

Alba Bellés Bellés

Epidemiología y caracterización de
mecanismos de resistencia a
carbapenems en *Pseudomonas
aeruginosa* de muestras clínicas y
de portadores fecales

Departamento

Microbiología, Medicina Preventiva y Salud
Pública

Director/es

Seral García, Cristina
Castillo García, Francisco Javier

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**EPIDEMIOLOGÍA Y
CARACTERIZACIÓN DE
MECANISMOS DE RESISTENCIA A
CARBAPENEMS EN *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* DE MUESTRAS
CLÍNICAS Y DE PORTADORES
FECALES**

Autor

Alba Bellés Bellés

Director/es

Seral García, Cristina

Castillo García, Francisco Javier

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

2017

Tesis Doctoral

**Epidemiología y caracterización de mecanismos de
resistencia a carbapenems en *Pseudomonas aeruginosa*
de muestras clínicas y de portadores fecales**

Memoria presentada por **Alba Bellés Bellés** para optar al **Grado de Doctor**
por la Universidad de Zaragoza

Directores: Cristina Seral García y Francisco Javier Castillo García

Zaragoza, enero 2017

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública
Facultad de Medicina

Índice

Índice

Abreviaturas	9
Lista de figuras.....	11
Lista de tablas	13
Introducción	17
1. El género <i>Pseudomonas</i>	19
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.1.1 Estructura e identificación.....	21
1.1.2 Epidemiología	23
1.1.3 Factores de virulencia.....	25
2. Antibióticos con acción anti <i>Pseudomonas</i>	29
2.1 Betalactámicos.....	30
2.1.1 Mecanismos de resistencia a betalactámicos	33
2.2 Aminoglucósidos	38
2.3 Quinolonas	40
2.4 Polimixinas	41
2.5 Resistencia a antibióticos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
2.5.1 Bombas de expulsión activa	45
2.5.2 La proteína OprD y su relación con la resistencia a antibióticos	46
2.5.3 Carbapenemasas en <i>P. aeruginosa</i>	48
3. Estructura y función de los integrones.....	51
4. Tipificación molecular.....	55
4.1 Genética de las poblaciones bacterianas.....	55
4.2 Métodos moleculares de tipificación bacteriana	57
4.2.1 Tipificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59

4.2.2	Clones internacionales de <i>P. aeruginosa</i> de alto riesgo.....	59
	Objetivos.....	63
	Material y métodos.....	67
1.	Aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estudiados.....	69
1.1	Aislados procedentes del tracto respiratorio inferior	69
1.2	Aislados procedentes de portadores fecales.....	70
2.	Características de los pacientes	70
3.	Medios, condiciones de cultivo e identificación	71
4.	Determinación de la sensibilidad a los antibióticos	72
4.1.	Microdilución en caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	72
4.2.	Métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia a antibióticos	74
4.2.1	Test sinérgico de doble disco para detección de metalobetalactamasas (MBL)	74
4.2.2	Test sinérgico de doble disco para detección de carbapenemasas de clase A	74
4.2.3	Epsilon-test (ϵ -test®). Imipenem/Imipenem-EDTA (IP/IPI) ®	75
5.	Extracción de DNA	76
5.1.	Resina (InstaGene™ Matrix, BioRad).....	76
5.2.	Cuantificación de DNA	76
6.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	77
6.1.	Detección de genes de resistencia mediante PCR múltiple	79
6.1.A.	Detección de genes codificantes de MBL.....	79
6.1.B.	Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A.....	80
6.2.	Estudio de la porina OprD.....	82
6.3.	Análisis de integrones	82

6.4.	Detección de genes de virulencia.....	84
7.	Electroforesis en gel de agarosa.....	86
7.1.	Preparación del gel de agarosa.....	86
8.	Tipificación molecular.....	87
8.1.	Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE).....	87
8.2.	Determinación de la Secuencia Tipo (MLST)	89
9.	Secuenciación	92
9.1.	Análisis de las secuencias.....	93
	Resultados	95
1	Aislados procedentes del tracto respiratorio inferior (T.R.I.)	97
1.1	Datos clínicos y epidemiológicos	97
1.2.	Estudio de la sensibilidad a antibióticos.....	101
1.2.	Estudio de la porina OprD.....	104
1.3.	Estudio de integrones	107
1.4.	Estudio de genes de virulencia	110
1.5.	Tipificación molecular	111
2	Aislados procedentes de portadores fecales	113
2.1	Prevalencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como colonizador intestinal en menores de 15 años	113
2.2.	Estudio de la sensibilidad a antibióticos de los aislados	113
2.3.	Estudio de integrones y de la porina OprD.....	114
2.4.	Estudio de genes de virulencia	116
2.5.	Tipificación molecular	117
	Discusión	121
	Conclusiones	141

Bibliografía	145
Anexo 1: Tablas	163

Abreviaturas

aa	aminoácido
AMC	amoxicilina-ácido clavulánico (antibiótico+inhibidor)
AMK	amikacina (antibiótico)
AmpC	cefalosporinasa de tipo AmpC
APB	ácido 3-aminofenilborónico
ATM	aztreonam (antibiótico)
BHI	Brain Heart Infusion (medio de cultivo)
BLEE	betalactamasa de espectro extendido
°C	grado centígrado / Celsius
CAZ	ceftazidima (antibiótico)
CFX	cefuroxima (antibiótico)
CIP	ciprofloxacina (antibiótico)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	centímetro
CMI	concentración mínima inhibitoria
CL	colistina (antibiótico)
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótido
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
etc.	etcétera
FEP	cefepime (antibiótico)
g	gramo
GEN	gentamicina (antibiótico)
h	hora
HCULB	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (de Zaragoza)
I	sensibilidad intermedia
IPM	imipenem (antibiótico)
IS	secuencia de inserción (Insertion Sequence)
L	litro
LEV	levofloxacino (antibiótico)
MBL	metalobetalactamasa
MDR	multirresistente
MER	meropenem (antibiótico)
mg	miligramo
MH	Müller Hinton (medio de cultivo)
min	minuto
mL	mililitro
MLST	multilocus sequence typing
mm	milímetro
nº	número
nt	nucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud

orf	Marco de lectura abierta (open reading frame)
P.	<i>Pseudomonas</i>
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Electroforesis en Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
R	resistente
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
S	sensible
sp.	especies
ST	secuencia tipo (sequence type)
SXT	trimetoprim-sulfametoxazol (antibiótico)
T^a hib.	Temperatura de hibridación
T3SS	Sistema de Secreción Tipo III
TBE	solución tris (hidroximetil)aminometano + ácido bórico + EDTA
TE	solución tris (hidroximetil)aminometano + EDTA
TIC	ticarcilina (antibiótico)
TOB	tobramicina (antibiótico)
TRI	tracto respiratorio inferior
TZP	piperacilina-tazobactam (antibiótico)
UCI	unidad de cuidados intensivos
UFC	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioleta
XDR	extensivamente resistente
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
%	signo de porcentaje (por ciento)

Lista de figuras

Figura 1. Ecología de las especies del género <i>Pseudomonas</i> (Silby et al., 2011)	19
Figura 2. Pigmentos producidos por distintos aislados de <i>Pseudomonas</i>	20
Figura 3. Pigmento verde (pioverdina) producido por <i>P. aeruginosa</i>	21
Figura 4. Fenotipo mucoso de <i>P. aeruginosa</i> procedente de una muestra de esputo de un paciente con fibrosis quística	22
Figura 5. Interrelación de los sistemas quórum sensing (las y rhl) de <i>P. aeruginosa</i> (Jimenez et al., 2012).....	26
Figura 6. Representación del mecanismo de acción del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) (Rasko and Sperandio, 2010).....	27
Figura 7. Quórum sensing y formación del biofilm (Fuqua and Greenberg, 2002)	28
Figura 8. Estructura química de los antibióticos betalactámicos (Suárez and Gudiol, 2009).....	31
Figura 9. Pared celular de los microorganismos Gram-negativos (Imagen obtenida de http://www.bmanuel.org/corling/corling1-5.html).....	32
Figura 10. Mecanismo de acción de los betalactámicos (Suárez and Gudiol, 2009)	33
Figura 11. Estructura química de los antibióticos carbapenémicos más utilizados.	37
Figura 12. Estructura química de gentamicina.....	38
Figura 13. Estructura química de las quinolonas	40
Figura 14. Estructura química de colistina	41
Figura 15. Evolución de la resistencia a carbapenems (2005-2014) en <i>P. aeruginosa</i> en Europa (http://ecdc.europa.eu/)	44
Figura 16. Modelos estructurales y funcionales de las principales bombas de expulsión activa en <i>P. aeruginosa</i> (Neves et al., 2010; Poole, 2005, 2011).	45
Figura 17. Esquema de la disposición de la proteína OprD en la membrana	47
Figura 18. Estructura de la porina OprD de <i>P. aeruginosa</i> (Eren et al., 2013).....	47

Figura 19. Estructura de un integrón de clase 1 y proceso de integración de un casete génico.	53
Figura 20. Diagrama eBurst del linaje CC235 de los STs de <i>P. aeruginosa</i> (Maatallah et al., 2011).	61
Figura 21. Test sinérgico de doble disco para detección de MBL.	74
Figura 22. Test sinérgico de doble disco para detección de carbapenemasas de clase A	75
Figura 23. E-test IP/IPI® de una cepa productora de MBL.....	75
Figura 24. Distribución (%) por Servicios de los pacientes hospitalizados	97
Figura 25. Distribución de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> con fenotipo MBL a lo largo del período estudiado	98
Figura 26. Distribución temporal y duración del ingreso en UCI de los pacientes con aislamiento de <i>P. aeruginosa</i> con fenotipo MBL.....	99
Figura 27. Porcentaje de resistencia de los aislados de <i>P. aeruginosa</i> procedentes del tracto respiratorio inferior.	103
Figura 28. Estructuras de los integrones de clase 1 detectados en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> de muestras del tracto respiratorio inferior	108
Figura 29. Patrones de PFGE obtenidos de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> portadoras de integrones.....	111
Figura 30. Estructura del gen <i>lasR</i> del aislado Pc5.....	117
Figura 31. Estructura del gen <i>lasR</i> del aislado Pc10.....	117
Figura 32a, 32b y 32c. Fotos de PFGE con los 42 aislados de portadores fecales.....	119

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de las betalactamasas (Bush and Jacoby, 2010; Lee et al., 2016a)	36
Tabla 2. Fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos anti- <i>Pseudomonas</i> y enzimas modificantes asociadas (adaptada (Odumosu et al., 2015; Poole, 2005; Vila and Marco, 2002).....	39
Tabla 3. Secuencias de los promotores Pc y P2 de los integrones de clase 1 (Jones-Dias et al., 2016; Jové et al., 2010).....	54
Tabla 4 Tipo y número de muestras del tracto respiratorio inferior de las cuales se aislaron las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	69
Tabla 5. Concentraciones de los antibióticos presentes en el panel 58 de MicroScan WalkAway® y puntos de corte para <i>P. aeruginosa</i> obtenidos del CLSI 2015.....	73
Tabla 6. Reactivos utilizados en la técnica de PCR.....	78
Tabla 7. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de MBL y condiciones de amplificación	79
Tabla 8. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A y condiciones de amplificación	80
Tabla 9. Reactivos utilizados en la PCR múltiple para detectar carbapenemasas de clase A.....	81
Tabla 10. Cebadores utilizados en el estudio del gen <i>oprD</i> y condiciones de amplificación	82
Tabla 11. Cebadores utilizados para la detección de integrones de clase 1, 2 y 3 y condiciones de amplificación	83
Tabla 12. Cebadores utilizados en la detección de genes de virulencia y condiciones de amplificación.....	84
Tabla 13. Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las reacciones de PCR de los genes “housekeeping” para la determinación de la Secuencia Tipo.....	90

Tabla 14. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la secuenciación de los genes “housekeeping” para la determinación de la Secuencia Tipo.....	90
Tabla 15. Condiciones de amplificación para los 7 genes “housekeeping”	91
Tabla 16. Condiciones de las distintas polimerasas utilizadas en la amplificación de los 7 genes “housekeeping”	92
Tabla 17. Características de los 160 pacientes con aislamiento de <i>P. aeruginosa</i> en muestras del tracto respiratorio inferior (TRI) en el HCU Lozano Blesa durante un año (Febrero 2013-2014).....	101
Tabla 18. Patrones de la proteína OprD de <i>P. aeruginosa</i> obtenidos en los aislados procedentes del tracto respiratorio inferior.	105
Tabla 19. Asociación de las secuencias tipo con las estructuras de los integrones de clase 1 en las cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	109
Tabla 20. Patrones de virulencia encontrados en los aislados de <i>P. aeruginosa</i> del tracto respiratorio inferior	110
Tabla 21. Porcentajes de resistencia antibiótica obtenidos con el sistema de Microdilución MicroScan WalkAway® en 42 aislados de <i>P. aeruginosa</i> procedentes de portadores fecales según CLSI 2015	113
Tabla 22. Alteraciones de la porina OprD detectadas en los aislados de <i>P. aeruginosa</i> de portadores fecales y sensibilidad a carbapenems.....	115
Tabla 23. Presencia de genes de virulencia en aislados de <i>P. aeruginosa</i> de portadores fecales.....	116
Tabla 24 Características principales de los 18 aislados de <i>P. aeruginosa</i> de portadores fecales tipados mediante MSLT (MultiLocus Sequence Typing)	120
Tabla 25. Características de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> procedentes del tracto respiratorio inferior incluidas en esta tesis	165
Tabla 26. Alteraciones en la proteína OprD detectadas en cepas con fenotipo MBL negativo de los aislados de <i>P. aeruginosa</i> del tracto respiratorio inferior	177

Tabla 27. Alteraciones en la proteína OprD detectadas en cepas con fenotipo MBL de los aislados de <i>P. aeruginosa</i> del tracto respiratorio inferior.....	180
Tabla 28. Características de los aislados de <i>P.aeruginosa</i> procedentes del tracto respiratorio inferior: relación del fenotipo de resistencia con el patrón de la proteína OprD, estructura de integrones, PFGE y MLST.....	181

Introducción

1. El género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se sitúa dentro del orden Pseudomonadales. Etimológicamente, “*Pseudomonas*” significa “falsa unidad”, del griego “*pseudo*” que significa “falso”, y “*monas*” que significa “unidad simple”.

Las especies del género *Pseudomonas* crecen, en general, rápidamente y en un amplio rango de temperaturas, de 20°C a 42°C aproximadamente, y son capaces de desarrollarse bajo diversas condiciones ambientales. Por todas estas características, estos microorganismos son muy ubicuos y pueden encontrarse en ecosistemas acuáticos y terrestres, siendo importantes patógenos tanto de plantas como de animales y humanos (Hardalo and Edberg, 1997; Palleroni, 1993; Silby et al., 2011). La Figura 1 muestra la gran versatilidad tanto ambiental como funcional del género *Pseudomonas*.

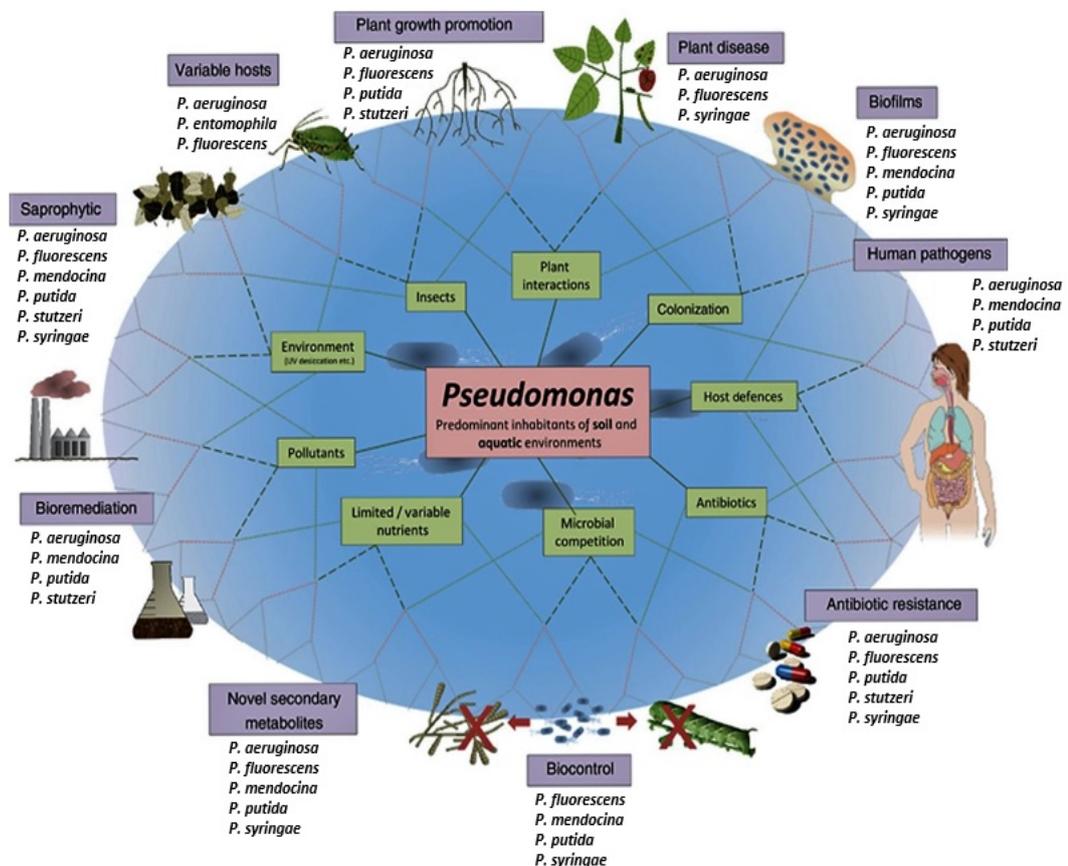


Figura 1. Ecología de las especies del género *Pseudomonas* (Silby et al., 2011)

Introducción

Las especies de este género son frecuentemente resistentes a antibióticos, detergentes, desinfectantes, metales pesados y solventes orgánicos (D'Arezzo et al., 2012; Lanini et al., 2011).

Dan lugar a unas colonias muy características, con brillo metálico y olor afrutado. Además, producen pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta de longitud de onda baja (254 nm), sobre todo cuando crecen en medios con bajo contenido en hierro (Figura 2). El pigmento fluorescente encontrado con mayor frecuencia en estas especies es la pioverdina (Figura 3), la cual proporciona un pigmento amarillo-verdoso, aunque no es el único. La piocianina, es un pigmento no fluorescente de color azul-verdoso producido por la mayoría de cepas de *P. aeruginosa*; la piorubina, de color rojo similar al óxido; la oxiclolorafina, de color naranja encontrado en *P. chlororaphis* y la clolorafina, de color verde descrito también en *P. chlororaphis*. Muchos de estos pigmentos actúan como sideróforos en los sistemas bacterianos de captación de hierro (Meyer et al., 2002). La producción de estos pigmentos puede demostrarse cultivando esta bacteria en medios que no contengan hierro. Las cepas no pigmentadas presentan un color gris pálido, y en agar sangre suelen presentar hemólisis.

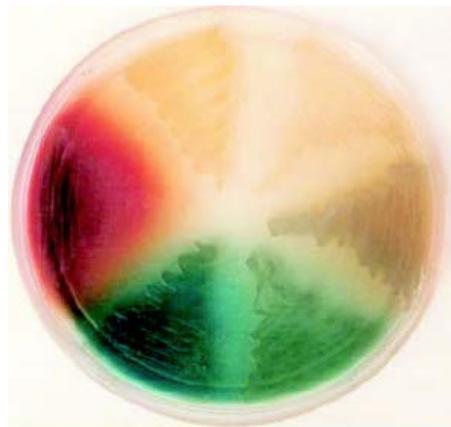


Figura 2. Pigmentos producidos por distintos aislados de *Pseudomonas*



Figura 3. Pigmento verde (pioverdina) producido por *P. aeruginosa*

El principal patógeno de la familia *Pseudomonadaceae* es *Pseudomonas aeruginosa*, implicada en múltiples procesos patológicos siendo una de las principales causas de infecciones nosocomiales graves, como neumonía, infecciones del tracto urinario o sepsis (Kaye and Pogue, 2015; Lee et al., 2013; Lister et al., 2009; Raineri et al., 2010). Por ello es la especie más estudiada, aunque hay otras especies de *Pseudomonas* presentes en infecciones humanas como *P. putida* (Hardjo Lugito et al., 2015), *P. stutzeri* (Kalra et al., 2015), *P. fluorescens* (Liu et al., 2015), *P. mendocina* (Chi et al., 2005; Suel et al., 2011) o *P. fulva* (Liu et al., 2014), entre otras.

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Estructura e identificación

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo, no fermentador de hidratos de carbono, ligeramente curvado. En la mayoría de los casos presenta un único flagelo polar, aunque se han observado aislados con dos o tres flagelos. La movilidad les permite responder a estímulos químicos (quimiotaxis), así como localizar sustratos a bajas concentraciones (Palleroni, 1993). Es oxidasa y catalasa positiva, crece en agar MacConkey como no fermentador de lactosa. Posee un metabolismo aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando el nitrato (NO_3) o la arginina como aceptores finales de electrones. Puede degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno gas (Palleroni, 1993; Silby et al., 2011; Stanier et al., 1966).

Introducción

La mayoría de especies tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C, pero pueden sobrevivir en gran diversidad de ambientes, incluyendo aquellos con elevado contenido en sales, y en un rango de temperaturas comprendido entre 20-42°C. Además presentan gran versatilidad para utilizar como nutrientes una notable cantidad de compuestos, lo que demuestra una gran capacidad metabólica y les permite establecerse y sobrevivir en los más diversos ambientes (Palleroni, 2003).

Tanto la morfología de las colonias como la producción de pigmentos pueden ser bastante heterogéneos. La colonia típica es alargada y plana con el centro elevado, con brillo metálico y aspecto gelatinoso, viscoso, especialmente en zonas de mayor crecimiento. Pero existen numerosas variantes, como cuando crecen formando biofilms, después de que estas cepas hayan estado expuestas a estrés medioambiental, por la presencia de antibióticos o durante infecciones crónicas de las vías respiratorias.

Un fenotipo comúnmente observado cuando estas cepas crecen en medio sólido es el mucoso o mucoide (Figura 4), consecuencia de la sobreproducción de alginato, que es un polisacárido extracelular. Este fenotipo suele darse en aislados procedentes de vías respiratorias de pacientes con Fibrosis Quística (FQ) o Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), y se relaciona con infecciones crónicas en estos pacientes. El alginato provoca un aumento de la resistencia a antibióticos del microorganismo y un aumento de la adherencia a las células epiteliales (May et al., 1991).

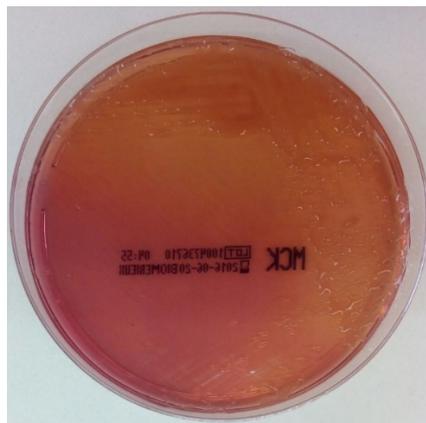


Figura 4. Fenotipo mucoso de *P. aeruginosa* procedente de una muestra de esputo de un paciente con fibrosis quística

1.1.2 Epidemiología

Pseudomonas aeruginosa es el patógeno humano más importante dentro del género *Pseudomonas*, tanto por el número como por el tipo de infecciones causadas y por la morbilidad y mortalidad asociadas. Es también patógeno oportunista de plantas y animales (Bugden, 2013; Khan and Cerniglia, 1994).

P. aeruginosa es capaz de sobrevivir en ambientes húmedos con mínimos requerimientos nutricionales, por ello supone un problema de salud en el ámbito hospitalario ya que esta especie ha sido aislada de una gran variedad de soluciones acuosas, incluyendo desinfectantes, jabones, fluidos de irrigación y de diálisis, y sus equipamientos. Además de esta procedencia nosocomial, también puede estar presente en piscinas, conducciones de agua caliente, soluciones de lentes de contacto, cosméticos e incluso en drogas inyectables (Lanini et al., 2011; Lin et al., 2016).

Aunque sea menos problemática que la infección nosocomial, la comunitaria también suele asociarse a entornos húmedos, siendo las más frecuentes las infecciones oculares relacionadas con el uso de lentes de contacto, otitis externa e infecciones cutáneas relacionadas con piscinas o baños calientes (Abidi et al., 2013; Petit et al., 2013).

No es frecuente encontrar *P. aeruginosa* como flora comensal habitual en individuos sanos, pero en caso de que se encuentre, el lugar más frecuente de colonización es el tracto gastrointestinal, y ha sido detectada entre el 2,6 y el 24 % en muestras fecales de individuos sanos (Estepa et al., 2014; Lister et al., 2009; Valenza et al., 2015). La colonización intestinal por *P. aeruginosa* es un factor muy importante para el desarrollo de infecciones sistémicas (Valenza et al., 2015). Otros lugares de colonización en individuos sanos, menos frecuentes que el tracto gastrointestinal, son faringe, mucosa nasal, axilas o perineo, zonas en las que se ha aislado este microorganismo con una frecuencia entre el 2 y 10 % en individuos sanos (Lister et al., 2009).

Introducción

En cambio, las tasas de colonización son elevadas en individuos inmunodeprimidos u hospitalizados, en particular aquellos que pasan largos períodos de hospitalización, que hayan recibido terapia antimicrobiana de amplio espectro o quimioterapia, pudiendo causar infecciones muy graves que pueden llegar a ser mortales (Tashiro et al., 2013). Por ello se considera un patógeno oportunista, y uno de los principales responsables de infecciones nosocomiales. Los lugares de colonización de estos pacientes son los mismos que en individuos sanos, y además se incluye el tracto respiratorio inferior, sobre todo en pacientes intubados, sometidos a ventilación mecánica (Bassetti et al., 2014; Mayhall, 1997).

Esta especie es la principal causa de neumonías asociadas a ventilación mecánica e infecciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos. Los pacientes más susceptibles a la infección por *P. aeruginosa* son los inmunodeprimidos, los que presentan un epitelio pulmonar comprometido debido a enfermedades como la fibrosis quística, soluciones de continuidad en la barrera cutánea como los grandes quemados, pacientes con ulceraciones o abrasiones mecánicas, como las producidas tras la implantación de catéteres. La inmunodeficiencia del individuo combinada con la elevada incidencia de cepas resistentes a los antibióticos, hace que el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* se convierta en un reto médico (Ali et al., 2015; Kwee et al., 2015).

Las infecciones por *P. aeruginosa* se pueden clasificar en agudas y crónicas. Las infecciones agudas, como las neumonías asociadas a ventilación mecánica, son citotóxicas, invasivas y frecuentemente dan lugar a infección sistémica, shock séptico y elevada mortalidad; en cambio, las infecciones crónicas, como las asociadas a fibrosis quística, a pesar de que los esputos presentan elevada colonización, son muy poco invasivas, no citotóxicas y no suelen progresar a infección sistémica, aunque pueden persistir durante años y acaban deteriorando el epitelio pulmonar complicando así la enfermedad de base (Jansen et al., 2016; Oliver et al., 2000; Ruffin et al., 2016). La cronicidad en este tipo de infecciones se debe, principalmente, a las adaptaciones de *P. aeruginosa* a las vías respiratorias de estos pacientes, entre las que se incluyen la formación de biofilms o la formación de cápsulas de naturaleza polisacárida.

La colonización de los tejidos se ve facilitada por la síntesis de adhesinas. Las adhesinas mejor caracterizadas son las de las fimbrias, aunque hay también otros tipos de adhesinas como los lipopolisacáridos, flagelos, proteínas de la membrana externa y alginato, que contribuyen a la adhesión de este microorganismo a superficies (Korpi et al., 2016).

1.1.3 Factores de virulencia

La comunicación bacteriana, tanto entre microorganismos de la misma especie como de especies distintas, ocurre a través de un sistema altamente desarrollado llamado quórum sensing (QS) (Miller and Bassler, 2001; Whitehead et al., 2001).

QS es un mecanismo dependiente de la densidad celular, mediante el cual las bacterias coordinan diferentes actividades entre las que se incluye la producción de distintos factores de virulencia. *Pseudomonas aeruginosa* posee al menos dos sistemas QS bien definidos e interrelacionados, las y rhl (Figura 5), que controlan la producción de distintos factores de virulencia, entre los que se incluyen elastasas (lasB y lasA), proteasa alcalina (aprA), rhamnolípidos que intervienen en síntesis de biosurfactantes (rhlAB), exotoxina A (exoA) con actividad ADP- ribosiltransferasa, cianuro de hidrógeno, superóxido dismutasa, etc. (de Kievit and Iglewski, 2000; Schaber et al., 2004; Smith and Iglewski, 2003).

La toxina más potente de *P. aeruginosa* es la exotoxina A, que inhibe la síntesis proteica en células eucariotas una vez se ha unido al receptor presente en ellas, y además posee actividad inmunodepresora. Esta exotoxina está posiblemente implicada en la dermatonecrosis que tiene lugar en las quemaduras o en el daño tisular en las infecciones pulmonares crónicas (Michalska and Wolf, 2015).

La destrucción tisular asociada a las infecciones por *P. aeruginosa* puede atribuirse también a las elastasas que hidrolizan numerosas proteínas del hospedador como la elastina, la laminina, el fibrinógeno, el colágeno, la transferrina, inmunoglobulinas, sustancias proinflamatorias y algunos componentes del complemento (Ruffin et al., 2016; van der Plas et al., 2016), también interviene en este

Introducción

proceso la proteasa alcalina que tiene como sustratos ciertos factores del complemento, la fibrina, el fibrinógeno y citoquinas (Bardoel et al., 2012).

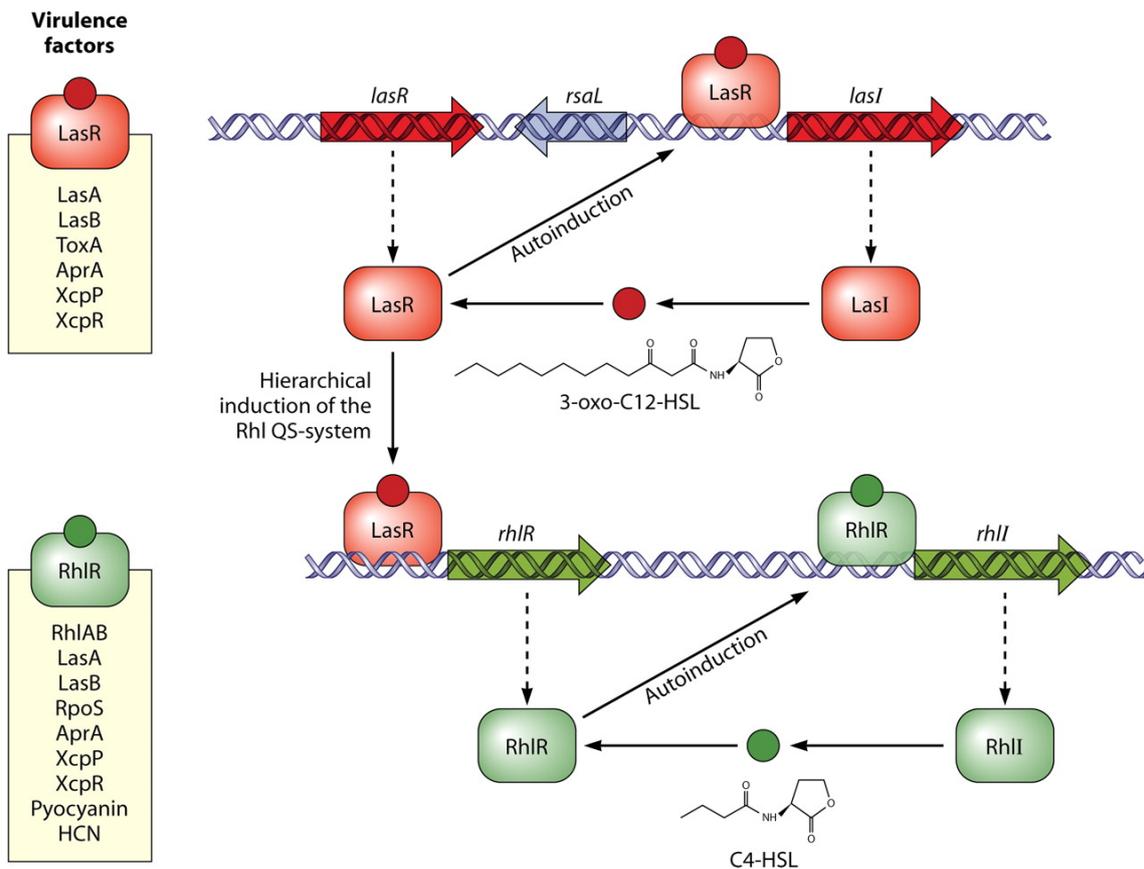


Figura 5. Interrelación de los sistemas quórum sensing (*las* y *rhl*) de *P. aeruginosa* (Jimenez et al., 2012)

El mayor determinante de patogenicidad de *P. aeruginosa* es el Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) mediante el cual se produce la inyección de diversos factores de virulencia directamente en el citoplasma de las células del hospedador (Feltman et al., 2001; Hauser, 2009). Este sistema es común a numerosos microorganismos Gram negativos (Figura 6). Las proteínas efectoras son dos ADP- ribosiltransferasas (*exoS* y *exoT*), una adeniliclasa (*exoY*) y un factor citolítico con actividad fosfolipasa A (*exoU*). Este sistema se expresa en respuesta a diversas señales ambientales, incluyendo bajas concentraciones de Ca^{2+} , algunos componentes presentes en el suero y con el contacto con superficies celulares eucariotas (Hauser, 2009).

