36), carril 3: Ps27, carril 4: Ps33, carril 5: Ps35, carril 6: Ps39, carril 7: Ps48, carril 8: Ps49, carril 9: Ps52, carril 10: Ps62, carril 11: Ps65, carril 12: Ps78, carril 13: Ps81, carril 14: Ps84. **c) *sul1*** (790pb) carril 1: blanco, carril 2: control positivo (Ps36), carril 3: Ps27, carril 4: Ps33, carril 5: Ps35, carril 6: Ps39, carril 7: Ps48, carril 8: Ps49, carril 9: Ps52, carril 10: Ps62, carril 11: Ps65, carril 12: Ps78, carril 13: Ps81, carril 14: Ps84.

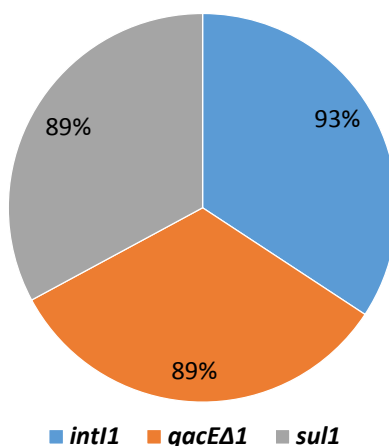


Figura 3. Porcentaje de cepas que amplificaron para los genes característicos de los integrones clase 1. A un total de 27 cepas se les determinó por PCR la presencia de los genes *intl1*, *qacEΔ1*, *sul1*.

Para determinar la estructura de los integrones se eligieron 6 cepas representativas del grupo de estudio del Hospital C.M.N. 20 de Noviembre de la Cd. de México con base al fenotipo y genotipo que presentaban; las cepas seleccionadas fueron 4 no portadoras de carbapenemasas: Ps09, Ps22, Ps39, Ps84 y 2 portadoras de carbapenemasa tipo GES: Ps52 y Ps36, a las cuales se les determinó la concentración mínima inhibitoria para los antibióticos CAZ (Ceftazidima), FEP (Cefepime), MEM (Meropenem), CIP (Ciprofloxacino), AN (Amikacina), GN (Gentamicina), con el fin de conocer los niveles de resistencia.

También se incluyeron las 2 cepas (E06 y E52) provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla debido a que presentaban resistencia a imipenem y meropenem y son portadoras del gen *imp-18*.

A las 8 cepas seleccionadas se les realizó la prueba fenotípica de detección de carbapenemasas en presencia de EDTA y APB. Como sabemos este tipo de pruebas son poco específicas, pero en ocasiones son una herramienta útil para la detección rápida de estas enzimas; sin embargo los resultados de este experimento no fueron determinantes debido a que no se observaron los halos característicos de cada prueba, por ejemplo en la cepa Ps36 con EDTA no se apreció el fenómeno conocido como "cola de pescado" o "forma de huevo" entre los tres discos y para el caso con APB se obtuvieron los halos alrededor de los discos de los antibióticos pero no la sinergia correspondiente entre ellos y el APB (Figura 4); por lo tanto es mejor comprobar la presencia de éstas enzimas por medio de técnicas moleculares.

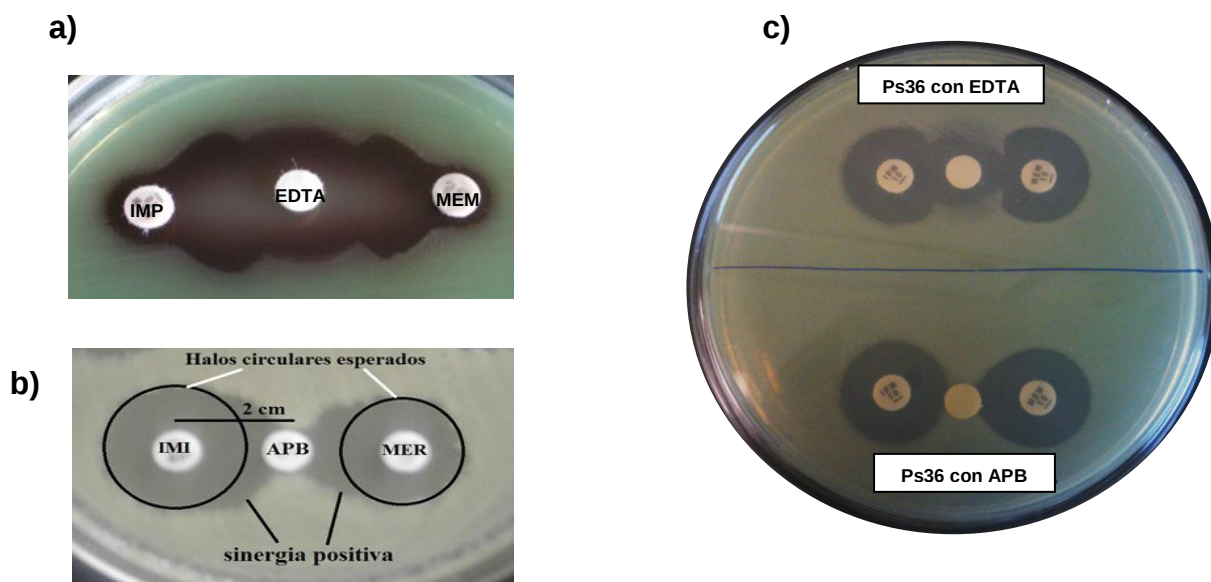


Figura 4. Prueba fenotípica para detección de metalo-β-lactamasas y carbapenemasas clase A. **a)** Resultado positivo de la prueba con EDTA y **b)** Resultado positivo de la prueba con APB las imágenes fueron tomadas de Estepa, 2014. **c)** Ejemplo de los resultados que se obtuvieron de la cepa Ps36, parte superior de la placa prueba con EDTA, parte inferior prueba con APB.

7.3 Determinación de la estructura de los integrones de algunas cepas de interés.

7.3.1 Integrones de las cepas no portadoras de carbapenemasas aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre

Como se mencionó anteriormente se eligieron 8 cepas para el estudio de integrones, 4 de ellas (Ps09, Ps22, Ps39, Ps84) debido a lo interesante de su fenotipo de resistencia y porque portaban genes como *oxa-2*, *ges-1* y *aac-(6')-Ib*, *aac-(3)-II* que han sido reportados en integrones clase 1 pero no portaban genes que estén involucrados en la resistencia a carbapenémicos y que en estudios previos se les determinaron las mutaciones en los reguladores de bombas de expulsión y se secuenció parcialmente el gen de la porina *oprD* (751pb) (Valerio, 2012; Ayala, 2013) para dar explicación a su fenotipo de resistencia (Tabla 14).

En este trabajo se determinó parcialmente la estructura de los integrones que portaban, para confirmar si había la presencia de algún gen con actividad carbapenemasa que no se hubiera logrado amplificar con los oligonucleótidos que se emplearon, y también se les determinó la CMI para cuantificar la resistencia que presentaban a los antibióticos. Los datos del fenotipo y genotipo de resistencia de estas cepas se muestran en la tabla 14, se resaltan con letras negras los obtenidos en estudios anteriores y con letras rojas los obtenidos en este trabajo. Las estructuras de los integrones encontrados se muestran en la figura 5.

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)						GENOTIPO DE RESISTENCIA	REGULADORES DE BOMBAS DE EXPULSIÓN	PORINA OprD (parcial)
					CAZ	FEP	MEM	CIP	AN	GN			
Ps09	UTI	Secreción bronquial	Junio/2007	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM*, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	256	64	32	16	128	256	<i>oxa-50 ges-1 aac-(6')-Ib aac-(3')-IIa</i>	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexT: Silvestre mexZ: Gly89Ser remoción 98-106	Inserción 167-169 Ala, Ala, Asn
Ps22	Nefrología	Urocultivo	Diciembre/2008	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM*, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	256	64	32	32	128	512	<i>oxa-50 ges-1 aac-(6')-Ib aac-(3')-IIa</i>	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexT: Remoción 77-80 Phe172Ile mexZ: Gly89Ser remoción 98-106	Inserción 167-169 Ala, Ala, Asn
Ps39	UCIA	Secreción bronquial	Febrero/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	256	64	32	16	128	512	<i>oxa-2 oxa-50 ges-1</i>	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexT: Glu154Gln Phe173Ile mexZ: Asp50Glu	Silvestre
Ps84	UCIA	Secreción bronquial	Marzo/2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	512	256	512	32	128	256	<i>oxa-2 oxa-50 ges-1 aac-(6')-Ib aac-(3')-IIa</i>	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexZ: Leu105Arg Asn153Ser	Lys103Thr Leu127Val Gln185Glu Gly186Pro Thr189Val Gln202Glu

Tabla 14. Datos obtenidos de las cepas Ps09, Ps22, Ps39, Ps84 no portadoras de carbapenemasas aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre. Se muestran las características de la resistencia de las cepas obtenidas en estudios anteriores (letras negras) y en este estudio (letras rojas).

*Sensibilidad intermedia, **UTI**: Unidad de Terapia Intensiva, **UCIA**: Unidad de cuidados intensivos para adultos

PIP: Piperacilina, **TIC**: Ticarcilina, **CB**: Carbenicilina, **TZP**: Piperacilina/Tazobactam, **TIM**: Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF**: Cefalotina, **CAZ**: Ceftazidima, **CTX**: Cefotaxima, **CRO**: Ceftriaxona, **FEP**: Cefepime, **IMP**: Imipenem, **MEM**: Meropenem, **ATM**: Aztreonam, **GM**: Gentamicina, **AN**: Amikacina, **NET**: Netilmicina, **CIP**: Ciprofloxacina, **OFX**: Ofloxacina, **NOR**: Norfloxacina, **C**: Cloranfenicol, **STX**: Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL**: Colistina. CLSI, 2013

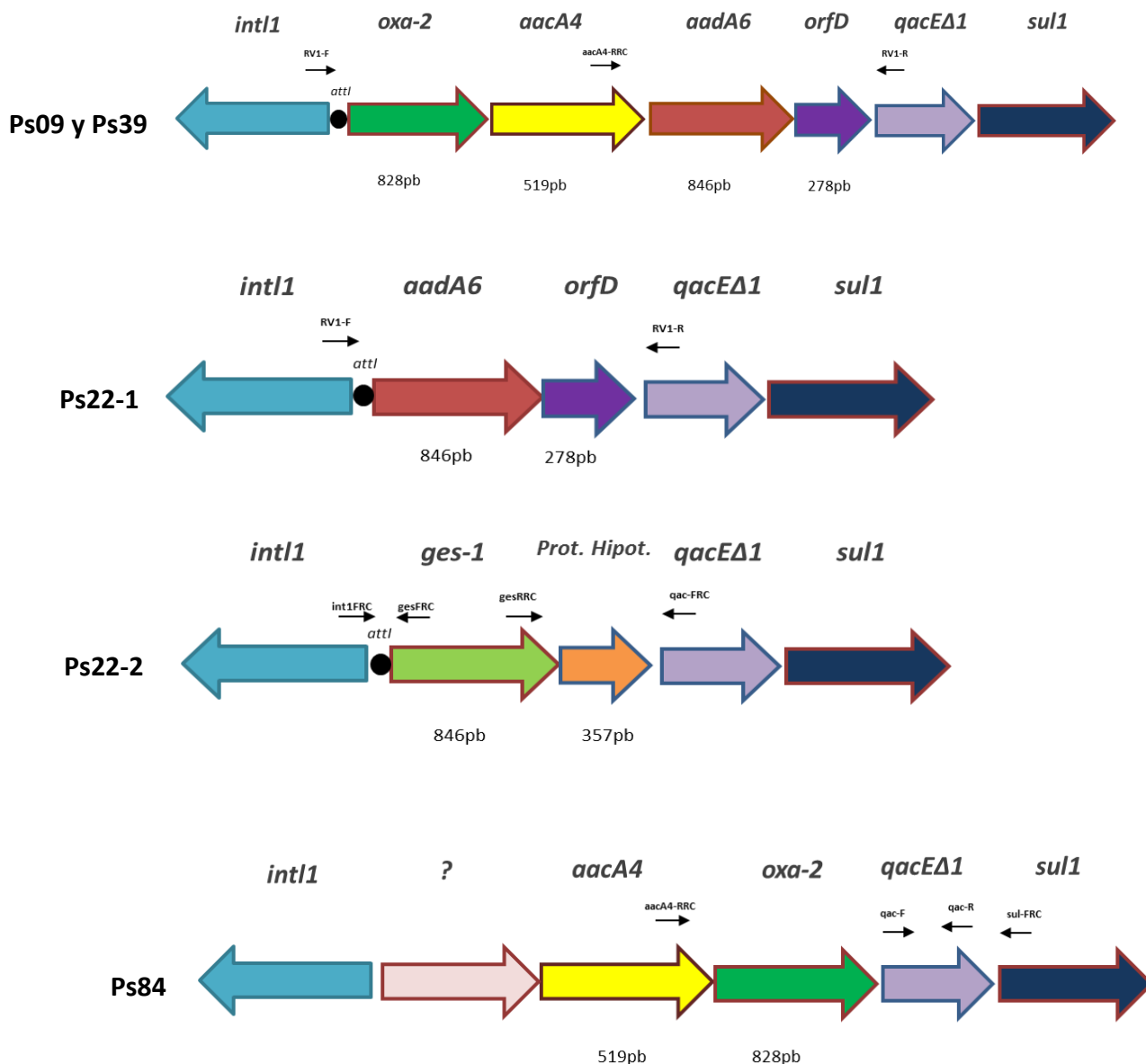


Figura 5. Esquema de los integrones encontrados en las cepas Ps09, Ps22, Ps39, Ps84 no portadoras de carbapenemasas aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre. Las flechas indican el iniciador utilizado para secuenciar. En la cepa Ps84 el signo (?) indica que no se sabe que gen pudiera estar presente entre los genes *intI1* y *aacA4* debido a que no se lograron unir las secuencias. Ps22-1 y Ps22-2 indican la estructura de los dos integrones que se determinaron en la cepa Ps22. Las secuencias parciales de los integrones se encuentran en los anexos 3-7.

7.3.2 Integrones de las cepas portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre

Otra cepa que se seleccionó para el estudio de integrones fue Ps52 debido a que se observó que presentaba un fenotipo y genotipo similar al de la cepa Ps36 portando una probable carbapenemasa tipo GES-11 (Ayala, 2013), hasta el momento reportada en un integron clase 1 de *Acinetobacter baumannii* (Moubareck y Brémont, 2009)

En este estudio se logró obtener casi en su totalidad la secuencia del integrón de la cepas Ps52 y Ps36, únicamente falta comprobar a que alelo corresponden las dos copias del gen *ges* en la estructura, ya que se observó que el producto que se obtuvo por PCR de la región variable tipo 1 corresponde por su tamaño a dos genes *ges* juntos (Figura 6). Sin embargo al realizar el análisis de las secuencias, no fue posible determinar a qué alelo correspondían debido a que los picos en el cromatograma se superponen en un nucleótido (A/G), lo que determinaría la variante del gen *ges* que se encuentra en la estructura (Anexo 8 y Anexo 9).

Es importante resaltar que en este trabajo se volvió a corroborar mediante la amplificación y secuenciación de la región variable el integrón de la cepa Ps36 reportado por Ayala, 2013, dado que el amplificado que se obtuvo en este trabajo fue similar en tamaño al encontrado en la cepa Ps52 (Figura 6). El integrón reportado por Ayala, obtenido por PCR múltiples uniendo los diferentes genes, tuvo una región variable distinta (Anexo 8), por lo que es posible que la cepa Ps36 este portando dos integrones, uno de ellos con una copia del gen *ges* y otro similar a de la cepa Ps52 portando dos genes *ges*, y que por algún motivo en este estudio no se pudo volver a determinar el reportado por Ayala, 2013 por lo que se sugiere estudiar posteriormente a esta cepa para corroborarlo.