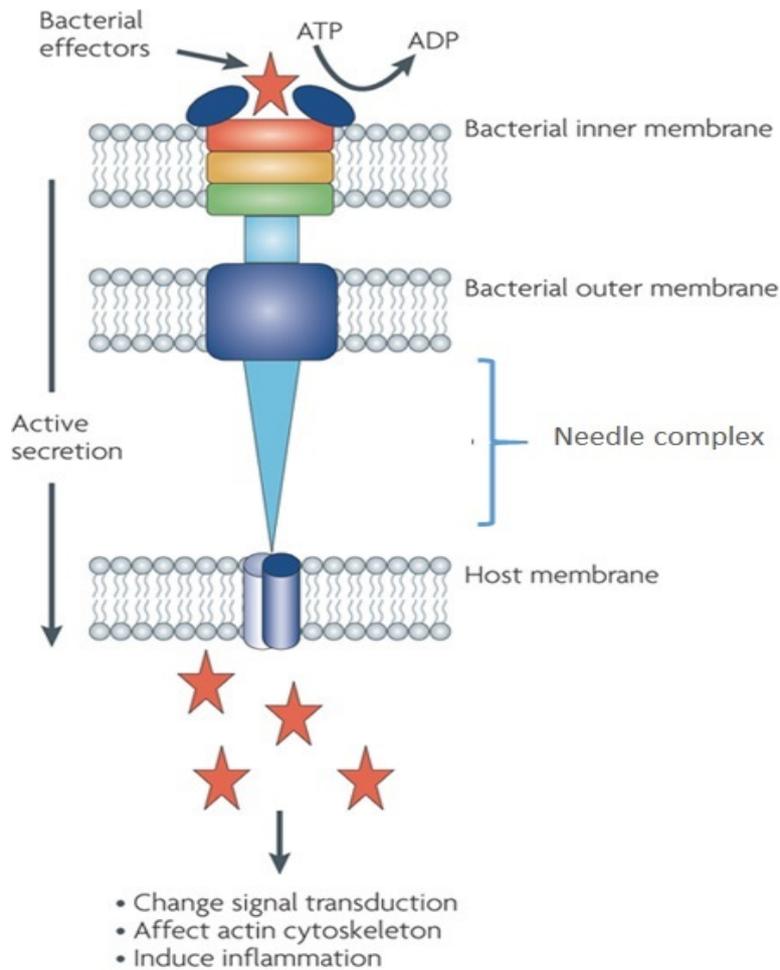


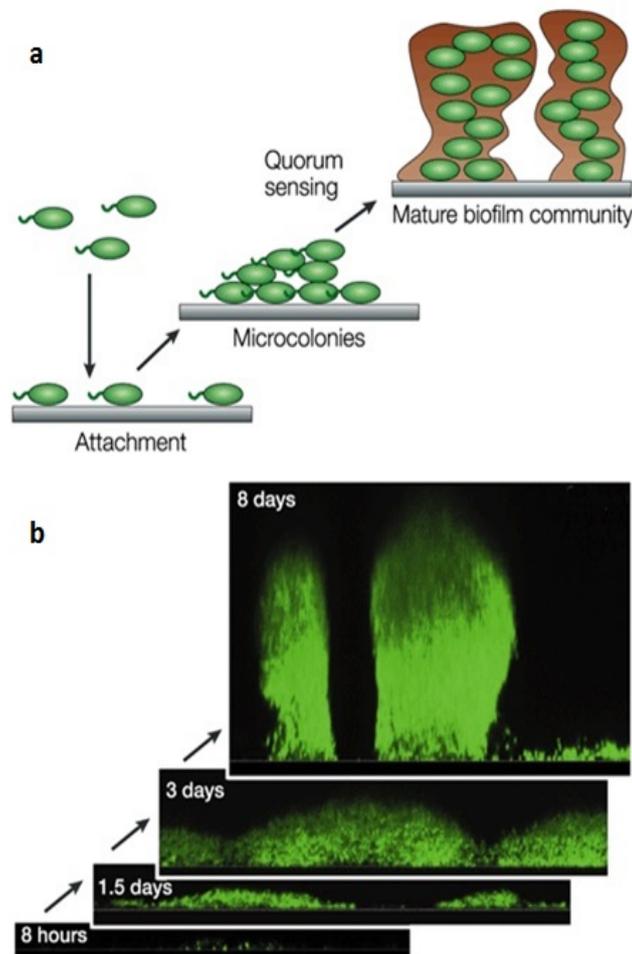
Figura 6. Representación del mecanismo de acción del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) (Rasko and Sperandio, 2010)

En las infecciones respiratorias humanas, la expresión de T3SS se ha asociado a un incremento del riesgo de mortalidad (Roy-Burman et al., 2001). En concreto, la toxina ExoU ha sido caracterizada como el principal factor de virulencia responsable del daño epitelial alveolar en pacientes con neumonía por *P. aeruginosa* (Sawa et al., 2014). El T3SS juega un papel importante en la supervivencia de este microorganismo en el medio ambiente, tanto en el agua como en el suelo (Kulich et al., 1994).

La formación de biofilm (Figura 7) también influye en la patogenicidad de *P. aeruginosa*, porque le va a permitir colonizar superficies como, por ejemplo, lentes de contacto, catéteres o tubos endotraqueales, y también se cree que contribuye a la infección crónica de las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística (Lund-Palau

Introducción

et al., 2016). Las bacterias que crecen dando lugar a biofilms presentan elevada resistencia a los antibióticos, a la fagocitosis, al sistema del complemento y a los biocidas, originando infecciones difíciles de tratar. Cuando el biofilm está consolidado, las bacterias se muestran refractarias a numerosos tratamientos antibióticos. Diversos estudios se centran en prevenir la formación de biofilm mediante diferentes estrategias, como evitar el primer paso de su formación: la adhesión (Figura 7), utilizar enzimas que degraden el biofilm maduro o agentes que interfieran el quórum sensing. Sin embargo, estas estrategias presentan limitaciones como que el espectro de microorganismos frente a los cuales son eficaces es reducido, y la potencial toxicidad o la respuesta inmune *in vivo* (Chaignon et al., 2007; Ren et al., 2016).



- Secuencia de mecanismos que tienen lugar durante la formación del biofilm.
- Desarrollo de un biofilm de *P. aeruginosa* a lo largo del tiempo. Imágenes realizadas con microscopio confocal.

Figura 7. Quórum sensing y formación del biofilm (Fuqua and Greenberg, 2002)

La presencia de todos estos factores de virulencia se ha relacionado con una mayor patogenicidad de *P. aeruginosa*. Sin embargo, a pesar de esta gran colección de factores de virulencia, *P. aeruginosa* raramente infecta a personas inmunocompetentes o tejidos que no estén dañados. Por ello, la pérdida de la integridad epitelial, especialmente con una disminución de la función inmunológica, es normalmente un requisito para las infecciones por este patógeno oportunista (Cullen et al., 2015; Maldonado et al., 2016).

2. Antibióticos con acción anti *Pseudomonas*

Pseudomonas aeruginosa es intrínsecamente resistente a numerosos antibióticos y, además, tiene facilidad para adquirir material genético exógeno, incluyendo genes de resistencia a antibióticos y es capaz de desarrollar resistencia durante el tratamiento antimicrobiano por diferentes mecanismos, comprometiendo así la efectividad del mismo. La resistencia a diferentes familias de antibióticos es muy común en *P. aeruginosa* y son numerosos los estudios que describen cepas de este microorganismo sensibles únicamente a colistina. La resistencia adquirida en *P. aeruginosa* es multifactorial y se atribuye tanto a mutaciones cromosómicas como a la adquisición horizontal de genes de resistencia.

Los antibióticos con acción anti-*Pseudomonas* más importantes incluyen:

- **Betalactámicos:** cefepime, ceftazidima, ceftolozano, piperacilina, ticarcilina, aztreonam, imipenem y meropenem.
- **Aminoglucósidos:** gentamicina, amikacina y tobramicina.
- **Quinolonas:** ciprofloxacino y levofloxacino.
- **Polimixinas:** colistina y polimixina B.

Cabe destacar dentro de los betalactámicos una nueva cefalosporina, ceftolozano, que es actualmente la cefalosporina con mayor actividad frente a *P. aeruginosa*. Influyen en este perfil su mayor estabilidad frente a la betalactamasa tipo AmpC de esta bacteria y no se ve afectado por la pérdida o alteración de las porinas ni

Introducción

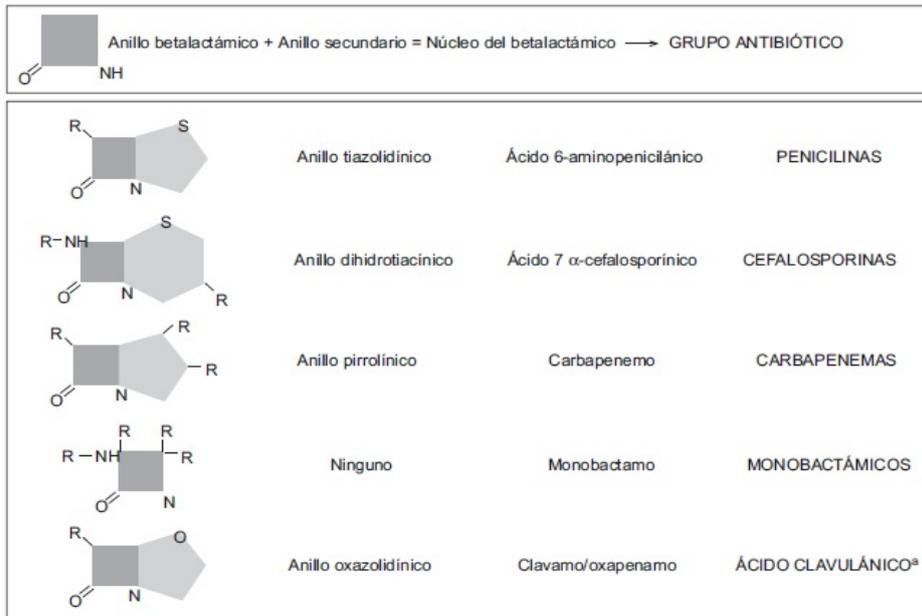
por la presencia de bombas de expulsión activa (Zhanel et al., 2014), que son los tres principales mecanismos de resistencia intrínseca que presenta *P. aeruginosa*, como veremos más adelante.

Ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación, cuando se combina con avibactam, un inhibidor de betalactamasas no betalactámico, adquiere un aumento significativo de su actividad contra microorganismos Gram negativos productores de serinobetalactamasas. Avibactam inhibe betalactamasas de clase A (KPC) y C (AmpC) de Ambler, así como determinadas enzimas de clase D (OXA-48). Esta nueva combinación de fármacos presenta muy buena actividad frente a enterobacterias productoras de carbapenemasas y *Pseudomonas* multirresistentes, aunque su utilización debe ser responsable y limitarse a aquellos pacientes sin alternativas terapéuticas (Sharma et al., 2016).

Se describen a continuación los mecanismos de acción y resistencia de estos antibióticos centrándonos principalmente en los betalactámicos, en concreto carbapenems, ya que han sido los estudiados en este trabajo.

2.1 Betalactámicos

Los betalactámicos son antibióticos de actividad bactericida lenta, siempre que la concentración plasmática alcanzada supere la concentración inhibitoria mínima (CIM). La presencia del anillo betalactámico es lo que define a esta familia de antibióticos, al cual se añaden diferentes radicales para dar lugar a los distintos grupos de antibióticos (Figura 8). Los antibióticos betalactámicos producen su efecto a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared celular e inducción de la autólisis bacteriana. La naturaleza de su diana hace que la toxicidad de esta familia de antibióticos sea baja (Suárez and Gudíol, 2009).



^aLos inhibidores de betalactamasas utilizados en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figura 8. Estructura química de los antibióticos betalactámicos (Suárez and Gudiol, 2009)

La pared celular es una estructura que se sitúa por fuera de la membrana plasmática bacteriana y está compuesta principalmente por peptidoglucano. Concretamente, la pared celular de los microorganismos Gram negativos (Figura 9) contiene menor cantidad de peptidoglucano y es más compleja que la de los Gram positivos, ya que consta de una membrana externa formada por mureína, proteínas, lipoteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS). Éste último contiene cadenas de polisacáridos específicas (antígeno O) las cuales son las responsables de la antigenicidad de las distintas especies mientras que la parte lipídica es la responsable de la actividad endotóxica.

El peptidoglucano está formado por cadenas largas de glúcidos, constituidas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina unidos mediante un enlace glucosídico β -1,4 y cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y se fijan al ácido murámico, dando lugar a una estructura en forma de malla. La síntesis de los componentes del peptidoglucano tiene lugar en el citoplasma y, una vez formados, son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio periplásmico. Allí se van ensamblando hasta formar dicha estructura. La última fase de

Introducción

la síntesis de la pared celular es el ensamblaje de los tetrapéptidos a partir de pentapéptidos mediante la pérdida del aminoácido terminal. Las enzimas que realizan esta función son las transpeptidasas localizadas en el espacio periplásmico (Livermore, 2006).

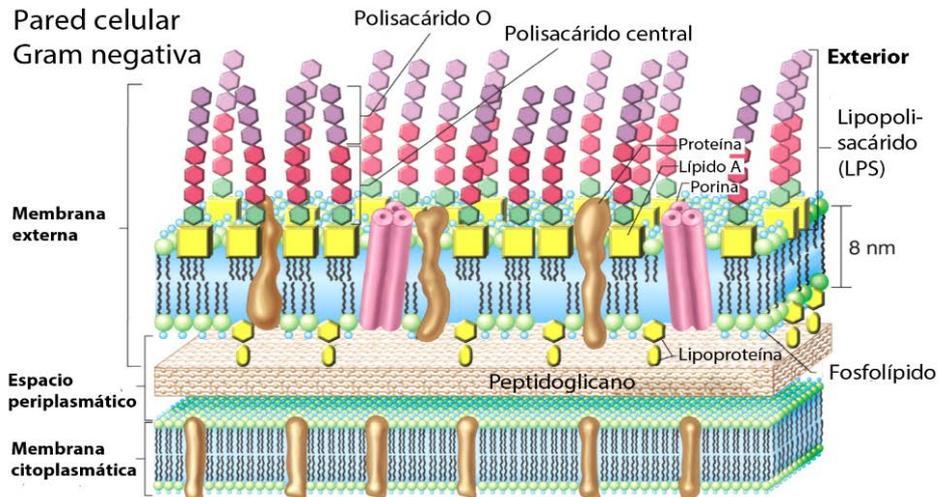


Figura 9. Pared celular de los microorganismos Gram-negativos (Imagen obtenida de <http://www.bmanuel.org/corling/corling1-5.html>)

El anillo betalactámico y el extremo D-Alanina-D-Alanina, que es la región del pentapéptido donde se unen las transpeptidasas, presentan similitud estructural. De este modo, los betalactámicos se unen covalentemente a las transpeptidasas bloqueando así este paso e impidiendo la correcta formación de la pared celular bacteriana (Figura 10). Por ello, estas enzimas se denominan también PBP (*Penicillin Binding Protein* 'proteína de unión de la penicilina'). Sin la pared celular, la bacteria quedará expuesta al medio y no resistirá cambios en la presión osmótica. Para que los betalactámicos lleven a cabo su acción, es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es en esta fase cuando se sintetiza la pared.

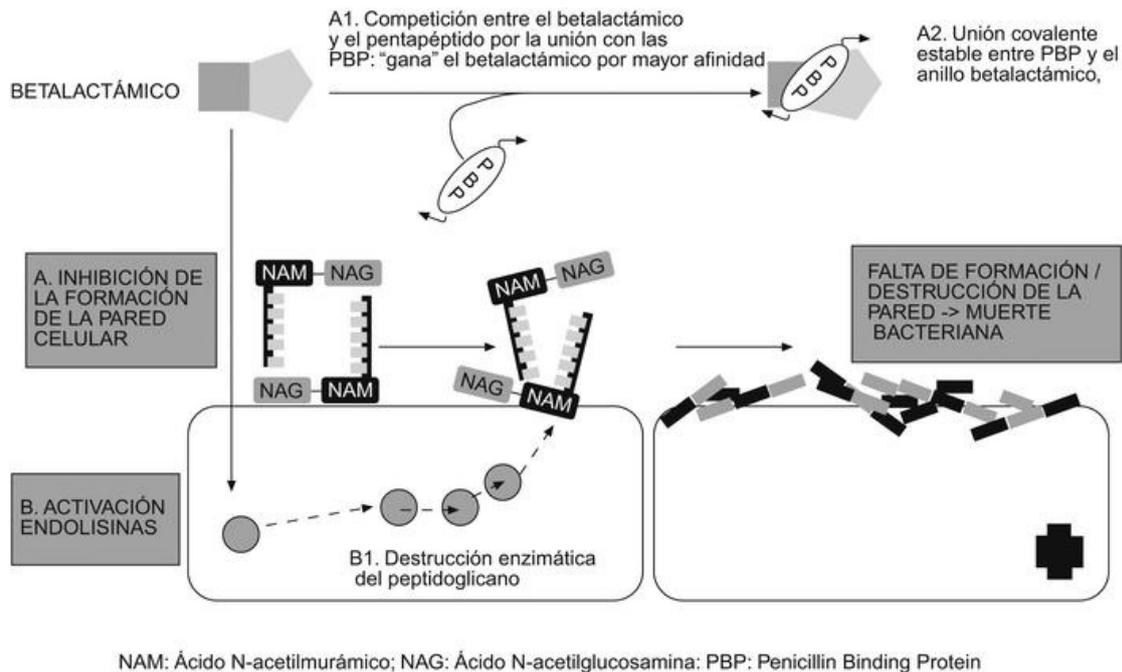


Figura 10. Mecanismo de acción de los betalactámicos (Suárez and Gudiol, 2009)

Los betalactámicos inducen además la activación de autolisinas bacterianas endógenas que destruyen el peptidoglucano. Aquellas cepas que carezcan de autolisinas inhibirán su crecimiento en presencia del betalactámico, pero no se destruirán completamente.

2.1.1 Mecanismos de resistencia a betalactámicos

La resistencia frente a esta familia de antibióticos obedece a varios mecanismos: reducción de la permeabilidad de la membrana, expulsión activa, modificación de la diana de acción, que es el principal mecanismo de resistencia en microorganismos Gram-positivos, o inactivación enzimática del antibiótico (Martínez-Martínez and Calvo, 2010). Este último mecanismo es el mayor determinante de resistencia en bacterias Gram-negativas, incluyendo *P. aeruginosa*, y las enzimas responsables son las betalactamasas, que actúan hidrolizando el enlace amida del anillo betalactámico inactivando así el antibiótico (Poole, 2011).

La clasificación de las betalactamasas, que se muestra en la Tabla 1, se describe en función de dos parámetros:

Introducción

- I. **Clasificación molecular:** Según su estructura proteica (Ambler, 1980). Así las betalactamasas se clasifican en 4 clases (A-D). Las de clase B son metalobetalactamasas, ya que requieren un ion cinc (Zn^{2+}) para llevar a cabo su actividad hidrolítica, mientras que las de clase A, C y D no dependen de metales sino que requieren un aminoácido en su centro activo, la serina.
- II. **Clasificación funcional:** Según sus características bioquímicas y funcionales (Bush et al., 1995). Se establecen 4 grupos que a su vez se subdividen en función del sustrato y del perfil de inhibición. Esta clasificación refleja la resistencia a diferentes antibióticos betalactámicos y diferentes inhibidores, por lo que es más útil a nivel clínico.

Según la clasificación funcional de las betalactamasas propuesta por Bush-Medeiros-Jacoy, diferenciamos:

Grupo 1: betalactamasas AmpC, cefalosporinasas o cefamicinasas. Estas enzimas van a hidrolizar la mayoría de los antibióticos betalactámicos, incluidas las cefamicinas y no son inhibidas por inhibidores clásicos de betalactamasas. Se corresponden con las betalactamasas de clase C de la clasificación de Ambler.

Grupo 2: serino-betalactamasas. Estas enzimas actúan sobre un amplio conjunto de antibióticos: penicilinas, cefalosporinas, oxacilinas y carbapenems. Son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Dentro de este grupo se incluyen enzimas de las clases A y D de Ambler. Se diferencian 6 subgrupos:

- Subgrupo 2a: penicilinasas. Son las enzimas de los microorganismos Gram positivos capaces de hidrolizar la penicilina G y son inhibidas por el ácido clavulánico.
- Subgrupo 2b: dentro de este subgrupo están la mayoría de betalactamasas de amplio espectro, que hidrolizan penicilinas, y si su expresión es elevada

hidrolizan cefalosporinas de 1^º generación. También son inhibidas por ácido clavulánico. Un ejemplo de enzimas que se encuentran en este grupo son las betalactamasas tipo TEM y SHV.

- Subgrupo 2be: betalactamasas de espectro ampliado (BLEE). Derivan del grupo anterior y se generan por mutaciones puntuales. Además de las penicilinas, hidrolizan también todas las cefalosporinas, excepto las cefamicinas, y el aztreonam. Son sensibles a carbapenémicos e inhibidas por los inhibidores de betalactamasas. Estas betalactamasas se incluyen dentro del grupo A de Ambler aunque hay algunas BLEE (oxacilinasas) que pertenecen al grupo 2d (clase D de Ambler). A parte de las enzimas tipo TEM y SHV se encuentran las cefotaximasas o CTX-M, que pertenecen también a la clase A de Ambler y son resistentes a cefuroxima, cefotaxima, cefepime y a ceftazidima en menor medida.
- Subgrupo 2br: betalactamasas resistentes a inhibidores (IRT). Son derivadas de las betalactamasas tipo TEM pero resistentes a los inhibidores clásicos de betalactamasas.
- Subgrupo 2c: carbenicilinasas (CARB o PSE). Estas enzimas hidrolizan las carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina).
- Subgrupo 2d: oxacilinasas. Hidrolizan la oxacilina. Son más resistentes a la acción de los inhibidores que las BLEE.
- Subgrupo 2e: Cefalosporinasas cromosómicas de *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri* y *Citrobacter sedlakii*. Son betalactamasas de clase C de Ambler.
- Subgrupo 2f: son las serino-betalactamasas de clase A de la clasificación de Ambler. Son carbapenemasas, es decir, hidrolizan los carbapenems y son inhibidas por el ácido clavulánico pero no por quelantes de iones.

Grupo 3: metalo-betalactamasas o MBL. Estas enzimas requieren un ion zinc divalente para ser activas, por tanto son inhibidas por agentes quelantes de iones como el EDTA y no se inhiben por los inhibidores de betalactamasas. Hidrolizan todos los antibióticos betalactámicos excepto el aztreonam. Este grupo de enzimas se corresponde con la clase B de la clasificación de Ambler.

Grupo 4: penicilinasas de *Burkholderia cepacia*. No están caracterizadas completamente por lo que hasta el momento no se incluyen dentro de ninguna clase de la clasificación de Ambler.

Tabla 1. Clasificación de las betalactamasas (Bush and Jacoby, 2010; Lee et al., 2016a)

Grupo Bush	Clase Ambler	Sustratos principales	Inhibidos por:		Enzimas representativas
			Ácido clavulánico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	NO	NO	AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cefalosporinas	NO	NO	GC-1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	SI	NO	PC1, LEN
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	SI	NO	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	SI	NO	TEM-3, SHV-2, PER-1, CTX-M-15, VEB-1
2br	A	Penicilinas	NO	NO	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	NO	NO	TEM-50
2c	A	Carbenicilinas	SI	NO	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilinas, cefepime	SI	NO	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	NO	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	NO	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	Variable	NO	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	SI	NO	CepA, CfxA
2f	A	Carbapenémicos	Variable	NO	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenémicos	NO	SI	IMP-1, VIM-1, CrA, IND-1
3b	B	Carbapenémicos	NO	SI	CphA, Sfh-1

De todos los antibióticos betalactámicos, los carbapenems son los de mayor espectro de acción y mejor actividad frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Por ello, son utilizados como antibióticos de “última línea”, cuando empeora el estado de los pacientes con infecciones no filiadas o cuando se sospecha que estas infecciones están causadas por un germen resistente (El-Gamal and Oh, 2010; Papp-Wallace et al., 2011). Numerosos estudios recientes muestran que la resistencia a carbapenems está aumentando claramente en todo el mundo (Estepa et al., 2016; Kaye and Pogue, 2015; Rojo-Bezares et al., 2016; Souli et al., 2008; Zalacain et al., 2016; Zhao et al., 2015).

Los carbapenems más utilizados son ertapenem, imipenem, meropenem y doripenem, cuya estructura química se muestra en la Figura 11. Su mecanismo de acción, al igual que el resto de betalactámicos, impide la formación de la pared celular uniéndose a las PBPs y dando lugar a la lisis bacteriana. Para producir su acción los carbapenems deben penetrar al interior de la célula, a través de unos canales proteicos o porinas situadas en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

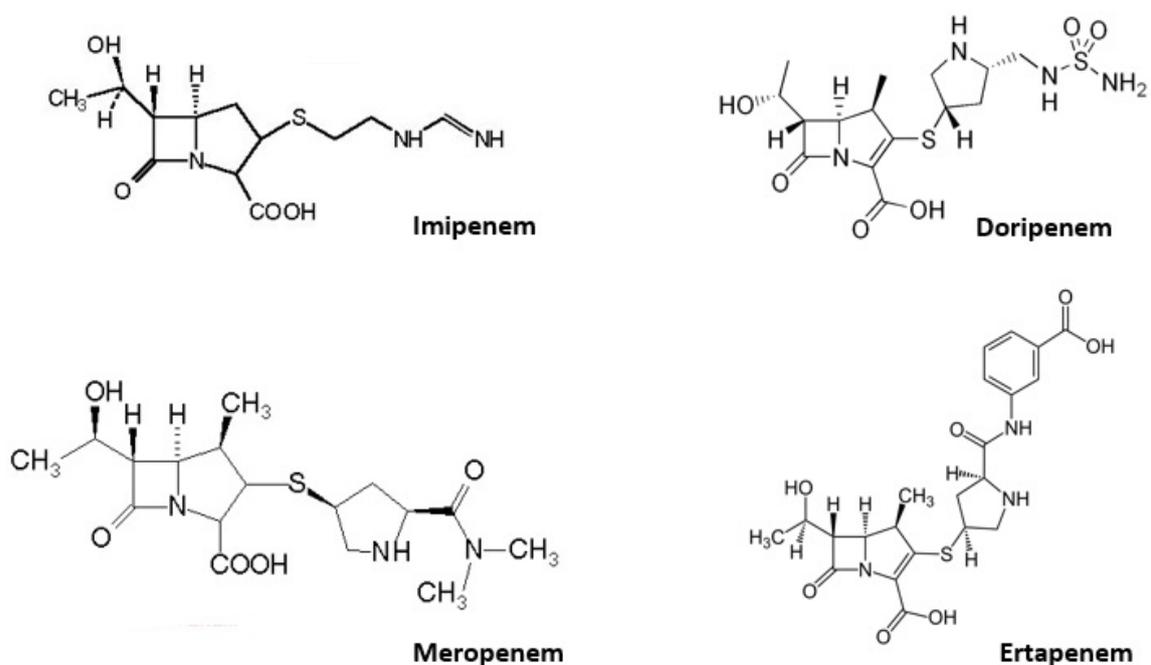


Figura 11. Estructura química de los antibióticos carbapenémicos más utilizados.

Introducción

Ertapenem presenta escasa actividad frente a *Pseudomonas* spp. ya que por su elevado peso molecular y su carácter aniónico no es capaz de atravesar las porinas y no alcanza niveles suficientes en el espacio periplásmico para ejercer su acción, aunque en enterobacterias sí es efectivo y su uso está indicado en infecciones causadas por bacterias productoras de BLEEs (Livermore et al., 2005). En cambio el resto de carbapenems al tener un peso molecular menor sí son capaces de atravesar las porinas y son activos, además, frente a *Pseudomonas* spp.

Los mecanismos de resistencia a los carbapenems en *P. aeruginosa* son la disminución de la permeabilidad de la membrana externa o alteración de las porinas, bombas de expulsión activa y la inactivación enzimática por producción de betalactamasas; dentro de ellas, las carbapenemasas son las de mayor importancia, aunque la resistencia a carbapenems puede deberse también a la hiperproducción de la betalactamasa cromosómica e inducible AmpC (Poole, 2011).

2.2 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son un componente esencial de la terapia anti-*Pseudomonas* y se utilizan para el tratamiento de una gran variedad de infecciones, particularmente infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (Cheer et al., 2003). La estructura química fundamental de los aminoglucósidos consiste en un anillo aminociclitol al cual se unen dos o más azúcares, con o sin grupo amino, por medio de enlaces glucosídicos u oxídicos. A modo de ejemplo, la Figura 12 muestra la estructura química del aminoglucósido más utilizado, gentamicina.

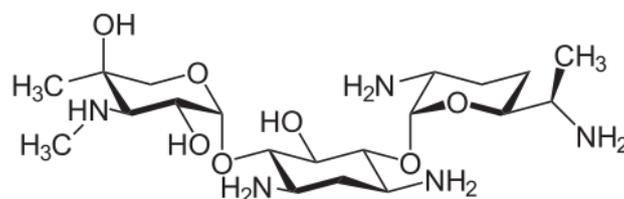


Figura 12. Estructura química de gentamicina

Estos antibióticos son bactericidas, actúan a nivel de la subunidad 30S del ribosoma inhibiendo la síntesis proteica, y presentan sinergia con otros antimicrobianos, sobre todo con betalactámicos, con los cuales se administran frecuentemente para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* (Basseti and Righi, 2013). Los aminoglucósidos con acción anti-*Pseudomonas* son gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina. El más utilizado es la gentamicina, aunque frente a microorganismos multirresistentes la amikacina es la más efectiva. La aparición de resistencias frente a estos antibióticos durante el tratamiento es baja, especialmente cuando se utilizan en terapia combinada (Yadav et al., 2015).