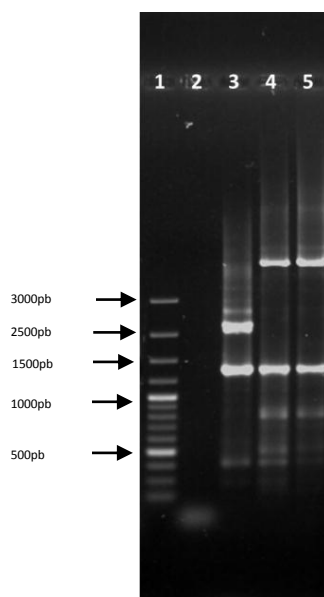


Figura 6. Amplificación de la región variable tipo 1 del integrón de las cepas Ps52 y Ps36 portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: blanco, carril 3: Ps09, carril 4: Ps52, carril 5: Ps36.

A continuación en la tabla 15 se detallan los resultados obtenidos por Ayala, 2013 y los resultados encontrados en este estudio con el fin de realizar la discusión de lo encontrado.

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)						GENOTIPO DE RESISTENCIA
					CAZ	FEP	MEM	CIP	AN	GN	
Ps52	UCIA	Secreción bronquial	Febrero 2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	512	256	512	32	128	256	<i>oxa-2</i> <i>oxa-50</i> <i>ges-11</i> <i>aac-(6)-Ib</i>
Ps36	UCIA	Punta de Catéter	Marzo 2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	512	256	256	32	128	256	<i>ges-11</i> <i>oxa-2</i> <i>oxa-50</i> <i>aac-(3)-IIa</i> <i>aac-(6)-Ib</i>

Tabla 15. Datos obtenidos de las cepas Ps52 y Ps36 portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre. Se muestran las características de resistencia de las cepas obtenidas en estudios anteriores (letras negras) y en este estudio (letras rojas). **PIP:** Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:** Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina. CLSI, 2013

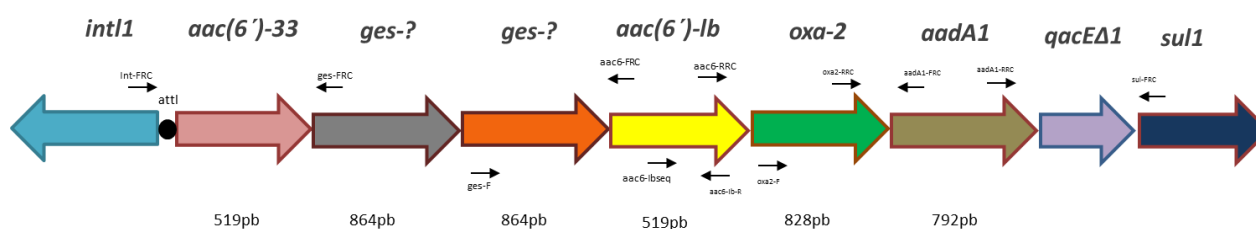


Figura 7. Esquema del integrón encontrado en las cepas Ps52 y Ps36 portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre. Las flechas indican el cebador utilizado para secuenciar la estructura del integrón. La secuencia se puede ver en el anexo 8.

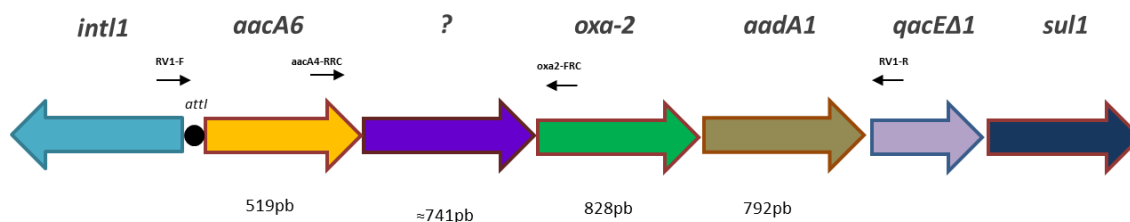
7.3.3 Integrones de las cepas portadoras de la metalo- β -lactamasa IMP-18 aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla

Se estudiaron los integrones de dos cepas que fueron aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, provienen del mismo paciente, mismo origen, pero se aislaron en diferente periodo de tiempo y portaban el gen *imp-18* (Tabla 16) (Juárez, 2014), estos datos son relevantes ya que es el primer reporte de cepas portadoras de metalo- β -lactamasas de este tipo en ese hospital. En la figura 8 se muestra el esquema de los integrones encontrados.

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	GENOTIPO DE RESISTENCIA
E06	Urología	Urocultivo	Mayo/2013	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	<i>oxa-2</i> <i>imp-18</i>
E52	C.E. M.I.	Urocultivo	Enero/2014	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, *NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	<i>oxa-2</i> <i>imp-18</i>

Tabla 16. Datos obtenidos de las cepas E06 y E52 aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla .C.E: Consulta Externa. M.I: Medicina Interna. ND: No determinado, *Sensibilidad intermedia. PIP: Piperacilina, TIC: Ticarcilina, CB: Carbenicilina, TZP: Piperacilina/Tazobactam, TIM: Ticarcilina/Ácido clavulánico, CF: Cefalotina, CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona FEP: Cefepime, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, ATM: Aztreonam, GM: Gentamicina, AN: Amikacina, NET: Netilmicina, CIP: Ciprofloxacina, OFX: Ofloxacina, NOR: Norfloxacina, C: Cloranfenicol, STX: Trimetoprim/Sulfametoxazol y CL: Colistina. CLSI, 2013 (Juárez, 2014)

E06



E52

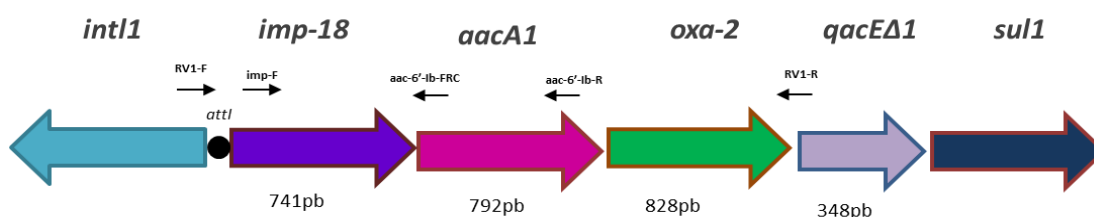


Figura 8. Esquema de los integrones encontrados en las cepas E06 y E52 aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla. Las flechas pequeñas indican el primer usado para secuenciar. El integrón de la cepa E06 se encuentra parcialmente secuenciado el signo (?) probablemente corresponda al gen *imp-18* con un peso alrededor de 741pb. Las secuencias de los integrones se muestran en los anexos 10 y 11.

7.4 Análisis de la transferencia de genes de resistencia mediante conjugación

Se realizó un ensayo de conjugación de la cepa Ps52 con el objetivo de conocer si los genes de resistencia que se encontraron en el integrón eran transferidos a otra cepa por medio de un plásmido conjugativo, para lo cual se usó la cepa Ps52 como donadora y la cepa PU21 como receptora. Se obtuvieron cuatro posibles transconjugantes mostradas en la tabla 17, a las cuales se les amplificaron los genes de resistencia que portaba el integrón, usando como control negativo la cepa receptora PU21. Posteriormente se eligió una de las cepas probable transconjugante que creció en tres antibióticos (Tc_{3A}-Ps52) y se le realizó el antibiograma por Kirby-Baüer y CMI (Tabla 18)

Cepas probables Transconjugantes	Antibióticos en los que se seleccionaron	Genes que amplificaron
T _{C₁} -Ps52	Rif+ AN	<i>int11, qacEΔ1, sul1, oxa-2, ges-11, aac-(6')-Ib</i>
T _{C_{2A}} -Ps52	Rif+MEM	<i>int11, qacEΔ1, sul1</i>
T _{C_{3A}} -Ps52	Rif+MEM+AN	<i>int11, qacEΔ1, sul1, oxa-2, ges-11, aac-(6')-Ib</i>
T _{C_{3B}} -Ps52	Rif+MEM+AN	<i>int11, qacEΔ1, sul1, oxa-2, ges-11, aac-(6')-Ib</i>

Tabla 17. Cepas probables transconjugantes de la cepa Ps52.
Rif: Rifampicina, **AN:** Amikacina, **MEM:** Meropenem

CEPA	ORIGEN	FENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (μg/mL)						GENOTIPO
			CAZ	FEP	MEM	CIP	AN	GN	
Ps52	Secreción bronquial	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	512	256	512	32	128	256	<i>oxa-2 oxa-50 ges-11 aac-(6')-Ib</i>
PU21	Cepa Receptora	CF, CTX*, CRO*, C, SXT*	8	8	2	1	16	4	ND
Tc3-Ps52	Transconjugante	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	>512	>512	>512	128	>512	>512	<i>oxa-2 oxa-50 ges-11 aac-(6')-Ib</i>

Tabla 18. Datos de las cepas Ps52, PU21 y Tc_{3A}-Ps52. ND: No determinado, *Sensibilidad intermedia. **PIP:** Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:** Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona, **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina. CLSI, 2013

Para verificar las transconjugantes, se realizó electroforesis en campos pulsados en donde se esperaba que el perfil de bandas de la transconjugante correspondiera a la cepa receptora. Los resultados indicaron que la cepa seleccionada como probable transconjugante corresponde a la cepa donadora (Ps52) por lo tanto no es transconjugante (Figura 9). Posteriormente en otra electroforesis realizada de manera simultánea en otro estudio (resultados no mostrados realizados por Juárez, 2014) se

analizó el perfil de bandas de las cepas probables transconjugantes del aislado Ps36, ensayo realizado previamente por Ayala, 2013, pero en este caso tampoco se lograron obtener transconjugantes.

7.5 Análisis genético por electroforesis en campos pulsados (PFGE)

Con la finalidad de conocer si las cepas de este estudio estaban relacionadas genéticamente se llevó a cabo PFGE y se logró observar que la cepa Ps09 y la cepa Ps39 están relacionadas genéticamente, mientras tanto las cepas Ps22, Ps84 presentaron un patrón de bandas diferente; de igual manera se les realizó la electroforesis a las dos cepas aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla (E06 y E52) y también se observó que no están relacionadas genéticamente (resultados no mostrados realizados por Juárez, 2014).

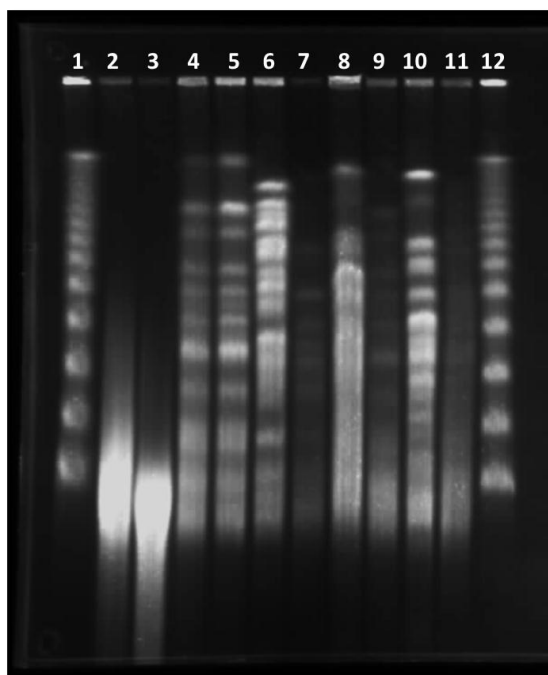


Figura 9. Resultado de la Electroforesis en Campos Pulsados de las cepas de estudio. Carril 1: marcador de peso molecular, **carril 2:** Ps36, **carril 3:** Tc-Ps36, **carril 4:** Ps52, **carril 5:** Tc_{3A}-52, **carril 6:** PU21, **carril 7:** Ps09, **carril 8:** Ps22, **carril 9:** Ps39, **carril 10:** Ps84, **carril 11:** E06, **carril 12:** marcador de peso molecular.

7.6 Genotipificación por MLST de algunas cepas de estudio

Para conocer su relación clonal, se determinó el número de Secuencia Tipo de las cepas Ps52 y Ps36 portadoras de carbapenemasa tipo GES aisladas del C.M.N. 20 de Noviembre y para las cepas E06 y E52 portadoras de IMP-18 del Hospital Regional I.S.S.S.T.E.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 19:

Cepa	Perfil alélico							ST
	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	
Ps36	13	8	9	3	1	17	15	309
Ps52	13	8	9	3	13	17	15	309
E06	13	4	5	21	12	7	15	308
E52	15	5	5	21	50	4	14	385

Tabla 19. Perfil alélico y secuencia tipo de las cepas portadoras de carbapenemasas. *acsA* (Acetil coenzima A sintasa), *aroE* (Shikimato deshidrogenasa), *guaA* (GMP sintasa), *mutL* (Proteína de reparación de DNA), *nuoD* (NADH deshidrogenasa I cadena C, D), *ppsA* (Fosfoenol piruvato sintasa), *trpE* (Componente I de antranilato sintasa). El número de secuencia tipo (ST) se obtiene introduciendo el número de alelo en la página <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.

7.7 Análisis de los reguladores de Bombas de Expulsión de la cepa Ps52

Para explicar la diferencia de CMI que presentaron las cepas Ps52 (512µg/mL) y Ps36 (256µg/mL) respecto al antibiótico meropenem y a la estructura del integron encontrado en ambas cepas, se decidió realizar análisis de los reguladores de bombas de expulsión de la cepa Ps52, debido a que los reguladores de bombas de la cepa Ps36 ya se habían estudiado por Ayala 2013. Se obtuvo que la cepa Ps52 porta dos de los cuatro reguladores de bombas buscados, *mexR* el cual presentó una mutación en Val126Glu y para el caso de *nfxB* fue silvestre (Anexo 12) los resultados obtenidos se muestran en la tabla 20.

7.8 Análisis del gen codificante de la porina *OprD* de las cepas Ps52 y Ps36

Otro mecanismo involucrado en la resistencia a carbapenémicos son los cambios que puede presentar la porina OprD, por lo tanto también se analizó el gen que la codifica para determinar posibles mutaciones. El gen de la porina de la cepa Ps52 no se obtuvo completo, debido a que no se logró amplificar al usar los iniciadores delanteros externos por lo que únicamente se obtuvieron 1134pb de 1332pb, que al traducirla esta corresponde a 377 aminoácido de 443 que tiene la cepa control y se observaron 37 cambios en la secuencia: V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, L279W, A280P, A281Q, K296Q, Q301E, D304G, Y305L, I306H, G307R, R310E, N311T, G312V, S313P, A315G, L347M, M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, K380Y, N381A, Y382G, G383L, S403A, Q424E y 2 deleciones ($\Delta 378G$ y $\Delta 379Y$) con respecto a la cepa control PAO1 número en GenBank GI:110645304 (Tabla 20 y Anexo 13).

De la cepa Ps36 se volvió a secuenciar con otros iniciadores para obtener el gen completo dado que solo se contaba con una parte (Ayala, 2013) y se obtuvieron 1321pb correspondientes a 429 aminoácidos. La cepa estudiada presentó 30 cambios aminoácidos: S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, A315G, L347M, M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, K380Y, N381A, Y382G, G383L, S403A, Q424E y 2 deleciones: $\Delta 378G$ y $\Delta 379Y$ (Tabla 20 y Anexo 14).