La resistencia a aminoglucósidos actualmente es muy común y su distribución es mundial. El mecanismo de resistencia más habitual es la modificación/inactivación del antibiótico, aunque también puede darse por alteraciones en la permeabilidad de la membrana, bombas de expulsión activa o modificación de la diana que impidan la unión del antibiótico al ribosoma. Se conocen tres tipos de enzimas modificantes de estos antibióticos: O-fosfotransferasas (APH), O-adeniltransferasas (ANT) y N-acetiltransferasas (AAC) y dentro de ellos se encuentran distintas variantes que se diferencian en su lugar de acción (Odumosu et al., 2015). La Tabla 2 muestra los distintos fenotipos que pueden darse en función de estas enzimas modificantes.

Tabla 2. Fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos anti-*Pseudomonas* y enzimas modificantes asociadas (adaptada (Odumosu et al., 2015; Poole, 2005; Vila and Marco, 2002)

Fenotipo de resistencia				Enzima modificante
GM	TOB	NET	AK	
R	S	S	S	AAC(3)-I
R	R	R	S	AAC(2')
R	R	R	S	AAC(3)-II o AAC(3)-IV
S/r	R	R	R	AAC(6')-I
R	R	R	S	AAC(6')-II
R	R	S	S	ANT(2')-I
S	R	S	R	ANT(4')-II
S	S	S	R	APH(3')-IV

GM: gentamicina; TOB: tobramicina; NET: netilmicina; AK: amikacina;

S: sensible; R: resistente; r: sensibilidad disminuida.

Introducción

Los genes codificantes de estas enzimas pueden encontrarse, tanto solos como acompañados de otros genes de resistencia a antibióticos, en casetes génicos en integrones, plásmidos o transposones.

2.3 Quinolonas

Las quinolonas son antibióticos sintéticos bactericidas cuya diana de acción es la DNA girasa y la topoisomerasa IV. Tienen un amplio espectro de actividad in vitro y presentan buena actividad frente a bacterias Gram negativas, y también frente a *P. aeruginosa*.

La primera quinolona utilizada fue ácido nalidíxico mostrando actividad sobretodo frente a bacterias Gram negativas y utilizada en infecciones del tracto urinario. Unos años más tarde, en la década de los 80, se introdujo un átomo de flúor y un anillo de piperazina, dando lugar a las denominadas fluoroquinolonas, dentro de las cuales se encuentra ciprofloxacino. Estas nuevas estructuras (Figura 13) presentaron mejoras tanto en la actividad biológica como en propiedades farmacocinéticas, convirtiendo a esta generación de quinolonas en fármacos de primera línea para numerosas infecciones. La última generación de fluoroquinolonas incluyen a levofloxacino y moxifloxacino, con mayor actividad frente a *Streptococcus pneumoniae* por lo que son muy utilizadas en infecciones respiratorias (Kosaka et al., 2016).

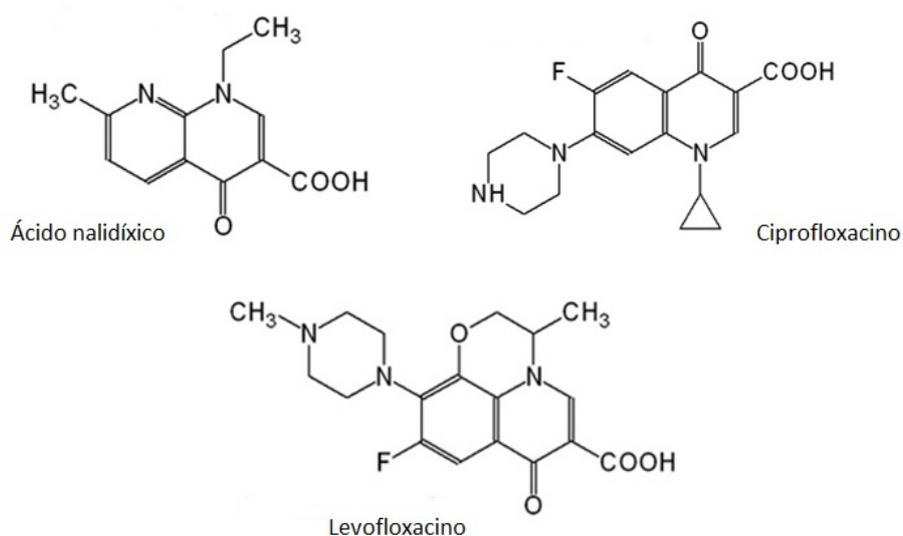


Figura 13. Estructura química de las quinolonas

La resistencia a fluorquinolonas en *P. aeruginosa* se debe, sobre todo, a cambios estructurales en la ADN girasa y topoisomerasa IV y a bombas de expulsión activa. Mutaciones puntuales en el gen *gyrA* localizado en la región QRDR (*quinolone-resistance-determining-region*) dan lugar a la síntesis de una ADN girasa o topoisomerasa II con baja afinidad por las fluoroquinolonas. Un único cambio aminoacídico sería responsable de un nivel de resistencia moderado mientras que mutaciones que afectan a los genes *gyrA* y *parC* (subunidad A de la topoisomerasa IV) condicionarían un elevado grado de resistencia (Agnello et al., 2016; Vila and Marco, 2002).

2.4 Polimixinas

Las polimixinas son antibióticos polipeptídicos producido por *Paenibacillus polymyxa*. Dentro de este grupo encontramos polimixina B y colistina (Polimixina E) cuya estructura se muestra en la Figura 14. Su espectro de actividad se limita a las bacterias Gram negativas. Las enterobacterias típicamente resistentes a colistina son *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*.

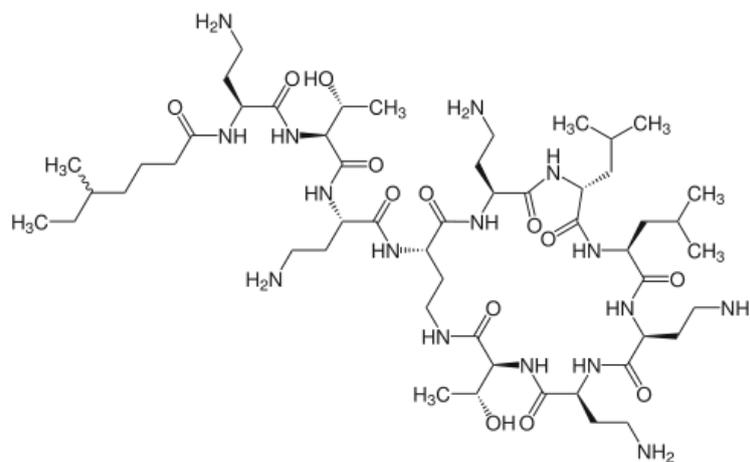


Figura 14. Estructura química de colistina

Estos antibióticos actúan fijándose al lipopolisacárido de las membranas de las células bacterianas y esta unión destruye las membranas mediante un efecto detergente, aumentando la permeabilidad de la membrana lo que se traduce en muerte

Introducción

celular. Presentan buena actividad frente a *Pseudomonas* y en numerosas ocasiones son la única opción terapéutica en infecciones producidas por cepas multirresistentes, por ello, el incremento de su uso ha dado lugar a la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a polimixinas (Lee et al., 2016b; Snitkin et al., 2013).

La resistencia a polimixinas se asocia a modificaciones en la estructura del lipopolisacárido de la membrana, en concreto en el lípido A (Abraham and Kwon, 2009; Barrow and Kwon, 2009).

2.5 Resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*

La resistencia a los antibióticos compromete la prevención y tratamiento de un gran número de infecciones bacterianas. La aparición de microorganismos resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se reproducen de forma errónea dando lugar a la aparición de mutaciones, o se intercambian genes de resistencia. En cualquier caso, un factor importante que favorece la aparición de resistencia es la utilización y el uso indebido de antimicrobianos. La resistencia a los antibióticos constituye una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial que requiere la adopción de medidas por parte de todos los sectores gubernamentales y de la sociedad en general. Afecta a todas partes del mundo, y los nuevos mecanismos de resistencia se están extendiendo a nivel internacional (Brauner et al., 2016; Prestinaci et al., 2015).

Las principales consecuencias de la resistencia a antibióticos son los fracasos terapéuticos en medicina, la disminución de las opciones terapéuticas disponibles para tratar las infecciones causadas por microorganismos resistentes y un aumento de la morbilidad y mortalidad en los pacientes hospitalizados (Torres et al., 2010).

Por estas razones, en el año 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un informe de vigilancia de la resistencia a antimicrobianos, mostrando la extensión de este fenómeno en numerosos países y la necesidad de crear programas de vigilancia de la resistencia a antibióticos. Además, otros organismos como el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) también han desarrollado proyectos educativos para fomentar el buen uso de los antibióticos, tanto

a nivel profesional como para el público en general y en su página web (<http://ecdc.europa.eu/>) se pueden consultar tanto tablas de evolución de resistencias a antibióticos en distintas especies bacterianas a lo largo de los años, como mapas de su distribución en Europa. La Figura 15 muestra la evolución de las resistencias a antibióticos carbapenémicos en *P. aeruginosa* desde el año 2005 al 2014.

Como hemos comentado previamente, *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a un gran número de antibióticos, pero además tiene una extraordinaria capacidad para adquirir resistencia por mutaciones cromosómicas o por transferencia horizontal (Poole, 2011; Solé et al., 2015). Además, es frecuente encontrar resistencias a varias familias de antibióticos con diferentes mecanismos de acción o de resistencia al mismo tiempo, dando lugar a cepas con un elevado nivel de resistencia a antibióticos, lo que puede dar lugar al fracaso terapéutico (Falagas et al., 2014; Martínez-Martínez and Calvo, 2010; Solé et al., 2015).

La producción de una betalactamasa (cefalosporinasa) AmpC inducible, la expresión de bombas de expulsión activa, constitutiva (MexAB-OprM) o inducible (MexXY-OprM) y la reducción de permeabilidad de la membrana externa, son los mecanismos que más influyen en la baja sensibilidad a antibióticos de *P. aeruginosa*, comparada con otros patógenos Gram negativos (Oliver et al., 2015). La producción de la betalactamasa AmpC hace que *P. aeruginosa* sea intrínsecamente resistente a aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina y amoxicilina-clavulánico), cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima y ceftriaxona. Las cepas en las que se da una hiperproducción de esta enzima son resistentes, además, a ceftazidima y aztreonam (Rodríguez-Martínez et al., 2009).

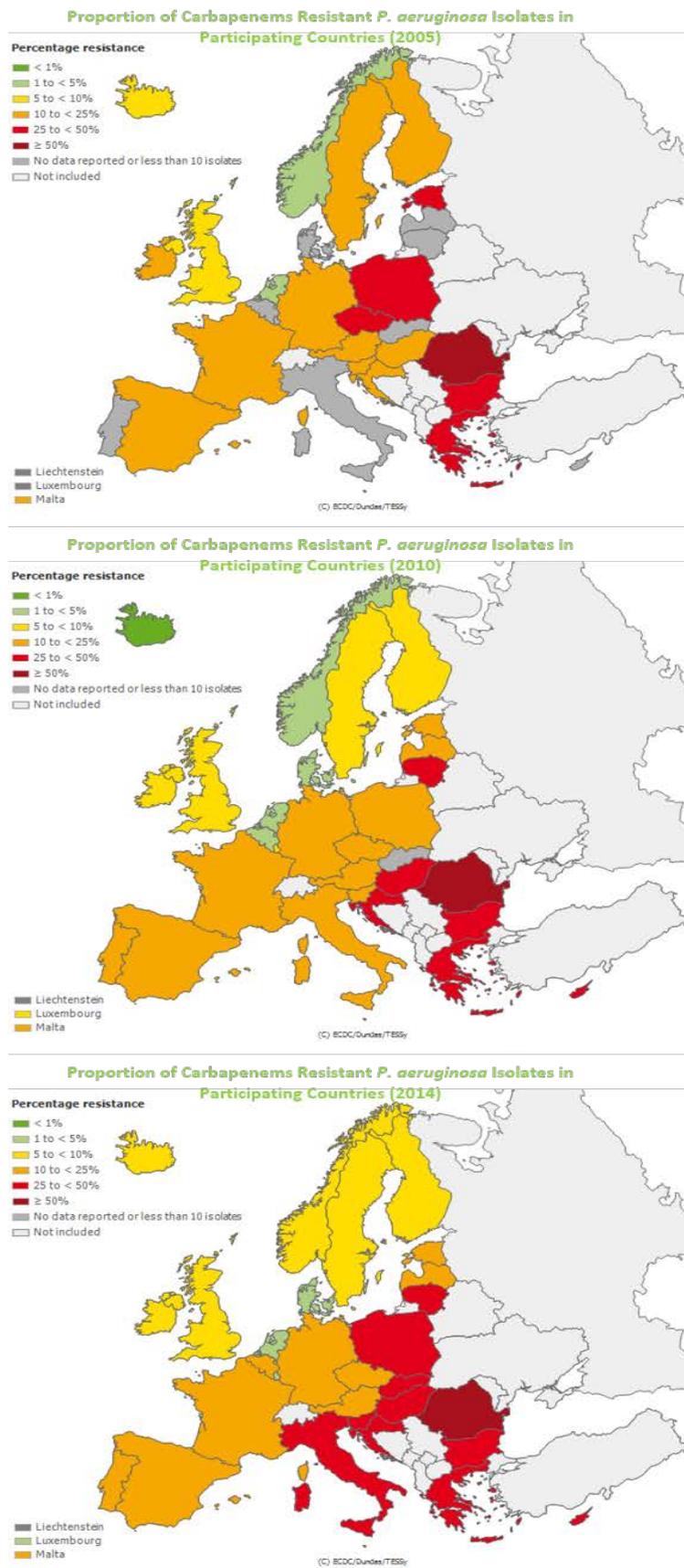
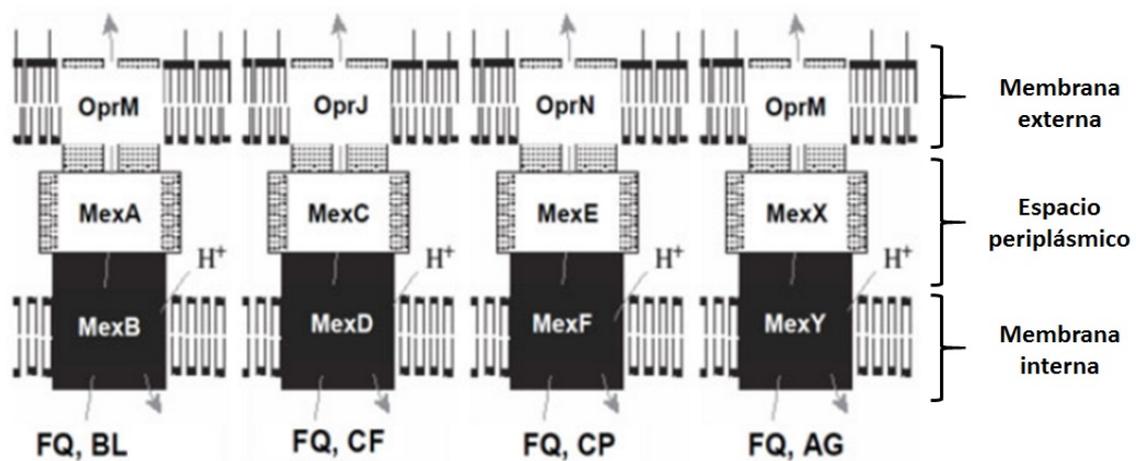


Figura 15. Evolución de la resistencia a carbapenems (2005-2014) en *P. aeruginosa* en Europa (<http://ecdc.europa.eu/>)

2.5.1 Bombas de expulsión activa

Se han descrito hasta 12 tipos de bombas de expulsión activa presentes en *P. aeruginosa* de las cuales cuatro, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM, son las principales (Aeschlimann, 2003; Poole, 2011). La Figura 16 representa los modelos estructurales y funcionales de estas 4 bombas de expulsión activa indicando la localización de las proteínas constituyentes y su preferencia por determinados sustratos.



Abreviaturas: AG (aminoglucósidos); BL (betalactámicos); CF (cefalosporinas); CP (carbapenems excepto imipenem); FQ (fluoroquinolonas);

Figura 16. Modelos estructurales y funcionales de las principales bombas de expulsión activa en *P. aeruginosa* (Neves et al., 2010; Poole, 2005, 2011).

La expresión constitutiva de la bomba de expulsión activa MexAB-OprM juega un papel muy importante en la resistencia de *P. aeruginosa* a la mayoría de betalactámicos (excepto imipenem) y fluoroquinolonas, mientras que la expresión inducible de MexXY-OprM va a afectar principalmente a aminoglucósidos (Li et al., 2015; Poole, 2011).

Introducción

2.5.2 La proteína OprD y su relación con la resistencia a antibióticos

P. aeruginosa presenta también en su membrana externa diversas porinas, que son canales que trabajan como filtros en una membrana permeable. Estas porinas son la vía de entrada de diferentes antibióticos hidrofílicos, como betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas (Lister et al., 2009). La pérdida o alteración de estas porinas puede limitar el acceso de dichos antibióticos al interior de la bacteria. La porina más abundante que se encuentra en la membrana externa de *P. aeruginosa* es la porina OprF (Sugawara et al., 2012) y como ésta, las porinas OprC y OprE son canales inespecíficos, aunque empleados por algunos antibióticos.

Los antibióticos carbapenémicos como el imipenem y el meropenem, utilizan la porina la OprD para acceder a la célula. Esta porina actúa como un canal específico de la membrana externa de *P. aeruginosa* que permite la entrada de aminoácidos básicos y péptidos pequeños, entre los que se encuentran los carbapenems, pero no permite la entrada de otros betalactámicos (Lister et al., 2009; Wolter et al., 2004).

La alteración o pérdida de la porina OprD va a ser uno de los mecanismos de resistencia a imipenem y sensibilidad reducida a meropenem en *P. aeruginosa*, ya que es la principal vía de entrada de imipenem, y en menor medida, de meropenem (Gutiérrez et al., 2007; Livermore, 2001). Tratamientos prolongados con imipenem en pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* favorece la aparición de mutantes resistentes a este antibiótico, tanto por pérdida de la porina OprD como por mutaciones en su gen codificante *oprD* (Ochs et al., 2000).

La porina OprD es una proteína de 443 aminoácidos, compuesta por 16 láminas β transmembrana antiparalelas que forman un cilindro, y 8 *loops* (L1-L8) en la cara externa de la célula. La Figura 17 muestra la topología de membrana de la proteína OprD. Las posiciones de los aminoácidos de cada uno de los *loops* son: L1 del aminoácido 44 al 61; L2 del aminoácido 93 al 127; L3 del 153 al 192; L4 del 221 al 233; L5 del 260 al 274; L6 del 304 al 317; L7 del 353 al 392; y L8 del aminoácido 418 al 431 (Rojo-Bezales et al., 2014).

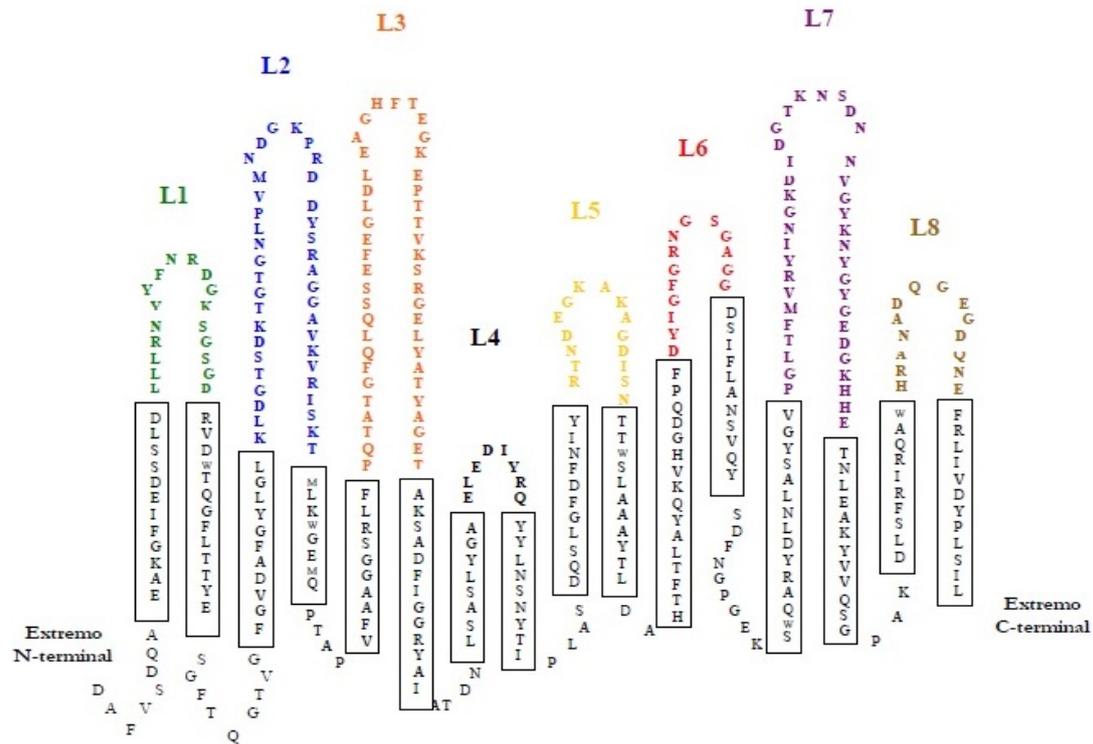


Figura 17. Esquema de la disposición de la proteína OprD en la membrana. Los *loops* externos están rotulados de L1 a L8, y las 16 láminas-β transmembrana se muestran encuadradas.

Los *loops* L3 y L7 son los más largos y el L3 es el que se pliega, siendo responsable de la constricción del canal y dando lugar al poro (Huang et al., 1995; Ochs et al., 2000). La Figura 18 muestra la estructura de la proteína OprD.

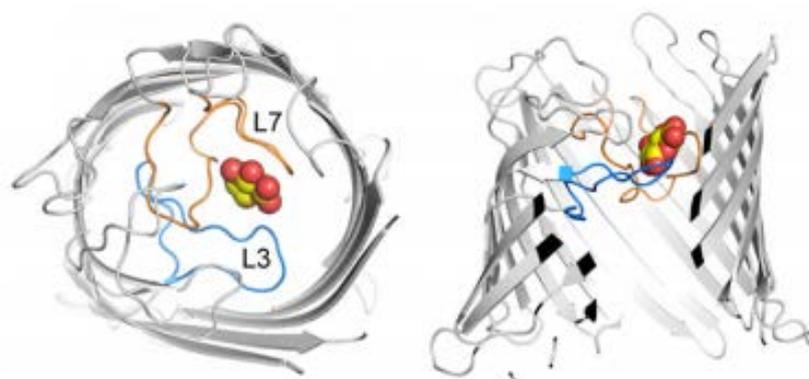


Figura 18. Estructura de la porina OprD de *P. aeruginosa* (Eren et al., 2013)

Introducción

Las principales alteraciones descritas de esta proteína que se han relacionado con resistencia a imipenem son la pérdida de la porina, la presencia de inserciones o deleciones de un nucleótido (Rojo-Bezares et al., 2014), la presencia de secuencias de inserción (IS) modificando la secuencia nucleotídica del gen *oprD* (Estepa et al., 2016; Kalantar-Neyestanaki et al., 2015; Rojo-Bezares et al., 2016; Sun et al., 2016) así como mutaciones puntuales que dan lugar a la aparición de un codón prematuro (Gutiérrez et al., 2007).

Otras alteraciones descritas en la secuencia de aminoácidos de la proteína OprD, que diversos estudios relacionan con un incremento de resistencia a imipenem, son aquellas que afectan a los *loops* L2 y L3. Las alteraciones en estas zonas impiden que el antibiótico se una a la porina y por tanto, la entrada a la célula. Por el contrario, mutaciones en el *loop* L7 se han relacionado con sensibilidad a meropenem, ya que dan lugar a un poro del canal más amplio (Epp et al., 2001; Li et al., 2012).

2.5.3 Carbapenemasas en *P. aeruginosa*

Las betalactamasas transferibles con actividad carbapenemasa pueden pertenecer a las clases A, B o D de Ambler. A continuación se describen cada una de ellas.

- Carbapenemasas de clase A

Estas betalactamasas pertenecen al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush (Tabla 1) y dentro de ellas hay 5 grupos: SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBC. Estas enzimas presentan actividad frente a oximino-betalactámicos, cefamicinas y carbapenems y presentan resistencia frente al aztreonam. La actividad de estas enzimas es inhibida por el ácido borónico, lo cual es útil para su detección por métodos fenotípicos como el test de sinergia de doble disco, que se basa en la inhibición producida por este ácido, y por ácido clavulánico y tazobactam parcialmente.

Las enzimas tipo KPC se describieron por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* y son las carbapenemasas de clase A con mayor relevancia epidemiológica, detectándose también en *P. aeruginosa*. Hasta ahora hay 24 variantes descritas

(<http://www.lahey.org/studies>). Las carbapenemasas KPC son plasmídicas y sus genes se asocian a elementos móviles como secuencias de inserción o transposasas, lo que facilita su transmisión. Por ello han llegado a ser las enzimas más extendidas dentro de este grupo (Villegas et al., 2007; Wolter et al., 2009).

Las betalactamasas tipo GES/IBC se describieron en dos variantes: GES-1 (*Guiana extended spectrum*, por su país de origen) en una cepa de *K. pneumoniae* (Poirel et al., 2000), e IBC-1 (*integron borne cephalosporinase*) en *E. cloacae* en Grecia, ambas en el mismo año (Giakkoupi et al., 2000). En un primer momento fueron definidas como BLEE, con actividad frente a carbapenems prácticamente nula. La nomenclatura de la familia GES/IBC fue revisada y se consensuó el cambio de las IBC por GES (Queenan and Bush, 2007). Los genes codificantes de estas enzimas son de naturaleza plasmídica localizados en integrones (Juan Nicolau and Oliver, 2010) y también se han detectado en *P. aeruginosa*.

- Carbapenemasas de clase B

Este grupo de carbapenemasas son las conocidas como metalo-betalactamasas (MBLs) y se corresponde con los grupos 3a y 3b de la clasificación funcional de Bush (Tabla 1). Son, probablemente, el grupo de carbapenemasas con más relevancia ya que están distribuidas a nivel mundial y en diferentes microorganismos. Presentan actividad frente a todos los antibióticos betalactámicos excepto frente a los monobactámicos (aztreonam). La actividad hidrolítica de las MBLs depende de la interacción de cationes divalentes, concretamente Zn^{2+} , con su centro activo. Por esta razón son inhibidas por quelantes de iones como el EDTA o como el ácido dipicolínico, los cuales se utilizan para su detección fenotípica, pero en cambio, su actividad no se ve afectada por los inhibidores clásicos de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam) (Queenan and Bush, 2007; Walsh et al., 2005).

Dentro de las MBLs se diferencian distintos grupos: VIM, IMP, NDM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM de las cuales las tres primeras son las más extendidas y habitualmente detectadas, relacionándose con brotes causados tanto por cepas de enterobacterias como por *Pseudomonas*. Estos genes se incorporan como casetes

Introducción

génicos en integrones, principalmente de clase 1, y suelen estar asociados a otros genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos, siendo los más frecuentes los genes de resistencia a aminoglucósidos, dando lugar a la aparición de cepas multirresistentes. Cuando estos integrones se asocian con plásmidos o transposones se facilita enormemente la transferencia horizontal entre bacterias dando lugar a un preocupante incremento de bacterias multirresistentes. También existen MBLs de codificación cromosómica, responsables de la resistencia natural a carbapenems, como es el caso de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Las enzimas tipo VIM (*Verona Integron-encoded MBL*) fueron descubiertas en el año 1997 en una cepa de *P. aeruginosa* resistente a los carbapenems en dicha ciudad (Lauretti et al., 1999). Hasta el momento se han descrito 46 variantes de enzimas tipo VIM (<http://www.lahey.org/Studies>) siendo la VIM-2 la más prevalente dentro de este grupo a nivel mundial (Paul et al., 2016; Walsh et al., 2005).

Las MBLs del grupo IMP se detectaron por primera vez en el año 1995 en una cepa de *Serratia marcescens* en Japón (Ito et al., 1995). Hasta hoy se han descrito 53 variantes de esta enzima en distintos microorganismos, entre los que se incluye *P. aeruginosa*, y prácticamente en todo el mundo. Estos genes se hallan en integrones de clase 1 aunque también se han descrito en integrones de clase 3 (Docquier et al., 2003; Pellegrini et al., 2009).

Las carbapenemasas tipo NDM (*New Delhi Metallo-beta-lactamasas*) se descubrieron en el año 2008 en Suecia en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en un paciente indio que previamente había estado hospitalizado en Nueva Delhi (Yong et al., 2009). Desde entonces se han propagado a nivel mundial rápidamente tanto en enterobacterias como en *Pseudomonas* (Oliver et al., 2015). Este gen se asocia con plásmidos y las cepas que lo portan suelen presentar elevada resistencia a antibióticos (Walsh et al., 2011).

- Carbapenemasas de clase D

Esta clase engloba a distintos tipos de oxacilinasas (OXA) incluidas en el grupo 2df de la clasificación funcional de Bush. Presentan actividad frente a carbapenems, cloxacilina y oxacilina, y no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni tampoco aztreonam. Se han encontrado diversas enzimas de esta clase en *P. aeruginosa* como OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19 Y OXA-28. Su detección debe ser comprobada por métodos genotípicos ya que este grupo de enzimas no son inhibidas por agentes quelantes, y la inhibición por los inhibidores clásicos es variable (Evans and Amyes, 2014).

3. Estructura y función de los integrones

Los integrones son sistemas de recombinación específicos de sitio capaces de reconocer, capturar, acumular, escindir y expresar genes exógenos. Estos genes que se incorporan a los integrones presentan una estructura particular y se han denominado casetes génicos, los cuales son elementos móviles constituidos por un gen carente de promotor, un marco de lectura abierto denominado *orf* (*open reading frame*) y un lugar de recombinación específico denominado *attC* o elemento de 59 bases (59 bp), en posición 3' (Fluit and Schmitz, 2004). La integración se produce por un mecanismo de recombinación específico de sitio.

Los elementos de los integrones necesarios para la captura y expresión de casetes génicos son tres (Coque-González, 2005):

- Gen codificante de la integrasa (*intI*) cuya función consiste en la integración de los genes exógenos.
- El lugar de recombinación específico de sitio denominada *attI* (*attachment site*).
- Un promotor (Pc) responsable de la expresión de los genes exógenos integrados.

Los integrones pueden dividirse en dos grandes grupos, los integrones de resistencia o móviles (RI o MI) y los superintegrones (SI). Los RI habitualmente se encuentran formando parte de transposones y/o plásmidos y contienen mayoritariamente genes de resistencia a antibióticos, mientras que los SI son de

Introducción

localización cromosómica en ciertas especies bacterianas y contienen genes asociados a diferentes funciones adaptativas (Marin and Vicente, 2013). Los SI, además son capaces de albergar numerosos casetes génicos, más de 100, mientras que en los RI se encuentran generalmente no más de 10 casetes.

Hasta el momento se han descrito 5 clases de RI en función de la secuencia de su integrasa, siendo los de clase 1 los más frecuentes seguidos de los de clase 2. Los integrones de clase 3 son similares a los de clase 1 aunque menos frecuentes. Estos 3 integrones son los más estudiados por su implicación en la resistencia a antibióticos. Se han detectado mayoritariamente en enterobacterias, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Coque-González, 2005; Cury et al., 2016; Moura et al., 2012).

Las integrasas de los integrones de las clases 1, 2 y 3 se denominan *IntI* 1-3 respectivamente, y pertenecen a la familia de las tirosin-recombinasas. La integrasa de tipo 1 (*IntI1*) reconoce los lugares de recombinación *attI1* del integrón y *attC* situado en los casetes génicos siendo capaz de integrarlos y escindirlos, además de otros lugares secundarios. La integrasa de tipo 2 (*IntI2*) suele ser no funcional, de manera que la integración de los casetes génicos es dependiente de otro tipo de integrasa. Frecuentemente los integrones de clase 2 se encuentran en microorganismos que poseen un integrón de clase 1 y es la integrasa de este último quien realiza la función (Hansson et al., 2002). En cuanto a la integrasa de tipo 3, tiene propiedades similares a las de *IntI1*. Es capaz de reconocer diferentes *attC* e integrar y escindir los casetes génicos (Collis et al., 2002).

Los integrones de clase 1 están constituidos por dos regiones de DNA muy conservadas en sus extremos, que se denominan 5'-CS y 3'-CS (*conserved segment*) entre los cuales se podrán insertar los casetes génicos. El extremo 5'-CS es el que contiene el gen codificante de la integrasa y el 3'-CS presenta tres pautas de lectura abiertas. La primera, *qacEΔ1*, confiere resistencia a componentes de amonio cuaternario. La segunda pauta de lectura corresponde a un gen que confiere resistencia a sulfonamidas (*sul1*) y la tercera pauta, *orf5*, no tiene función conocida por el momento. Estos genes no son casetes génicos, sino que se encuentran en la estructura del integrón (Sabaté and Prats, 2002). La Figura 19 representa el proceso de integración de un gen

exógeno en un integrón de clase 1. La inserción y/o escisión de los casetes dentro del integrón desempeña una importante función en la formación de nuevas combinaciones de resistencia a antibióticos. Tanto el hecho de que muchos integrones posean más de un gen casete como que muchos de ellos estén localizados en elementos genéticos móviles como transposones o plásmidos, facilita la diseminación de resistencias a antibióticos entre bacterias de la misma o de distintas especies (Moazami Goudarzi and Eftekhari, 2015).

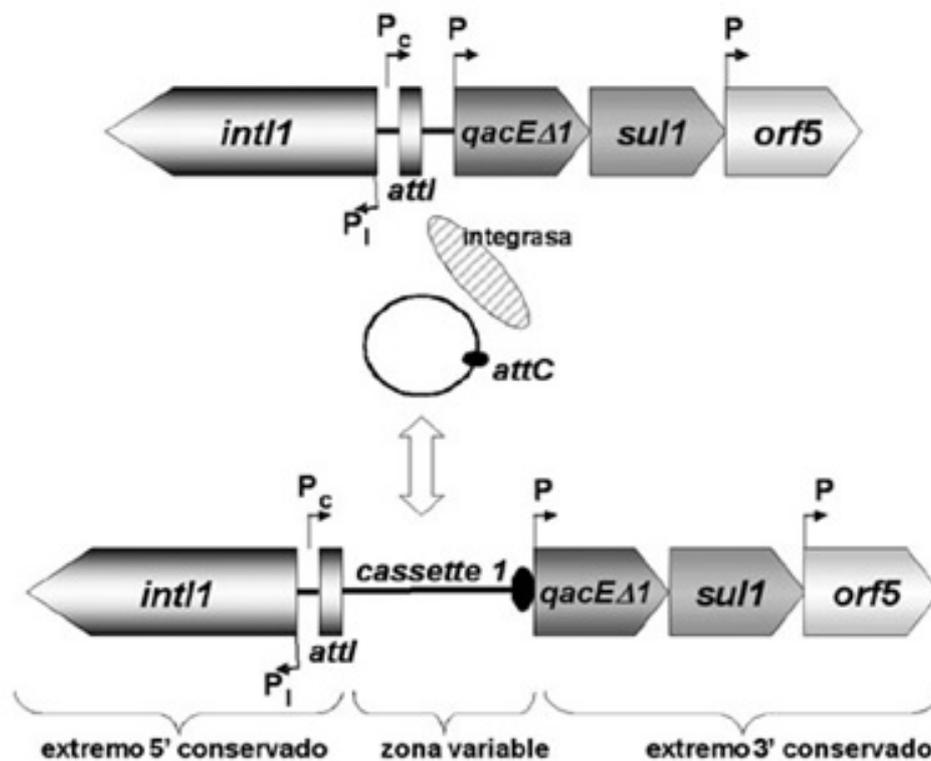


Figura 19. Estructura de un integrón de clase 1 y proceso de integración de un casete genético. Las flechas indican la dirección de la transcripción. P_c , P_i y P indican la posición y la orientación de los diversos promotores (González et al., 2004).

Los casetes genéticos, al no incluir promotores, normalmente se expresan por acción del promotor común que está localizado en la región 5'-CS del integrón, el P_c (Figura 19), cuya secuencia nucleotídica es altamente conservada y en el cual, pequeñas variaciones pueden afectar a la fuerza de transcripción del promotor, como veremos a continuación, llegando incluso a niveles muy bajos de expresión que hagan que la bacteria sea fenotípicamente sensible, aunque potencialmente resistente por poseer el

Introducción

gen que codifica la resistencia para un determinado antibiótico. Como consecuencia, el uso de un determinado antibiótico, al ejercer la correspondiente presión selectiva, podría seleccionar aquellas cepas con promotores más fuertes y capaces de expresar el gen determinando así la resistencia de las bacterias a dicho antibiótico (González et al., 2004).

En la región 5'-CS, algunos de los integrones de clase 1 presentan el promotor P2, además del Pc. Se diferencian variantes del promotor Pc en base a sus secuencias -35 y -10. La fortaleza del promotor Pc y la combinación de ambos promotores determina la expresión de los casetes génicos así como la actividad de la integrasa. Cuanto más fuerte es el promotor mayor expresión de los casetes génicos, aunque menor capacidad de la integrasa para incorporar o escindir casetes génicos (Moura et al., 2012). Las diferentes secuencias de las variantes de los promotores encontradas en integrones de clase 1 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de los promotores Pc y P2 de los integrones de clase 1 (Jones-Dias et al., 2016; Jové et al., 2010)

	Promotor	Secuencia -35	Separación entre secuencias (pb) ^a	Secuencia -10
Pc	PcS (Strong)	TTGACA	17	TAAACT
	PcW (Weak)	TGGACA	17	TAAGCT
	PcH1 (Hybrid 1)	TGGACA	17	TAAACT
	PcH2 (Hybrid 2)	TTGACA	17	TAAGCT
P2		TTGTTA	14	TACAGT

^aLas secuencias que separan ambos exámenes son: en el Pc la secuencia de 17 pb=taagcctgttcggttcg, y en el P2 la secuencia de 14 pb=tgactgttttttg.

Pueden encontrarse distintos casetes génicos dentro de un mismo integrón y aunque suelen insertarse en la misma dirección, su expresión no es uniforme. Los casetes génicos distales presentan una expresión reducida por la presencia de los más proximales. Esto se explica porque las repeticiones invertidas de los *attC* previos forman *loops* que silencian completamente la expresión de los casetes distales, funcionando así también como finalizadores de la transcripción. Este hecho puede afectar al nivel de resistencia a antibióticos alcanzado por el microorganismo, así pues, el casete génico que se encuentre inmediatamente después del extremo 5'-CS y, por tanto, más cerca

del promotor sería el que alcanzaría mayor nivel de resistencia (Collis and Hall, 1995; González et al., 2004).

Los grupos de antibióticos a los que con mayor frecuencia confieren resistencia estos casetes génicos son los betalactámicos y aminoglucósidos, aunque también codifican con elevada frecuencia genes que confieren resistencia a trimetoprim y cloranfenicol (Rowe-Magnus and Mazel, 2002). Existen numerosos estudios que describen estructuras de integrones en la especie *P. aeruginosa* en concreto, portadores de casetes génicos implicados en resistencia a varias familias de antibióticos, siendo la principal asociación de resistencias encontrada a betalactámicos, entre los que destacan los genes de MBL de las familias IMP y VIM, y a aminoglucósidos (Estepa et al., 2016; Mikucionyte et al., 2016; Rojo-Bezares et al., 2014).

4. Tipificación molecular

4.1 Genética de las poblaciones bacterianas

La genética de las poblaciones estudia la variabilidad genética entre las poblaciones bacterianas, explica los mecanismos mediante los cuales una especie evoluciona y proporciona información sobre la estructura poblacional y la naturaleza de la variación genética que existe en las poblaciones naturales. Los cortos tiempos de generación de las bacterias y el enorme tamaño de sus poblaciones hacen que los cambios evolutivos sean muy rápidos. Así, la aparición y selección de mutantes o la importancia de la mutación y de la recombinación en una población bacteriana son esenciales para comprender y poder explicar los cambios epidemiológicos que se dan en ellas (Kidd et al., 2012).

Los estudios de genética de poblaciones bacterianas han aumentado en los últimos años sobre todo para caracterizar las cepas patógenas, aspecto de gran importancia en la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Es necesario comprender las relaciones genéticas que existen entre cepas causantes de enfermedad y cepas no patógenas de una misma especie bacteriana. Así, las diferencias entre ambas pueden ayudar a explicar los orígenes de las cepas patógenas (Kerckhoffs et al., 2011).

Introducción

En estos estudios de genética de poblaciones se ha comprobado que generalmente existe una asociación entre unos determinados clones de la bacteria estudiada, que suelen encontrarse en pequeña proporción, y el desarrollo de enfermedad. Esto nos indica que la diversidad entre las cepas patógenas es menor que en las no patógenas (Cholley et al., 2011; Oliver et al., 2015).

La transferencia horizontal de genes tiene también relevancia en la epidemiología de los microorganismos patógenos. La adquisición de este material extracromosómico va a tener consecuencias en la evolución bacteriana tanto a corto plazo, por la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos, como a largo plazo, como por ejemplo la adquisición de determinantes de virulencia que puedan producir cambios en la patogenicidad de la bacteria (Horiike et al., 2011; von Wintersdorff et al., 2016).

Los cambios genéticos de las poblaciones se deben a diversos mecanismos:

- **Mutación:** proceso que impulsa los cambios evolutivos. Las tasas de mutación son muy bajas, por ello el proceso de mutación por sí solo produce cambios lentos en la genética de las poblaciones.
- **Recombinación:** implica el reemplazo de una región del cromosoma con la región correspondiente de otro individuo de la misma o de otra especie relacionada genéticamente.
- **Migración o flujo génico:** es la transferencia de genes de una población a otra de la misma especie que puede dar lugar a cambios en la composición genética de una población local.
- **Deriva génica al azar:** es una fuerza evolutiva que actúa cambiando las frecuencias genéticas de una población en el tiempo. Es consecuencia del muestreo aleatorio y de la pérdida de genes por azar y no por selección natural. Cuanto más pequeña es la población mayor será el efecto de la deriva sobre las frecuencias génicas.
- **Selección natural:** proceso que controla aquellos caracteres que se desvían de la media de la población, seleccionando los organismos con mayor eficacia

biológica. La selección tiende a eliminar los individuos divergentes y mantener un nivel óptimo asegurando así los avances conseguidos durante generaciones.

Las variantes genéticas generadas por mutación, recombinación, migración y deriva génica pueden aumentar o disminuir de frecuencia, con independencia de si son o no cambios útiles a sus portadores. En cambio, el único proceso evolutivo direccional respecto a la adaptación es la selección natural. La capacidad de adaptación de los microorganismos tanto en su comportamiento como en su fisiología es debida a la selección natural. En el caso de las bacterias, la selección natural juega un papel de gran importancia ya que selecciona las cepas mejor adaptadas. Un ejemplo es la aparición de un mutante que presente cierta ventaja ecológica sobre el resto de individuos de una población: provocará un incremento mayor de este clon en dicha población, eliminando los individuos menos adaptados. Por tanto, si en cualquier especie bacteriana, escogemos una población que esté sometida a una elevada presión selectiva, estaremos seleccionando poblaciones clonales. Esto precisamente es lo que sucede si sólo analizamos poblaciones de cepas patógenas. Las especies patógenas están constituidas por una amplia base de no patógenas en las que predomina un grupo responsable de la enfermedad. En este caso se deberían analizar tanto las poblaciones de cepas patógenas, como de las no patógenas para determinar de este modo la estructura poblacional correcta de la especie estudiada (Ballarini et al., 2012).

Por todo esto, la variación genética en las poblaciones bacterianas patógenas plantea diversas dificultades en el control de las enfermedades infecciosas: la emergencia de nuevos clones patógenos o la aparición de cepas resistentes a antibióticos son ejemplos de la importancia del conocimiento de los procesos genéticos que se dan en las poblaciones bacterianas.

4.2 Métodos moleculares de tipificación bacteriana

Con estos métodos es posible identificar cepas idénticas o muy relacionadas, fuentes de infección, o transmisiones cruzadas, por ejemplo en el ámbito hospitalario. Por ello, los métodos de tipificación molecular son de gran utilidad para controlar la

Introducción

propagación, identificar las vías de transmisión y determinar la variabilidad genética de patógenos nosocomiales (Ballarini et al., 2012).

Existen numerosas técnicas que permiten comparar los genotipos de especies bacterianas, cada una de las cuales tiene unas características determinadas. Así, pueden ser complementarias unas de otras. Todas estas técnicas deben cumplir unos requisitos esenciales: a) poder de tipificación, deben ser capaces de clasificar un aislamiento en un tipo determinado, b) poder discriminatorio, deben ser capaces de discriminar entre aislamientos no relacionados y c) reproducibilidad, deben dar resultados reproducibles entre distintos estudios y estables para una cepa determinada (Coll et al., 2005). Las técnicas moleculares de tipificación incluyen el análisis de patrones de bandas, es decir, el análisis del tamaño de los fragmentos de DNA producidos tras la digestión del mismo con enzimas de restricción y otras técnicas que se basan en el análisis de la secuencia de genes amplificados mediante PCR (Fernández Cuenca et al., 2013; Kidd et al., 2011; Vílchez and Alonso, 2009). Entre las técnicas más utilizadas se encuentran:

- **AFLP**: análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism analysis).
- **PFGE**: electroforesis en campo pulsado (pulse-field gel electrophoresis).
- **Rep-PCR**: amplificación por PCR de elementos palindrómicos repetitivos (repetitive element palindromic PCR).
- **RAPD-PCR**: amplificación aleatoria de DNA polimórfico (random amplified polymorphic DNA).
- **MLST**: tipificación multilocus de secuencias (multilocus sequence typing) la cual se basa en el estudio de la secuencia de varios genes internos de la bacteria llamados “*housekeeping*”.

El método PFGE se considera el método de referencia para comparar los nuevos métodos, porque tiene un gran poder discriminatorio y proporciona una visión completa del genoma de la bacteria, ya que los patrones de bandas son únicos para cada clon (Ballarini et al., 2012; Vílchez and Alonso, 2009), pero dada su baja reproducibilidad y la necesidad de desarrollar técnicas que sean estandarizables, se ha incrementado el desarrollo de métodos basados en el análisis de secuencias. Los datos obtenidos

mediante estos últimos métodos son comparables entre distintos laboratorios. El método más utilizado tanto en estudios epidemiológicos como geológicos y evolutivos es el MLST ya que es capaz de detectar cambios genéticos dentro de los genes conservados que estudia (Glaeser and Kämpfer, 2015; Maâtallah et al., 2013). Así, PFGE se puede utilizar para confirmar clonalidad entre cepas, pero MLST es el mejor método para predecir e identificar posibles cepas clonales (Waters et al., 2012).

4.2.1 Tipificación de *Pseudomonas aeruginosa*

En un primer momento, la tipificación de *P. aeruginosa* se realizaba fenotípicamente, sin embargo, la enorme capacidad de desarrollar resistencia bajo la presión de un tratamiento antibiótico que presenta esta especie, obligó a desarrollar métodos basados en la tipificación genotípica (Curran et al., 2004). Los métodos genotípicos más utilizados son el PFGE y el MLST.

Como se ha comentado anteriormente, el PFGE estudia el genoma completo por digestión del mismo con enzimas de restricción, mientras que el MLST estudia las secuencias de 7 genes conservados o “housekeeping”. Por ello, PFGE será más sensible a polimorfismos debidos a inserciones y deleciones de material genético mientras que MLST detectará polimorfismos de nucleótidos que se acumularán por error en la replicación durante la evolución (Ballarini et al., 2012).

En el año 2004, Curran y colaboradores desarrollaron un esquema de MLST para *P. aeruginosa* en el que se analizan 7 genes diferentes y según la combinación de los mismos se proporciona una nomenclatura: secuencia tipo (ST). Los genes estudiados son *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE* y la página web en la que aparece la base de datos con todas las combinaciones de estos genes, sus secuencias alélicas y los STs descritos hasta el momento es <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.

4.2.2 Clones internacionales de alto riesgo de *P. aeruginosa*

Los estudios de epidemiología molecular de *P. aeruginosa* procedentes de infecciones nosocomiales, así como los estudios realizados en muestras ambientales, muestran una gran variabilidad clonal, con la mayoría de aislados representados por un solo genotipo. A pesar de la gran cantidad de secuencias tipo (ST) descritas (2391

Introducción

secuencias tipo a fecha 24 de enero de 2017), la detección de nuevas variantes se da con mucha frecuencia. Sin embargo, hay estudios que muestran que este hecho se da en aislados sensibles a antibióticos, pero no en aislados multirresistentes (MDR) o extremadamente resistentes (XDR) (Cabot et al., 2012). La diversidad clonal cuando hablamos de este tipo de cepas es notablemente menor. Así se han descrito los tres clones MDR/XDR internacionales mayoritarios: ST111, ST175 y ST235. De estos tres clones, el ST235 es el más ampliamente distribuido en todo el mundo ya que se ha descrito en numerosos países de los cinco continentes. Este clon es el fundador del complejo clonal CC235 (Figura 20). ST111 se ha detectado en todos los continentes excepto en Oceanía, mientras que ST175 únicamente se ha descrito en Europa y Japón. Varios estudios muestran que estos clones son infrecuentes entre cepas sensibles. Otros clones, a parte de los considerados de alto riesgo, que cabe destacar son ST244 que se ha detectado con elevada frecuencia en diferentes países, aunque no siempre asociado con perfiles multirresistentes, y ST277 que presenta una elevada prevalencia en Brasil.

La asociación entre estos tres clones de alto riesgo y la transferencia horizontal de mecanismos de resistencia a antibióticos, particularmente metalobetalactamasas, es de gran importancia, aunque también existe una enorme relación, documentada en numerosos trabajos, entre estos clones y los mecanismos de resistencia debidos a mutaciones, como la inactivación de la porina OprD o la hiperexpresión de AmpC, o de bombas de expulsión activa (Oliver et al., 2015).

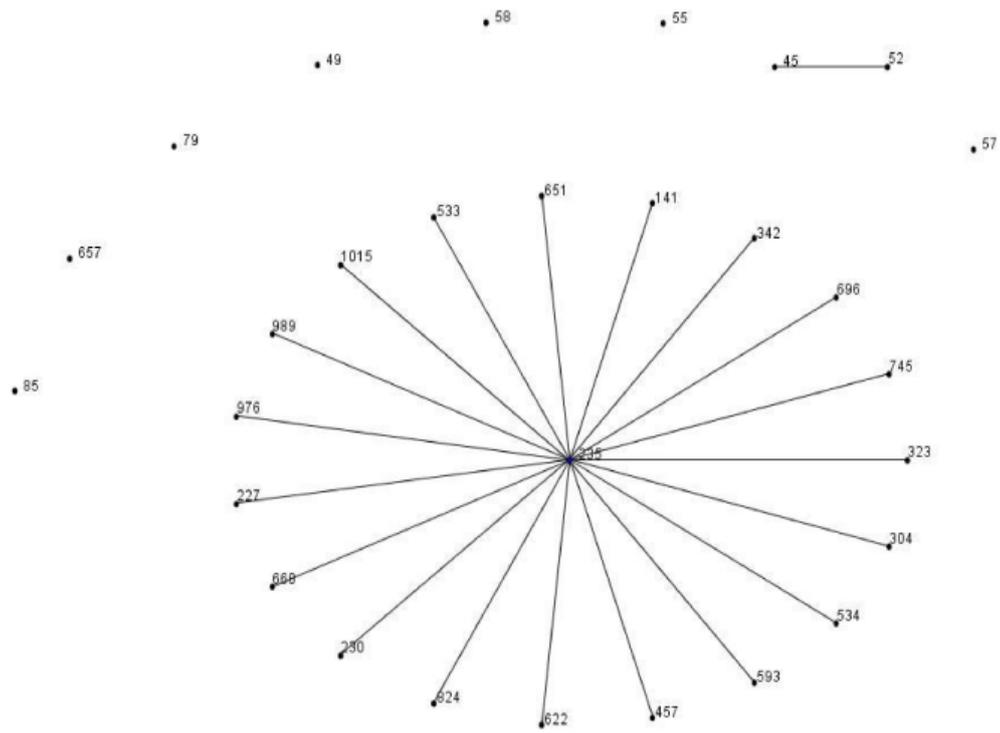


Figura 20. Diagrama eBurst del linaje CC235 de los STs de *P. aeruginosa* (Maatallah et al., 2011).

Objetivos

Los objetivos de este estudio son:

Muestras procedentes del tracto respiratorio inferior:

1. Estudio de la sensibilidad a antibióticos de cepas de *P. aeruginosa* aisladas en muestras clínicas procedentes del tracto respiratorio inferior de pacientes asistidos en el HCU Lozano Blesa durante un año (enero 2013 - enero 2014).
2. Descripción de las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con infecciones producidas por cepas de *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas.
3. Caracterización de los mecanismos de resistencia a carbapenems implicados.
4. Estudio y caracterización de la proteína OprD.
5. Detección y caracterización de integrones de clase 1, 2 y 3.
6. Estudio de factores de virulencia.
7. Estudio de clonalidad de aislados del tracto respiratorio inferior.

Muestras procedentes de portadores fecales

1. Estudio de la prevalencia y sensibilidad a antibióticos en cepas de *P. aeruginosa* procedentes de portadores fecales, menores de 15 años, residentes en la misma área.
2. Estudio de los fenotipos de resistencia a carbapenems y caracterización de los mecanismos de resistencia implicados.
3. Estudio y caracterización de la proteína OprD.
4. Estudio de integrones de clase 1, 2 y 3.
5. Estudio de factores de virulencia.
6. Realización de la tipificación molecular de las cepas procedentes de portadores fecales.

Material y métodos

1. Aislados de *Pseudomonas aeruginosa* estudiados

1.1 Aislados procedentes del tracto respiratorio inferior

Durante el período de tiempo comprendido entre el 1 de febrero de 2013 y el 31 de enero de 2014, en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, se recogieron 164 aislados de *P. aeruginosa* procedentes de muestras del tracto respiratorio inferior de 160 pacientes, 106 hombres y 54 mujeres, cuyo rango de edades variaba de 4 a 94 años, con una media de edad de 69 años. Los tipos y número de muestras se reflejan en la **Tabla 4**. Se recogió un aislado por paciente excepto en 4 pacientes, en los que se recogieron dos aislados diferentes por presentar distinta sensibilidad a carbapenems.

Tabla 4 Tipo y número de muestras del tracto respiratorio inferior de las cuales se aislaron las cepas de *P. aeruginosa*

Tipo de muestra	Número de muestras	Porcentaje (%)
Espuito	98	59,76 %
Broncoaspirado	53	32,32 %
Aspirado endotraqueal	8	4,87 %
Espuito inducido	3	1,83 %
Lavado broncoalveolar	1	0,61 %
Líquido pleural	1	0,61 %
Total	164	100 %

Material y métodos

1.2 Aislados procedentes de portadores fecales

Por otro lado, durante un período de tiempo de 5 meses (de junio a octubre de 2013), se estudió la presencia de *P. aeruginosa* en portadores fecales menores de 15 años. Durante este período, en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, se recibieron 1080 muestras de heces procedentes de 790 pacientes menores de 15 años, que se procesaron utilizando los métodos estandarizados para la investigación de *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* (Castillo García et al., 2007). Tras incubación a 37 °C durante 18-24 h se seleccionaron aquellas muestras de heces en las que no había presencia de enteropatógenos. Se aisló *P. aeruginosa* en 42 de estas muestras de heces.

2. Características de los pacientes

Los datos clínicos de los pacientes en los que aisló *P. aeruginosa* en muestras del tracto respiratorio inferior, se obtuvieron a través del Servicio de Historias Clínicas de nuestro hospital. De todos los pacientes se recogieron las siguientes variables:

- **Datos demográficos:** edad y sexo.
- **Tipo de muestra y Servicio de procedencia.**
- **Comorbilidades de los pacientes:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asma, bronquiectasias, enfisema pulmonar o fibrosis pulmonar, fibrosis quística, traqueostomía, ventilación mecánica, diabetes mellitus, neoplasia, bacteriemia, insuficiencia renal, enfermedad neurológica, inmunodeprimidos (trasplantados o VIH).
- **Días de hospitalización.**
- **Tratamiento antibiótico en los 30 días previos a la recogida de la muestra.**

3. Medios, condiciones de cultivo e identificación

Los medios de cultivo utilizados fueron Brain Heart Infusion (BHI) (Difco), tanto caldo como agar, agar chocolate (PVX), agar Mac Conkey (MCK) y agar Müller-Hinton (MH2) (bioMèrieux).

Los medios de cultivo se incubaron a 37°C durante 18-24 h y a continuación, la identificación de *P. aeruginosa* se llevó a cabo atendiendo tanto a la morfología microscópica como macroscópica de las colonias. Se realizó la prueba de la Oxidasa (Bactident® Oxidase), una prueba de identificación en la que se deposita una colonia bacteriana sobre la superficie de una tira comercial impregnada con el reactivo. La reacción se considera positiva cuando transcurridos aproximadamente 10 segundos vira a un color morado. El fundamento de esta prueba es que en presencia de oxígeno el sistema citocromo-oxidasa/citocromo c puede reducir distintas sustancias orgánicas, entre otras el reactivo NaDi (1-naftol + dimetilparafenilendiamina) con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol. Las bacterias del género *Pseudomonas* son positivas para esta prueba.

Para completar la identificación a nivel de especie y el estudio de la sensibilidad antibiótica de cada aislamiento se utilizó el sistema semiautomático MicroScan WalkAway® (Siemens, Healthcare, España), y se llevó a cabo la confirmación de la identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker, Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).

Todos los aislados de *P. aeruginosa* se conservaron a -20°C en crioviales Viabank™ (Medical Wire & Equipment Co, Corsham, Reino Unido), los cuales contienen aproximadamente 0,5-1 mL de un caldo nutritivo estéril crioprotector con 15-20% de glicerol.

4. Determinación de la sensibilidad a los antibióticos

La sensibilidad a los diferentes antibióticos se realizó mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con un sistema semiautomatizado.

4.1. Microdilución en caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para la realización de esta técnica se utilizaron los paneles comerciales MicroScan WalkAway® (Siemens, Healthcare, España), los cuales constan de una batería de antibióticos en distintos pocillos y a diferentes concentraciones que, tras inocular y rehidratarlos con una suspensión estandarizada del microorganismo, se incuban a 37°C durante 18 h. A continuación se determina la CMI, como la concentración antimicrobiana mínima que muestre inhibición del crecimiento. Estos paneles nos permiten obtener la CMI en µg/mL de los antibióticos reflejados en la Tabla 5. Los puntos de corte utilizados por el sistema MicroScan WalkAway® son los recomendados por The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) y/o European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST), clasificando así los aislados en distintas categorías de sensibilidad a antibióticos: sensibles, intermedios o resistentes.

Tabla 5. Concentraciones de los antibióticos presentes en el panel 58 de MicroScan WalkAway® y puntos de corte para *P. aeruginosa* obtenidos del CLSI 2015

Antimicrobiano	Abreviatura	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)	Puntos de corte		
			Sensible	Intermedio	Resistente
Ticarcilina	TI	8-16-32	≤ 16	32	> 32
Piperacilina/ Tazobactam	P/T	8/4-16/4-32/4- 64/4	$\leq 16/4$	32/4	$\geq 64/4$
Ceftazidima	CAZ	1-2-4-8-16-32	≤ 8	16	≥ 32
Cefepime	FEP	1-2-4-8-16	≤ 8	16	> 16
Aztreonam	AZT	1-2-4-8-16	≤ 8	16	> 16
Imipenem	IMP	1-2-4-8	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem	MER	1-2-4-8	≤ 2	4	≥ 8
Gentamicina	GM	1-2-4-8	≤ 4	8	> 8
Tobramicina	TO	2-4-8	≤ 4	8	> 8
Amikacina	AK	8-16-32	≤ 16	32	> 32
Ciprofloxacino	CP	0,5-1-2	≤ 1	2	> 2
Levofloxacino	LVX	1-2-4	≤ 2	4	> 4
Timetoprim/ Sulfametoxazol	T/S	2/38	$< 2/38$	-	$> 2/38$
Colistina	CL	2-4	≤ 2	4	> 4

Material y métodos

4.2. Métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia a antibióticos

Tanto la actividad de metallo-betalactamasas (MBL) como la producción de carbapenemasas de clase A se investigaron mediante la técnica del test sinérgico de doble disco, basada en la utilización de inhibidores de carbapenemasas.

4.2.1 Test sinérgico de doble disco para detección de metalobetalactamasas (MBL)

Se realizó este test sinérgico a todos los aislados resistentes a carbapenems. Para la detección de MBL se realizó un antibiograma con una distribución de los discos: IMI (10 µg) + disco blanco con 6µl de ácido etilendiaminotetraacético 0,5M pH 8 (EDTA) + MEM (10 µg). Se observa el fenotipo MBL (Figura 21) cuando se produce una deformación (ampliación) del halo de inhibición de los carbapenémicos en las proximidades del disco de EDTA (Lee et al., 2001). Este estudio nos da una idea previa de la presencia de algún tipo de MBL en la cepa correspondiente, pero deberá ser confirmado por técnicas moleculares.



Figura 21. Test sinérgico de doble disco para detección de MBL.

4.2.2 Test sinérgico de doble disco para detección de carbapenemasas de clase A

La detección fenotípica de carbapenemasas de clase A (Figura 22) se realizó en todos los aislados de *P. aeruginosa*, tanto sensibles como resistentes, del mismo modo que la anterior pero con la siguiente distribución de discos: IMI (10 µg) + disco blanco con 6 µl de ácido 3-aminofenilborónico (APB 50 mg/ml, Sigma) + MEM (10 µg). El aumento y deformación del halo en las proximidades del disco central indica la presencia

de una carbapenemasa de clase A (Pasteran et al., 2009), pero de la misma manera que en las MBL, se necesita la confirmación por técnicas moleculares.

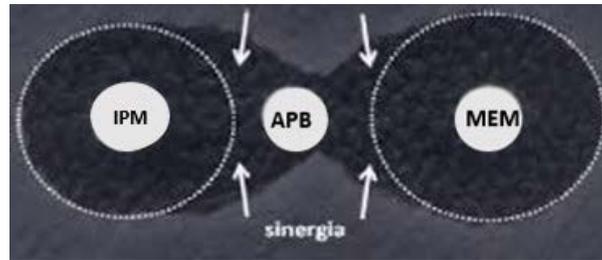


Figura 22. Test sinérgico de doble disco para detección de carbapenemasas de clase A

4.2.3 Epsilon-test (ϵ -test[®]). Imipenem/Imipenem-EDTA (IP/IPI)[®]

El método de Epsilon-test (ϵ -test[®], bioMèrieux) nos permite conocer la CMI en $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se utilizan tiras de plástico con un gradiente definido de un antibiótico equivalente a 15 diluciones dobles seriadas. Al colocar la tira sobre el agar, se producirá la difusión del antibiótico desde la tira hasta el agar dando lugar a un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras un período de incubación de 18-24 h se observará la zona de inhibición de forma simétrica y elipsoidal. El punto de corte del halo de inhibición con la tira de E-test nos dará la CMI. En aquellos aislados en que el test sinérgico de doble disco para detección de MBL fue dudoso, se realizó la prueba comercial E-test Imipenem/Imipenem-EDTA (IP/IPI[®]) (Figura 23). En este caso, las tiras de E-test llevan incorporado en un lado un carbapenem (imipenem, IP 4-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en el otro el carbapenem junto a un inhibidor (imipenem + EDTA, IPI 1-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La lectura se realizó según las indicaciones de la casa comercial.