La cepa Ps52 presentó nueve cambios aminoácidos más que la cepa Ps36 (L279W, A280P, D304G, Y305L, I306H, G307R, N311T, G312V, S313P) siete de ellos (del aminoácido 304-313) localizados en el *loop* 6 de la porina (Tabla 20) por lo que se tuvo la inquietud de realizar el modelo tridimensional de las proteínas para apreciar los cambios (Figuras 10 y 11), encontrando que la conformación de la proteína se ve afectada en cuanto a la disposición espacial de los dominios con respecto a la PAO1 (GI:110645304), lo que pudiera dar como consecuencia una interacción diferente con las moléculas de los antibióticos carbapenémicos, se sugiere realizar un estudio más detallado acerca de estas modificaciones y su repercusión en la función de la proteína.

CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)						ST	GENOTIPO DE RESISTENCIA	CONFORMACIÓN DEL INTEGRÓN	REGULADORES DE BOMBAS DE EXPULSIÓN	PORINA OprD
					CAZ	FEP	MEM	CIP	AN	GN					
Ps52	UCIA	Secreción bronquial	Febrero 2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	512	256	512	32	128	256	309	oxa-2 oxa-50 ges-11 aac-(6)-Ib	Int1 aac-(6)-33 ges-? ges-? aac-(6)-Ib oxa-2 aadA1 qac sul	mexR: Val126Glu nfxB: Silvestre	Loop 1: NA Loop 2: SC Loop 3: SC Loop 4: E230K Loop 5: N262T Loop 6: D304G, Y305L, I306H, G307R, R310E, N311T, G312V, A315G Loop 7: M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379, K380Y, N381A, Y382G, G383L Loop 8: Q424E
Ps36	UCIA	Punta de Catéter	Marzo 2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	512	256	256	32	128	256	309	ges-11 oxa-2 oxa-50 aac-(3)-IIa aac-(6)-Ib	Int1 aac-(6)-33 ges-11 ges-? aac-(6)-Ib oxa-2 aadA1 qac sul	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexT: Remoción 77-80 Glu154Gln Inserción 165 Arg Phe173Ile mexZ: Asp73 Glu Leu138Arg	Loop 1: S57E, S59R Loop 2: V127L Loop 3: E185, P186G, V189T Loop 4: E230K Loop 5: N262T Loop 6: R310E, A315G Loop 7: M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379 Loop 8: Q424E

Tabla 20. Datos generales obtenidos de las cepas Ps52 y Ps36. UCIA: Unidad de Cuidados Intensivos Adultos. *Sensibilidad intermedia. **PIP:** Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **CB:** Carbenicilina, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ácido clavulánico, **CF:** Cefalotina, **CAZ:** Ceftazidima, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona **FEP:** Cefepime, **IMP:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **ATM:** Aztreonam, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NET:** Netilmicina, **CIP:** Ciprofloxacina, **OFX:** Ofloxacina, **NOR:** Norfloxacina, **C:** Cloranfenicol, **STX:** Trimetoprim/Sulfametoxazol y **CL:** Colistina. CLSI, 2013. **NA:** No amplificado, **SC:** Sin cambios. En color azul se señalan las diferencias de CMI para el antibiótico meropenem entre ambas cepas.

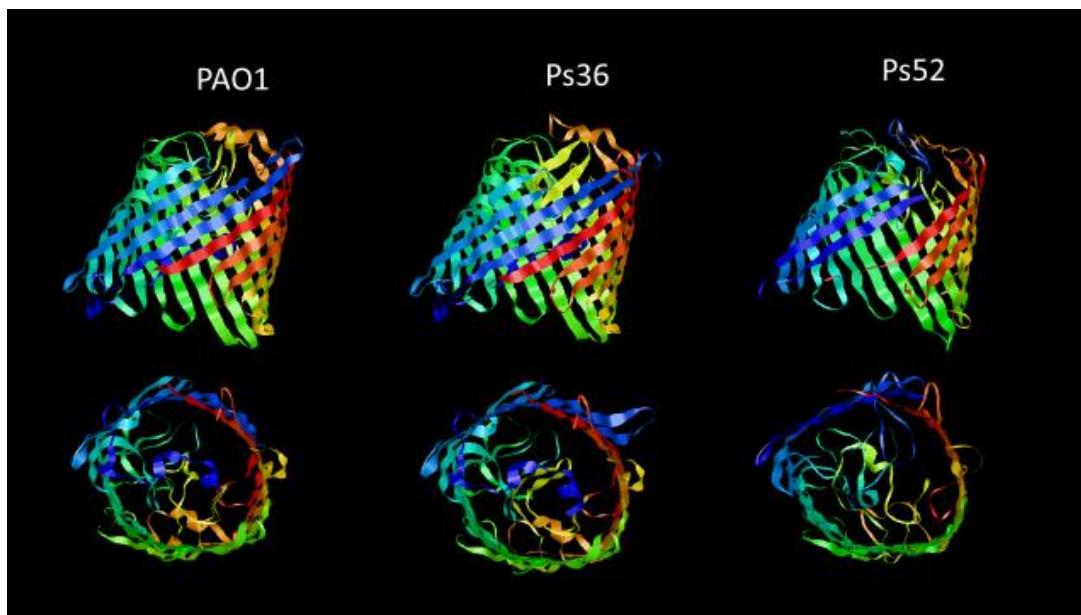


Figura 10. Modelado de proteína de la porina OprD de las cepas PAO1, Ps36 y Ps52. En la cepa Ps36 se observa una ligera amplitud en el poro y los dominios (amarillo y azul) sobresalen de la estructura con respecto a la cepa control PAO1(GI:110645304). En la cepa Ps52 se aprecia la interacción del dominio color verde en el interior de la porina y la falta del dominio color naranja, que posiblemente corresponde a los aminoácidos que no se pudieron obtener. El modelo fue realizado con el programa Protein Homology/analogYRecognition Engine V 2.0 y se visualizó en el programa RasWin Molecular Graphics versión 2.7.4.2.

Para tratar de visualizar mejor las diferencias que presentaban las porinas, se realizó el modelaje de las tres proteínas en un solo esquema para poder compararlas (Figura 11).

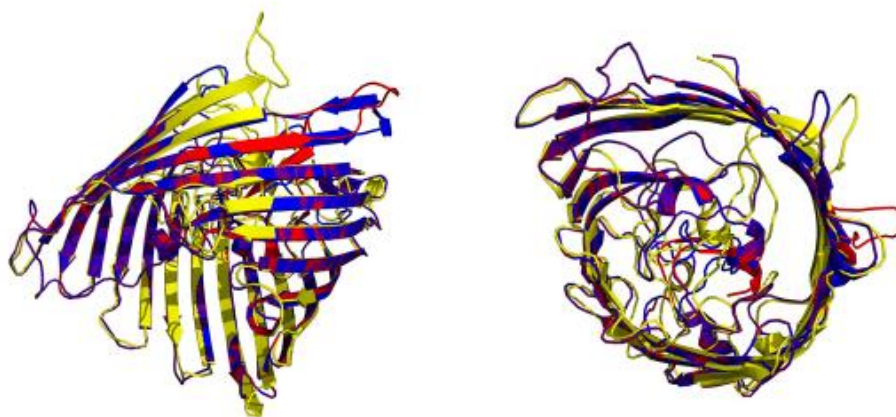


Figura 11. Modelo de comparación de las porinas estudiadas. El código de colores indica la estructura de las proteínas PAO1: azul, Ps36: rojo, Ps52: amarillo. Tamaño del poro superior 30.4Å tamaño del poro inferior 40.4Å. Se aprecia que al interior del poro los dominios de la cepa Ps52 presentan diferente disposición a comparación de las cepas PAO1 y Ps36. El modelo fue realizado en el programa PyMOL Molecular Graphics Sistem versión 1.7.2. con ayuda del M.C.B. Sergio Romero Romero, UNAM.

En la tabla 21 se resumen las características de las cepas de estudio así como los diferentes mecanismos de resistencia que presentan.

CLASIFICACIÓN	CEPA	SERVICIO	ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	FENOTIPO DE RESISTENCIA	CMI (µg/mL)						ST	GENOTIPO DE RESISTENCIA	CONFORMACIÓN DEL INTEGRÓN	REGULADORES DE BOMBAS DE EXPULSIÓN	PORINA OprD
						CAZ	FEP	MEM	CIP	AN	GN					
NO PORTADORAS DE CARBAPENEMASAS	Ps09	UTI	Secreción bronquial	Junio 2007	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM*, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	256	64	32	16	128	256	ND	<i>oxa-50</i> <i>ges-1</i> <i>aac-(6')-Ib</i> <i>aac-(3')-IIa</i>	<i>intI1</i> <i>oxa-2</i> <i>aacA4</i> <i>aadA6</i> <i>qacEΔ1</i> <i>sul1</i>	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexT: Silvestre mexZ: Gly89Ser remoción 98-106	Inserción 167-169 Ala, Ala, Asn
	Ps22	Nefrología	Urocultivo	Diciembre 2008	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM*, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	256	64	32	32	128	512	ND	<i>oxa-50</i> <i>ges-1</i> <i>aac-(6')-Ib</i> <i>aac-(3')-IIa</i>	*Porta dos integrones <i>intI1/intI1</i> <i>aadA6/ges1</i> <i>orfD/Prot.hipot.</i> <i>qacEΔ1/qacEΔ1</i> <i>sul1/sul1</i>	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexT: Remoción 77-80 Phe172Ile mexZ: Gly89Ser remoción 98-106	Inserción 167-169 Ala, Ala, Asn
	Ps39	UCIA	Secreción bronquial	Febrero 2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	256	64	32	16	128	512	ND	<i>oxa-2</i> <i>oxa-50</i> <i>ges-1</i>	<i>intI1</i> <i>oxa-2</i> <i>aacA4</i> <i>aadA6</i> <i>qacEΔ1</i> <i>sul1</i>	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexT: Glu154Gln Phe173Ile mexZ: Asp50Glu	Silvestre
	Ps84	UCIA	Secreción bronquial	Marzo 2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	512	256	512	32	128	256	ND	<i>oxa-2</i> <i>oxa-50</i> <i>ges-1</i> <i>aac-(6')-Ib</i> <i>aac-(3')-IIa</i>	<i>intI1</i> ? <i>aacA4</i> <i>oxa-2</i> <i>qacEΔ1</i> <i>sul1</i>	mexR: Val126Glu nfxB: silvestre mexZ: Leu105Arg Asn153Ser	Lys103Thr Leu127Val Gln185Glu Gly186Pro Thr189Val Gln202Glu
PORTADORAS DE CARBAPENEMASA TIPO GES	Ps52	UCIA	Secreción bronquial	Febrero 2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	512	256	512	32	128	256	309	<i>oxa-2</i> <i>oxa-50</i> <i>ges-11</i> <i>aac-(6')-Ib</i>	<i>intI1</i> <i>aac-(6')-33</i> <i>ges-?</i> <i>ges-?</i> <i>aac-(6')-Ib</i> <i>oxa-2</i> <i>aadA1</i> <i>qacEΔ1</i> <i>sul1</i>	mexR: Val126Glu nfxB: Silvestre	Loop 1: NA Loop 2: SC Loop 3: SC Loop 4: E230K Loop 5: N262T Loop 6: D304G, Y305L, I306H, G307R, R310E, N311T, G312V, A315G Loop 7: M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379, K380Y, N381A, Y382G, G383L Loop 8: Q424E

	Ps36	UCIA	Punta de Catéter	Marzo 2009	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	512	256	256	32	128	256	309	<i>ges-11</i> <i>oxa-2</i> <i>oxa-50</i> <i>aac-(3')-IIa</i> <i>aac-(6')-Ib</i>	<i>intI1</i> <i>aac-(6')-33</i> <i>ges-?</i> <i>ges-?</i> <i>aac-(6')-Ib</i> <i>oxa-2</i> <i>aadA1</i> <i>qacED1</i> <i>sul1</i>	Val126Glu nfxB: silvestre mexT: Remoción 77-80 Glu154Gln Inserción 165 Arg Phe173Ile mexZ: Asp73 Glu Leu138Arg	Loop 1: S57E, S59R Loop 2: V127L Loop 3: E185, P186G, V189T Loop 4: E230K Loop 5: N262T Loop 6: R310E, A315G Loop 7: M372V, S373D, D374S, N375S, N376S, V377S, Δ378, Δ379 Loop 8: Q424E
PORTADORAS DE METALO-β-LACTAMASA IMP-18	E06	Urología	Urocultivo	Mayo 2013	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT, CL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	308	<i>oxa-2</i> <i>Imp-18</i>	<i>intI1</i> <i>aacA6</i> <i>?</i> <i>oxa-2</i> <i>aadA1</i> <i>qacED1</i> <i>sul1</i>	ND	ND
	E52	C.E. M.I.	Urocultivo	Enero 2014	PIP, TIC, CB, TZP, TIM, CF, CAZ, CTX, CRO, FEP, IMP, MEM, ATM, GM, AN, *NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	385	<i>oxa-2</i> <i>Imp-18</i>	<i>intI1</i> <i>imp-18</i> <i>aacA1</i> <i>oxa-2</i> <i>qacED1</i> <i>sul1</i>	ND	ND

Tabla 21. Resumen de las características de las cepas de estudio y sus mecanismos de resistencia. UTI: Unidad de Terapia Intensiva/Intermedia. UCIA: Unidad de Cuidados Intensivos Adultos. C.E.: Consulta externa. M.I.: Medicina interna. ND: No determinado. SC: Sin cambios ST: Secuencia Tipo. *Intermedio. PIP: Piperacilina, TIC: Ticarcilina, CB: Carbenicilina, TZP: Piperacilina/Tazobactam, TIM: Ticarcilina/Ácido clavulánico, CF: Cefalotina, CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona FEP: Cefepime, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, ATM: Aztreonam, GM: Gentamicina, AN: Amikacina, NET: Netilmicina, CIP: Ciprofloxacina, OFX: Ofloxacina, NOR: Norfloxacin, C: Cloranfenicol, STX: Trimetoprim/Sulfametoxazol y CL: Colistina . CLSI, 2013

8. DISCUSIÓN

Se analizaron 27 cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes en su mayoría aisladas de secreciones bronquiales coincidiendo con los reportes a nivel mundial, donde la bacteria se asocia a infecciones de tracto respiratorio provocando neumonías asociadas a ventilador y también afectando a pacientes con fibrosis quística (Pitt y Sparrow, 2001), alarmantemente el 85% fué resistente a carbapenémicos y el 19% mostró resistencia a colistina fármaco usado como última elección para tratar infecciones de bacterias multirresistentes, lo que disminuye las opciones terapéuticas efectivas.