Figura 23. E-test IP/IPI[®] de una cepa productora de MBL

5. Extracción de DNA

5.1. Resina (InstaGene™ Matrix, BioRad)

Para la extracción del DNA de los aislados de *P. aeruginosa* se utilizó el sistema InstaGene™ Purification Matrix (BioRad), una matriz que absorbe los productos de la lisis celular que pueden interferir en la PCR, facilitando la obtención de DNA válido para la amplificación por PCR. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Resuspender 1 colonia en 1 mL de agua destilada estéril en un tubo de centrifuga.
2. Centrifugar 1 min a 12000 rpm. Desechar el sobrenadante.
3. Añadir 200 µL de InstaGene Matrix al pellet e incubar a 56 °C durante 15-30 min. La matriz se debe mantener en agitación a una velocidad moderada.
4. Agitar en agitador tipo vórtex a alta velocidad durante 10 s.
5. Hervir la mezcla a 100 °C durante 8 min.
6. Agitar en agitador tipo vórtex a alta velocidad durante 10 s.
7. Centrifugar durante 5 min a 13000 rpm y almacenar a 4 °C.

5.2. Cuantificación de DNA

La cuantificación y pureza del DNA extraído se comprobó con el espectrofotómetro Nanodrop® ND-100 que permite realizar lecturas de volúmenes pequeños de muestra (1-3 µL).

La concentración de DNA se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, para lo que se considera que una unidad de absorbancia ($A_{260}=1$) corresponde a una concentración de 50 µg/mL de DNA de doble hebra y a 20 µg/mL de DNA de cadena única, aproximadamente. La pureza del DNA extraído se determina con el cociente entre las lecturas a 260 y 280 nm. Una muestra con DNA puro presentará un cociente entre 1,8 y 2,0; mientras que la contaminación con proteínas disminuye la relación por debajo de 1,8 y la presencia de RNA da un cociente superior a 2,0. Los valores óptimos de concentración de DNA para las PCR realizadas en *P. aeruginosa* son 300-600 ng/µL. en aquellos casos en que la concentración extraída fue superior, se realizaron diluciones con agua destilada estéril.

6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, “Polymerase Chain Reaction”), es un método enzimático que nos va a permitir realizar una amplificación *in vitro* de un fragmento específico de DNA localizado entre dos regiones de secuencia conocida. Para iniciar la PCR se requieren:

- **Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs):** son el sustrato de la reacción.
- **Cebadores o iniciadores:** oligonucleótidos, de 15 a 30 pares de bases (pb) que son complementarios a una de las hebras de DNA. Son reconocidos por la polimerasa, permitiendo iniciar la reacción. Delimitan el fragmento de DNA que se desea amplificar.
- **Iones divalentes:** comúnmente magnesio (Mg^{2+}) agregado como cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Son cofactores de la polimerasa.
- **Solución tampón:** mantiene el pH y la fuerza iónica adecuada para el funcionamiento de la polimerasa.
- **DNA polimerasa:** enzima que cataliza la síntesis de DNA a partir de los dNTPs y de una hebra de DNA molde.

La reacción se lleva a cabo en un termociclador. Para llevar a cabo la amplificación, este método se basa en tres reacciones sucesivas que tienen lugar a diferente temperatura:

- **Desnaturalización:** separación de las hebras de DNA.
- **Hibridación:** unión de los cebadores con las secuencias diana.
- **Polimerización:** síntesis de la cadena complementaria por acción de la enzima DNA polimerasa.

Estos tres pasos se repiten con el objetivo de conseguir millones de copias de la secuencia original. Una PCR múltiple consiste en la amplificación de distintos genes en una misma reacción mediante la adición de varias parejas de cebadores.

Los termocicladores utilizados para realizar este estudio fueron MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BioRad) y T100™ Thermal Cycler (BioRad). Los cebadores

Material y métodos

utilizados para este estudio fueron sintetizados por Sigma-Aldrich®. La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50 µL para cada tubo de reacción utilizando las cantidades representadas en la Tabla 6 de cada componente.

Tabla 6. Reactivos utilizados en la técnica de PCR

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final
Cebador directo (Sigma)	25 µM	1 µL	0,5 µM
Cebador reverso (Sigma)	25 µM	1 µL	0,5 µM
Tampón (Bioline)	10X	5 µL	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1,5 µL	1,5 mM
dNTP's (Bioline)	10 mM	1 µL	0,2 mM
BioTaq™ DNA polimerasa	5 U/ µL	0,3 µL ^a	1,5 U
DNA	-	10 µL	-
Agua estéril	-	Hasta 50 µL ^b	-

^aEn las PCR con fragmentos superiores a 1500 pb se emplearon 0,5 µL de BioTaq™ DNA polimerasa.

^bVolumen variable en función de si la PCR es simple o múltiple.

En todas las reacciones de PCR se incluyeron un control positivo y un control negativo. El control positivo contenía DNA en el que se había comprobado por secuenciación la presencia del gen que se desea amplificar. El control negativo contenía todos los componentes de la mezcla excepto DNA. Las secuencias de los cebadores, las condiciones de amplificación y los tamaños de los fragmentos de DNA amplificados se describen a continuación.

6.1. Detección de genes de resistencia mediante PCR múltiple

6.1.A. Detección de genes codificantes de MBL

Se estudió la presencia de genes codificantes de MBL, enzimas que confieren resistencia a los antibióticos carbapenémicos, en todos los aislados resistentes a carbapenems, tanto aquellos con fenotipo MBL positivo como negativo.

Para la detección de genes codificantes de MBL, se empleó una PCR múltiple. La mezcla de reacción se preparó siguiendo las directrices del artículo original (Ellington et al., 2007) y las condiciones específicas de esta PCR se describen en la Tabla 7.

Tabla 7. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de MBL y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Referencia
<p>Sim: 570 pb F: TACAAGGGATTTCGGCATCG R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG</p>		
<p>Gim: 477 pb F: TCGACACACCTTGGTCTGAA R: AACTTCCAACCTTGCCATGC</p>	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s	
<p>Vim: 390 pb F: GATGGTGTGGTTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCG</p>	52°C 40s 36 ciclos 72°C 50s	Ellington <i>et al</i> , 2007
<p>Spm: 271 pb F: AAAATCTGGGTACGCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG</p>	72°C 5min 1 ciclo	
<p>Imp: 188 pb F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC^a R: CCAAACYACTASGTTATCT^a</p>		

^aY= C+T; S=G+C

Cuando se obtenían resultados positivos, se llevaba a cabo una PCR empleando únicamente la pareja de cebadores que había amplificado en la PCR múltiple.

Material y métodos

6.1.B. Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A

Se estudió la presencia de genes codificantes de carbapenemasas de clase A en todos los aislados de *P. aeruginosa*. Para detectar estos genes se utilizó una PCR múltiple (Hong *et al.*, 2012). En la Tabla 8 aparece la secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para llevar a cabo esta PCR así como sus condiciones de amplificación.

En esta ocasión el volumen final fueron 25 µl y se empleó la polimerasa “KAPA Taq HotStart DNA Polymerase” (KAPABIOSYSTEMS) con las condiciones representadas en la Tabla 9.

Tabla 8. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Referencia
KPC^a : 638 pb F: GTATCGCCGTCTAGTTCTGC R: GGTCGTGTTTCCCTTAGCC		
SME^b : 551 pb F: ACTTTGATGGGAGGATTGGC R: ACGAATTCGAGCATCACCAG	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 50°C 30s 25 ciclos 72°C 1min	Hong <i>et al.</i> , 2012
IMI (NMC)^c : 399 pb F: TGCGGTCGATTGGAGATAAA R: CGATTCTGAAGCTTCTGCG	72°C 7min 1 ciclo	
GES^d : 323 pb F: GCTTCATTACGCACTATT R: CGATGCTAGAAACCGCTC		

^aVariantes del gen KPC capaz de detectar: de KPC-2 a KPC-13

^bVariantes del gen SME capaz de detectar: de SME-1 a SME-3

^cVariantes de los genes IMI y NMC capaces de detectar: de IMI-1 a IMI-3 y NMC-A

^dVariantes del gen GES capaz de detectar: de GES-1 a GES-9 y de GES-11 a GES-20

Tabla 9. Reactivos utilizados en la PCR múltiple para detectar carbapenemasas de clase A

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final
Cebador <i>KPC</i> directo (Sigma)	25 µM	0,5 µL	0,5 µM
Cebador <i>KPC</i> reverso (Sigma)	25 µM	0,5 µL	0,5 µM
Cebador <i>SME</i> directo (Sigma)	25 µM	0,5 µL	0,5 µM
Cebador <i>SME</i> reverso (Sigma)	25 µM	0,5 µL	0,5 µM
Cebador <i>IMI</i> directo (Sigma)	25 µM	0,5 µL	0,5 µM
Cebador <i>IMI</i> reverso (Sigma)	25 µM	0,5 µL	0,5 µM
Cebador <i>GES</i> directo (Sigma)	25 µM	0,5 µL	0,5 µM
Cebador <i>GES</i> reverso (Sigma)	25 µM	0,5 µL	0,5 µM
Tampón “KAPA Taq HotStart buffer” (KAPABIOSYSTEMS)	5X	2,5 µL	0,5X
MgCl ₂ (KAPABIOSYSTEMS)	25 mM	0,75 µL	0,75 mM
dNTP's (Bioline)	10 mM	0,5 µL	0,2 mM
KAPA Taq HotStart (KAPABIOSYSTEMS)	5 U/ µL	0,1 µL	0,5 U
DNA	-	5 µL	-
Agua estéril	-	Hasta 25 µL	-

Material y métodos

6.2. Estudio de la porina OprD

Para realizar el estudio de la porina OprD se amplificó por PCR el gen *oprD* con las condiciones de amplificación que muestra la Tabla 10 y posteriormente se llevó a cabo su secuenciación. Para completar el estudio de la porina se llevó a cabo la comparación de las secuencias obtenidas con la porina OprD de *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank accession no. AE004091).

Este estudio se llevó a cabo en todos los aislados de *P. aeruginosa*.

Tabla 10. Cebadores utilizados en el estudio del gen *oprD* y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Referencia
<i>OprD</i>: 1412 pb F: CGCCGACAAGAAGAACTAGC R: GTCGATTACAGGATCGACAG	94°C 5min 1 ciclo 94°C 1min 55°C 1min 35 ciclos 65°C 8min 72°C 8min 1 ciclo	Gutiérrez <i>et al.</i> 2007
<i>OprD long</i>: 1586 pb F: CTACGCAGATGCGACATGC R: CCTTTATAGGCGCGTTGCC	94°C 5min 1 ciclo 94°C 1min 55°C 1min 35 ciclos 65°C 8min 72°C 8min 1 ciclo	Wolter <i>et al.</i> 2004

6.3. Análisis de integrones

Se estudió la presencia de integrones en todos los aislados, tanto aquellos procedentes de muestras del tracto respiratorio inferior como de portadores fecales.

En la Tabla 11 aparecen las condiciones de amplificación y los cebadores utilizados en las reacciones de PCR realizadas para detectar la presencia de integrasas de tipo 1, 2 ó 3, el segmento 3' conservado característico del integrón de clase 1 y la región variable del integrón de clase 1.

Cuando las regiones variables de los integrones tenían un tamaño elevado (> 1500 pb) fue necesario recurrir a la técnica de mapeo por PCR donde, combinando diferentes cebadores tanto para amplificar como para secuenciar, se sucedían los fragmentos de manera solapante permitiendo obtener el integrón completo.

Tabla 11. Cebadores utilizados para la detección de integrones de clase 1, 2 y 3 y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Referencia
<p><i>int11</i>: 483 pb F: GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG R: ACATGCGTGAAAATCATCGTTCG</p>	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 62°C 30s 30 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000
<p>Región variable de integrón clase 1 F: GGCATCCAAGCAGCAAG R: AAGCAGACTTGACCTGA</p>	94°C 5min 1 ciclo 94°C 1min 55°C 1min 35 ciclos 65°C 8min 72°C 8min 1 ciclo	Lévesque & Roy, 1993
<p><i>qacEA1 + sul1</i>: 1125 pb F: GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG R: GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG</p>	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 63°C 30s 30 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000
<p><i>int12</i>: 788 pb F: CACGGATATGCGACAAAAAGGT R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG</p>	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 62°C 30s 30 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000
<p><i>int13</i>: 979 pb F: GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R: ACGGATCTGCCAAACCTGACT</p>	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 62°C 30s 30 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000

Material y métodos

6.4. Detección de genes de virulencia

Se estudió la presencia de los distintos genes de virulencia en los aislados de *P. aeruginosa* del tracto respiratorio inferior con distinto patrón PFGE, así como en todos los aislados procedentes de portadores fecales. Los cebadores utilizados y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Cebadores utilizados en la detección de genes de virulencia y condiciones de amplificación

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Referencia
exoU: 2000 pb F: ATGCATATCCAATCGTTG R: TCATGTGAACTCCTATT	94°C 3 min. 1 ciclo	S.M.C. Petit <i>et al.</i> , (2013)
	94°C 30sg	
	55°C 30sg 40 ciclos	
	72°C 2 min	
exoS: 118 pb F: GCGAGGTCAGCAGAGTATCG R: TTCGGCGTCACTGTGGAT	72°C 5 min 1 ciclo	Ajayi <i>et al.</i> , (2003)
	94°C 3 min. 1 ciclo	
	94°C 30sg	
	60°C 30sg 40 ciclos	
exoY: 289 pb F: CGGATTCTATGGCAGGGAGG R: GCCCTTGATGCACTCGACCA	72°C 2 min	Ajayi <i>et al.</i> , (2003)
	94°C 3 min. 1 ciclo	
	94°C 30sg	
	60°C 30sg 40 ciclos	
exoT: 152 pb F: AATCGCCGTCCAACCTGCATGCG R: TGTTGCGCCGAGGTAAGTCTC	72°C 2 min	Ajayi <i>et al.</i> , (2003)
	94°C 3 min. 1 ciclo	
	94°C 30sg	
	60°C 30sg 40 ciclos	
exoA: 396 pb F: GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC R: CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	72°C 2 min	Khan and Cerniglia, (1994)
	94°C 3 min. 1 ciclo	
	94°C 30sg	
	60°C 30sg 40 ciclos	
lasA: 514 pb F: CGCCATCCAACCTGATGCAAT R: AGGCCGGGGTTGTACAACGGA	72°C 2 min	Lomholt <i>et al.</i> , (2001)
	94°C 3 min. 1 ciclo	
	94°C 30sg	
	60°C 30sg 40 ciclos	
	72°C 5 min 1 ciclo	

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Referencia
lasB : 153 pb F: TTCTACCCGAAGGACTGATAC R: AACACCCATGATCGCAAC	94°C	3 min.	1 ciclo	Zhu et al., (2004)
	94°C	30sg	40 ciclos	
	55°C	30sg		
	72°C	2 min		
aprA : 140 pb F: ACCCTGTCCTATTCGTTCC R: GATTGCAGCGACAACCTGG	72°C	5 min	1 ciclo	Zhu et al., (2004)
	94°C	3 min.	1 ciclo	
	94°C	30sg	40 ciclos	
	55°C	30sg		
72°C	2 min			
rhlAB : 151 pb F: TCATGGAATTGTCACAACCGC R: ATACGGCAAATCATGGCAAC	72°C	5 min	1 ciclo	Zhu et al., (2004)
	94°C	3 min.	1 ciclo	
	94°C	30sg	40 ciclos	
	60°C	30sg		
72°C	2 min			
rhlI : 625 pb F: CTTGGTCATGATCGAATTGCTC R: ACGGCTGACGACCTCACAC	72°C	5 min	1 ciclo	Schaber et al., (2004)
	94°C	3 min.	1 ciclo	
	94°C	30sg	40 ciclos	
	60°C	30sg		
72°C	2 min			
rhlR : 730 pb F: CAATGAGGAATGACGGAGGC R: GCTTCAGATGAGGCCAGC	72°C	5 min	1 ciclo	Schaber et al., (2004)
	94°C	3 min.	1 ciclo	
	94°C	30sg	40 ciclos	
	60°C	30sg		
72°C	2 min			
lasI : 605 pb F: ATGATCGTACAAATTGGTCGGC R: GTCATGAAACCGCCAGTCG	72°C	5 min	1 ciclo	Schaber et al., (2004)
	94°C	3 min.	1 ciclo	
	94°C	30sg	40 ciclos	
	60°C	30sg		
72°C	2 min			
lasR : 1100 pb F: CGGGTATCGTACTAGGTGCATCA R: GACGGGAAAGCCAGGAACTT	72°C	5 min	1 ciclo	S.M.C. Petit et al. (2013)
	94°C	3 min.	1 ciclo	
	94°C	30sg	40 ciclos	
	60°C	30sg		
72°C	2 min			

7. Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los productos de PCR se utilizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa, que está basada en la migración unidireccional del DNA cuando se le aplica un campo eléctrico. A pH neutro, el DNA tiene carga negativa, lo que comporta su migración desde el polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). La movilidad electroforética de los fragmentos de DNA depende en gran medida de su tamaño. Esta técnica se utiliza para separar, identificar y aislar fragmentos de DNA a partir de una mezcla heterogénea.

La visualización de los fragmentos de DNA se consigue tras la incorporación de un colorante fluorescente al gel de agarosa, en el caso de este estudio, Bromuro de Etidio (EtBr), un agente que se intercala entre las dos hebras del DNA. Al ser iluminado con radiación ultravioleta de longitud de onda corta (310 nm) el colorante revelará la presencia de una banda de DNA.

7.1. Preparación del gel de agarosa

La concentración de agarosa está condicionada por el tamaño de los fragmentos de DNA que se pretenden separar. En este estudio se utilizaron concentraciones entre el 1 y el 2 % (m/v). El gel se prepara disolviendo agarosa en tampón TBE 1X (Tris 0,44 M, ácido bórico 0,44 M, EDTA 12,5 mM pH 8) y se lleva a ebullición hasta su total disolución. Se deja enfriar hasta unos 55 °C y se añade una solución acuosa de Bromuro de Etidio (EtBr) (0,5 µg/mL). Esta mezcla se vierte en un molde previamente sellado y con el peine correspondiente y se deja solidificar. A continuación, se retira el peine sin dañar los pocillos, el gel se coloca en la cubeta de electroforesis y se añade el tampón TBE 1X asegurando que cubra la totalidad del gel. Cada uno de los pocillos se carga con 10 µL de producto de PCR mezclados con 2 µL de tampón de carga (1 % SDS, 50 % glicerol, 0,05 % azul de bromofenol). El primer pocillo del gel se carga con 4 µL de marcador de peso molecular. Según los tamaños de amplicón esperados se pueden utilizar distintos marcadores de peso molecular (Bioline): Hyperladder IV (100 pb) o Hyperladder I (200 pb). La electroforesis se desarrolló a 100 V en TBE 1X. El gel se visualizó con el sistema de imágenes automatizado Gel Doc™ EZ System (BioRad).

8. Tipificación molecular

8.1. Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

La relación clonal de los 39 aislados de *P. aeruginosa* procedentes de muestras del tracto respiratorio inferior portadores de integrones así como la de todos los aislados procedentes de portadores fecales se analizó mediante esta técnica (Rojo-Bezares, 2014). Se utilizó la enzima de restricción *SpeI* (10000U/mL) (TAKARA Biotechnology, Dalian, China)

- Preparación de insertos:

A partir de un cultivo puro de 24 horas en placa de agar BHI, se inocularon varias colonias en 3 mL de BHI líquido y se incubaron toda la noche (16 h) a 37 °C con agitación. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 13000 rpm durante 2 min (repitiendo la centrifugación en caso necesario) y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 mL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8 1 mM EDTA pH 8) y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min. Se eliminó de nuevo 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. A continuación, se dejó solidificar unos minutos en la nevera.

- Lisis de insertos

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

Material y métodos

- 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 con agitación; 2) 10 mL de buffer TE con tiourea (0,005 g de tiourea en 1 L TE) durante 30 min en un baño de agua a 56 °C con agitación (se repite tres veces); y 3) 10 mL de buffer TE con tiourea durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Tras el último lavado, se cambió por última vez el buffer TE con tiourea y los insertos fueron guardados a 4 °C (tienen una caducidad aproximada de un año).

- Digestión enzimática de insertos

Para la digestión enzimática se utilizó la mitad de un inserto de cada cepa y un volumen final de 100 µL de la mezcla de digestión compuesta por: 1,5 µL de enzima *SpeI* (10 U) + 10 µL CutSmart buffer (10X) + 88,5 µL agua destilada estéril. Se incubaron durante 6 h 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 para hacer el gel, preparado previamente con el peine correspondiente, y se deja solidificar a temperatura ambiente. Los pocillos se rellenaron con los insertos dejando el primero y último de los mismos para el marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker BioLabs) y se sellan con agarosa de la misma concentración 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 para los insertos digeridos con *SpeI* fueron: 1) Una rampa lineal pulsada de 5 a 15 s con un gradiente de voltaje 6 V/cm a 14 °C durante 10 h; seguida de 2) Una rampa lineal pulsada de 15 a 45 s con un gradiente de voltaje 6 V/cm a 14 °C durante 10 horas.

- Tinción del gel y visualización

La tinción del gel se llevó a cabo en una solución acuosa de 200 mL de Bromuro de Etidio (BrEt) (20 μ L/200 mL) durante 20 min. Se visualizó en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con captador de imágenes (Image Store 5000, UVP). Posteriormente se destiñó el gel con agua destilada.

- Análisis de los patrones

Los patrones se compararon visualmente y se clasificaron según las directrices propuestas por Tenover y colaboradores (1995) en indistinguibles, si los aislados presentaban el mismo número de bandas y aparentemente del mismo peso molecular; estrechamente relacionados, cuando los aislados presentaban de dos a tres bandas diferentes; posiblemente relacionados, si los patrones de los aislados presentaban de cuatro a seis bandas distintas; o diferentes, generalmente cuando los patrones se diferencian en más de 7 bandas (Tenover et al., 1995).

8.2. Determinación de la Secuencia Tipo (MLST)

Esta técnica se llevó a cabo en los aislados de *P. aeruginosa* del tracto respiratorio inferior con distinto patrón de PFGE, y en 18 aislados de *P. aeruginosa* de portadores fecales escogidos al azar incluyendo, al menos, uno de cada patrón de proteína OprD.

En la tipificación molecular se empleó la técnica de “MultiLocus Sequence Typing” (MLST) basada en el estudio de las secuencias nucleotídicas de 7 genes internos que codifican fragmentos estables en cada género bacteriano. Estos genes se denominan “housekeeping” y la combinación de los 7 alelos determina la secuencia tipo (ST). Curran y colaboradores (2004) desarrollaron esta técnica para *P. aeruginosa* y con objeto de optimizar el proceso, describieron unos cebadores para amplificar el DNA mediante PCR y otros cebadores para ser utilizados en la secuenciación. En la Tabla 13 vemos las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la realización de la PCR de los genes “housekeeping” y en la Tabla 14 las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para su secuenciación y determinar así la Secuencia Tipo.

Tabla 13. Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las reacciones de PCR de los genes “housekeeping” para la determinación de la Secuencia Tipo.

Gen	Cebadores (secuencia 5'→3')	Tamaño del amplicón
<i>acsA</i>	F: ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC R: GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	842 pb
<i>aroE</i>	F: TGGGGCTATGACTGGAAACC R: TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	825 pb
<i>guaA</i>	F: CGGCCTCGACGTGTGGATGA R: GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	940 pb
<i>mutL</i>	F: CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG R: CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	940 pb
<i>nuoD</i>	F: ACCGCCACCCGACTG R: TCTCGCCCATCTTGACCA	1042 pb
<i>ppsA</i>	F: GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG R: GGGTTCTTCTTCCGGCTCGTAG	989 pb
<i>trpE</i>	F: GCGGCCAGGGTCGTGAG R: CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	811 pb

Tabla 14. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la secuenciación de los genes “housekeeping” para la determinación de la Secuencia Tipo

Gen	Cebadores (secuencia 5'→3')	Tamaño del amplicón
<i>acsA</i>	Seq-F: GCCACACCTACATCGTCTAT Seq-R: AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC	390 pb
<i>aroE</i>	Seq-F: ATGTCACCGTGCCGTTCAAG Seq-R: TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG	495 pb
<i>guaA</i>	Seq-F: AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC Seq-R: GACGTTGTGGTCCGACTTGA	372 pb
<i>mutL</i>	Seq-F: AGAAGACCGAGTTCGACCAT Seq-R: GGTGCCATAGAGGAAGTCAT	441 pb
<i>nuoD</i>	Seq-F: ACGGCGAGAACGAGGACTAC Seq-R: TGGCGGTCGGTGAAGGTGAA	366 pb
<i>ppsA</i>	Seq-F: GGTGACGACGGCAAGCTGTA Seq-R: GTATCGCCTTCGGCACAGGA	369 pb
<i>trpE</i>	Seq-F: TTCAACTTCGGCGACTTCCA Seq-R: GGTGTCCATGTTGCCGTTCC	441 pb

En cuanto a las condiciones de amplificación, para cada gen se emplearon unas concretas. En las Tablas 15 y 16 se presentan las diferentes condiciones utilizadas para los distintos genes.

El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización a 95 °C 3 min; 30 ciclos 95 °C 1 min + Temperatura de hibridación 1 min + 72 °C 1 min y elongación final a 72 °C 10 min.

Para el gen *nuoD* se necesita que el programa de amplificación realice 35 ciclos en lugar de 30.

Tabla 15. Condiciones de amplificación para los 7 genes “housekeeping”

Gen	Polimerasa utilizada (distribuidor)	Temperatura de hibridación (°C)
<i>acsA</i>	Immolase DNA Polymerase (Bioline)	54
<i>aroE</i>	KAPA Taq HotStart DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS)	55
<i>guaA</i>	Immolase DNA Polymerase (Bioline)	56
<i>mutL</i>	BioTaq DNA Polymerase (Bioline)	58
<i>nuoD</i>	Immolase DNA Polymerase (Bioline)	55,5
<i>ppsA</i>	Immolase DNA Polymerase (Bioline)	56
<i>trpE</i>	Immolase DNA Polymerase (Bioline)	56

Tabla 16. Condiciones de las distintas polimerasas utilizadas en la amplificación de los 7 genes “housekeeping”.

Componentes	“Immolase DNA Polymerase” (Bioline)	BioTaq DNA Polymerase (Bioline)	KAPA Taq HotStart DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS)
Cebador <i>directo</i> 1	1 µL	1 µL	0,5 µL
Cebador <i>reverso</i> 1	1 µL	1 µL	0,5 µL
Tampón de reacción	5 µL (Inmunobuffer 10X)	NH ₄ buffer 10X	5 µL (KAPA Taq HotStart buffer 5X)
MgCl₂	1,5 µL (50 mM)	1,5 µL (50 mM)	1,5 µL (25 mM)
dNTP's (10 mM)	1 µL	1 µL	0,5 µL
Polimerasa	0,3 µL	0,3 µL	0,5 µL
DNA	10 µL	10 µL	5 µL
Agua destilada estéril	Hasta 50 µL	Hasta 50 µL	Hasta 25 µL

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados, analizados y comparados con la base de datos <http://pubmlst.org/paeruginosa/>. La combinación de los 7 alelos nos proporcionó la secuencia tipo que nos permite tipificar las diferentes cepas.

9. Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo en la discriminación de diferentes variantes de genes de resistencia a antibióticos, en la detección de mutaciones del gen *oprD*, en la caracterización de los integrones y en el estudio de MLST. Los cebadores de secuenciación fueron los mismos que se han utilizado en las diferentes reacciones de PCR y algunos tuvieron que ser diseñados para secuenciar completamente el fragmento de DNA amplificado. La secuenciación se realizó por el servicio de secuenciación del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) con el secuenciador ABI 3130 XL (Applied Biosystems).

9.1. Análisis de las secuencias

Para realizar el análisis de las secuencias se utilizaron diversas herramientas informáticas a través de distintas páginas web:

- **Tratamiento de las secuencias:** Extended Nucleic Acid Sequence Massager (<http://www.cmbn.no/tonjum/seqMassager-saf.htm>)
- **Análisis y comparación de las secuencias obtenidas con la secuencia patrón:** Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
- **Comparación con la base de datos GenBank:** Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- **Análisis de secuencia tipo:** *Pseudomonas aeruginosa* MLST database (<http://www.pubmlst.org/paeruginosa/>)
- **Estudio de secuencias de inserción:** ISFinder (<https://www-is.biotoul.fr/>)

En aquellos casos en los que se detectaron mutaciones, se procedió al análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas para comprobar si se trataba de mutaciones silentes o realmente daban lugar a cambios aminoacídicos. Para el análisis de las secuencias del gen *oprD* se realizó una comparación directa con la cepa control *P. aeruginosa* PAO1 (número de acceso en GenBank: AE004091).

10. Análisis estadístico

Los datos clínicos de los pacientes se procesaron mediante el programa informático Microsoft Excel 2013 y SPSS para Windows (versión 15.0, SPSS, Chicago III, EE.UU.). Se realizó un estudio de comparación de proporciones. Se utilizó la función Z para calcular el nivel de significación y se fijó en 0,05, así las diferencias serán estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

1 Aislados procedentes del tracto respiratorio inferior (T.R.I.)

1.1 Datos clínicos y epidemiológicos

Durante el período de tiempo comprendido entre el día 1 de febrero de 2013 y 31 de enero del 2014 en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (HCULB) se aislaron un total de 164 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de 160 pacientes, que fueron obtenidas a partir de muestras del tracto respiratorio inferior (esputo (98), aspirado bronquial (53), aspirado de traqueostomía (8), esputo inducido (3), lavado broncoalveolar (1) y líquido pleural (1)). Únicamente se estudió un aislado por paciente, excepto 4 pacientes en los que se estudiaron dos aislados de *P. aeruginosa* con sensibilidad antibiótica distinta.

Las características de los 160 pacientes se muestran en la Tabla 17. De los 160 pacientes, 106 fueron hombres y 54 mujeres. La media de edad fue de 69 años. Ciento uno estaban ingresados, y los 59 restantes provenían de Atención Primaria. La mayoría de los pacientes hospitalizados con aislamiento de *P. aeruginosa* (48,51%) estaban ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). El resto se recuperaron de pacientes asistidos en los de los Servicios de Neumología, 24 pacientes (23,76%), Medicina Interna, 14 pacientes (13,86%), Enfermedades Infecciosas, 5 pacientes (4,95%), Urgencias, 4 pacientes (3,96%) y los Servicios de Cirugía, Cardiología, Oncología, Traumatología y Hematología, un paciente cada uno (Figura 24).

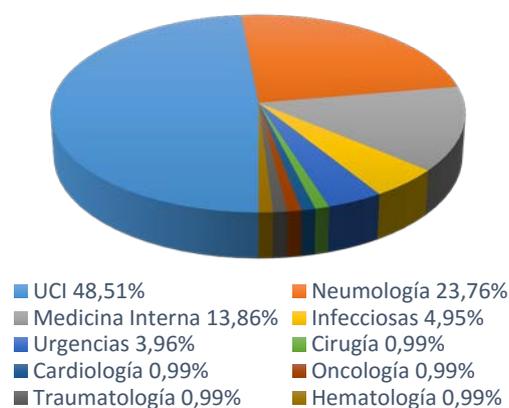


Figura 24. Distribución (%) por Servicios de los pacientes hospitalizados

Resultados

El fenotipo MBL se detectó en 23 de los 164 aislados (14,02%), siendo dos aislados del mismo paciente. Todos los pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* con fenotipo MBL estaban hospitalizados, y la gran mayoría de ellos (86,36%) en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). El resto de pacientes (n=3) en los que se aisló *P. aeruginosa* con fenotipo MBL estaban ingresados en los servicios de Neumología, Enfermedades Infecciosas y Cirugía, aunque los tres habían estado ingresados previamente en la UCI de nuestro hospital. La Figura 25 muestra la distribución de los aislados de *P. aeruginosa* con fenotipo MBL a lo largo del período de estudio, y la Figura 26 representa la duración del ingreso en UCI de los pacientes con aislamiento MBL positivo.