Es importante recalcar que en estudios previos únicamente se encontró que el 59% de las 27 cepas estudiadas portan *ges-1*, 7% *ges-11*, 4% *oxa-1*, 70% *oxa-2*, 100% *oxa-50*, 59% *aac-(3')-IIa*, 48% *acc-(6')-Ib*, y se ha visto que no son productoras de metalo- β -lactamasas que son frecuentemente encontradas a nivel mundial en *P. aeruginosa*, ni tampoco de serín- β -lactamasas con actividad carbapenemasa como KPC ó GES (excepto en dos cepas se encontró probable GES-11, GES-19/GES-20) (Martínez, 2011; Valerio, 2012; Ayala, 2013). Las enzimas de tipo GES han sido encontradas en diversos géneros bacterianos, entre los más comunes están *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, generalmente son acarreadas por integrones aunque también se ha visto que pueden estar presentes en el cromosoma; se encuentran registradas 26 variantes de este gen, que típicamente son β -lactamasas de espectro extendido que hidrolizan cefalosporinas y aztreonam, sin embargo algunas variantes presentan una actividad carbapenemasa (GES- 2, 4, 5, 6, 11, 12, 20)(Poirel *et al.*, 2001; Lee y Jeong, 2005; Barrios *et al.*, 2012, Garza-Ramos *et al.*, 2014) y se han reportado en varios países de Europa, Asia, América y África (Bogaerts *et al.*, 2010).

El 70% de las 27 cepas estudiadas se detectó la oxacilinasasa OXA-2 (Ayala, 2013) que hidroliza cefalosporinas de 3^a. y 4^a generación y ha sido identificada a menudo en *A. baumannii*, *P.aeruginosa*, *S. typhimurium*, *M. morgani*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Bordetella bronchiseptica*, en los países de Serbia, Francia, Uruguay, Argentina asociadas muy frecuentemente a integrones clase 1 (Poirel *et al.*, 2010)

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) específicamente acetilasas se detectaron en más del 40% de las 27 de las cepas de estudio (Ayala, 2013), estas enzimas modifican principalmente gentamicina, amikacina, tobramicina, netilmicina y de acuerdo a lo reportado en la bibliografía la presencia de EMAs se ha asociado con las estructura de diversos integrones clase 1, clase 2 y recientemente en clase 3 en diferentes géneros bacterianos (Shaw *et al.*, 1993; Mazel, 2006).

Debido a que el fenotipo de resistencia, no estaba completamente explicado en algunas de las cepas, en este trabajo se procedió a hacer la determinación de otros genes de resistencia de tipo *tem*, *shv*, *ctx*, *per*, *bel* y variantes de los genes *vim*, *imp*, y *ndm* que pudieran estar actuando simultáneamente con los genes de resistencia que ya se habían determinado en estudios previos realizados por Martínez, 2011; Valerio, 2012 y Ayala, 2013; obteniéndose como resultado que las cepas no son portadoras de las variantes de β -lactamasas buscadas en este estudio.

Diversos estudios sugieren que la resistencia a antibióticos carbapenémicos pudiera estar atribuida a diversos mecanismos, y debido a que no se había logrado amplificar algún gen que pudiera estar confiriéndoles la resistencia a β -lactámicos sobre todo a carbapenémicos, se decidió estudiar los integrones clase 1, ya que como se sabe son estructuras que capturan y acarrean diversos genes de resistencia (Carattoli *et al.*, 2001).

De las 27 cepas estudiadas el 93% presentó *intl1*, 89% *qacE Δ 1*, 89% *sul1*. Las cepas Ps14 y Ps17 no presentaron los genes característicos de integrones clase 1 y tampoco el gen *intl2* por lo tanto se sugiere buscar otro tipo de integrasa que pudiera estar presente. La cepa Ps78 únicamente porta *intl1* pero carece de los genes característicos del extremo (3'-CS) de los integrones comunes, cabe mencionar que estas estructuras carentes del extremo (3'-CS) han sido reportadas como parte de transposones en cepas de *E. coli*, *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *C.*

youngae, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Ploy *et al.*, 2000; Sáenz *et al.*, 2010; Tato *et al.*, 2010).

Todos los aislados restantes (24) amplificaron tanto para el extremo (5'-CS) como el (3'-CS), sin embargo para tener un panorama más amplio de la variedad de integrones que pudieran portar la cepas sería conveniente estudiar los diferentes genes *intl2*, *intl3*, *sul2*, *sul3* y *qacH*; que conforman otra clase de integrones ó que pudieran dar indicios de que forman parte de transposones.

Para conocer la estructura de la región variable de los integrones se seleccionaron cepas representativas del grupo, con base al fenotipo y genotipo de resistencia que se había determinado en estudios previos (Martínez, 2011; Valerio, 2012; Ayala, 2013).

De las cepas que no portaban genes de resistencia a carbapenémicos buscados, las cepas Ps09 y Ps39 seleccionadas se encontro que están relacionadas genéticamente y fueron obtenidas de cultivos de secreciones bronquiales, en diferente periodo de tiempo (2007 y 2009); portan el mismo integrón en cuya estructura no se encontró presente el gen *ges-1*; la cepa Ps09 porta tres genes de EMAS (*aac-(6')-Ib*, *aac-(3')-IIa* y *aadA6*) y presentó menor CMI para el antibiótico gentamicina (GN) (256µg/mL) a comparación de la cepa Ps39 (512 µg/mL); no obstante la cepa Ps39 presentó diferentes mutaciones en los reguladores de bombas de expulsión *mexT* (Glu154Gln, Phe173Ile) y *mexZ* (Asp50Glu). Generalmente los cambios en *mexT* se asocian a resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Llanes *et al.*, 2011) pero en este caso no se ve reflejado en la CMI de ciprofloxacina (16 µg/mL) ya que en ambas cepas fué igual. Para explicar el fenotipo de resistencia de estas cepas hacia meropenem (32µg/mL), debido a que no portan carbapenemasas, en la cepa Ps09 se puede atribuir a las inserciones que presentó el gen de la porina *OprD*, pero se sugiere llevar acabo el análisis completo del gen, ya que se cuenta con las secuencias parciales, para confirmar si esta involucrado en la sensibilidad disminuida al carbapenémico, en las dos cepas como se ha reportado en diversos estudios (Eren *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014).

La cepa Ps22 no tiene relación genética con las cepas estudiadas, fue aislada en un año diferente a las demás (2008) y obtenida de un urocultivo; esta cepa porta dos integrones diferentes, uno acarreado el gen *ges-1* y una proteína hipotética y el otro conteniendo el gen de adenilasa *aadA6* seguida de *orfD*. Curiosamente presenta un genotipo y fenotipo similar al de la cepa Ps09, sin embargo al igual que la cepa Ps39 tiene una CMI para gentamicina de (512 µg/mL), pero presentó un incremento para el antibiótico ciprofloxacina (32 µg/mL) lo que pudiera ser explicado por las mutaciones que presenta en los reguladores *mexT* (remoción 77-80, Phe172Ile) y *mexZ* (Gly89Ser, remoción 98-106). Ps22 y Ps09 presentaron los mismos cambios aminoacídicos en la secuencia parcial de la porina OprD dando como resultado el mismo fenotipo para meropenem (32 µg/mL) sin embargo en este caso también se sugiere estudiar la secuencia completa del gen de la porina *OprD*.

La cepa Ps84 presentó un patrón de bandas en PFGE diferente a las demás cepas no portadoras de carbapenemasas, fue aislada en 2009 de una secreción bronquial; no se pudo determinar la estructura completa de su integron debido a que no se logró unir el gen de integrasa *intI1* al gen casete *aacA4* por lo que tal vez la estructura no es común y pudiera tener cambios en el arreglo de los genes, como los reportados por (Bonnin, 2013) en donde los genes se encuentran en sentido inverso 3'-5' o formando parte de transposones más complejos, por lo que se propone estudiar este tipo de elementos. Es resistente a colistina y presentó elevadas CMI para los antibióticos CAZ (512 µg/mL), FEP (256 µg/mL) a diferencia de las que presentaron las cepas Ps09, Ps22 y Ps39 (CAZ: 256 µg/mL y FEP: 64 µg/mL) atribuible posiblemente a las enzimas OXA o a algún otro gen que pudiera estar presente en la secuencia faltante del integrón. Únicamente se detectaron tres reguladores de bombas de expulsión de los cuales *mexZ* tuvo dos mutaciones (Leu105Arg, Asn153Ser) lo que explicaría probablemente la resistencia a quinolonas y aminogucósidos asociado a la presencia de las EMA. Es altamente resistente a MEM (512 µg/mL) probablemente debido a las seis mutaciones que presentó en la porina OprD (Lys103Thr, Leu127Val, Gln185Glu,

Gly186Pro, Thr189Val, Gln202Glu), por lo que sería interesante secuenciar todo el gen para analizar su estructura. (Li, *et al.*, 2012; Ochs *et al.*, 2000).

En cuanto a las cepas portadoras de carbapenemasas Ps52 y Ps36 es de suma importancia mencionar que fueron aisladas el mismo año (2009), del mismo servicio hospitalario, diferente paciente y distinto origen de muestra; y presentaban semejante fenotipo de resistencia excepto para imipenem; mediante la genotipificación por MLST se observó que comparten idéntico número de secuencia tipo ST309, lo que las hace estar relacionadas genéticamente, este número de secuencia tipo ha sido reportado por Koutsogiannou *et al.*, 2013 en Grecia provenientes de cepas hospitalarias que eran portadoras de genes *vim-1* y *vim-2*, lo que evidencia que siendo la misma clona pueden presentar distintos genes de resistencia.

Se sabía en un inicio que las cepas Ps52 y Ps36 portaban probablemente la carbapenemasa GES-11 acarreada en un integron similar, con extremos conservados, sin embargo al analizar las secuencias que se obtuvieron de las diferentes PCR durante el "*primer walking*" se observó en el cromatograma que en el nucleótido (493) que corresponde al gen *ges* se aprecian dos picos solapados (A/G), lo que pudiera indicar que son dos variantes diferentes del gen que podrían corresponder a GES-19 y/o GES-20 y no a GES-11. Al realizar la amplificación de la región variable se presume que efectivamente se pudiera tratar de dos copias del gen *ges* en tándem como lo reportado por (Viedma *et al.*, 2009; Barrios *et al.*, 2012; Garza-Ramos *et al.*, 2014).

Hasta 2012 habían reportados en la bases de datos "Integrall" dos integrones portadores de *ges* en tándem con estructura similar, el primero al que se le asignó el nombre In647 (*aac*-(6')-33, *ges*-1/*ges*-5, *aacA4*, *oxa*-2, *qacH*, *aadA1*) encontrado en el cromosoma de *P. aeruginosa* ST235 aislada de un hospital español (Viedma *et al.*, 2009) y el otro nombrado In724 (*aac*-(6')-33, *ges*-19/*ges*-20, *aacA4*, *oxa*-2, *qacH*, *aadA1*) transportado por un plásmido conjugativo de 40Kb encontrado en *K.pneumoniae* y *E.coli* aisladas de hospitales mexicanos en el periodo 2005-2009, (Barrios *et al.*, 2012), Si el integron encontrado en este

trabajo estuviera conformado por *ges-19/ges-20*, aun así muestra diferencias con los otros integrones porque In724 porta el gen *qacH* entre los genes *oxa-2* y *aadA1*. En un estudio reciente publicado por Garza-Ramos *et al.*, 2014, realizado en cinco hospitales mexicanos se describen cepas de *P. aeruginosa* portando integrones con esta peculiar duplicación en tándem GES-19/GES-20 y hacen mención de dos nuevos integrones encontrados, In768 (*aacA42*, *ges-19/ges-20*, *aacA4*, *oxa-2*, *addA1*) y el otro In783 (*aacA42*, *ges-19/ges20*, *aadA1*), que se diferencian del encontrado en este trabajo por contener *aacA42*.

Para poder determinar la variante del gen *ges* que conforma el integron y la posible duplicación, se siguió la metodología empleada por Barrios y colaboradores, sin embargo no se obtuvieron resultados que nos permitieran confirmarlo, debido a que no se visualizó claramente el perfil de restricción, por lo que es importante continuar con el estudio para poder corroborar la variante del gen *ges* y obtener la estructura del integrón completa ya que este arreglo de genes casete es nuevo no ha sido reportado y sería importante ingresarla a la base de datos "Integrall" y al GenBank.

Los resultados del ensayo de conjugación que se realizó en este trabajo para la cepa Ps52 y por Ayala, 2013 para la cepa Ps36, evidencian que al no haber obtenido transconjugantes, posiblemente el integrón no se encuentre en un plásmido conjugativo, por lo que se sugiere extraer el plásmido para verificar su localización.

Como se ha mencionado la resistencia a diferentes antibióticos y en especial a carbapenémicos no puede ser atribuida únicamente a la presencia de enzimas β -lactamasas, sino también a otros mecanismos presentes en *P. aeruginosa* como la sobreexpresión de bombas de eflujo debido a mutaciones en los genes reguladores de sus operones. La sobreexpresión de MexAB-OprM (*mexR*) se sabe que afectan la eficacia de meropenem pero no la de imipenem, MexCD-OprJ (*nfxB*) y MexXY-OprM (*mexZ*) también pueden estar involucradas en la reducción de la susceptibilidad a meropenem (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009; Bambeke, *et al.*, 2013).

El estudio de las mutaciones en los reguladores de bombas de eflujo de las dos cepas portadoras de carbapenemasa tipo GES, se realizó para explicar la diferencia en la CMI a Meropenem entre las cepas Ps52 (512µg/mL) y Ps36 (256µg/mL), porque el fenotipo para los antibióticos CAZ, FEP, CIP, AN y GN resultó igual para ambas; encontrando que la cepa Ps52 tiene solo dos de los cuatro reguladores buscados, *mexR* en el cual se encontró el cambio de Val126Glu, que ha sido frecuentemente reportado pero no tiene repercusión significativa en la función de la bomba (Henrichfreise *et al.*, 2007) mientras que *nfxB* fue silvestre, estos resultados corresponden también a los de cepas Ps36 pero también a los de las cepas Ps09, Ps22, Ps39 y Ps84 reportados por Ayala, 2013; sin embargo la cepa Ps36 también presentó cambios en los reguladores *mexT* y *mexZ* generalmente asociados con la resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, pero no a carbapenémicos (Llanes *et al.*, 2011) .

Otro mecanismo de resistencia que presenta *P.aeruginosa* hacia los carbapenémicos es a través de inserciones, deleciones ó por la pérdida de la porina OprD. OprD es una porina de membrana externa, sustrato específica, que permite la difusión de aminoácidos básicos, pequeños péptidos e imipenem en la célula (Hancock y Brinkman, 2002). Es una proteína de 443 aminoácidos compuesta de 8 loops de los cuales se ha propuesto que L2 y L3 están implicados en la unión específica a imipenem, mientras que el acortamiento por delección de únicamente dos aminoácidos del L7 (llamado Loop 7-corto) produce la apertura del canal permitiendo la entrada de meropenem (Epp *et al.*, 2001) y también se ha reportado que la supresión de L5, L7, L8 produce el aumento de la susceptibilidad a β -lactámicos, quinolonas, cloranfenicol y tetraciclina, indicando que estos loops probablemente aumentan la acumulación intracelular de algunos antibióticos (Li *et al.*, 2012).