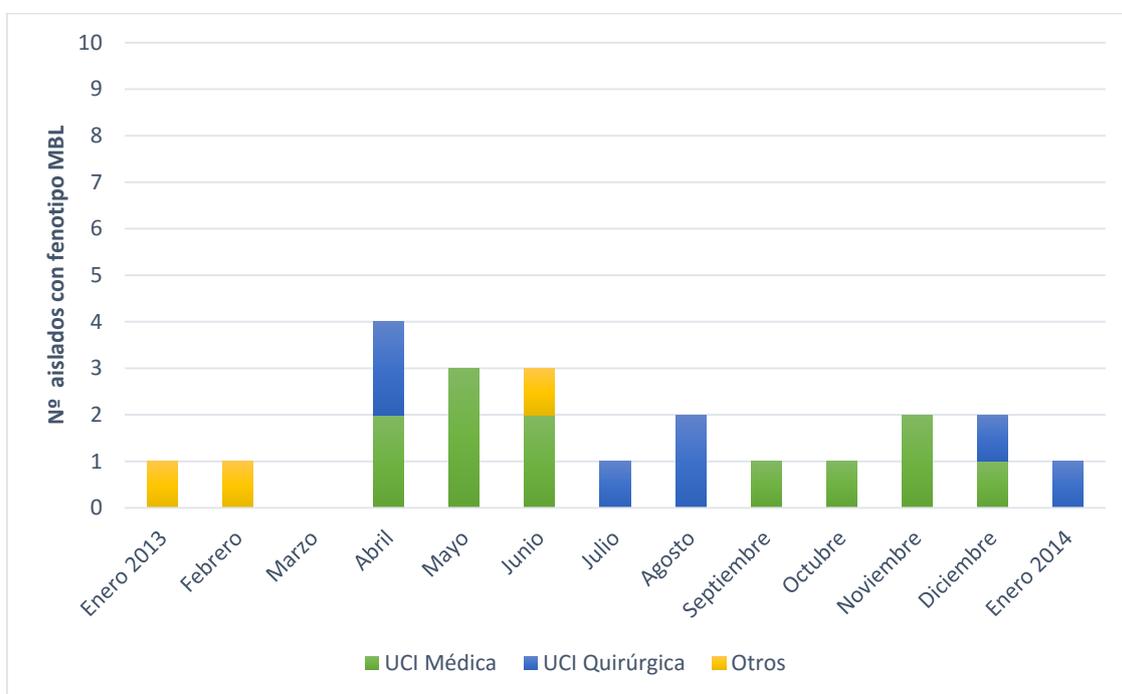


Figura 25. Distribución de los aislamientos de *P. aeruginosa* con fenotipo MBL a lo largo del período estudiado

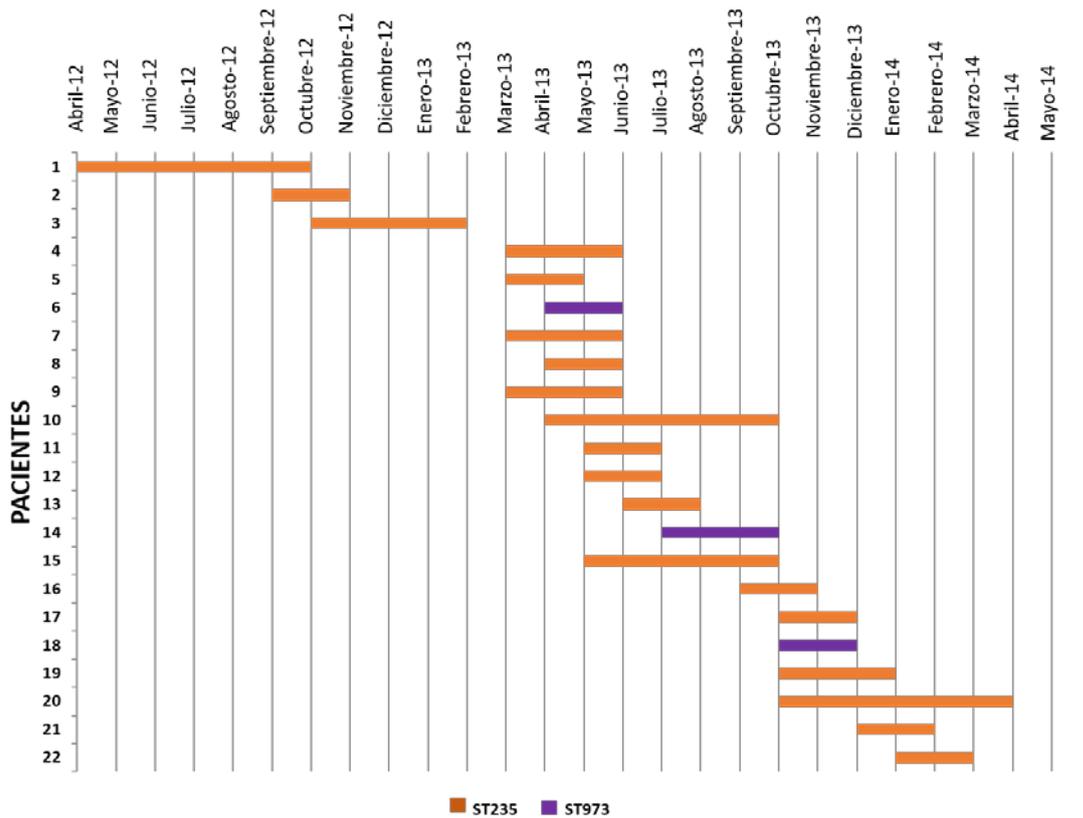


Figura 26. Distribución temporal y duración del ingreso en UCI de los pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* con fenotipo MBL

El gráfico muestra una continuidad temporal en los ingresos de los pacientes en los que se aislaron cepas MBL positivas a partir de marzo de 2013 hasta el final del estudio.

En cuanto a las enfermedades de base o comorbilidades de los 164 pacientes, un 56,88% (91/160) tenían alguna enfermedad respiratoria (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asma, bronquiectasias, atelectasias, enfisema pulmonar y/o fibrosis pulmonar), un 20% (32/160) estaban sometidos a ventilación mecánica, un 11,88% (19/160) estaban traqueostomizados y un 2,5% de los pacientes (4/160) padecían Fibrosis Quística.

Resultados

Diez de los pacientes ingresados tenían bacteriemia cuando se realizó el aislamiento de *P. aeruginosa*. Los gérmenes implicados en estas bacteriemias fueron los siguientes: 2 *P. aeruginosa*, 1 *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *Serratia marcescens*, 1 *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente (MRSA), 1 *Staphylococcus epidermidis*, 1 *Enterococcus faecium*, 1 *Streptococcus anginosus* y 1 *Candida glabrata*.

Los antibióticos más utilizados en los 30 días previos al aislamiento de *P. aeruginosa* fueron betalactámicos, colistina y fluoroquinolonas. Ochenta pacientes estuvieron tratados con betalactámicos y 39 de ellos con carbapenems. En cuanto a los pacientes con aislamiento de cepas con fenotipo MBL, cabe destacar que 14 de los 22 (64 %) estuvieron en tratamiento con carbapenems antes de la fecha del aislamiento. 15 pacientes fueron tratados con 3 o más familias de antibióticos de los cuales 5 presentaron fenotipo MBL. Por otro lado, 21 pacientes no estaban recibiendo terapia antibiótica, sin presentar fenotipo MBL ninguno de sus aislados. El anexo 1 incluye una tabla (Tabla 25) en la que están representadas todas las características de estos aislados.

Se estudiaron estadísticamente las diferencias entre las características de los pacientes con aislamiento de cepas con fenotipo MBL y las de los pacientes sin fenotipo MBL, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas para ingreso en UCI, enfermedad respiratoria, ventilación mecánica, traqueostomía, bacteriemia, duración prolongada del ingreso (≥ 30 días) y tratamiento previo con carbapenems y/o con tres o más familias de antibióticos diferentes durante el mes previo al aislamiento de *P. aeruginosa*.

Tabla 17. Características de los 160 pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* en muestras del tracto respiratorio inferior (TRI) en el HCU Lozano Blesa durante un año (Febrero 2013-2014)

Características de los pacientes	Número de pacientes (n=160)	Pacientes con fenotipo MBL (n=22)	Pacientes sin fenotipo MBL (n=138)	Prueba Z
Género				
Número de hombres (%)	106 (66,25%)	15 (68,18%)	91 (65,94%)	0,21 (p>0,05)
Número de mujeres (%)	54 (33,75%)	7 (31,81%)	47 (34,06%)	0,21 (p>0,05)
Edad (años) (rango de edades)	69 (4-94)	65 (32-80)	70 (4-94)	
Atención primaria ^a	59	0	59	3,86 (p<0,05)
Ingresados ^a	101	22	79	3,86 (p<0,05)
Servicios:				
UCI ^a	49	19	30	7,60 (p<0,05)
Neumología	24	1	23	-
Medicina interna	14	0	14	-
Enfermedades infecciosas	5	1	4	-
Urgencias	4	0	4	-
Cirugía	1	1	0	-
Cardiología	1	0	1	-
Oncología	1	0	1	-
Traumatología	1	0	1	-
Hematología	1	0	1	-
Comorbilidades				
Enfermedad respiratoria ^a	91	4	87	3,95 (p<0,05)
Ventilación mecánica ^a	32	11	21	3,79 (p<0,05)
Diabetes mellitus	20	2	18	0,52 (p>0,05)
Traqueostomía ^a	19	6	13	2,40 (p<0,05)
Bacteriemia ^a	10	4	6	2,49 (p<0,05)
Enfermedad cardíaca	10	1	9	-
Enfermedad renal	4	0	4	-
Fibrosis quística	4	0	4	-
Enfermedad neurológica	2	0	2	-
Trasplantados/VIH	2	0	2	-
Sin datos	6	0	6	-
≥30 días de hospitalización ^a	38	15	23	5,27 (p<0,05)
Terapia antimicrobiana (30 días previos)				
Betalactámicos ^{a, b}	80	16	64	2,30 (p<0,05)
Carbapenems ^a	39	14	25	4,62 (p<0,05)
Colistina	28	6	22	1,30 (p>0,05)
Fluoroquinolonas	36	6	30	0,58 (p>0,05)
Aminoglicosidos	10	1	9	0,36 (p>0,05)
≥3 familias de antibióticos ^a	15	5	10	2,31 (p<0,05)
Sin antibiótico	21	0	21	-
Sin datos	14	4	10	-

^aSe observan diferencias estadísticamente significativas

^bSe incluyen carbapenems

Resultados

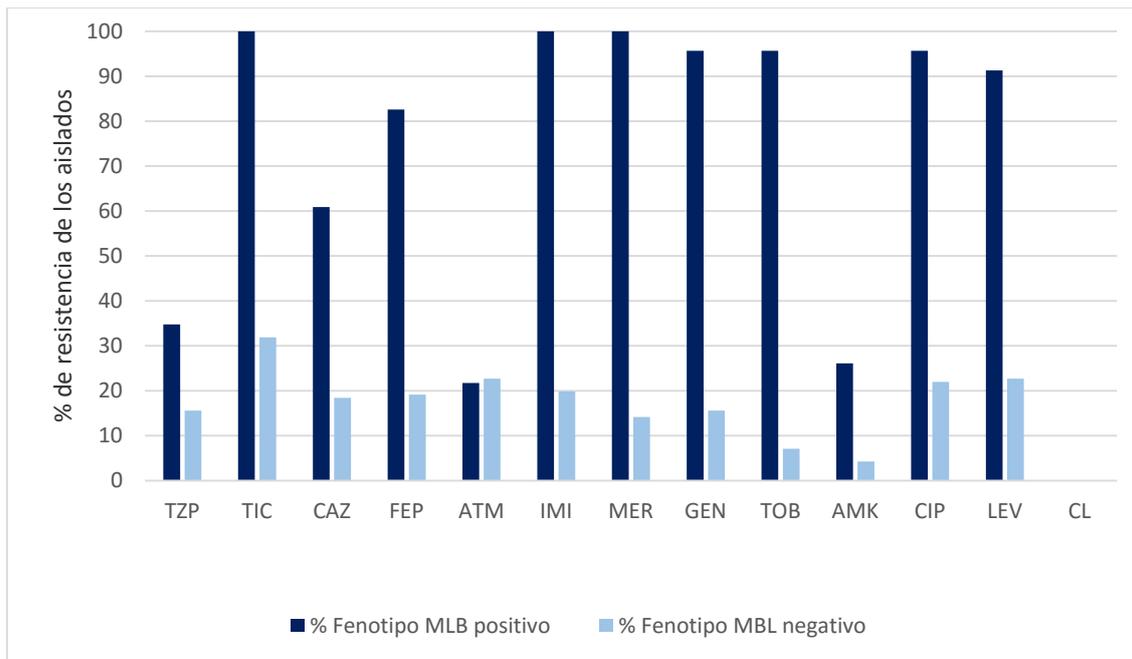
1.2. Estudio de la sensibilidad a antibióticos

Se obtuvieron 52 aislados resistentes a imipenem (31,71 %) y 44 aislados resistentes tanto a imipenem como meropenem, siendo dos aislados del mismo paciente, lo que supone un 26,83 % de resistencia a ambos carbapenems en las muestras aisladas en nuestro medio.

El fenotipo MBL se detectó en 23 de los 164 aislados (14,02%), es decir, en el 52,27 % de los aislados resistentes a carbapenems, siendo dos aislados del mismo paciente. Todos los pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* con fenotipo MBL habían estado hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

Los porcentajes de resistencia a los distintos antibióticos con actividad antipseudomonas de los 164 aislados se muestran en la Figura 27. Los aislados con fenotipo MBL positivo (n=23) fueron resistentes a 3 o más familias de antibióticos distintas: todos ellos fueron resistentes a carbapenems (imipenem y meropenem) y ticarcilina y presentaron elevadas tasas de resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas. El 95,65% (22/23) fueron resistentes a gentamicina, tobramicina y ciprofloxacino y un 91,30 % (21/23) a levofloxacino. En contraste, las cepas sin fenotipo MBL fueron más sensibles, exceptuando la resistencia a aztreonam que fue similar tanto en los aislados con fenotipo MBL positivo (21,74% de resistencia) como en los aislados con fenotipo MBL negativo (22,70% de resistencia). Todos los aislados fueron sensibles a colistina.

Once aislados (6,7 %) fueron resistentes a todos los betalactámicos (piperacilina-tazobactam, ticarcilina, ceftazidima, cefepime, aztreonam, imipenem y meropenem) y 4 de ellos (36,3 %) presentaron fenotipo MBL.



Abreviaturas: TZP: piperacilina-tazobactam, TIC: ticarcillin, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMI: imipenem, MER: meropenem, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, AMK: amikacina, CIP: ciprofloxacino, LEV: levofloxacino, CL: colistin

Figura 27. Porcentaje de resistencia de los aislados de *P. aeruginosa* procedentes del tracto respiratorio inferior.

A todos los aislados con fenotipo MBL positivo se les realizó una primera PCR múltiple para la detección de los genes codificantes de MBL (*bla_{SIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}* y *bla_{IMP}*) y una PCR simple del gen *bla_{VIM}* cuya posterior secuenciación confirmó la presencia de este gen en todas las cepas con fenotipo MBL positivo. La variante del gen *bla_{VIM-2}* se confirmó en todas ellas al hacer el estudio de integrones.

También se realizó a todas las cepas PCR múltiple para detección de carbapenemasas de clase A (*bla_{KPC}*, *bla_{SME}*, *bla_{IMI}* y *bla_{GES}*) resultando en todos los casos negativa, con lo cual descartamos la presencia de este tipo de carbapenemasas en nuestros aislados.

Resultados

1.2. Estudio de la porina OprD

A todos los aislados de *P. aeruginosa* del TRI (n=164) se les realizó el estudio de la porina OprD mediante PCR, secuenciación y comparación con la porina OprD de *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank accession no. AE004091). El tamaño de referencia de esta proteína son 443 aminoácidos.

El gen *oprD* amplificó en todos los aislados excepto en uno (Ps106) que fue resistente a carbapenems con las siguientes CIM: IMI >8 µg/mL; MEM 8 µg/mL. Dicho aislado no presentó fenotipo MBL y las PCR de genes codificantes de carbapenemasas fueron negativas para el mismo. Teniendo en cuenta el resultado negativo de la PCR, la resistencia a carbapenems sería compatible con la pérdida de la porina.

En el resto de aislados en los que sí amplificó el gen *oprD* se detectaron gran variedad de cambios aminoacídicos así como la presencia de deleciones, inserciones y codones de finalización prematuros (Tabla 18), cambios que sugieren la pérdida de función de la porina OprD, y la posible disminución de sensibilidad a carbapenems, y en particular a imipenem. En el anexo I se adjuntan las Tablas 26 y 27, en las que se muestran las mutaciones detectadas en cada cepa y su relación con el fenotipo de resistencia obtenido.

Diez de los aislados MBL presentaron una mutación en el codón de inicio (patrón OprD: D), por tanto estos aislados carecen de la proteína OprD. Todos ellos fueron resistentes tanto a imipenem como a meropenem, ya que además de esta mutación, todos presentaban fenotipo MBL. Como demuestra este hallazgo, la acumulación de diferentes mecanismos de resistencia para un mismo grupo de antimicrobianos es un hecho constatado y frecuente entre los aislados clínicos estudiados.

Se detectaron 14 aislados resistentes a imipenem que presentaron un codón de finalización prematuro, en diferentes localizaciones, y como resultado una proteína OprD de menor tamaño (patrones de OprD: E, G, a, d, f, o y r).

Los 13 aislados que presentaron tanto inserciones (7 aislados con patrones de OprD: H, b, c y e), como deleciones (6 aislados con patrones de OprD: B, h, m, p y s) de

nucleótidos en la secuencia del gen *oprD*, dando lugar a proteínas de mayor o menor tamaño de lo esperado, respectivamente, fueron resistentes a imipenem.

Cuatro de los aislados presentaron una secuencia de inserción truncando la secuencia del gen *oprD*, que podría traducirse en una posible pérdida de la funcionalidad de la proteína, lo que explicaría que estos 4 aislados sean resistentes también a imipenem.

La presencia del loop-L7 corto se demostró en 73 aislados (patrones OprD: A, n y t) siendo todos ellos sensibles a imipenem y meropenem excepto un aislado resistente a imipenem, lo que sugiere que esta configuración, que es frecuente, no parece tener repercusión significativa en la sensibilidad a imipenem.

Ocho aislados no presentaron alteraciones en la proteína OprD tras compararlos con la de *P.aeruginosa* PAO1, siendo todos ellos sensibles a carbapenems.

Tabla 18. Patrones de la proteína OprD de *P. aeruginosa* obtenidos en los aislados procedentes del tracto respiratorio inferior.

Patrón OprD	Nº aislados	Sensibilidad carbapenems		MBL	Tamaño (nº aa)	Mutaciones ^a
		IMI	MER			
A	1	R	I	NO	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, loop L-7 corto
	53	S/I	S/I	NO		
B	1	R	R	SI	73	Delección de 1 pb en el codón 74 (nt 222)
C	1	R	R	SI	-	Secuencia de inserción
D	10	R	R	SI	0	Sin codón de inicio (M1T)
E	5	R	R	SI	66	Q67STOP
F	5	R	R	1/5	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A
	24	S	S	NO		
G	2	R	R/I	1/2	423	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, Q424STOP
H	4 ^b	R	R	SI	>443	Inserción de 2 pb (nt 1160)
a	1	R	R	NO	55	D43N, K56STOP
b	1	R	R	NO	>443	Inserción de 1 pb (nt 775)

Resultados

Patrón OprD	Nº aislados	Sensibilidad carbapenems		MBL	Tamaño (nº aa)	Mutaciones ^a
		IMI	MER			
c	4	R	S/I/R	NO	>443	Inserción de 1 bp (nt 1206)
d	1	R	S	NO	295	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296STOP
e	1	R	R	NO	>443	Inserción de 5 pb (nt 490)
f	3	R	R	NO	141	D43N, S57E, S59R, Q142STOP
g	3	S	S	NO	443	D43N, T103S, K115T, F170L
h	1	R	R	NO	16	Delección de 7 pb (nt 50)
i	1	R	S	NO	-	Secuencia de inserción
j	1	R	R	NO	-	Secuencia de inserción
k	1	R	R	NO	-	Secuencia de inserción
l	1	R	R	NO	443	L11P
m	1	R	R	NO	285	Delección de 1pb (nt 855)
n	13	S	S	NO	441	S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, E301Q, R310E, A315G, L347M, S403A, Q424E, Loop L-7 corto
o	1	R	I	NO	126	T103S, K115T, A126P, V127STOP
p	2	R	R	NO	134	Delección de 2 pb (nt405)
q	5	S	S	NO	443	T103S, K115T, F170L
r	1	R	R	NO	72	Y73STOP
s	1	R	I	NO	157	Delección de 11 pb (nt 472)
t	6	S/I	S	NO	441	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, E301Q, R310E, G312R, A315G, L347M, S403A, Q424E, Loop L-7 corto
u	8	S	S	NO	443	No se detectan mutaciones
w	1	R	R	NO	-	PCR negativa

^aAbreviaturas: aa=aminoácidos, nt=nucleótido; pb= pares de bases; L-7 corto= 372-VDSSSSYAGL-383; STOP= codón de parada.

^bDos aislados pertenecían al mismo paciente.

1.3. Estudio de integrones

Se estudió la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3 en los 164 aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Se detectaron integrones de clase 1 en 39 de estos aislados (23,78%). No se detectó ningún integrón de clase 2 o de clase 3. En estos integrones, se detectó un único gen implicado en la resistencia a carbapenémicos, (*bla_{VIM-2}*) y casetes génicos relacionados con la resistencia a aminoglucósidos (*aadB*, *aadA1*, *aadA6*, *aacA4* y *aac(3)-I*).

Se han detectado 7 estructuras diferentes de regiones variables, entre el gen codificante de la integrasa de tipo 1 y la región 3' conservada, tanto en cepas productoras como no productoras de MBL. Dichas estructuras están representadas en la Figura 28. Las 23 cepas productoras de MBL contenían el gen *bla_{VIM-2}* dentro de estos integrones, como único gen en la región variable o bien en combinación con genes que confieren resistencia a aminoglucósidos. También se estudiaron los promotores asociados a estos integrones. La Tabla 19 muestra la asociación entre las estructuras génicas de los integrones de clase 1 con las Secuencias Tipo (ST) detectadas. Además, 11 de las cepas portaban 2 integrones simultáneamente (dos cepas del mismo paciente) y 13 presentaban hasta tres integrones diferentes (Tabla 19).

Únicamente se han encontrado integrones regulados por promotores híbridos de tipo 1 y de tipo 2. No se han encontrado integrones regulados por ningún promotor fuerte (PcS) ni débil (PcW). Cuando el primer casete génico es el mismo, el tipo de promotor también es el mismo (Tabla 19). El integrón más prevalente (*bla_{VIM-2}*) está regulado por un promotor híbrido tipo 1 (PcH1).

Resultados

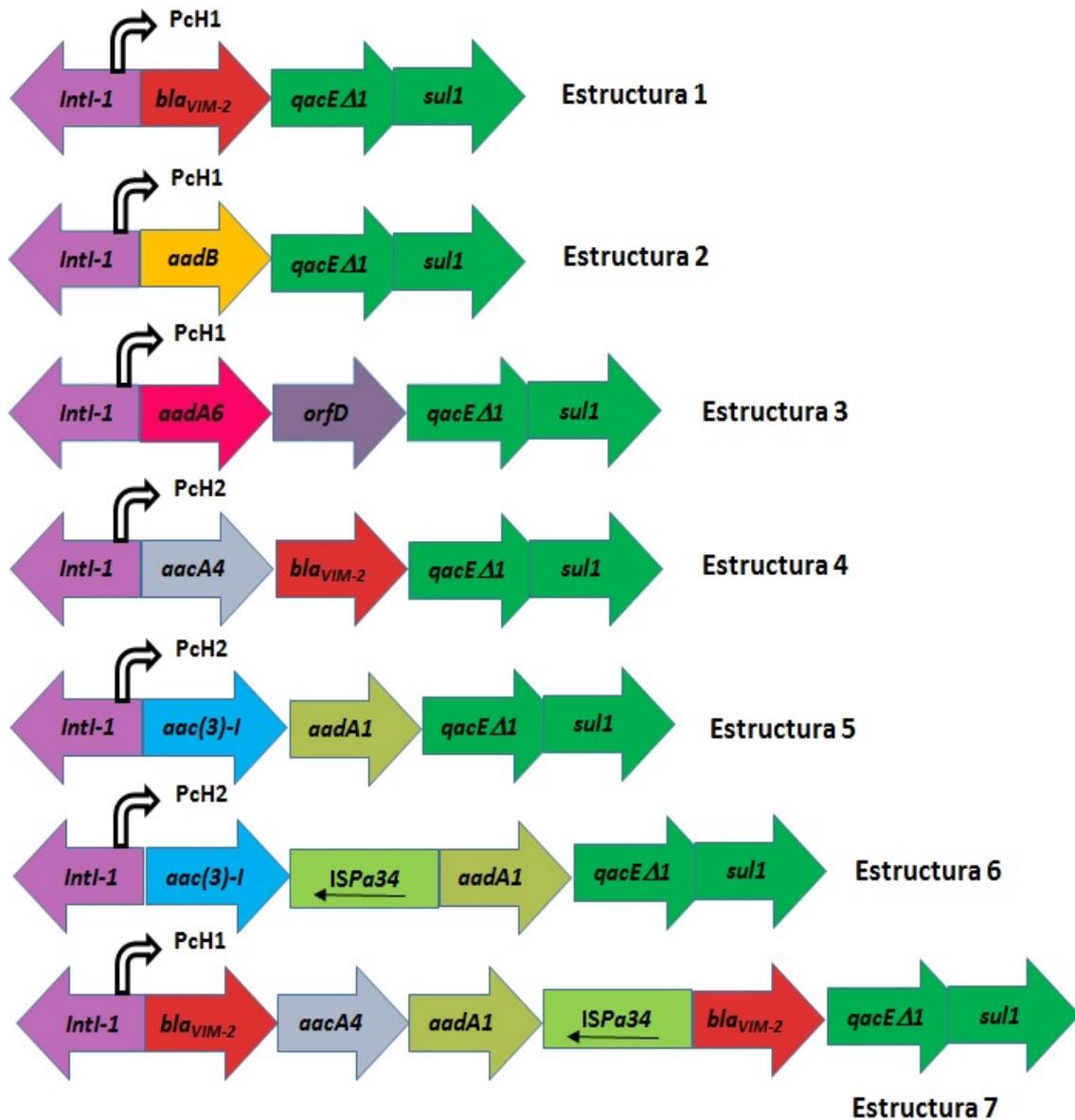


Figura 28. Estructuras de los integrones de clase 1 detectados en las cepas de *P. aeruginosa* de muestras del tracto respiratorio inferior

Tabla 19. Asociación de las secuencias tipo con las estructuras de los integrones de clase 1 en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*

	Cepas con integrones (Nº cepas)	MLST	Estructura genética de las regiones variables de los integrones de clase 1	Promotores
Cepas productoras de MBL (n=23)	Ps4, Ps52 ^a , Ps55, Ps61 ^a , Ps78, Ps81 ^a , Ps83, Ps86, Ps104, Ps158 ^a , Ps168 (11)	ST235	<i>aac(3)-I + aadA1</i> <i>bla_{VIM-2}</i> <i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>	PcH2 PcH1 PcH1
	Ps49 Ps99, Ps109 ^a , Ps150 ^a (4)	ST973	<i>bla_{VIM-2}</i> <i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>	PcH1 PcH1
	Ps119, Ps127 (2)	ST235	<i>bla_{VIM-2}</i> <i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>	PcH1 PcH1
	Ps6, Ps46, PS65, Ps160 ^a (4)	ST235	<i>aacA4+ bla_{VIM-2}</i>	PcH2
	Ps47, Ps147 (2)	ST235	<i>aac(3)-I + ISPa34 + aadA1</i> <i>bla_{VIM-2}</i> <i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>	PcH2 PcH1 PcH1
	Cepas no productoras de MBL (n=16)	Ps5, Ps139, Ps167 (3)	ST235	<i>aac(3)-I + aadA1</i>
	Ps31, Ps42, Ps87, Ps163, Ps165 (5)	ST235	<i>aac(3)-I + aadA1</i> <i>aadA6-orfD</i>	PcH2 PcH1
	Ps10, Ps14, Ps25 (3)	ST235	<i>aadA6-orfD</i>	PcH1
	Ps8, Ps101 (2)	ST253	<i>aadA6-orfD</i>	PcH1
	Ps41 ^a , Ps45, Ps85 (3)	ST175	<i>aadB</i>	PcH1

^aA estos aislados no se les realizó estudio de Secuencia Tipo por tener mismo perfil de PFGE que otro, al cual sí se le realizó. Dichos aislados fueron los siguientes: Ps52 y Ps158 con mismo patrón PFGE que Ps104 (P2), Ps81 con mismo PFGE que Ps83 (P11), Ps41 con mismo PFGE que Ps85 (P17a), Ps160 con mismo PFGE que Ps55 (P4), Ps61 con mismo PFGE que Ps78 (P6a), Ps109 con mismo PFGE que Ps99 (P9a) y Ps150 con mismo PFGE que Ps49 (P9b).

Resultados

1.4. Estudio de genes de virulencia

Se estudió la presencia de genes de virulencia mediante PCR en 31 aislados de *P. aeruginosa* del tracto respiratorio inferior. El criterio de selección fue por patrón de PFGE: se seleccionó un aislado de cada patrón PFGE obtenido (PFGE se realizó a las cepas *int11* positivas).

Se obtuvieron 6 patrones diferentes (Tabla 20). La mayoría de ellos (74,19%, n=23) amplificaron todos los genes excepto *exoS* (patrón I de virulencia).

Todos los aislados amplificaron genes de exotoxinas: el gen *exoU* fue amplificado en 27 aislados (87,10%) todos ellos pertenecientes al ST235 (n=25) o al ST253 (n=2), y *exoS* fue amplificado en los 4 restantes (12,90%) adscritos al ST175 (n=2) y al ST973 (n=2), siendo la presencia de ambos genes excluyente. Se estudió el fenotipo de virulencia en 16 de los aislados productores de MBL. De ellos, 14 (87,5 %) pertenecían a ST235 y presentaron genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ mientras que los otros dos aislados (12,5 % restante) pertenecían a ST973 y presentaron genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁺.

Los genes implicados en los sistemas *Quórum sensing* (QS), *las* y *rhl*, fueron amplificados en la mayoría de los aislados (Tabla 20) y los genes codificantes de proteasas (*aprA*, *rhlAB*, *lasA* y *lasB*) amplificaron en todos ellos.

Tabla 20. Patrones de virulencia encontrados en los aislados de *P. aeruginosa* del tracto respiratorio inferior

<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	<i>exoA</i>	<i>lasA</i>	<i>aprA/ rhlAB</i>	<i>rhlI/ rhlR</i>	<i>lasI/ lasR</i>	n ^a	MLST	Patrón virulencia
+	-	+	+	+	+	+	+	+	23	235/253	I
+	-	-	+	+	+	+	+	+	2	235	II
+	-	+	+	-	+	+	+	+	1	235	III
+	-	+	+	+	+	+	-	+	1	235	IV
-	+	+	+	+	+	+	-	+	2	175	V
-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	2	973	VI

^aNúmero de aislados que presentan cada patrón de genes de virulencia

1.5. Tipificación molecular

Se realizó PFGE a los aislados que presentaron integrones de clase 1 excepto a uno (n=38), el aislado Ps109, por ser del mismo paciente que el aislado Ps99 y tener el mismo patrón de la proteína oprD que éste, así como los mismos integrones (Tabla 19). Se han obtenido 31 patrones diferentes de PFGE (Figura 29), y se ha estudiado la Secuencia Tipo (MLST) en estos 31 aislados con distintos patrones de PFGE.