Para la cepa Ps52 es importante señalar que no se logró amplificar por completo el gen de la porina *oprD* debido a que no se obtuvo producto de PCR con los iniciadores delanteros externos, por lo que se puede sospechar que tiene cambios sustanciales al inicio del gen o en estructuras adyacentes, posiblemente debido a

esto, la cepa mostró mayor CMI para el antibiótico meropenem (512 µg/mL) en comparación al punto de corte de la cepa Ps36 (256 µg/mL), además de que presentó nueve mutaciones más; siete de ellas afectando el *loop* 6. En el modelaje de las proteínas se apreció que la amplitud del canal superior e interior no son diferentes con respecto a la cepa control PAO1, pero al analizar las interacciones de los dominios en el interior del poro se observó que los dominios de la cepa Ps52 se pliegan más que los de las otras cepas, siendo que se puede ver afectada la interacción con el antibiótico meropenem impidiendo que entre y hagan su efecto. Para corroborar que la susceptibilidad a imipenem se ve afectada, se sugiere realizar la CMI para este antibiótico así como efectuar ensayos (*in silico*) de modelaje de las proteínas y *docking* molecular para analizar si todos los cambios presentes en los diferentes loops afectan la entrada a la célula de antibióticos carbapenémicos y de otras familias (Epp *et al.*, 2001; Eren *et al.*, 2012, Eren *et al.*, 2013)

En cuanto a las dos cepas estudiadas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla: E06 y E52 se decidió incluirlas en el estudio debido a que portaban el gen *imp-18* que codifica para una metalo-β-lactamasa, siendo este el primer reporte de esta enzima localizada en cepas aisladas de ese hospital y en el estado de Puebla. Estas cepas de fueron aisladas del mismo paciente, mismo origen de muestra, pero en diferente periodo de tiempo (2013 y 2014 respectivamente); durante la estancia en la Universidad de la Rioja se logró obtener la secuencia tipo de las cepas así de como la estructura de los integrones que portan.

Si bien estas cepas fueron aisladas del mismo paciente no tienen relación genética; la cepa E06 (resistente a colistina) pertenece a la secuencia tipo ST308 reportada en los países de Francia, China y Colombia, portando genes *kpc-2*, *imp-13*, *imp-45* (Cuzon *et al.*, 2011; Milan *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014) y la cepa E52 fué ST385 reportada en muestras de origen ambiental, animal y de pacientes con fibrosis quística en Australia (Kidd *et al.*, 2012) resultados que nos indican que ha habido una gran diseminación de clonas a nivel mundial y que además han logrado adquirir diversos genes de resistencia. El integrón de la cepa E06 se tiene

parcialmente secuenciado, está conformado por los extremos conservados y la región variable consta de dos genes que codifican para EMAs y un gen de *oxa-2*, pese a que no se ha determinado la región entre *aacA6* y *aadA1* presumiblemente en este segmento pudiera estar presente el gen *imp-18*. El integrón de la cepa E52 está completamente secuenciado y presenta los extremos conservados, pero una región variable diferente al de la cepa E06, está constituido por los genes *imp-18*, *aacA1* y *oxa-2*. Ambas estructuras, aún cuando una no está totalmente secuenciada, hasta lo que se tiene se puede decir que no han sido reportadas, siendo una aportación importante y se espera que al terminirlas, se ingresen a la base de datos del Genbank, puesto que sólo existen seis integrones de *P. aeruginosa* (In133, In706, In707, In98, In96, In169) con esta metalo- β -lactamasa que han sido reportados en Estados Unidos, Puerto Rico y México (Borgianni *et al.*, 2011; Hanson *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2012; Sánchez-Martínez *et al.*, 2010). Para tener un estudio global de los mecanismos de resistencia que presentan estas dos cepas, se sugiere continuar con el estudio de mutaciones en los reguladores de bombas de expulsión, de la porina OprD, así como otros mecanismos y para corroborar que tanto influyen en el perfil de resistencia de las cepas realizar la CMI probando diferentes tipos de antibióticos.

En resumen *P. aeruginosa* es un microorganismo que posee una gran diversidad de mecanismos de resistencia a los antibióticos que pueden actuar simultáneamente proporcionándole ventajas que le permiten adaptarse al ambiente hospitalario. Aunado a esto la transferencia horizontal de material genético es de suma importancia debido a que contribuye a la fácil diseminación de genes de resistencia entre diferentes géneros bacterianos, por lo que es de enorme relevancia llevar a cabo estudios de epidemiología molecular en aislados bacterianos en los diferentes hospitales para conocer a qué tipo de microorganismos multirresistentes nos estamos enfrentando. Igualmente la información generada contribuye a conocer los mecanismos de resistencia que van variando a lo largo del tiempo según la presión selectiva a la que se encuentren sometidas las cepas en el ambiente hospitalario aun teniendo el mismo número de secuencia tipo (ST).

9. CONCLUSIONES

- ✓ Las 27 cepas estudiadas no portan genes de BLEE tipo *ctx-m*, *shv*, *tem*, *per* y *bel* ni genes de metalo- β -lactamasas tipo *imp*, *vim* y *ndm*, pero el 93% portan el gen *intI1*, el 89% *qacE Δ 1* y *sul1*.
- ✓ Las cepas Ps09 y Ps39 están relacionadas genéticamente y portan el mismo integron, difieren en las mutaciones que presentaron en los reguladores de bombas de expulsión y de la porina OprD; que se ve reflejado en el fenotipo CMI para ambos aislados.
- ✓ La cepa Ps22 no guarda relación genética con las otras cepas y es portadora de dos integrones diferentes, tiene diversas mutaciones en los reguladores de bombas de expulsión y los mismos cambios en la porina OprD que la cepa Ps09.
- ✓ De la cepa Ps84 no se logró obtener la región variable cercana al extremo 5'-CS en estructura del integrón y presentó alta CMI para meropenem, así como mutaciones en tres reguladores de bombas de expulsión y en la porina OprD.
- ✓ Las cepas Ps52 y Ps36 fueron ST309 y portan el mismo integrón con carbapenemasa tipo GES en tándem, que no ha sido reportado y difieren en la CMI para meropenem. La cepa Ps52 presentó dos reguladores de bombas de expulsión y más cambios aminoacídicos en la porina OprD que la cepa Ps36 y ésta posee cuatro reguladores de bombas.
- ✓ No se lograron obtener transconjugantes de las cepas Ps52 y Ps36.
- ✓ Las cepas E06 y E52 tienen diferente secuencia tipo, ambas portan el gen *imp-18* en integrones con estructuras diferentes que no han sido reportadas.

10. PERSPECTIVAS

- ❖ Continuar con el estudio de los integrones de las cepas restantes y determinar la relación genética que guardan por medio de PFGE y MLST.
- ❖ Determinar si los integrones estudiados se encuentran en plásmidos o en cromosoma.
- ❖ Diseñar una metodología para determinar los alelos de gen *ges* presentes en tándem en el integrón de las cepas Ps52 y Ps36.
- ❖ Continuar con el análisis de los genes reguladores de bombas de expulsión y de la porina *OprD* para ver si presentan mutaciones que afecten la sensibilidad a los antibióticos, específicamente a carbapenémicos y hacer *docking* molecular para ver la interacción de la porina con los antibióticos imipenem y meropenem para explicar la resistencia de estas cepas.
- ❖ Determinar la CMI para imipenem de todos los aislados.
- ❖ Realizar la búsqueda de mutaciones en la cefalosporinasa AmpC que puede estar involucrada con la resistencia a carbapenémicos.
- ❖ Completar la secuencia del integrón de la cepa E06 y continuar con el estudio de los diferentes mecanismos de resistencia.
- ❖ Realizar el estudio general de los diferentes mecanismos resistencia en la cepa E52

BIBLIOGRAFÍA

- Al Naiemi, N., Duim, B., & Bart, A. (2006). A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 11), 1607–8.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(7), 1612–5.
- 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.
- Bambeke, V., Resistance, M. D., & Division, R.-. (2013). Antibiotic susceptibility RND efflux pumps in *P. aeruginosa*: an underestimated resistance mechanism, (May), 26–28.
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Ochoa-Sanchez, L. E., Reyna-Flores, F., Rojas-Moreno, T., Morfin-Otero, R., Silva-Sanchez, J. (2012). A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 4032–4.
- Bauernfeind, A., Stemmlinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., & Casellas, J. M. (1996). Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2), 509–13.
- Bauernfeind, A., Stemmlinger, I., Jungwirth, R., Mangold, P., Amann, S., Akalin, E., Casellas, J. M. (1996). Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(3), 616–20.
- Bogaerts, P., Bauraing, C., Deplano, A., & Glupczynski, Y. (2007). Emergence and dissemination of BEL-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1584–5.
- Bogaerts, P., Naas, T., El Garch, F., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., Glupczynski, Y. (2010). GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4872–8.

- Bonnet, R. (2003). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1–14.
- Bonnin. (2013). Complete sequence of broad-host-range plasmid pNOR-2000 harbouring the metallo- β -lactamase gene blaVIM-2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 68, 1060–1065.
- Borgianni, L., Prandi, S., Salden, L., Santella, G., Hanson, N. D., Rossolini, G. M., & Docquier, J.-D. (2011). Genetic context and biochemical characterization of the IMP-18 metallo- β -lactamase identified in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 140–5.
- Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32(3-4), 243–59.
- Chanawong, A. (2001). SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(6), 839–852.
- Chen, Y., Zhou, Z., Jiang, Y., & Yu, Y. (2011). Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6), 1255–9.
- Clark, C. A., Purins, L., Kaewrakon, P., Focareta, T., & Manning, P. A. (2000). The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology*, 146(10), 2605–2612.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., & Rossolini, G. M. (2011). Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *The Lancet. Infectious Diseases*, 11(5), 381–93.
- Cuzon, G., Naas, T., Villegas, M.-V., Correa, A., Quinn, J. P., & Nordmann, P. (2011). Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing β -lactamase blaKPC-2 gene in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5350–3.
- Danel, F., Hall, L. M. C., Gur, D., Akalin, H. E., & Livermore, D. M. (1995). Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(2), 281–294.
- Döring, G., Conway, S. P., Heijerman, H. G. ., Hodson, M. ., Høiby, N., Smyth, A., the Consensus Committee, for. (2000). Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *European Respiratory Journal*, 16(4), 749.

- Dundar, D., & Otkun, M. (2010). In-vitro efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Yonsei Medical Journal*, 51(1), 111–6.
- Epp, S. F., Köhler, T., Plésiat, P., Michéa-Hamzehpour, M., Frey, J., & Pechère, J. C. (2001). C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1780–7.
- Eren, E., Parkin, J., Adelanwa, A., Cheneke, B., Movileanu, L., Khalid, S., & van den Berg, B. (2013). Toward understanding the outer membrane uptake of small molecules by *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 12042–53.
- Eren, E., Vijayaraghavan, J., Liu, J., Cheneke, B. R., Touw, D. S., Lepore, B. W., van den Berg, B. (2012). Substrate specificity within a family of outer membrane carboxylate channels. *PLoS Biology*, 10(1), e1001242.
- Estepa, V. (2014). Tesis Doctoral. Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes orígenes. Departamento de Agricultura y Alimentación. Área de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de la Rioja.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., & Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 180(20), 5443–5447.
- Fang, Z.-L., Zhang, L.-Y., Huang, Y.-M., Qing, Y., Cao, K.-Y., Tian, G.-B., & Huang, X. (2014). OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 21, 124–8.
- Fiett, J., Baraniak, A., Mrówka, A., Fleischer, M., Drulis-Kawa, Z., Naumiuk, L., Gniadkowski, M. (2006). Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3), 880–6.
- Garza-Ramos, U., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Tamayo-Legorreta, E., Catalan-Najera, J. C., Morfin-Otero, R., Silva-Sanchez, J. (2014). Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 9–11.

- Garza-Ramos, U., Morfin-Otero, R., Sader, H. S., Jones, R. N., Hernández, E., Rodríguez-Noriega, E., Silva-Sanchez, J. (2008). Metallo-beta-lactamase gene bla(IMP-15) in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2943–6.
- Glupczynski, Y., Bogaerts, P., Deplano, A., Berhin, C., Huang, T.-D., Van Eldere, J., & Rodríguez-Villalobos, H. (2010). Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(5), 866–71.
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., ... Oliver, A. (2007). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4329–35.
- Hancock, R. E. W., & Brinkman, F. S. L. (2002). Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annual Review of Microbiology*, 56, 17–38.
- Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A. H., & Sørensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), 3332–7.
- Hanson, N. D., Hossain, A., Buck, L., Moland, E. S., & Thomson, K. S. (2006). First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), 2272–3.
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W., & Wiedemann, B. (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4062–70.
- Henwood, C. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility. *Journal of Antimicrob. Chemother* 47 (6): 789-799.
- Horan, T. C., Andrus, M., & Dudeck, M. A. (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American Journal of Infection Control*, 36(5), 309–32.

- Jeannot, K., Fournier, D., Müller, E., Cholley, P., & Plésiat, P. (2013). Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing extended-spectrum β -lactamase SHV-2a. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 673–5.
- Kidd, T. J., Ritchie, S. R., Ramsay, K. A., Grimwood, K., Bell, S. C., & Rainey, P. B. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PloS One*, 7(9), e44199.
- Koh, T. H., Wang, G. C. Y., & Sng, L.-H. (2004). IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent *Pseudomonas* isolated in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2334–6.
- Koutsogiannou, M., Drougka, E., Liakopoulos, A., Jelastopulu, E., Petinaki, E., Anastassiou, E. D., Christofidou, M. (2013). Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 665–8.
- Laurettil, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., & Rossolini, G. M. (1999). Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo-beta-lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(7), 1584–1590.
- Lee, S. H., & Jeong, S. H. (2005). Nomenclature of GES-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2148; author reply 2148–50.
- Li, H., Luo, Y.-F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C.-M. (2012a). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 302(2), 63–8.
- Linares, J. F., López, J. A., Camafeita, E., Albar, J. P., Rojo, F., & Martínez, J. L. (2005). Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1384–91.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(5), 634–40.
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., van Delden, C., & Plésiat, P. (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of

- Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5676–84.
- Lowbury, E. J. L., Lilly, H. A., Kidson, A., Ayliffe, G. A. J., & Jones, R. J. (1969). Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics: emergence of strains highly resistant to carbenicillin. *The Lancet*, 294(7618), 448–452.
- 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 Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Martínez, T., Vazquez, G. J., Aquino, E. E., Goering, R. V, & Robledo, I. E. (2012). Two novel class I integron arrays containing IMP-18 metallo- β -lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2119–21.
- Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y., & Mine, Y. (1988). Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(8), 1243–1246.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(8), 608–20.
- Meletis, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D., & Diza, E. (2012). Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia*, 16(4), 303–7.
- Meletis Georgios, T. E. and S. E. (2014). *Trends in Infectious Diseases*. (S. K. Saxena, Ed.). InTech.
- Mercier, J., & Levesque, R. C. (1990). Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 beta-lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(8), 1577–1583.
- Milan, O., Debroize, L., Bertrand, X., Plesiat, P., Valentin, A., Quentin, R., & Mee-marquet, N. Van Der. (2013). IMP13-producing *P. aeruginosa*: experience feedback concerning a cluster of urinary tract infections at a surgical clinic in France, 1–5.
- Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Hare, R. S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., Shaw, K. J. (1997). The Most Frequent Aminoglycoside Resistance Mechanisms--Changes with Time and Geographic Area: A Reflection of

- Aminoglycoside Usage Patterns? *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement 1), S46–S62.
- Moubareck, C., & Brémont, S. (2009). GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemother*, 53(8): 3579–3581.
- Mugnier, P., Dubrous, P., Casin, I., & Arlet, G. (1996). beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. A TEM-Derived Extended-Spectrum β - Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 40(11), 2488–2493.
- Naas, T., Philippon, L., Poirel, L., Ronco, E., & Nordmann, P. (1999). An SHV-Derived Extended-Spectrum beta-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(5), 1281–1284.
- Naas, T., Poirel, L., & Nordmann, P. (2008). Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, 42–52.
- Naenna, P., Noisumdaeng, P., Pongpech, P., & Tribuddharat, C. (2010). Detection of outer membrane porin protein, an imipenem influx channel, in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41(3), 614–624.
- Nakano, M., Deguchi, T., Kawamura, T., Yasuda, M., Kimura, M., Okano, Y., & Kawada, Y. (1997). Mutations in the gyrA and parC genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41(10), 2289–2291.
- Ochs, M. M., Bains, M., & Hancock, R. E. W. (2000). Role of Putative Loops 2 and 3 in Imipenem Passage through the Specific Porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1983–1985.
- Page, M. G. P., & Heim, J. (2009). Prospects for the next anti-*Pseudomonas* drug. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 558–65.
- Partridge, S. R., Recchia, G. D., Scaramuzzi, C., Collis, C. M., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2000). Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiology*, 146(11), 2855–2864.
- Peterson, L. R. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(6), 992–3.

- Petroni, A., Corso, A., Melano, R., Cacace, M. L., Bru, A. M., Rossi, A., & Galas, M. (2002). Plasmidic Extended-Spectrum β -Lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor Isolates in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1462–1468.
- Picão, R. C., Poirel, L., Gales, A. C., & Nordmann, P. (2009). Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 2225–6.
- Pitt, T. L., & Sparrow, M. (2001). Survey of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. In *24th European Cystic Fibrosis Conference*. Vienna: ECFS.
- 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(10), 2684–2688.
- Poirel, L., Brinas, L., Verlinde, A., Ide, L., & Nordmann, P. (2005). BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3743–8.
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 24–38.
- Poirel, L., Weldhagen, G. F., Naas, T., Champs, C. D. E., Dove, M. G., & Nordmann, P. (2001). GES-2, a Class A β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem, 45(9), 2598–2603.
- Qing, Y., Cao, K.-Y., Fang, Z.-L., Huang, Y.-M., Zhang, X.-F., Tian, G.-B., & Huang, X. (2014). Outbreak of PER-1 and diversity of β -lactamases among ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 63(Pt 3), 386–92.
- Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology (Reading, England)*, 141 (Pt 1, 3015–27.
- RHOVE. (2012). *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria (RHOVE)* (p. 50). México, Distrito Federal.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Velasco, C., Briales, A., García, I., Conejo, M. C., & Pascual, A. (2008). Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1240–3.

- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4783–8.
- Rodríguez-noriega, E., León-garnica, G., Petersen-morfín, S., Pérez-gómez, H. R., González-díaz, E., & Morfín-otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México , 1973-2013, 34, 181–190.
- Rolain, J. M., Parola, P., & Cornaglia, G. (2010). New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(12), 1699–701.
- 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 *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Veterinary Microbiology*, 144(3-4), 493–7.
- 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), 235–9.
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., ... Ohta, M. (1996). PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J. Clin. Microbiol.*, 34(12), 2909–2913.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138–63.
- Tapia, R. (1999). Infecciones nosocomiales. *Salud Pública, México*. 41, 3–4.
- Tato, M., Coque, T. M., Baquero, F., & Cantón, R. (2010). Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 320–7.
- Tulkens, P. M. Van Bambeke, F., B. E. (2000). Antibiotic Efflux Pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60(13), 457–470.

- Vakulenko, S. B., Donabedian, S. M., Voskresenskiy, A. M., Zervos, M. J., Lerner, S. A., & Chow, J. W. (2003). Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1423–1426.
- Valerio, C. E. (2012). Tesis de Maestría. Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de Infecciones Nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Viedma, E., Juan, C., Acosta, J., Zamorano, L., Otero, J. R., Sanz, F., ... Oliver, A. (2009). Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4930–3. doi:10.1128/AAC.00900-09
- Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A., & Quinn, J. P. (2007). First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1553–5.
- Wang, Y., Wang, X., Schwarz, S., Zhang, R., Lei, L., Liu, X., ... Shen, J. (2014). IMP-45-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* of canine origin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2579–81.
- Weldhagen, G. F., Poirel, L., & Nordmann, P. (2003). Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2385–2392.
- Wolter, D. J., Hanson, N. D., & Lister, P. D. (2004). Insertional inactivation of opr D in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 236(1), 137–143.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046–54.
- Yu, G., Li, Y., Liu, X., Zhao, X., & Li, Y. (2013). Role of integrons in antimicrobial resistance: A review. *African Journal of Microbiology Research*. Review in Medical Microbiology. 26(1), 26-31.

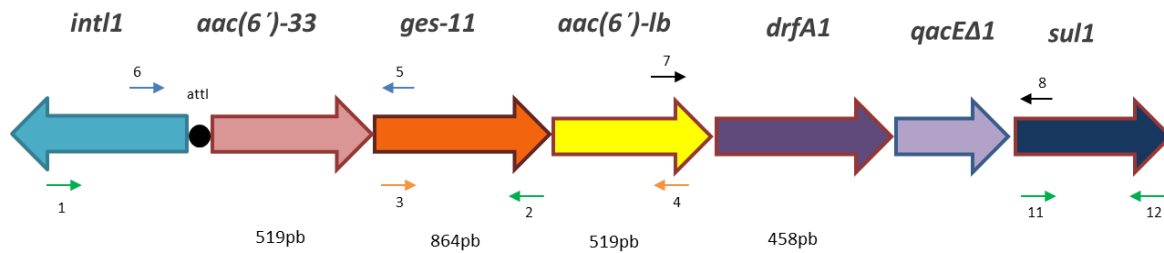
ANEXOS

Anexo 1. Antecedentes de las 27 cepas de *P. aeruginosa* del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" de la Cd. de México.

Cepa	Perfil de Resistencia	Genes de Resistencia				
		Oxas	β-lactámicos	Aminoglucósidos	Bombas	Porina OprD
Ps 09	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM*, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mexR: Val126Glu</i> <i>nfxB: silvestre</i> <i>mexT: Silvestre</i> <i>mexZ: Gly89Ser</i> remoción 98-106	Inserción 167-169 Ala, Ala,Asn
Ps 13	TIC, CB, CF, CTX, MEM, GM, AN, NET, CIP, OFX, NOR, C, SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 14	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-50</i>	(-)	<i>aac-3-IIa</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 17	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM*, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-50</i>	(-)	<i>aac-3-IIa</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 22	PIP,TIC,CB,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM*, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mexR: Val126Glu</i> <i>nfxB: silvestre</i> <i>mexT: Remoción 77-80</i> <i>Phe172Ile</i> <i>mexZ: Gly89Ser</i> remoción 98-106	Inserción 167-169 Ala, Ala,Asn
Ps 25	TIC, CB, TIM, CF, , CTX, CRO, IMP, MEM, AN, NET, CIP, OFX, C, SXT	<i>oxa-50</i>	(-)	(-)	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 24	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 27	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM*, GM,AN,NET,CIP,OFX,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa</i>	<i>mex-R, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 33	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 35	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
**Ps 36	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,MEM, ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-11</i>	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mexR: Val126Glu</i> <i>nfxB: silvestre</i> <i>mexT: Remoción 77-80</i> <i>Glu154Gln</i> Inserción 165 Arg <i>Phe173Ile</i> <i>mexZ: Asp73 Glu Leu138Arg</i>	Silvestre
Ps 39	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM*, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	(-)	<i>mexR: Val126Glu</i> <i>nfxB: silvestre</i> <i>mexT: Glu154Gln Phe173Ile</i> <i>mexZ: Asp50Glu</i>	Silvestre
Ps 47	CB, CF, CTX, CRO, IMP, MEM, AN, NET, OFX, C, SXT	<i>oxa-50</i>	(-)	(-)	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 48	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM*, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	(-)
Ps 49	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM*, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 52	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-11</i>	<i>aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 62	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	(-)	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 65	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM/I, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 74	PIP,TIC,CB,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO, GM,NET,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	(-)	<i>aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, mex-T</i>	<i>oprD</i>
Ps 78	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	(-)	<i>aac-3-IIa</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 81	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT,CL	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 82	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP*,JMP,MEM,ATM*, C,SXT	<i>oxa-50</i>	(-)	(-)	<i>mex-R, nfxB, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 84	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT,CL	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mexR: Val126Glu</i> <i>nfxB: silvestre</i> <i>mexZ: Leu105Arg, Asn153Ser</i>	Lys103Thr Leu127Val Gln185Glu Gly186Pro Thr189Val Gln202Glu
Ps 87	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 89	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT,CL	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T</i>	<i>oprD</i>
Ps 91	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT,CL	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 94	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO, ATM, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	(-)	<i>aac-3-IIa, aac-6-Ib</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-Z</i>	<i>oprD</i>
Ps 95	PIP,TIC,CB,TZP,TIM,CF,CAZ,CTX,CRO,FEP,IMP,MEM,ATM*, GM,AN,NET,CIP,OFX,NOR,C*,SXT	<i>oxa-2, oxa-50</i>	<i>ges-1</i>	<i>aac-3-IIa</i>	<i>mex-R, nfxB, mex-T, mex-Z</i>	<i>oprD</i>

Se señalan con rojo las cepas a las que se les confirmó pureza. ** Ayala, 2013 determinó un integrón en esta cepa. *Sensibilidad intermedia. El símbolo (-) indica que no porta el gen. Los reguladores de bombas de expulsión y porina OprD que no tienen análisis, no han sido secuenciados (Martínez, 2011; Valerio, 2012; Ayala, 2013). Se resaltan con color gris las cepas que se seleccionaron en este trabajo para el estudio de sus integrones.

Anexo 2. Estructura del integrón de la cepa Ps36 descrito por Ayala, 2013



Las flechas pequeñas indican el primer utilizado para secuenciar. Tamaño aproximado de los genes casete: 2360pb. 1. int1-R, 2. ges-R, 3. ges-F, 4. aac-(6')-lb-R, 5. FRC-ges, 6. FRC-int1, 7. RRC-aac, 8. FRC-sul1, 9. oxa2-R, 10. FRC-aadA1, 11. sul1-F, 12. sul1-R.

Anexo 3. Secuencia parcial de la región variable del integrón de la cepa Ps09

```
GGGCTGTTTCGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAACAAAGTTGGGCATTAAGGAAAAGTTAATGGCAA
TCCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTCTCTTGCCACTTTCGCGCATGCGCGAAAGGGCCCGGTACA
ACGTTTCAGACCGGAGGAAGTTTTTCCGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAACGCCAA
GCGGATCGTGCCATGTTGGTTTTTGATCCTGTGCGATCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATCGACATTCAAGA
TACCTCATACACTTTTTCGCACTTGATGCAGGCGCTGTTTCGTGATGAGTTCCAGATTTTTCGATGGGACGGCGT
TAACAGGGGCTTTGCAGGCCACAATCAAGACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTTGGGTG
TATGAGCTATTTGCAAAGGAAATTGGTGATGACAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCAACG
CCGATCCTTCGACAAGTAATGGCGATTACTGGATAGAAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAGCAAATTGC
ATTTCTCAGGAAGCTCTATCGTAACGAGCTGCCCTTTTCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATCTCATG
ATTGTGGAAGCCGGTCGCAACTGGATACTGCGTGCAAAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATGGGTGGGTGGTAG
GATGGGTGAGTGGCCGACTGGCTCCGTATTCTTCGCACTGAATATTGATACGCCAAACAGAATGGATGATCT
TTTCAAGAGGGAGGCAATCGTGCGGGCAATCCTTCGCTCTATTGAAGCGTTACCGCCCAACCCGGCAGTCAAC
TCGGACGCTGCGCGATAAACCAGCGCAGCGCCGGTTACTTCAACGTTAAGAGGCTACTCACGCACATCGAGGC
CAGCAACCATGAAATCAAACGTTAGGCATCACAAAGTACAGCATCGTGACCAACAGCAACGATTCCGTCACAC
TGCGCCTCATGACTGAGCATGACCTTGCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCGTCGAGTGGTG
GGGCGGAGAAGAAGCACGCCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAG
TCCGTCACCTCCATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAA
GCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTCACTGGCGAATGCATC
ACAATGGGCAAAGGCTTGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGTTGAGTTGCTGTTCAATGATCCCGAGGTC
ACCAAGATCCAAACGACCCGTCGCCGAGCAACTTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAAGCGGGGTTTGAGA
GGCAAGGTACCGTAACCACCCAGAT
```

FALTAN 63 BASES PARA COMPLETAR EL GEN *aacA4*

FALTAN 331 BASES PARA COMPLETAR EL GEN *aadA6*

```
AGTGGCAGCGTAAGGACATTCTTGCGGGCATCTTCGAGCCCGCCACAACCGATGTTGATCTGGCTATTCTGCT
AACTAAAGTAAGGCAGCATAGCCTTGCAATTGGCAGGTTTCGGCCGAGAGGATTTCTTTAACCCAGTTCCGGAA
GGCGATCTATTCAAGGCATTGAGCGACACTCTGAAACTATGGAATTCGAGCCGGATTGGGAAGGCATGAGC
GGAATGTAGTGCTTACCTTGCTCGCATTTGGTACAGCGCAGCAACCGCAAGATCGCACCGAAGGATATCGT
TGCCAACTGGGCAATGGAGCGTCTGCCAGATCAACATAAGCCCGTACTGCTTGAAGCCCGGCAGGCTTATCTT
GGACAAGGAGAAGATTGCTTGGCCTCACGCGCGGATCAGTTGGCGGCGTTCGTTCACTTCGTGAAACATGAAG
CCACTAAATTGCTTAGTGCCATGCCAGTGATGTCTAACAATTCAATTAAGCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGC
TTAATTCAGGCGTTAGTACCACTGAAACCCTCCTTTATTTGCCCCATGTTTATTCAAACGGCATTCAAGTTTCT
CAAACGCTGTGCAGCGCTGGGTTTGCCGTTTCTCTTGGCTTCCAGCGGCAAGGAGATGTGGTGTGTGGTCTT
TTTGGCCTCTGGCCCTTGCGTAGCAAGCGCGAGCAGCTATTCTTTTAGTAGTGTCGTGCCGCTCGCAGGCAC
```

ACTGCCTTTTCGCAGCAGCGCCCGTCGCCAAGTTACGGTTATCCGTTTGGCTTCTGGCTTTATCACCCGGTC
AAGCCGACCGCGCATTACTGCGATCGGTTAA

Tamaño de la región variable: ≈2500pb

Fragmentos secuenciados:

attI: 56pb

oxa-2: 828pb

Region intergénica: 70pb

attc aacA4: 66pb

aacA4: (456pb) + 63pb que faltan = 519pb

aadA6: (515pb) + 331pb que faltan = 846pb

Region intergénica: 17pb

orfD: 303pb

Anexo 4. Secuencia parcial de la región variable del integrón de la cepa Ps39

GCTCGACTTCGCTGCTGCCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCCGTGGAACGGATGAAGGCACGAACCCA
GACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTAAACGTGAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTG
ACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTATGACTGTTTTTTGTACAGTCTA
TGCCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTGCGATGTTTGTATGTTATGGAGCAGCAACGATGT
TACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTGGGCATTAAAGGAAAAGTTATGGCAATCCGAATCTTCGCG
ATACTTTTCTCCATTTTTTCTCTTGCCACTTTCGCGCATGCGCAAGAAGGCACGCTAGAACGTTCTGACTGGA
GGAAGTTTTTTCAGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAACGCCAAGCGGATCGTGCCAT
GTTGGTTTTTTCAGTCTGTGCGATCGAAGAAACGCTACTGCGCTGCATCGACATTCAAGATACCTCATACACTT
TTTGCACTTGATGACAGGCGCTGTTTCGTGATGAGTTCCAGATTTTTTCGATGGGACGGCGTTAACAGGGGCTTTG
CAGGCCACAATCAAGACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTTGGGTGTATGAGCTATTTGC
AAAGGAAATTGGTGATGACAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCAACGCCGATCC