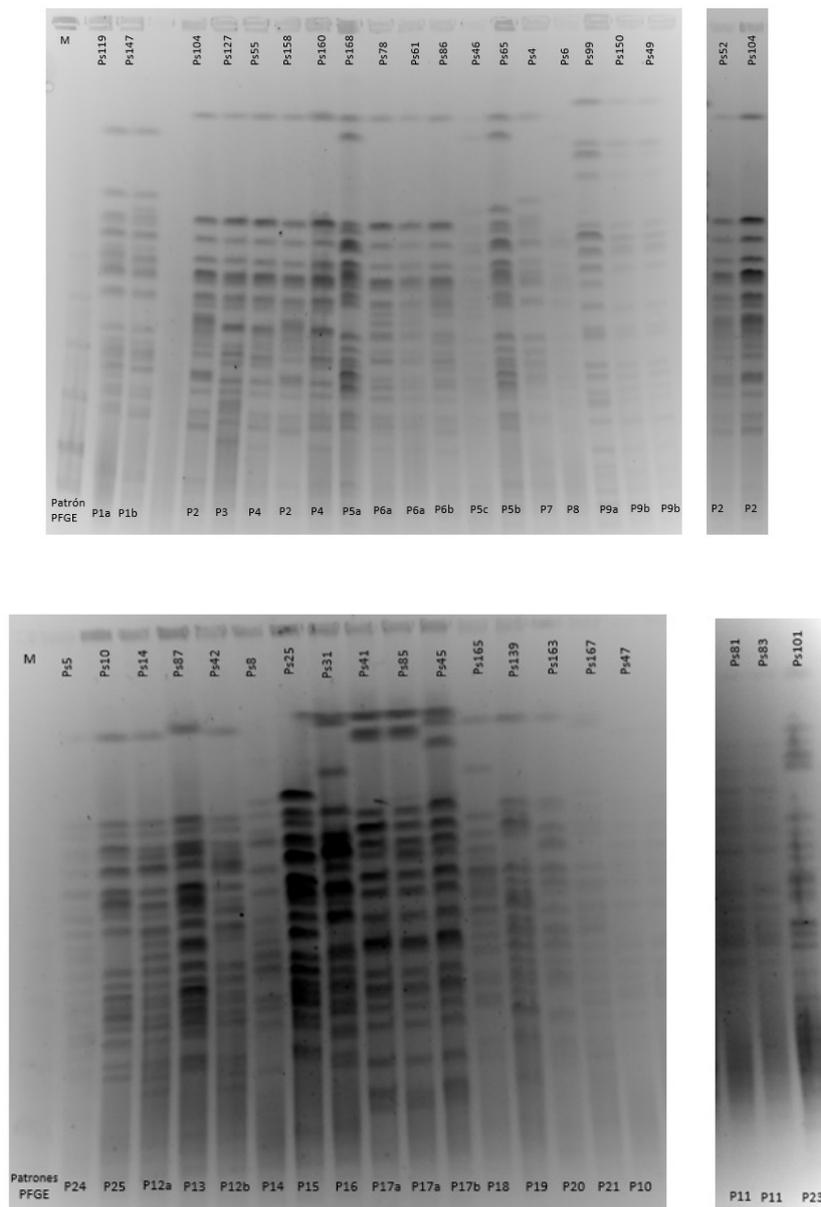


Figura 29. Patrones de PFGE obtenidos de las cepas de *P. aeruginosa* portadoras de integrones

Resultados

Se detectaron 4 Secuencias Tipo diferentes: ST175, ST235, ST253 y ST973 (Tabla 19) siendo el ST235 el mayoritario, detectándose en 30 aislados (76, 92%). La mayor parte de los pacientes con aislamiento de *P.aeruginosa* ST235 estaban ingresados en la UCI (25/30, 83,33%), dos pacientes en Neumología, otros dos en Medicina Interna y uno provenía de un centro de salud pero estuvo ingresado con anterioridad en el Servicio de Neumología de nuestro hospital. El ST973 se detectó en 3 cepas que presentaron los mismos integrones, dos de ellas con idéntico patrón de PFGE (P9b) y uno con patrón estrechamente relacionado a las anteriores (P9a), aisladas en meses distintos (abril, agosto y noviembre) de pacientes ingresados en distintas fechas (no coincidentes en el tiempo) en UCI. El ST175 se detectó en 3 aislados de 3 pacientes, uno de ellos ingresado en UCI, otro en Neumología y el tercero provenía de centro de salud aunque también había estado ingresado en Neumología previamente. Las tres cepas eran portadoras del mismo integrón, dos de ellas con idéntico patrón de PFGE (17a) y ambas aisladas en el mes de abril, y una con patrón estrechamente relacionado a las anteriores (17b) aislada en el mes de junio. Por último, el ST253 se detectó en dos aislados de pacientes no ingresados, portadores del mismo integrón, aunque presentaron diferente patrón de PFGE (P14 y P23). La tabla que relaciona los patrones de PFGE, MLST, estructura de integrones y los patrones de OprD se encuentra en el anexo I (Tabla 28).

2 Aislados procedentes de portadores fecales

2.1 Prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* como colonizador intestinal en menores de 15 años

Desde el 1 de junio hasta el 31 de octubre del año 2013 en la sección de coprocultivos del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, se recogieron cepas de *P. aeruginosa* de muestras de heces procedentes de menores de 15 años, en las que no se aisló ningún enteropatógeno.

Durante estos 5 meses se recibieron 790 muestras de niños menores de 15 años (una muestra por niño). En 42 de estas 790 muestras se aisló *P. aeruginosa*, lo que supone un 5,32% de colonización intestinal por esta especie en menores de 15 años. 18 de los 42 colonizados por *P. aeruginosa* eran niñas (42,85%) y 24 niños (57,14%). Procedían de 16 centros de salud diferentes, 10 centros de Zaragoza capital y 6 de diferentes comarcas de la provincia de Zaragoza (Cariñena, Ejea de los Caballeros, La Almunia, La Muela, María de Huerva y Utebo).

2.2. Estudio de la sensibilidad a antibióticos de los aislados

Los porcentajes de resistencia antibiótica (Tabla 21) se han obtenido mediante microdilución en caldo, utilizando los paneles comerciales MicroScan WalkAway®.

Tabla 21. Porcentajes de resistencia antibiótica obtenidos con el sistema de Microdilución MicroScan WalkAway® en 42 aislados de *P. aeruginosa* procedentes de portadores fecales según CLSI 2015

%	TZP	TIC	CAZ	FEP	ATM	IMI	GEN	CIP
Resistencia (n^a)	11,9 (5)	11,9 (5)	11,9 (5)	11,9 (5)	11,9 (5)	2,38 (1)	4,76 (2)	2,38 (1)

^aNúmero de aislados

TZP: Piperacilina/Tazobactam; TIC: Ticarcilina; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; IMI: imipenem; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacino

Todos los aislados fueron sensibles a meropenem, tobramicina, amikacina, levofloxacino y colistina. Algunos aislados presentaron sensibilidad disminuída a determinados antibióticos; 12 aislados (28,57%) presentaron sensibilidad intermedia a ticarcilina, 6 aislados (14,29%) a gentamicina, dos aislados (4,76%) a meropenem, dos

Resultados

aislados (4,76%) a aztreonam, un aislado (2,38%) a amikacina y un aislado (2,38%) a cefepime.

No se detectó ningún aislado con fenotipo MBL ni con fenotipo compatible con la producción de carbapenemasas de clase A mediante los test de sinergia de doble disco (IMI (10 µg) + EDTA 0,5 M pH 8 + MEM (10 µg) para MBL y IMI (10 µg) + APB 50 mg/ml + MEM (10 µg) para carbapenemasas de clase A).

Las PCRs múltiples realizadas a todos los aislados para detectar tanto MBL como carbapenemasas de clase A, fueron en todos los casos negativas.

2.3. Estudio de integrones y de la porina OprD

En las 42 cepas se investigó la presencia de integrones obteniendo un resultado negativo para todas ellas.

En cuanto a las alteraciones genéticas de la porina OprD, se han detectado 9 patrones diferentes (A-I) representados en la Tabla 22. El patrón más frecuente fue el patrón A (D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, Loop L-7 corto) detectado en 15 de los 42 aislados (35,7%).

En uno de los aislados (Pc1), que presentó resistencia a imipenem (8 µg/mL) y sensibilidad intermedia a meropenem (4 µg/mL) se detectó un codón stop en posición 277, dando lugar a una proteína OprD con un tamaño de 276 aminoácidos. Esta mutación puede ser la responsable de la sensibilidad disminuida a carbapenems.

Únicamente dos de los aislados (Pc6 y Pc15) no presentaron modificaciones respecto a la OprD de *P. aeruginosa* PAO1 (Patrón D). En ningún aislado se detectó la presencia de inserciones o deleciones que alterara el marco de lectura de la proteína.

Tabla 22. Alteraciones de la porina OprD detectadas en los aislados de *P. aeruginosa* de portadores fecales y sensibilidad a carbapenems

Aislado (Pc)	IMP	MEM	Tamaño OprD (nº aminoácidos)	Patrón OprD ^a
3, 8, 11, 12, 13, 17, 19, 22, 24, 26, 27, 28, 35, 39, 43	S	S	441	A
2	S	S	441	B
1	R	I	276	C
6, 15	S	S	443	D
10	S	I	443	E
23, 33, 37, 38, 41	S	S	441	F
9, 21, 25	S	S	443	G
4, 5, 7, 14, 18, 20, 29, 30, 32, 40	S	S	443	H
16, 31, 32, 36	S	S	441	I

^a**Patrón OprD:** **A** (D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, Loop L-7 corto), **B** (D43N, S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, A315G, L347M, S403A, Q424E, Loop L-7 corto), **C** (G60R, T105A, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, S248E, N262T, A267S, W277STOP), **D** (NO SE DETECTAN MUTACIONES), **E** (R310E, A315G, G425A), **F** (S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, A315G, L347M, S403A, Q424E, Loop L-7 corto), **G** (T103S, K115T, F170L), **H** (T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A) y **I** (V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, S403A, Q424E, Loop L-7 corto)

Resultados

2.4. Estudio de genes de virulencia

En todos los aislados de portadores fecales se estudió la presencia de genes de virulencia mediante PCR. La Tabla 23 representa los 9 patrones obtenidos, y el número de aislados que presenta cada patrón.

Tabla 23. Presencia de genes de virulencia en aislados de *P. aeruginosa* de portadores fecales

<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	<i>exoA</i>	<i>lasA/ lasB</i>	<i>aprA/ rhlAB</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlR</i>	<i>lasI/ lasR</i>	n ^a	Patrón virulencia	MLST
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8	I	ST313 ST1149 ST1411 ST2223 ^c
+	-	-	+	+	+	+	+	+	+ ^b	5	II	ST667
+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	2	III	ST313 ST667
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	IV	ST2143 ST2222 ^c
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ^b	20	V	ST244 ST254 ST274 ST508 ST527 ST2125
-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1	VI	ND ^d
-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	1	VII	ND ^d
-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	2	VIII	ST1648
-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	1	IX	ST2221 ^c

^aNúmero de aislados que presentan cada patrón de genes de virulencia

^bDentro de los patrones de virulencia II y V se ha encontrado un aislado en cada uno de ellos que posee el tamaño de amplicón de *lasR* de 2000 pb

^cNuevo MLST

^dNo determinado

El gen *exoS* se detectó en el 61,90% (26/42) de los aislados y el gen *exoU* en el 40,48% (17/42). Únicamente uno de los aislados no amplificó ningún gen codificante de exotoxinas. Dos aislados (Pc16 y Pc18) presentaron simultáneamente los genes *exoU* y *exoS*.

Los genes implicados en los sistemas *Quórum sensing* (QS), *las* y *rhl*, fueron amplificados en la mayoría de los aislados. Al amplificar el gen *lasR*, dos aislados (Pc5 y Pc10) presentaron un tamaño de amplicón de 2000 pb, que es mayor de lo esperado, y se secuenció el producto de PCR obteniendo las siguientes estructuras:

- Pc5: se detectó la secuencia de inserción *IS1246* precediendo al gen *lasR* (Figura 30)
- Pc10: se detectó la secuencia de inserción *ISPpu17* a continuación del gen *lasR* (Figura 31).

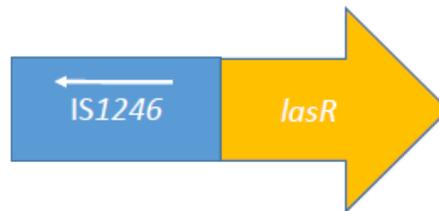


Figura 30. Estructura del gen *lasR* del aislado Pc5

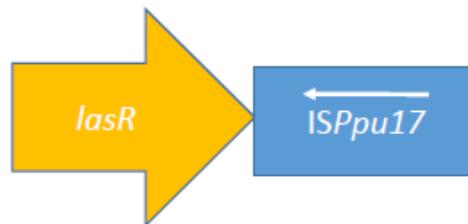


Figura 31. Estructura del gen *lasR* del aislado Pc10

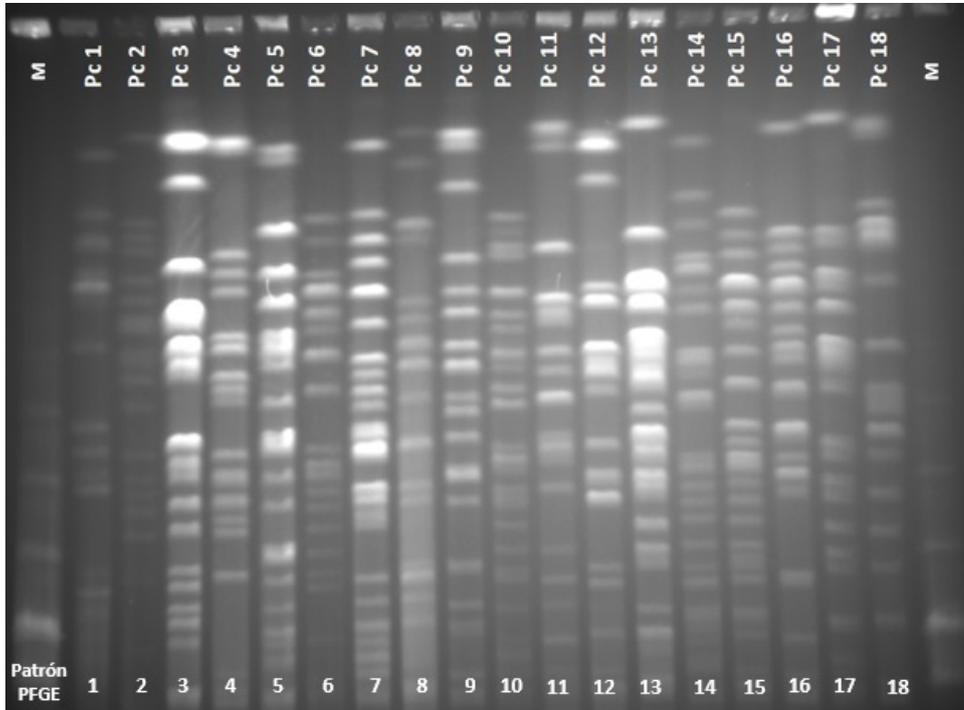
Las secuencias de inserción detectadas no truncaron el gen *lasR* sino que se presentaron precediéndolo o bien a continuación del mismo, por lo que desconocemos si este hecho afecta a la funcionalidad del gen. Los genes codificantes de proteasas (*aprA*, *rhlAB*, *lasA* y *lasB*) fueron amplificados en todos los aislados.

2.5. Tipificación molecular

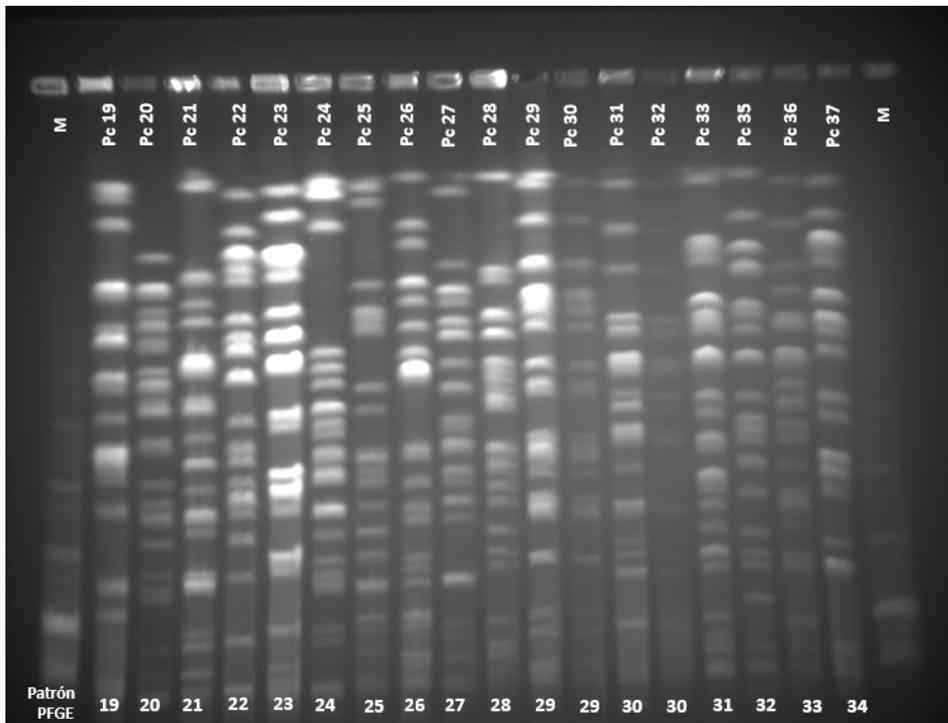
Se realizó PFGE a los 42 aislados procedentes de portadores fecales obteniendo 39 patrones diferentes. Las siguientes cepas presentaron únicamente 3 bandas diferentes en sus patrones de PFGE, por tanto podemos decir que son clones: los aislados Pc29 y Pc30 (patrón PFGE 29), los aislados Pc31 y Pc32 (patrón PFGE 30) y los

Resultados

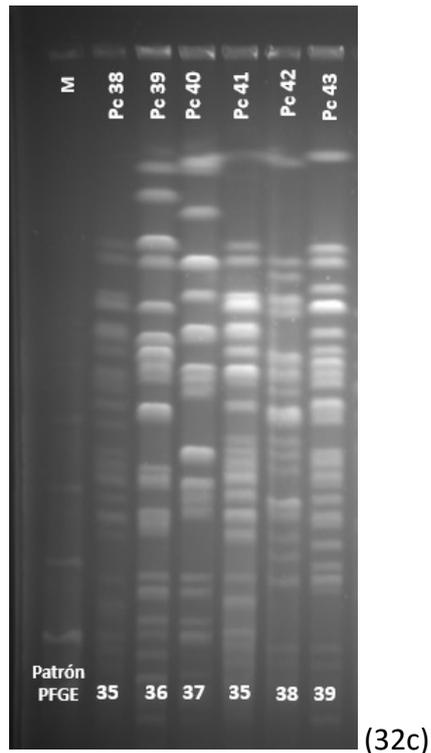
aislados Pc38 y Pc41 (patrón PFGE 35). Las figuras 32a, 32b y 32c muestran los PFGE obtenidos de los 42 aislados.



(32a)



(32b)



M: marcador de peso molecular

Figura 32a, 32b y 32c. Fotos de PFGE con los 42 aislados de portadores fecales

Se determinó la Secuencia Tipo (ST) a 18 aislados escogidos al azar, incluyendo al menos un aislado de cada patrón de OprD, obteniéndose 15 secuencias tipo diferentes (Tabla 24).

Tres de los aislados presentaron nuevas combinaciones alélicas que fueron añadidas a la base de datos MLST como ST2221 (*acsA87, aroE5, guaA114, mutL37, nuoD86, ppsA100, trpE1*), ST2222 (*acsA7, aroE5, guaA26, mutL72, nuoD3, ppsA47, trpE10*) y ST2223 (*acsA32, aroE5, guaA61, mutL13, nuoD1, ppsA126, trpE54*). Estos nuevos ST fueron depositados en la página web de MLST de *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Los ST244, ST303 y ST667 aparecieron dos veces cada uno, pero los niños no tenían parentesco alguno ni estaban relacionados geográficamente (ST244 → CS Universitas y CS Casetas; ST303 → CS La Muela y CS Casetas; ST667 → CS La Almunia y CS Casetas).

Resultados

Cabe destacar que ninguna Secuencia Tipo detectada en cepas de portadores fecales coincidió con las detectadas en las cepas procedentes del tracto respiratorio inferior de los pacientes ingresados.

Tabla 24 Características principales de los 18 aislados de *P. aeruginosa* de portadores fecales tipados mediante MSLT (*MultiLocus Sequence Typing*)

Nº aislado (Pc)	Sexo	Edad (años)	Patrón OprD	Patrón virulencia	Patrón PFGE	MLST	CIM (µg/mL)	
							IMI	MEM
Pc3	Masculino	8	A	V	3	ST527	≤ 1	≤ 1
Pc17	Masculino	5	A	V	17	ST508	≤ 1	≤ 1
Pc22	Femenino	9	A	V	22	ST254	≤ 1	≤ 1
Pc43	Masculino	4	A	V	39	ST274	2	2
Pc2	Femenino	11	B	I	2	ST1149	≤ 1	≤ 1
Pc1	Femenino	1	C	IX	1	ST2221 ^a	8	4
Pc15	Masculino	13	D	V	15	ST244	≤ 1	≤ 1
Pc10	Masculino	7	E	V	10	ST244	2	4
Pc37	Masculino	< 1	F	III	34	ST313	2	≤ 1
Pc23	Masculino	1	F	I	23	ST313	≤ 1	≤ 1
Pc33	Masculino	1	F	I	31	ST1411	≤ 1	≤ 1
Pc9	Masculino	2	G	V	9	ST2125	2	≤ 1
Pc4	Femenino	10	H	VIII	4	ST1648	≤ 1	≤ 1
Pc18	Masculino	< 1	H	IV	18	ST2222 ^a	≤ 1	≤ 1
Pc29	Masculino	5	H	I	29	ST2223 ^a	≤ 1	≤ 1
Pc16	Femenino	10	I	IV	16	ST2143	≤ 1	≤ 1
Pc31	Masculino	1	I	II	30	ST667	≤ 1	≤ 1
Pc36	Femenino	2	I	III	33	ST667	≤ 1	≤ 1

^aNuevo MLST

Discusión

Aislados procedentes del tracto respiratorio inferior

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, comúnmente asociado a infecciones nosocomiales, con una gran capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos, que se suman a su elevada resistencia intrínseca a diversas familias de antibióticos (Kaiser et al., 2016; Lister et al., 2009). En este estudio se aislaron 164 cepas procedentes de 160 pacientes de los cuales un 63 % estaban ingresados en el HCULB, de ellos prácticamente la mitad (48,5 %) en UCI, y el 37 % restante procedían de atención primaria. Un 56,9% de los pacientes padecían alguna enfermedad respiratoria como EPOC o bronquiectasias, patologías determinadas como factores predisponentes para la infección por *Pseudomonas* (Gallego et al., 2014). Veinte de los pacientes (12,5 %) padecían diabetes mellitus de tipo 2. Un 78 % (125/160) había estado en tratamiento antibiótico durante el mes previo al aislamiento, en concreto, un 24% (39/160) fue tratado con carbapenems. Todas estas variables han sido asociadas a la infección nosocomial por *P. aeruginosa* multirresistente (Micek et al., 2015).

La prevalencia de *P. aeruginosa* resistente a carbapenems ha aumentado en España en los últimos años. Los datos correspondientes a nuestro país obtenidos por la red de vigilancia EARSS del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) muestran una progresión al alza desde un 16,3 % en el año 2011, 16,4 % en 2012, 17,6 % en 2013 y 18,5 % en 2014 (<http://ecdc.europa.eu>). La frecuencia de resistencia a carbapenems (imipenem y meropenem) obtenida en nuestro hospital ha sido de un 26,86 % en el período estudiado (2013-2014), porcentaje superior al obtenido por el ECDC y algo mayor también al 23 % obtenido en el estudio multicéntrico realizado en el año 2012 en nuestro país (Peña et al., 2012). Un trabajo anterior realizado por Rojo-Bezares y colaboradores en el año 2014 en el que caracterizaron 123 aislados de *P. aeruginosa* recogidos desde 2008 a 2010, procedentes de 80 pacientes del HCULB, mostró un porcentaje de resistencia a carbapenems del 12,8 %, siendo menor que los datos publicados por el ECDC en aquella fecha (13,8 % en 2008 y 17,8 % en 2010). Estos datos sugieren una tendencia al alza en cuanto a la resistencia a carbapenems (imipenem y meropenem) en nuestro hospital. Otro estudio llevado a cabo en Estados Unidos (Logan et al., 2016) obtuvo un 20 % de resistencia a carbapenems en aislados

Discusión

procedentes de niños hospitalizados con edades comprendidas entre 1 y 17 años en el año 2012. En nuestra colección de muestras procedentes del tracto respiratorio inferior, únicamente hay dos aislados de dos niños de 4 años con fibrosis quística, procedentes de consultas externas.

Existen numerosas publicaciones que describen la presencia de *P. aeruginosa* multirresistente (resistente a 3 o más familias distintas de antibióticos) en UCI, incluso como agentes de brotes epidémicos (Knoester et al., 2014; Ramírez-Estrada et al., 2016; Tissot et al., 2016). Todos los pacientes portadores cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de nuestro estudio estaban o habían estado ingresados en UCI y presentaban comorbilidades o factores de riesgo como enfermedad respiratoria de base, ventilación mecánica, traqueostomía, bacteriemia y/o administración de carbapenems en los 30 días previos al aislamiento, detectándose diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de estos factores en pacientes con cepas con fenotipo MBL y pacientes con cepas sin fenotipo MBL. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos (Micek et al., 2015; Peña et al., 2012; Rojo-Bezares et al., 2014).

Como veremos más adelante, las cepas con fenotipo MBL estaban adscritas mayoritariamente al ST235 aunque no todas presentaron patrones de PFGE idénticos según los criterios de Tenover, (Tenover et al., 1995). Este hecho ha sido descrito por varios estudios que muestran cepas pertenecientes al ST235 con distinto patrón de PFGE (Maatallah et al., 2011) y también se ha descrito en otros géneros como, por ejemplo, el clon ST131 de *E. coli*, que muestra numerosas variantes de PFGE (Brolund et al., 2010). La diversidad de los patrones de PFGE en el ST235 sugiere una microevolución dentro de esta secuencia tipo. La diversidad genotípica de los diferentes clones de *P. aeruginosa* se ha atribuido a la recombinación entre las cepas. La estructura poblacional de *P. aeruginosa* es muy compleja (Wiehlmann et al., 2007b) y está formada por un número limitado de clones ampliamente diseminados que se seleccionan de un gran número de genotipos no relacionados siendo la recombinación de alta frecuencia el factor decisivo en la diversidad genotípica de los clones de *P. aeruginosa* (Maatallah et al., 2011; Oliver et al., 2015; Pirnay et al., 2009).

En nuestro estudio se muestra continuidad temporal tanto en los tiempos de ingreso de los pacientes portadores de aislados MBL como en el aislamiento de las mismas, datos que sugieren una persistencia de un clon, principalmente ST235, en diversos nichos ecológicos de la UCI. La capacidad del clon ST235 de albergar distintos elementos de adquisición horizontal (integrones, transposones o plásmidos) que porten genes responsables de la producción de betalactamasas como *bla_{VIM}*, entre otros, ha sido descrito previamente (Empel et al., 2007). Esta variabilidad genética hace que este clon sea un clon versátil y exitoso en ambientes hostiles como la UCI.

Como ocurre en este estudio, se ha descrito previamente una asociación de resistencia entre betalactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos en cepas de origen clínico de *P. aeruginosa* (Estepa et al., 2016; Poole, 2011; Rojo-Bezares et al., 2014). Cabe destacar el elevado porcentaje de co-resistencia a carbapenems y gentamicina, así como a carbapenems y fluoroquinolonas: un 73 % de los aislados resistentes a carbapenems lo fueron también a gentamicina y un 70 % a fluoroquinolonas. Un 64 % fue resistente tanto a carbapenems como a gentamicina y fluoroquinolonas.

En esta tesis hemos estudiado y caracterizado los siguientes mecanismos de resistencia a carbapenems: presencia de carbapenemasas de clase A, MBL y las alteraciones en la estructura de la proteína OprD. Un dato importante a destacar es que en ningún caso hemos obtenido resultados positivos en la búsqueda de carbapenemasas de clase A, aunque han sido descritas en otros estudios (Oliver et al., 2015). Por tanto, podemos concluir que son otros los mecanismos responsables de la resistencia a carbapenems en nuestro hospital.

En nuestro estudio, el 52 % de los aislados resistentes a carbapenems presentaron fenotipo MBL, asociado con la presencia del gen *bla_{VIM-2}*, porcentaje que ha aumentado en nuestro hospital en los últimos años, ya que el porcentaje de cepas productoras de MBL obtenido en el año 2014 por Rojo-Bezares fue del 49 %. No se aisló ninguna cepa productora de carbapenemasas en pacientes comunitarios. El rango de edad de los pacientes con aislamiento de cepas productoras de MBL era de 32 a 80 años con una media de 65. Un estudio multicéntrico en el que participaron 12 hospitales de

Discusión

5 países (Estados Unidos, Francia, Italia, Alemania y España) realizado en el 2015 por Micek y colaboradores, concluyó que tanto la edad del paciente como sus comorbilidades, especialmente diabetes, consumo previo de antibióticos e ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) eran factores predisponentes a la adquisición de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes. Así la media de edad que obtuvieron en pacientes portadores de cepas multirresistentes fue de $53,5 \pm 17,5$, media similar a la obtenida en nuestros pacientes portadores de cepas con fenotipo MBL.

El único casete génico detectado fue *bla*_{VIM-2}, estando presente en todas las cepas con fenotipo MBL. Este resultado es idéntico al obtenido en 2014 con cepas de nuestro hospital (Rojo-Bezares et al., 2014). Cabe destacar que la MBL tipo VIM y, en concreto VIM-2, está dentro de las carbapenemasas adquiridas detectadas con mayor frecuencia y más diseminadas, tanto en Europa como en el resto del mundo. Además, como veremos más adelante, la mayoría de nuestras cepas productoras de VIM-2 pertenecen al complejo clonal CC235 (ST235), lo que coincide con lo descrito tanto en España como en otros países (Mikucionyte et al., 2016; Oliver et al., 2015; Rojo-Bezares et al., 2016; Shamaeva et al., 2015).

Sin embargo, la prevalencia de *P. aeruginosa* productoras de MBL en España no es tan elevada, si la comparamos con otros países como Italia o Grecia (<http://ecdc.europa.eu/>). De hecho, como se observa en nuestro trabajo, la pérdida de la proteína OprD o la presencia de alteraciones, como codones de finalización prematuros, la presencia de inserciones o deleciones de una o más pares de bases, así como la presencia de secuencias de inserción truncando el gen, son los mecanismos implicados en la resistencia a imipenem que se describen con mayor frecuencia en la bibliografía (Estepa et al., 2016; Fournier et al., 2013; Ocampo-Sosa et al., 2012). Sin olvidar, que la sumación de diferentes mecanismos de resistencia en una misma cepa, incluyendo hiperproducción de AmpC y sobre expresión de bombas de expulsión, dan también como resultado CIMs a carbapenems por encima de los puntos de corte clínicos.