FALTAN 376pb PARA COMPLETAR EL GEN *oxa-2*

FALTAN 441pb PARA COMPLETAR EL GEN *aadA6*

ACAACCGATGTTGATCTGGCTATTCTGCTAACTAAAGTAAGGCAGCATAGCCTTGCATTGGCAGGTTTCGGCCG
CAGAGGATTTCTTTAACCCAGTTCCGGAAGGCAGATCTATTCAAGGCATTGAGCGACACTCTGAAACTATGGAA
TTCGCAGCCGGATTGGGAAGGCAGATGAGCGGAATGTAGTGCTTACCTTGTCTCGCATTTGGTACAGCGCAGCA
ACCGGCAAGATCGCACCGAAGGATATCGTTGCCAAGTGGGCAATGGAGCGTCTGCCAGATCAACATAAGCCCG
TACTGCTTGAAGCCCGGCAGGCTTATCTTGACAAGGAGAAGATTGCTTGGCCTCACGCGCGGATCAGTTGGC
GGCGTTTCGTTCACTTCGTGAAACATGAAGCCACTAAATTGCTTAGTGCCATGCCAGTGATGTCTAACAAATTCA
TTTGGCCTGCAGGCAGCAAGGGGCGGGGCATAATTCTGGCGTTAGCACCATTGAAACCATCCGTTATTTCGCC
CAACATTTTTTCAAACGGCATTTCAGTTTCTCAAAGCTCCGGCAGCGTGGGGTACACAGTTTCTTCAGGATTCCC
CGGGTGGAGTTACGGCGGTACCCAGGGCCATGACATCTGTCCGGAGTGTAGCAAGCGCGAGCGCAGCCCTGTG
TAGTGGTTCTGCAGCCCGGAAGTGGCACAGCTCCTCACAGCAGTTAGTCGAGTCACCAAGTTACCCTTATTTCG
TTTCCTTTTCGGCTCTAACATTTTCGTCAAGCTCGACCCTCATTTCTGCGGTTCGGCACAACCTCGCCCGTGAG

Tamaño de la región variable: ≈2500pb

Fragmentos secuenciados:

IntI1: 234pb

Promotores *Pc*

attI: 87pb

oxa-2 cassette

oxa-2 59-be; IntI-type integrase recombination

oxa-2: 452pb faltan 376pb= 828pb

aadA6: 405pb faltan 441pb= 846pb

Región intergénica: 96pb

orfD: 298pb

Anexo 5. Secuencia completa de la región variable del integrón de la cepa Ps22 (Ps22-1)

```
GGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGACATCATGAGTAACGCAGTACC
CGCCGAGATTTCCGGTACAGCTATCACTGGCTCTCAACGCCATCGAGCGTCATCTGGAATCAACGTTGCTGGCC
GTGCATTTGTACGGCTCTGCACTGGACGGTGGCCTGAAGCCATACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACTGTGG
CTGCACGGCTCGATGAGACTGTCCGACAAGCCCTGGTCGTAGATCTCTTGGAATTTCTGCCTCCCCTGGCCA
AAGTGAAGCTCTCCGCGCCTTGGAAGTTACCATCGTCGTGCATGGTGATGTTGTCCCTTGGCGTTATCCGGCC
AGACGGGAAGTGAATTCGGGGAGTGGCAGCGTAAGGACATTCTTGCGGGCATCTTCGAGCCCGCCACAACCG
ATGTTGATCTGGCTATTCTGCTAACTAAAGTAAGGCAGCATAGCCTTGCATTGGCAGGTTTCGGCCGCAGAGGA
TTTCTTTAACCCAGTTCCGGAAGGCGATCTATTCAAGGCATTGAGCGACACTCTGAAACTATGGAATTCGCAG
CCGGATTGGGAAGGCGATGAGCGGAATGTAGTGCTTACCTTGCTCTCGCATTTGGTACAGCGCAGCAACCGGCA
AGATCGCACCGAAGGATATCGTTGCCAACTGGGCAATGGAGCGTCTGCCAGATCAACATAAGCCCGTACTGCT
TGAAGCCCGGCAGGCTTATCTTGGACAAGGAGAAGATTGCTTGGCCTCACGCGCGGATCAGTTGGCGGCGTTT
GTTCACTTCGTGAAACATGAAGCCACTAAATTGCTTAGTGCCATGCCAGTGATGTCTAACAATTCATTCAAGC
CGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAAATTCAGGCGTTAGTACCACTGAAACCCTCCTTTATTTGCCCCATGTTT
ATTCAAACGGCATTTCAGTTTCTCAAACGCTGTGCAGCGCTGGGTTTGCCGTTTCTCTGGGCTTCGCCTGGTGG
CGTTACGCTGGTTTGTGGTCTTTTTGGCCTCTGGCCCTTGTGTAGCAAGCGCGAGCAGCTATTTTTTTCGTAG
TGCTGTGCCGCTCGGTGGCACCGTGCCTTTTCGCAGTTAGCGCCCGTCGCCAAGTTACGGTTATCCGTTTTG
GCTTCTGGCTCTAACATTTCCGGTCAAGCCGACCCGCATTCTGCGGTTCGGCTTAACCTCGCCCG
```

Tamaño de la región variable: ≈1500pb

Fragmentos secuenciados:

attI: 56pb

aadA6: 846pb

Región intergénica: 41pb

orfD: 278pb

Región intergénica: 9pb

Anexo 6. Secuencia parcial de la región variable del integrón de la cepa Ps22 (Ps22-2)

```

TTACCGAAACCTTGCCTCGCTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGG
GTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACATACGCCTGTTCCGGTTGGTAACTGTAA
TGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCCTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGG
CGGTTTTTCATGCTTGTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTA
CGCCGTGGGTGATGTTTGTATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAG
TTAGACGGGCGTACAAAGATAATTTCCATCTCAAGGGATCACCATGCGCTTCATTACGCACACTATTACTGGCA
GGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAAAAAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAA
AAGCAGCTCAGATCGGTGTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCG
TTTTGCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCAGGCACCGAG
CGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCTCCTGCCACGGAGCGGTTTCTAG
CATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCTGCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCT
CTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCTGCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGG
CTAGACCGGAAAGAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATAACAATACGCCTATTGCTA
TGGCACGTACTGTGGGTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCACACCATTGAGAGGTG
GCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGGGGGTTTTTCCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAA
ACTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGACAT
FALTAN 142pb PARA COMPLETAR EL GEN ges-1
TGCCTCTGTTCCGGTCAAGTTATAGCGTGTCTCGGTGTCCAATTCTGATACCGACCCCTGGCACTCCAGACTCAT
AGAGGCCATTTCCATCTATTGGAATGAGGGTCTGTTTTGGGAGCTGTAAAACCGAATTGTCCGGGTTTTCCGTC
ACTTCCGCACCCAGCCACCTAGAGTTTTCTCCTGAGCCGACTTGACCGGTCATTGTTCCCATCGATTTA
CCGATCGGTGCGTGTCTCAAGGTGAAAACGGATTGGAGGCTCTGTATCGGCAGGGGGGTCTTGGTAGGTAGTT
CAGGCTTGCCGCAATAGGCCACCGAGGAGAGCGACCAAAGGCATCCAGCGGTCGATATACCAATGCAGAAGA

```

Tamaño de la región variable: ≈1500pb

Fragmentos secuenciados:

Int11: 362pb

(112..117): "gene cassette P1 promoter"

(135..140): "gene cassette P1 promoter"

(231..236): "gene cassette P2 promoter"

(251..256): "gene cassette P2 promoter"

att1: 62pb

Región intergénica: 46pb

ges-1: 722pb + 142pb faltan = 846pb

Prot. Hipotética: 357pb

Anexo 7. Secuencia parcial de la región variable del integrón de la cepa Ps84

FALTAN 469pb PARA COMPLETAR EL GEN *aacA4*

```
GAGGGGGACGTCCAAGGGCTGGCGCCCTTGGCCGCCCTCATGTCAAACGTTGGGCATTAAGGAAAAGTTAAT
GGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTTTCTCTTGCCACTTTCGCGCATGCGCAAGAAGGCACG
CTAGAACGTTCTGACTGGAGGAAGTTTTTCAGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAAC
GCCAAGCGGATCGTGCCATGTTGGTTTTTGATCCTGTGCGATCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATCGACATT
CAAGATACCTCATACTTTTTGCACTTGATGCAGGCGCTGTTCTGTGATGAGTTCCAGATTTTTTCGATGGGAC
GGCGTTAACAGGGGCTTTGCAGGCCACAATCAAGACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTT
GGGTGTATGAGCTATTTGCAAAGGAAATTGGTGATGACAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAA
```

FALTAN 399pb PARA COMPLETAR EL GEN *oxa-2*

FALTAN 79pb PARA COMPLETAR EL GEN *qacEΔ1*

```
TTATCGCAATAGTTGGCGAAGTAATCGCAACATCCGCATTAATAATCTAGCGAGGGCTTTACTAAGCTTGCCCC
TTCCGCCGTTGTCATAATCGGTTATGGCATCGCATTTTATTTTCTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTC
GGTGTTGCTTATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTGTCATAATTACAGCCATTGCCTGGTTGCTTCATGGGC
AAAAGCTTGATGCGTGCGGCTTTGTAGGTATGGGGCTCATAATTGCTGCC
```

Fragmentos secuenciados:

aacA4 59-base element: 50pb + 469pb faltan = 519pb

sitio core: 21pb

oxa-2: 429pb + 399pb faltan = 828pb

qacEΔ1: 269pb + 79pb faltan = 348pb

Anexo 8. Secuencia parcial del integrón de cepa Ps52

CCTCGACTTCGCTGCTGCTGCCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTG
GACATAAGCCTGTTTCGGTTTCGTAAACTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTG
ACCGAACGCAGCGGTGGAAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTTGTACAGTCTA
TGCTTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTGCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGT
TACGCAGCAGGGCAGTCCGCCCTAAAACAAAGTTAGGCTGACGCGCTTCGCGCGGAAGACTTTTATGGCTACTCG
GAGACTTTTGAATGGCGTATGAGTTCTGCGAAATAGGTGAATCAAACGAATATATTATTCTGGCGGCTAGAATC
TTAACGAAATCATTCTAGATATCGGTAATAATTCCTGGCCTGACATGAAAAGTGTACTAAAGAAGTTGAAG
AATGCATTGAGAAGCCAAACATATGTCTTGAATACATGAAAATGAAAAATTGCTTGGATGGATTGGCCTTAG
GCCCCATGTACAAATTAACATGGGAATTACATCCCTTGGTAATAAGTACTCAATATCAGAATAAAGGTATTGGA
AGACTTTTAATAAATGAATTAGAAAAAAGCAAAGCAAATTTGGAATAATTGGAATAGTATTGGGAAGTACG
ATGAATACTTTAAAACTTCATTATCAGCTGTTGATCTTTACGGCGAAAATATTCTTGATGAGATAAGGACTAT
TAAAAACATAAAAAATCATCCGTACGAATTCTATCAAAAATGTGGGTATTCCATTGTGCGAGTAATACCCGAT
GCAAATGGAAAAAGGAAGCCAGATATTTGGATGTGGAAGAAGATAAATGATTAGGGTAAAAATGACAGCCTAA
CAATCGCTTTACCTCGACAACCCGGCCTGTACGCAATCTGCTAGTTTAATCCTTGTGGAAGATTGCGCGCC
AGGCTCGGGTTGCGGGTGAAGCGTATGTTAGACGGGCGTACAAAGATAATTTCCATCTCAAGGGATCACCATG
CGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGCGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAAAAATTAACCTTCAAGA
CCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGTGTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGAT
CGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTTGCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTC
TTTGAAAGAATTGACTCAGGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAATTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAAT
GGTCTCCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCTGCGGTGCA
GCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCTGCTGCAATGACGCAGTATTTT
CGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAAGAGCCGGAGATGA/GGCGACAACACACCTGGCGA
CCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCTATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACG
TCCACCTCGACCCACACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTT
TTCCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAATGGTACCTGCGCCAACGGGGGCGGAACGACATTGGTTTTTTT
TAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCGAAACTATCGGCCGTAGAACGTGAC
GAATTAGTTGCCTCTGTGCGTCAAGTTATTACACAACCTCATCCTGAGCACGGACAAATAGTTGACGCCCCGTCT
AACAATTGCTTCAAGCCGACGTTGCTTTCGTGGCGGCGCTTGCGTGCTACGCTAAGCTTCGCACGCCGCTTGCC
ACTGCGCACCGCGGCTTAACCTCAGGCGTTAGGCATCACAAAGTACAGCATCGTGACCAACAGCAACGATTCCG
TCACACTGCGCCTCATGACTGAGCATGACCTTGCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCGTCGA
GTGGTGGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAGCGTTTTAGCG
CAAGAGTCCGTCACTCCATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCTGACGTTGCTC
TTGGAAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTCACTGGCGAA
TGCATCACAACTGGGCAAAGGCTTGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGTTGAGTTGCTGTTCAATGATCCC
GAGGTACCAAGATCCAAACGGACCCGTCGCCGAGCAACTTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAAGCGGGGT
TTGAGAGGCAAGGTACCGTAACCAACCCAGATGGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTGCA
CGCAACACGCAGTGATGCCTAACCTTCCATCGAGGGGGACGTCCAAGGGCTGGCGCCCTTGCCCGCCCTCA
TGTCAAACGTTGGGCATTAAGGAAAAGTTAATGGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTTTCTC
TTGCCACTTTTCGCGCATGCGCAAGAAGGCACGCTAGAACGTTCTGACTGGAGGAAGTTTTTCAGCGAATTTCA
AGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAACGCCAAGCGGATCGTGCCATGTTGGTTTTTGATCCTGTGCGA
TCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATCGACATTCAAGATACTCATACACTTTTGCAGTTGATGCAGGCGCTG
TTCGTGATGAGTTCCAGATTTTTTCGATGGGACGGCGTTAACAGGGGCTTTCAGGCCACAATCAAGACCAAGA
TTTTCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTTGGGTGTATGAGCTATTTGCAAAGGAAATTGGTGATGACAAA
GCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCAACGCCGATCCTTCGACAAGTAATGGCGATTACTGGATAG
AAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAGCAAATTGCATTCTCAGGAAGCTCTATCGTAACGAGCTGCCCTT
TCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATCTCATGATTGTGGAAGCCGGTCGCAACTGGATACTGCGTGCA
AAGACGGGCTGGGAAGGCCGATGTTGGTGGGTAGGATGGGTTGAGTGGCCGACTGGCTCCGTATTCTTCG
CACTGAATATTGATACGCCAAACAGAATGGATGATCTTTTCAAGAGGGAGGCAATCGTGCGGGCAATCCTTCG
CTCTATTGAAGCGTTACGCCCAACCCGGCAGTCAACTCGGACGCTGCGCGATAAACCAGCGCAGCGCCGGTT
ACTTCAACGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCG
TCATCGAGCGCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAA
GCCACACAGTGATATTGATTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATC

Por peso de la
región variable
correspondería a
dos genes ges

AACGACCTTTTGGAAACGTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTG
TGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAGCGCAAGTTTGGAGAATGGCAGCGCAATGA
CATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATTGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAGAGCAAGAGAA
CATAGCGTTGCCTTTGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACCTCTTTGATCCGGTTCTTGAACAGGATCTATTTGAGG
CGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTAC
GTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAGAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATG
GAGCGCCTGCCGGCCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATC
GCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTTCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGG
CAAATAATGTCCTAACAATTTCGTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGGCGCGGCTTACCTTGGCCGTTAGATGCACT
AAGCACATAATTGCTCACAGCCAAACTATCAGGTCAAGTCTGCTTTTATTATTTTAAAGCGTGCATAATAAGC
CCTACACAAATTGGGAGATATATCATGAAAGGCTGGCTTTTTCTTGTATCGCAATAGTTGGCGAAGTAATCG
CAACATCCGCATTAAAATCTAGCGAGGGCTTTACTAAGCTTGCCCTTCCGCCGTTGTCATAATCGGTTATGG
CATCGCATTTTATTTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTTGCTTATGCAGTCTGGTCGGGA
CTCGGCGTCGTCATAATTACAGCCATTGCCTGGTTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAG
GTATGGGGCTCATAATTGCTGCCTTTTTGCTCGCCCGATCCCATCGTGGAAGTCGCTGCGGAGGCCGACGCC
ATGGTGA

Tamaño de la región variable: >3000pb

Fragmentos secuenciados:

intI1: 375pb

aac-(6')-33 : 555pb

Región intergénica: 162pb

ges-20: 864pb

Región intergénica: 172pb

aacA4=aaac-(6') Ib : 519pb

Región intergénica: 81pb

oxa-2: 828pb

Región intergénica: 36pb

aadA1: 792pb

Región intergénica: 163pb

gacEA1: 348pb

Anexo 9. Comparación de las secuencias nucleotídicas de las variantes del gen *ges-1*, *ges-5*, *ges-19*, *ges-20* y el encontrado en las cepas Ps52 y Ps36.

Ps52	ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGCGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-20	ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGCGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-5	ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-1	ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-11	ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
ges-19	ATGCGCTTCATTACGCACTATTACTGGCAGCGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA

Ps52	AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-20	AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-5	AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-1	AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-11	AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
ges-19	AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT

Ps52	GTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-20	GTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-5	GTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-1	GTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-11	GTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
ges-19	GTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT

Ps52	GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
ges-20	GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
ges-5	GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
ges-1	GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
ges-11	GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
ges-19	GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA

Ps52	GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
ges-20	GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
ges-5	GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
ges-1	GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
ges-11	GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
ges-19	GGCACCGAGCGGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT

Ps52	CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
ges-20	CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
ges-5	CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
ges-1	CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
ges-11	CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
ges-19	CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT

Ps52 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
ges-20 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
ges-5 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
ges-1 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
ges-11 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
ges-19 GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT

Ps52 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
ges-20 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
ges-5 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
ges-1 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
ges-11 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
ges-19 GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA

Posición 493 en
donde se
superponen los
picos de los
nucleótidos A/G

Ps52 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCT
ges-20 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCT
ges-5 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCT
ges-1 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCT
ges-11 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCT
ges-19 GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAACCTACGCCTATTGCT

Ps52 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
ges-20 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
ges-5 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
ges-1 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
ges-11 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC
ges-19 ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC

Ps52 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
ges-20 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
ges-5 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
ges-1 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
ges-11 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT
ges-19 ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT

Ps52 CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-20 CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-5 CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-1 CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-11 CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC
ges-19 CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC

Ps52 ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-20 ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-5 ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-1 ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-11 ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
ges-19 ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG

Ps52	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-20	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-5	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-1	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-11	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA
ges-19	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTTCGGTCAAGTTATTACACAA

Ps52	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-20	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-5	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-1	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-11	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
ges-19	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG

Anexo 10. Secuencia parcial de la región variable del integrón de la cepa E06

```

CGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGCATCACAAAGTACAGCATCGTGACCAACAGC
ACCGATTCCGTCACACTGCGCCTCATGACTGAGCATGACCTTGCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGATCTC
ATATCGTCGAGTGGTGGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAGTACTTGCCAAG
CGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACTCCATACATTGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCCAGTCG
TACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGATGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGT
CACTGGCGAATGCATCACAACTGGGCAAAGGCTTGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGTTGAGTTGCTGTT
CAATGATCCCCGAGGTACCAAGATCCAAACGGACCCGTCGCCGAGCAACTTGCGAGCGATCCGATGCTACGAG
AAAGCGGGGTTTGAGAGGCAAGGTACCGTAACCAACCCAGATGGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCC
AGGCATTTCGAGCGAACACGCAGTGATGCCTAACCTTCCATCG
FALTAN 741pb PARA UNIR LOS FRAGMENTOS
TGTCAAACGTTGGGCATTAAAGGAAAAGTTAATGGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTTTCTC
TTGCCACTTTTCGCGCATGCGCAAGAAGGCACGCTAGAACGTTCTGACTGGAGGAAGTTTTTCAGCGAATTTCA
AGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAACGCCAAGCGGATCGTGCCATGTTGGTTTTTGATCCTGTGCGCA
TCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATCGACATTCAAGATAACCTCATACTTTTGCACCTGATGCAGGCGCTG
TTTCGTGATGAGTTCCAGATTTTTTCGATGGGACGGCGTTAACAGGGGCTTTGCAGGCCACAATCAAGACCAAGA
TTTTCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTTGGGTGTATGAGCTATTTGCAAAGGAAATTGGTGATGACAAA
GCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCAACGCCGATCCTTCGACAAGTAATGGCGATTACTGGATAG
AAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAGCAAATTGCATTTCTCAGGAAGCTCTATCGTAACGAGCTGCCCTT
TCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATCTCATGATTGTGGAAGCCGGTCGCAACTGGATACTGCGTGCA
AAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATGGGTGGTGGGTAGGATGGGTGAGTGGCCGACTGGCTCCGTATTCTTCG
CACTGAATATTGATACGCCAAACAGAATGGATGATCTTTTCAAGAGGGAGGCAATCGTGCGGGCAATCCTTCG
CTCTATTGAAGCGTTACCGCCCCAACCCGGCAGTCAACTCGGACGCTGCGCGATAAACC CGCGCAGCGCCGGTT
ACTTCAACGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCG
TCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCGAGTGGATGGCGGCCTGAA
GCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACAGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATC
AACGACCTTTTGAAACGTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCAACCATTGTTG
TGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAGTTTGAGGAATGGCAGCGCAATGA
CATTCTTGACAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATTGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAA
CATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACCTTTTGATCCGGTTCTTGAACAGGATCTATTTGAGG
CGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTAC
GTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAGAATCGCGCCGAAGGATGTGCTGCGCTGCCGACTGGGCAATG
GAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATC
GCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTGTTCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGG
CAAATAATGTCTAACAATTGTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTACC

```

Tamaño de la región variable: ~3000pb

Fragmentos secuenciados:

attI: 97pb

aacA6: 519pb

Faltan ~ 741pb para unir los fragmentos

oxa-2: 828pb

Región intergénica: 36pb

aadA1: 840pb

Región intergénica: 48pb

Anexo 11. Secuencia completa de la región variable integrón de la cepa E52

```

GTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGAAAAGGGTAA
GTATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCCTTTGCAACATTGCTGCTGCAGATGATTCTTTGCCTGA
TTTAAAAAATTGAGAAGCTTGAAAAAGGCGTTTATGTTTCATACTTCGTTTGAAGAAGTTAAAGGTTGGGGTGTA
GTCACAAAACACGGTTTAGTGGTTCTTGTAAGAATGATGCTTATCTGATAGATACTCCAATTACCGCTAAAG
ATACTGAAAAATTAGTTAATTGGTTTATTGAGCACGGCTATAGAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCA
TGGCGACAGTACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCTCCACGTATGCCTCTGAATTAACAAAT
GAACTTCTAAAAAAGACAATAAGGTGCAAGCTACAAATTCTTTTAGTGGAGTTAGTTATTTACTTATCAAAA
ACAAAATTGAAGTTTCTATCCAGGTCCAGGACACACTCAAGATAACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAA
AATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCGGACGGTCTTGGAATTTAGGGGATGCAATTTAGAAGCTTGG
CCAAAGTCCGCTAAAATATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAACTGGTTGTTTCAGGTCATAGTGAAATTG
GAAACGCATCACTCTTGCAGCGCACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGTTAAATGAAAGTAAAAAACCGTTACA
GCCAAGTAGCTAAATTTCTAACAAGTCGTTGCAGCATCGTTCCGCTTTGCTCCACTGGACGGGTTTTAAGTCG
CATTTTTGTGGCTCGCTGGCGCTCACTTTATCACAAAAATACAACCTAAAACCCGCCGCTGAACTCGGCGTTA
AACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCC
ATCTCGAACCAGCTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCGAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGA
TATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTG
GAAACGTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACA
TCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAAGTGCAGTTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCAGG
TATCTTCGAGCCAGCCACGATTGACATTGATCTGGCTATCTTGTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCC
TTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACCTCTTTGATCCGGTTTCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAA
CCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCAT
TTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAGAATCGCGCCGAAGGATGTGCTGCGGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCG
GCCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGC
GCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTTCCTACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAATGTCT
AACAATTCGTTCAAGCCGACGCCGCTTTCGCGGCGCGGCTTACCTTGGCCGTTGGGCATTAAGGAAAAGTTAAT
GGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTTTCTCTTGCCACTTTTCGCGCATGCGCAAGAAGGCACG
CTAGAACGTTCTGACTGGAGGAAGTTTTTTCAGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAAC
GCCAAGCGGATCGTGCCATGTTGGTTTTTGTATCCTGTGCGATCGAAGAAACGCTACTCGCCTGCATCGACATT
CAAGATACCTCATACACTTTTTGCACTTGATGCAGGCGCTGTTTCGTGATGAGTTCCAGATTTTTTCGATGGGAC
GGCGTTAACAGGGGCTTTGCAGGCCACAATCAAGACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTT
GGGTGTATGAGCTATTTGCAAAGGAAATTGGTGATGACAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGG
CAACGCCGATCCTTCGACAAGTAATGGCGATTACTGGATAGAAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAGCAA
ATTGCATTTCTCAGGAAGCTCTATCGTAACGAGCTGCCCTTTTCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATC
TCATGATTGTGGAAGCCGGTCGCAACTGGATACTGCGTGCAAAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATGGGTTGGTG
GGTAGGATGGGTTGAGTGGCCGACTGGCTCCGTATTCTTCGCACTGAATATTGATACGCCAAACAGAATGGAT
GATCTTTTCAAGAGGGAGGCAATCGTGCGGGCAATCCTTCGCTCTATTGAAGCGTTACCGCCCAACCCGGCAG
TCAACTCGGACGCTGCGCGATAA AACC GCGCAGCGCCGGTTACTTCAACGTTAGATGCACTAAGCAC

```

Tamaño de la región variable: 2695pb

Fragmentos secuenciados:

attI: 75pb

imp-18: 741pb

Región intergénica: 139pb

aacA1: 792pb

Región intergénica: 76pb

oxa2: 828pb

Región intergénica: 44pb

Anexo 12. Análisis de la secuencia de aminoácidos de los reguladores de bombas de expulsión de la cepa Ps52

Alineamiento de aminoácidos del regulador *mexR*

```

Ps52mexR      MNYFVNPDLMPALMAVFQHVTRIQSELDQCRLDLTPPDVHVLKLIDEQRLNQLDLGRQ 60
mexRPA01      MNYFVNPDLMPALMAVFQHVTRIQSELDQCRLDLTPPDVHVLKLIDEQRLNQLDLGRQ 60
                *****

Ps52mexR      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF 120
mexRPA01      MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF 120
                *****

Ps52mexR      APLTPVEEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI- 147
mexRPA01      APLTPVEEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI- 147
                *****

```

❖ **Presenta mutación en Val126Glu**

Alineamiento de aminoácidos del regulador *nfxB*

```

nfxBPs52      -----DERLIKALAVAIVDRPRATLKELEAAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET 54
nfxBPA01      MTLISHDERLIKALAVAIVDRPRATLKELEAAGVSKATLHRFCGTRDNLVQMLEDHGET 60
                *****

nfxBPs52      VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPDFLDPHGEGARWQSYLE 114
nfxBPA01      VLNQIIQACDLEHAEPLEALQRLIKEHLTHRELLVFLVFQYRPDFLDPHGEGARWQSYLE 120
                *****

nfxBPs52      ALDEFFLRGQQKGVFRIDITA AVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG 174
nfxBPA01      ALDEFFLRGQQKGVFRIDITA AVFTELFITLVYGMVDAERRGRAASSNSAHTLEQMFLHG 180
                *****

nfxBPs52      ASNPARS- 181
nfxBPA01      ASNPARS- 187
                *****

```

Anexo 13. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la porina OprD de la cepa Ps52

```

Ps52 -----
PA01 MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD LLLRNYYFNRDGKSGSG

Ps52 ----WTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
PA01 DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYL GLKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
      *****

Ps52 SRAGGALKVRISKTMWKWEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF
PA01 SRAGGAVKVRISKTMWKWEMQPTAPVFAAGG SRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF
      *****:*****

Ps52 TEGKQGT TTKSRGELYATYAGQTAKSADFAGGRYAITDNL SASLYGAELKDIYRQYYLNT
PA01 TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETA KSADF IGGRYAITDNL SASLYGAELEDIYRQYYLNS
      ****: ** . *****:***** *****:*****:

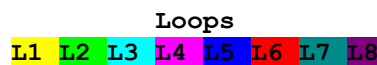
Ps52 NYTIPLASDQSLGFDFNIYRTTDEGKAKAGDISNTAWSWPGAYTLDAHTFTLAYQQVHGD
PA01 NYTIPLASDQSLGFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD
      *****:*****:*** . *****:****

Ps52 EPPFGLHRFGETVPGGGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNMASYGVPGLTFMVR
PA01 QPFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR
      :** ** . * . *****:*****

Ps52 YINGKIDIDGTKVDSSSS--YAGLYGEDGKHHETNLEAKYVVQAGPAKDLSFRIRQAWHRA
PA01 YINGKIDIDGTKMSDNNVGYKNYGYGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA
      *****:.... *****:*****

Ps52 NADGEGDQNEFRLIVDYPLSIL
PA01 NADQEGDQNEFRLIVDYPLSIL
      ***:*****

```



Anexo 14. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la porina OprD de la cepa Ps36

PAO1 MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSGSG
Ps36 MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKEGRG
*****.* **

PAO1 DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGLYGLKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY
Ps36 DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGLYLGLKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDY

PAO1 SRAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF
Ps36 SRAGGALKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF
*****.

PAO1 TEGKEPPTTVKSRGELYATYAGE TAKSADF IGGRYAITDNLSASLYGAELEDIYRQYYLNS
Ps36 TEGKQGTTTKSRGELYATYAGQ TAKSADF AGGRYAITDNLSASLYGAELKDIIYRQYYLNT
.: **.**:***** *****:*****:

PAO1 NYTIPLASDQSLGFDNFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD
Ps36 NYTIPLASDQSLGFDNFNIYRTTDEGKAKAGDISNTAWSLAGAYTLDAHTFTLAYQQVHGD
*****.*****:***.*****:****

PAO1 QPFEDYIGFGFRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR
Ps36 EPFDYIGFGENSGGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNMASYGVPGLTFMVR
:*****.***.*****:*****

PAO1 YINGKDIDGTKMSDNNVGYKNYGEDGKHHE TNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA
Ps36 YINGKDIDGTKVDSSSS--YAGLYGEDGKHHE TNLEAKYVVQAGPAKDLSFRIRQAWHRA
*****:.... *****:*****

PAO1 NADQEGEQNE FRLIVDYPLSIL
Ps36 NADEGEQNE-----
.**

Loops

L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8