Tan solo uno de los aislados resistentes a carbapenems y no productor de MBL (Ps106) no amplificó el gen *oprD* mientras que en el resto de aislados (n=163) se

detectaron numerosas alteraciones. Diez de las cepas ni siquiera presentaron codón de inicio debido a una mutación en el primer codón (M1T) denominado patrón “D”, todas ellas resistentes a carbapenems y productoras de MBL. Esta situación fue descrita por Rojo-Bezares y colaboradores (2014) en el estudio realizado con aislados de nuestro hospital y sería un ejemplo de acumulación de diferentes mecanismos de resistencia frente a betalactámicos en la misma cepa.

Se detectaron 14 aislados resistentes a imipenem que presentaron un codón de finalización prematuro, en diferentes localizaciones, dando lugar a una proteína OprD de menor tamaño. El codón de finalización más frecuente fue Q67stop, el cual da lugar a una proteína de 66 aminoácidos que se encontró en 5 aislados de pacientes ingresados en UCI, asociados todos ellos con la línea clonal ST235. Esta mutación ya había sido descrita previamente (Rojo-Bezares et al., 2014), así como otros codones de finalización prematuros detectados en este estudio como, por ejemplo, Q142stop, presente en 3 aislados, todos ellos pertenecientes al ST175, relación descrita previamente también por Estepa y colaboradores (2016). La recuperación en distintos periodos de tiempo de cepas de determinados ST portadoras de mecanismos específicos de resistencia sugiere la persistencia y/o propagación de estas cepas con carácter endémico en nuestro hospital.

Los 13 aislados que presentaron tanto inserciones como deleciones de nucleótidos en la secuencia del gen *oprD*, dando lugar a proteínas de mayor o menor tamaño de lo esperado, respectivamente, fueron todos resistentes a imipenem. La inserción que se dio con mayor frecuencia fue la de un par de bases en el codón 402 (posición del nucleótido 1206), denominado patrón “c”, dando lugar a una proteína de más de 443 aminoácidos, mutación descrita previamente por los mismos autores mencionados.

La inactivación del gen *oprD* por la presencia de una secuencia de inserción, como por ejemplo *ISPa1328* o *ISPa1635*, fue descrita por primera vez por Wolter y colaboradores (2004). Desde entonces, numerosos trabajos han constatado la presencia de diferentes secuencias de inserción truncando el gen *oprD*, relacionándolo directamente con la resistencia a imipenem (Estepa et al., 2016; Gutiérrez et al., 2007;

Discusión

Rodríguez-Martínez et al., 2009; Rojo-Bezares et al., 2016; Rojo-Bezares et al., 2014; Ruiz-Martínez et al., 2011; Wolter et al., 2004). Del mismo modo, en nuestro estudio hemos obtenido 4 aislados, todos ellos resistentes a imipenem, con una secuencia de inserción truncando la secuencia del gen *oprD*.

Aun así, no todas las alteraciones detectadas están implicadas en la resistencia a imipenem. Por ejemplo, el acortamiento en dos aminoácidos del loop L7 corto, descrito previamente por Epp y colaboradores en el año 2001, no afecta a la resistencia a carbapenems ya que la porina sigue presentando una apertura que no impide la penetración del antibiótico (Epp et al., 2001). La presencia del loop L7 corto se ha detectado tanto en cepas sensibles como resistentes (Estepa et al., 2016; Ocampo-Sosa et al., 2012; Rojo-Bezares et al., 2014). En este estudio hemos detectado el loop L7 en 73 cepas, todas ellas sensibles excepto una, que no presentó fenotipo MBL. La resistencia a imipenem en este caso podría explicarse por otros mecanismos cromosómicos como la hiperproducción de AmpC o bombas de expulsión activa, aunque estos datos no se han analizado en este trabajo.

El patrón de alteraciones en la proteína OprD denominado **patrón A** (D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, loop L-7 corto) ha sido el mayoritario en las dos colecciones de cepas estudiadas en esta tesis, y se ha repetido mayoritariamente en aislados sensibles y con sensibilidad intermedia a imipenem ($CIM \leq 4$) y también en un aislado resistente a imipenem sin fenotipo MBL, detectándose en 54 de las 164 cepas procedentes del tracto respiratorio inferior (33 %) y en 15 de los 42 aislados procedentes de portadores fecales (36%) todos ellos sensibles a imipenem ($CIM \leq 2$) como veremos más adelante. Este patrón ya había sido descrito previamente por diversos autores también en cepas sensibles y resistentes a carbapenems (Estepa et al., 2016; Estepa et al., 2014; Ocampo-Sosa et al., 2012; Rojo-Bezares et al., 2014; Wang et al., 2010). Otras mutaciones detectadas en nuestro estudio también habían sido descritas por estos mismos autores, por ejemplo el patrón **F** (T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A) descrito en cepas tanto sensibles como resistentes o el patrón **t** (V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, E301Q, R310E, G312R, A315G, L347M,

S403A, Q424E, Loop L-7 corto) descrito tanto en cepas sensibles como con sensibilidad intermedia a imipenem. En 8 de nuestros aislados no se detectó ninguna alteración al compararlos con *P. aeruginosa* PAO1, siendo todos ellos sensibles a carbapenems. Estos resultados demuestran que son muy frecuentes las mutaciones que producen cambios en los genes que expresan y regulan la síntesis de la porina OprD, que, dependiendo de su naturaleza y trascendencia, se pueden traducir en resistencia de alto nivel o constituir un mecanismo adicional que puede contribuir a la resistencia.

La presencia de integrones de clase 1, 2 y 3 se estudió en los 164 aislados detectándose el gen de la integrasa de clase 1 (*intI1*) en 39 de estos aislados (23,78 %), siendo dos del mismo paciente. La mayoría de estos pacientes (89,47 % 34/38) estaban ingresados en el HCULB y, de ellos, 30 en la UCI. No se obtuvieron resultados positivos para la investigación de integrones de clase 2 o de clase 3. Se han detectado 7 estructuras diferentes de integrones de clase 1. Las 23 cepas productoras de MBL contenían el gen *bla_{VIM-2}* dentro de estos integrones, como único gen en la región variable o bien en combinación con genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, resultados previamente descritos (Guzvinec et al., 2014; Juan et al., 2010; Oliver et al., 2015; Rojo-Bezares et al., 2016; Rojo-Bezares et al., 2014), Adicionalmente, la mayoría de los aislados productores de VIM-2 estaban pertenecen a ST235, como ocurre en otros países (Edelstein et al., 2013; Mikucionyte et al., 2016). La emergencia y propagación, a nivel mundial, de estos clones que acumulan mecanismos de resistencia y factores de virulencia, evidencian su importancia y constituyen un ejemplo del denominado “capitalismo genético”.

Cabe destacar que 11 de las cepas portaban 2 integrones simultáneamente y 13 presentaban hasta tres integrones diferentes, situación que también se había descrito previamente por Rojo-Bezares (2014). La capacidad que aportan estos elementos genéticos para la captación y expresión de genes casetes, incluyendo genes de resistencia, refleja el potencial de estas cepas para mantenerse y propagarse en ambientes hostiles por la presión selectiva que en ellos se ejerce, como es nuestro caso, ya que se trata mayoritariamente (78,95% 30/38) de aislados recuperados en pacientes ingresados en UCI. El casete génico *aadB* fue detectado en aislados de *P. aeruginosa*

Discusión

pertenecientes a ST175. Esta asociación fue descrita previamente por Nemeč y colaboradores (2010) en la República Checa y en posteriores estudios anteriormente citados (Estepa et al., 2016; Rojo-Bezares et al., 2014). La secuencia tipo ST175 se considera un clon epidémico de alto riesgo relacionado con cepas multirresistentes productoras de MBL y se encuentra diseminado tanto en los hospitales españoles como a nivel mundial (Oliver et al., 2015; Viedma et al., 2014).

La secuencia de inserción *ISPa34* fue descrita en el año 2011 por Rojo-Bezares, formando parte de integrones de clase 1 únicamente en aislados adscritos al ST235. En nuestro estudio se detectó formando parte de diferentes estructuras de los integrones de clase 1 (estructuras 6 y 7) en 16 aislados adscritos tanto a ST235 como ST973.

Como describen diversos autores en la bibliografía (Juan et al., 2010; Oliver et al., 2015), se observa una asociación clara de las cepas adscritas a clones denominados de alto riesgo (ST235 y ST175) con cepas portadoras de integrones de clase 1, aunque en nuestro estudio también se han detectado otras dos secuencias tipo (ST253 y ST973) portadoras de estas estructuras como también se han descrito en otros estudios (Rojo-Bezares et al., 2014).

Numerosos factores de virulencia contribuyen a la patogenicidad de *P. aeruginosa*, tanto en infecciones agudas como crónicas (Gellatly and Hancock, 2013), la mayoría de estos factores se localizan en el genoma accesorio formando parte de islas de patogenicidad o islas genómicas (Battle et al., 2008; Ozer et al., 2014). La interacción entre la virulencia y la resistencia a antibióticos es un importante punto a considerar. La resistencia a antibióticos puede determinar y comprometer la virulencia bacteriana y puede estar estadísticamente asociada a ciertos rasgos o perfiles de virulencia (Martínez-Ramos et al., 2014; Sawa et al., 2014; Skurnik et al., 2013).

Uno de los determinantes de virulencia más relevantes en *P. aeruginosa* es el sistema de secreción tipo III (T3SS), el cual inyecta potentes citotoxinas (ExoS, ExoU, ExoT y ExoY) directamente en el citoplasma de células eucariotas (Gómez-Zorrilla et al., 2016; Hauser, 2009). La producción de cada una de estas citotoxinas determina diferentes lesiones en los tejidos del hospedador. ExoS es la principal citotoxina

implicada en la colonización, invasión y diseminación de la bacteria durante la infección, y se considera la más prevalente de las citotoxinas del T3SS. ExoU tiene más capacidad lesional que ExoS y mayor impacto en la gravedad de la enfermedad, siendo considerado el principal determinante de la virulencia bacteriana (Gómez-Zorrilla et al., 2016; Kulasekara et al., 2006; Maatallah et al., 2011; Sawa et al., 2014). Además, la distribución de los genes codificantes de estas citotoxinas no es uniforme en todos los aislados de *P. aeruginosa* y la presencia de algunos de ellos, concretamente *exoS* y *exoU*, es prácticamente excluyente (Gómez-Zorrilla et al., 2016; Oliver et al., 2015; Wiehlmann et al., 2007a), aunque hay estudios que muestran la presencia de ambos concomitantemente (Maatallah et al., 2011; Peña et al., 2015; Pirnay et al., 2009). Este hallazgo coincide con lo encontrado en nuestro estudio en dos aislados procedentes de portadores fecales que presentaron ambos genes, *exoU* y *exoS*, resultado comprobado mediante secuenciación.

Por lo tanto, se ha sugerido que determinadas líneas clonales están relacionadas con genotipos específicos de T3SS. En un estudio multicéntrico realizado en España se demostró que el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ era un factor de riesgo de mortalidad en bacteriemias por *P. aeruginosa* y estaba vinculado negativamente con los perfiles extremadamente resistentes (XDR) y positivamente con los fenotipos moderadamente resistentes (Peña et al., 2015). La mayoría de los aislados XDR de dicho estudio pertenecían a los clones de alto riesgo ST175 y ST111, los cuales mostraron en todos los casos el genotipo *exoU*⁻/*exoS*⁺. Sin embargo, el clon de alto riesgo más diseminado es ST235, que muestra el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ y en diversos estudios se ha asociado tanto a multirresistencia como a resultados clínicos desfavorables (Edelstein et al., 2013; Gómez-Zorrilla et al., 2016; Lee et al., 2013; Viedma et al., 2009). Parece claro que el genotipo del T3SS es el principal factor diferencial que debe considerarse cuando se analiza la virulencia asociada a los diferentes clones de *P. aeruginosa*, así como a su perfil de resistencia (Oliver et al., 2015).

En este trabajo se investigó la presencia de genes de virulencia en 31 aislados del tracto respiratorio inferior. El criterio de selección fue que presentaran diferente patrón de PFGE. De ellos, un 87 % (27/31) presentaron el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻ y, como ocurre

Discusión

en los trabajos citados previamente, todos pertenecían a ST235 (n=25), que ha sido la secuencia tipo mayoritaria en nuestro estudio, y a ST253 (n=2). El 13 % restante (4/31) presentaron el genotipo *exoU/exoS⁺* siendo ambos genes excluyentes, como algunos estudios nombrados previamente demostraron. Además, como también se ha descrito en trabajos previos, los aislados con genotipo *exoU/exoS⁺* estaban adscritos al ST175 (n=2) y al ST973 (n=2).

Todos estos aislados eran portadores de integrones y todos fueron resistentes a 3 o más familias de antibióticos, excepto dos (Ps8 y Ps101) que fueron sensibles a todos ellos. Estos dos aislados sensibles pertenecían a ST235, aunque presentaron diferente patrón de PFGE, y los dos presentaron genotipo *exoU⁺/exoS⁻*. En concreto, el perfil de virulencia fue el mismo para los dos casos (Patrón I: amplificaron todos los genes estudiados excepto *exoS*).

De los 27 aislados que presentaron el genotipo *exoU⁺/exoS⁻*, 24 (88,89 %) fueron resistentes a fluoroquinolonas. Esta relación entre la presencia del gen *exoU* y mayor resistencia a fluoroquinolonas que muestran nuestros datos había sido descrita previamente (Agnello et al., 2016; Agnello and Wong-Beringer, 2012; Lee et al., 2013). Únicamente 4 aislados presentaron genotipo *exoU⁻/exoS⁺* y de ellos, dos fueron resistentes a quinolonas y dos sensibles.

Los dos sistemas *quorum sensing* (QS) que posee *P. aeruginosa* (*las* y *rhl*) tienen como función regular la expresión genética de factores de virulencia mediante la producción y secreción de autoinductores (*lasI* y *rhlI*) los cuales activan la familia de reguladores LuxR: LasR y RhlR, respectivamente (Balasubramanian et al., 2013). Los factores de virulencia cuya producción está regulada por estos sistemas incluyen elastasas (LasB), estafilolisina (LasA), alcalinproteasa (*aprA*), exotoxina A (*exoA*), rhamnolípidos (RhlA y RhlB), piocianina, lectinas y superóxido dismutasa, entre otros (Rumbaugh et al., 2000; Schaber et al., 2004). En este trabajo, los genes implicados en el sistema QS, *las* y *rhl*, fueron amplificados en la mayoría de los aislados del tracto respiratorio inferior. Tres aislados no amplificaron *rhlI* ni *rhlR* y únicamente uno no amplificó el gen *lasR*. Se conoce que la proteína LasR inicia el sistema regulador del QS activando la transcripción de otros reguladores, como el gen *rhlR* (Feltner et al., 2016).

En la bibliografía se han descrito aislados con mutaciones en el gen *lasR*, así como aislados deficientes en él relacionándolos con infecciones crónicas como fibrosis quística (Hoffman et al., 2009; Smith et al., 2006). Se cree que la pérdida de funcionalidad del gen *LasR* es parte de una adaptación selectiva al entorno de la infección pulmonar prolongada (Hammond et al., 2016). Por otro lado, se ha demostrado que *RhlR* regula los genes dependientes de *LasR* en los aislados que carecen del gen *lasR* (Dekimpe and Déziel, 2009). En nuestros resultados, el único aislado *lasR*⁻ sí amplificó el gen *rhIR*. Por otro lado, el gen de la exotoxina A (*exoA*), que posee un efecto inmunosupresor actuando sobre los linfocitos B y T (Takumida and Anniko, 2006) fue amplificado en 30 de los 31 aislados (96,8 %).

El resto de genes de factores de virulencia estudiados, amplificaron en todos los aislados: alcalinproteasa (*aprA*) que previene la fagocitosis mediada por el complemento degradando el factor C2 (Casilag et al., 2015); el gen *lasA* que codifica para la proteasa extracelular *LasA* con presenta actividad estafilolítica (Alasil et al., 2015; Aybey and Demirkan, 2016) y los rhamnolípidos (*RhlAB*) con actividad surfactante involucrados en el desarrollo de biofilm (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Los resultados obtenidos en diferentes estudios previos muestran también que estos genes están presentes en la mayoría de los aislados estudiados (Lee et al., 2013; Pobiega et al., 2016).

Habitualmente los estudios de epidemiología molecular realizados en aislados de *P. aeruginosa* tanto de muestras hospitalarias como de muestras ambientales, presentan una gran diversidad clonal. Además, a pesar del gran y creciente número de STs descritos (2342 STs a fecha 15 de diciembre de 2016), la detección de nuevas variantes es muy frecuente, de hecho en esta tesis describimos 3 nuevos STs en el siguiente apartado. Sin embargo, varios análisis muestran que esta gran diversidad clonal se obtiene al analizar cepas sensibles a antibióticos pero no en cepas multirresistentes. Por ejemplo, un estudio multicéntrico español de bacteriemias por *P. aeruginosa*, demostró que prácticamente cada aislado sensible estaba representado por un único genotipo, mientras que la diversidad clonal era mucho menor entre los aislados multirresistentes (Cabot et al., 2012; Mulet et al., 2013; Oliver et al., 2015; Peña et al., 2015). Así, un 90 % de los aislados XDR que estudiaron (73/81) pertenecían a tan solo 3

Discusión

clones, que se corresponden con los 3 principales clones de alto riesgo internacionales: ST111, ST175 y ST235. Así mismo, numerosos estudios realizados en todo el mundo, muestran que la mayoría de los aislados MDR o XDR pertenecen a estos mismos o a unos pocos clones más (Castanheira et al., 2014; Estepa et al., 2016; Oliver et al., 2015; Wright et al., 2015).

En cuanto al estudio de clonalidad de nuestros aislados, realizamos PFGE a las cepas portadoras de integrones de clase 1 excepto a una (n=38), el aislado Ps109, por ser del mismo paciente que el aislado Ps99 y tener el mismo patrón de la proteína oprD que éste y los mismos integrones. Se obtuvieron 31 perfiles diferentes de PFGE y se estudió la Secuencia Tipo en estos 31 aislados con distintos perfiles de PFGE. Se detectaron 4 Secuencias Tipo diferentes: ST175, ST235, ST253 y ST973. Dos de los clones detectados, ST175 y ST235, son de los previamente denominados de alto riesgo, los cuales están diseminados por todo el mundo y se han relacionado con cepas multirresistentes. La gran mayoría de nuestros aislados, un 77 %, estaban adscritos al ST235, coincidiendo con lo descrito por Rojo-Bezares y colaboradores (2014) en cepas de nuestro hospital y como también ocurre en otros países (Hong et al., 2015; Mikucionyte et al., 2016; Oliver et al., 2015). El resto de Secuencias Tipo, se detectaron minoritariamente: ST175 y ST973 en tres aislados cada una y ST253 en dos aislados.

En resumen, hemos detectado una elevada prevalencia en el tracto respiratorio inferior de *P. aeruginosa* productoras de MBL entre los aislados resistentes a carbapenems, porcentaje que ha aumentado en los últimos años. El único gen codificante de carbapenemasas detectado ha sido *bla_{VIM-2}* siempre asociado al clon de alto riesgo ST235. La alteración de la proteína OprD asociada con la presencia de inserciones, deleciones o con codones de finalización prematuros fue el mecanismo de resistencia a imipenem mayoritariamente detectado en nuestros aislados, aunque se evidenció un elevado polimorfismo en el gen *oprD* de nuestras cepas, lo que puede estar relacionado con la sensibilidad variable a carbapenems que presentaron los aislados no productores de MBL. La diseminación del gen *bla_{VIM-2}* a través de integrones de clase 1, la mayoría de los cuales incluían al mismo tiempo genes de resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos, es preocupante, ya que estos elementos genéticos

móviles constituyen una forma muy efectiva de diseminación de múltiples mecanismos de resistencia. La mayoría de nuestros aislados presentaron el genotipo de virulencia *exoU⁺/exoS⁻* y amplificaron la mayoría de los genes implicados en el sistema QS. Los clones de alto riesgo detectados en nuestro hospital han sido ST235 y ST175, siendo el primero claramente mayoritario.

Aislados procedentes del portadores fecales

La colonización intestinal por *P. aeruginosa* es una condición importante para el desarrollo de infecciones sistémicas. Así, las sepsis causadas por este microorganismo están asociadas frecuentemente con la presencia de cepas virulentas capaces de adherirse al epitelio intestinal y promover la translocación y, consecuentemente, la diseminación sistémica (Markou and Apidianakis, 2014). Las cepas resistentes a carbapenems se han descrito formando parte de la flora intestinal de pacientes ingresados en UCI, en los que un tratamiento previo con carbapenems representa un factor de riesgo para la colonización intestinal por *P. aeruginosa* (Armand-Lefèvre et al., 2013). En contraste con los numerosos estudios realizados sobre este microorganismo en ambiente hospitalario, los realizados sobre la caracterización molecular de *P. aeruginosa* procedentes de individuos sanos son escasos.

La segunda colección de cepas de *P. aeruginosa* estudiadas en esta tesis, fueron aquellas aisladas durante 5 meses (junio-octubre 2013) de muestras de heces procedentes de menores de 15 años, no ingresados, en las cuales no se aisló ningún enteropatógeno. Durante este periodo se recibieron 790 muestras de individuos diferentes y en 42 de ellas se aisló *P. aeruginosa*, lo que supone un 5,32 % de colonización intestinal en la población estudiada. Este porcentaje es menor al hallado en un estudio realizado en España sobre personas sanas en España, con edades comprendidas entre 3 y 66 años, en el que obtuvieron una tasa de 8,2 % de portadores fecales (Estepa et al., 2014). Esta diferencia puede explicarse porque en nuestra colección sólo estaban incluidas muestras de niños no ingresados, y podría deberse, como describen algunos estudios, a que la población adulta ha tenido mayor contacto con antibióticos, lo que favorece la colonización por este microorganismo (Markou and

Discusión

Apidianakis, 2014). Otro estudio realizado en Alemania describe también que el porcentaje de colonización por *P. aeruginosa* es mayor en individuos con edades superiores a 59 años que en niños y también lo relaciona con la exposición previa a antibióticos, ya que su uso repetido puede alterar la flora intestinal disminuyendo la flora normal y promoviendo la colonización por *P. aeruginosa* (Valenza et al., 2015). Aun así, estos porcentajes están dentro del rango informado previamente en individuos sanos que va del 2,6 a 24% (Kerckhoffs et al., 2011; Lister et al., 2009).

En general, los aislados procedentes de portadores sanos descritos en la bibliografía, del mismo modo que la mayoría de nuestros aislados, no muestran multirresistencia (Estepa et al., 2014; Valenza et al., 2015), datos que se complementan con los estudios que describen que las cepas multirresistentes están principalmente asociadas con estancias hospitalarias y con antibioterapia previa (Micek et al., 2015; Mikucionyte et al., 2016). La resistencia a antibióticos de nuestros aislados fue muy baja, posiblemente por la baja presión antibiótica, situación que también se da en aislados ambientales (Estepa et al., 2015). Encontramos 4 aislados resistentes simultáneamente a 3 familias diferentes de antibióticos: penicilinas anti-pseudomónicas (ticarcilina y piperacilina-tazobactam), cefalosporinas anti-pseudomónicas (ceftazidima y cefepime) y a monobactámicos (aztreonam). Únicamente un aislado (Pc1) fue resistente a imipenem aunque sensible al resto de antibióticos probados y, como hemos evidenciado, esta resistencia se puede explicar por la presencia de un codón de finalización prematuro en la proteína OprD.

Ninguna de las cepas presentó fenotipo de carbapanemasa de clase A o MBL, resultando negativas las PCR múltiples realizadas en todos los casos. Tampoco se detectó ninguna cepa portadora de integrones de clase 1, 2 o 3. Estos resultados son superponibles a los que presentan los estudios realizados en portadores sanos, citados anteriormente.

En cuanto a las alteraciones de la proteína OprD, se detectaron 9 patrones diferentes siendo el más frecuente el patrón **A** (D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, Loop L-7 corto) presente en el 36 % de los aislados (15/42), todos ellos sensibles a carbapenems (con CIM \leq 2).

Este patrón también fue el más frecuente en los aislados del tracto respiratorio inferior y había sido descrito tanto en cepas sensibles como resistentes a carbapenems en diversos estudios (Estepa et al., 2016; Ocampo-Sosa et al., 2012). Únicamente dos de los aislados (Pc6 y Pc15) no presentaron modificaciones respecto a la OprD de *P. aeruginosa* PAO1 (Patrón D), siendo ambos sensibles a carbapenems como también ocurría en los aislados sin alteraciones detectados en las muestras del tracto respiratorio inferior.

El único aislado resistente a imipenem (Pc1 con CIM = 8 µg/mL), presentó un codón de finalización prematuro en posición 277, descrito previamente por Rojo-Bezares y colaboradores (2014), que da lugar a una proteína con un tamaño de 276 aminoácidos. Dicha mutación puede ser la responsable de la resistencia a imipenem ya que, como se ha comentado con anterioridad, diversos estudios relacionan la presencia de codones de finalización prematuros con resistencia a imipenem (Estepa et al., 2016; Gutiérrez et al., 2007; Rojo-Bezares et al., 2014). En ningún aislado se detectó la presencia de inserciones o deleciones que alteraran el marco de lectura de la proteína.

Se estudió la presencia de genes de virulencia en todos los aislados procedentes de portadores fecales. En cuanto a los genes del T3SS, un 41 % (17/42) presentaron el genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻. Este porcentaje es muy elevado si tenemos en cuenta que las cepas proceden de portadores fecales sanos. Diversos estudios remarcan que la presencia de *exoU* es exclusiva del ámbito hospitalario (Lee et al., 2013) y más prevalente en cepas multirresistentes (Sawa et al., 2014). En este caso, nuestros aislados proceden de portadores fecales sanos y, como se ha comentado anteriormente, no presentan multirresistencia. Además, estos aislados con genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁻, presentan una gran variabilidad clonal detectándose 7 secuencias tipo diferentes. Cabe destacar que dos de estos aislados pertenecían al ST313, descrito previamente como un clon nosocomial (Libisch et al., 2008). Dos de nuestras cepas presentaron ambos genes simultáneamente (genotipo *exoU*⁺/*exoS*⁺) hecho que, aunque no es frecuente, también se ha descrito en diversos estudios (Maatallah et al., 2011; Peña et al., 2015). Únicamente un aislado no amplificó ningún gen del T3SS.

En cuanto a los genes implicados en el sistema QS, *las* y *rhl*, amplificaron en la mayoría de los aislados procedentes de portadores fecales, igual que ocurría en las

Discusión

cepas del tracto respiratorio inferior. Un aislado no amplificó los genes *rhlI/rhIR* y dos aislados no amplificaron *lasR*. Además, otras dos cepas presentaron un tamaño de amplicón de *lasR* mayor del esperado y se detectó la presencia de dos secuencias de inserción (*IS1246* y *IS_{Ppu17}*). Varios estudios muestran que las mutaciones en el gen *lasR* son frecuentes, tanto en cepas clínicas como ambientales, y que la mayoría de ellas mantienen la funcionalidad del gen (Feltner et al., 2016). Además, cuando las mutaciones dan lugar a un gen *lasR* nulo o afuncional, no se pierden los factores de virulencia regulados por el QS gracias a la regulación mediada por el factor rhIR (D'Argenio et al., 2007; Dekimpe and Déziel, 2009; Feltner et al., 2016), así, tanto los aislados que presentaron secuencias de inserción en el gen *lasR* como el único aislado deficiente en este gen sí amplificaron el gen *rhlR*. Los genes codificantes de proteasas (*aprA*, *rhlAB*, *lasA* y *lasB*) amplificaron en todos los aislados.

Respecto al estudio de clonalidad de esta colección de cepas, se realizó PFGE a los 42 aislados detectándose 39 patrones diferentes. De los 3 pares de clones detectados, únicamente dos aislados (Pc29 y Pc30 con patrón PFGE 29) procedían de distintos pacientes del mismo centro de salud (Ejea). Se determinó la Secuencia Tipo (ST) de 18 aislados escogidos al azar, incluyendo al menos un aislado de cada patrón de OprD y se obtuvieron 15 secuencias tipo diferentes (ST244, ST254, ST274, ST313, ST508, ST527, ST667, ST1149, ST1411, ST1648, ST2125, ST2143, ST2221, ST2222 y ST2223). Los ST244, ST303 y ST667 aparecieron dos veces cada uno. Las secuencias tipo ST2221, ST2222 y ST2223 fueron descritas como nuevas combinaciones alélicas en este estudio mientras que el resto ya habían sido descritas anteriormente. Dentro de estas secuencias tipo detectadas, encontramos ST244, ST254 y ST274 consideradas como clones intercontinentales ya que se han descrito en 3 o más continentes (Europa, América, Asia, África y Oeanía) tanto en cepas clínicas como ambientales (Cholley et al., 2014). Algunas de ellas se han relacionado con ambiente hospitalario. Por ejemplo, se ha descrito ST244 como un clon ampliamente diseminado en países como China, relacionado con aislados multirresistentes productores de carbapenemasas tipo IMP-6 (Chen et al., 2014) o Tanzania, relacionado con aislados productores de VIM-2 (Moyo et al., 2015). Los clones ST254 y ST274 se habían detectado previamente en portadores fecales sanos (Estepa et al., 2014; Valenza et al., 2015). Además, ST274 se ha descrito,

tanto en España como en distintos países europeos y en Australia, en pacientes con fibrosis quística como un clon epidémico circulante (Fernández-Olmos et al., 2013; García-Castillo et al., 2011; Ocampo-Sosa et al., 2012). ST313 ha sido descrito en Hungría como un clon nosocomial productor de VIM-2 (Libisch et al., 2008), aunque también se detectó en el estudio de colonización intestinal por *P. aeruginosa* llevado a cabo en Alemania por Valenza y colaboradores (2015).

Cabe destacar que no hemos encontrado ningún clon de alto riesgo (ST111, ST175 o ST235) entre las cepas de portadores fecales, y ningún ST coincide con los detectados en la colección de muestras del tracto respiratorio inferior.

En resumen, hemos detectado una baja prevalencia de colonización intestinal por *P. aeruginosa* en niños no hospitalizados, inferior a la prevalencia detectada en otros estudios. Ningún aislado presentó multirresistencia ni se encontraron cepas con fenotipo de carbapenemasa de clase A o MBL. Únicamente uno de los aislados fue resistente a imipenem, siendo la aparición de un codón de finalización prematuro en la proteína OprD la posible responsable de esta resistencia. No se detectó la presencia de inserciones o deleciones en esta proteína, aunque se evidenció un alto grado de polimorfismo en el gen *oprD* en esta colección de cepas. Tampoco se detectó la presencia de integrones de clase 1. El genotipo mayoritario de virulencia detectado en los portadores fue *exoU⁻/exoS⁺* aunque el genotipo *exoU⁺/exoS⁻* se identificó en un número elevado de aislados. Como ocurría en la colección de cepas de origen clínico, estos aislados amplificaron la mayoría de los genes implicados en el sistema QS. Se ha evidenciado una elevada variabilidad clonal, describiéndose nuevas combinaciones alélicas. Dentro de ellas se han encontrado algunas previamente descritas como clones intercontinentales (ST244), nosocomiales y relacionadas con pacientes con fibrosis quística (ST274, ST313), y finalmente algunas de ellas también habían sido descritas en portadores sanos. No se detectaron clones de alto riesgo (ST111, ST175 o ST235) entre las cepas procedentes de portadores fecales.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La resistencia a carbapenems en aislados procedentes del tracto respiratorio inferior es elevada y muestra una asociación con la resistencia a otras familias de antibióticos como aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Los aislados de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas se detectan fundamentalmente en pacientes ingresados en UCI portadores de una enfermedad respiratoria de base, sometidos a ventilación mecánica y/o receptores de tratamiento antibiótico previo.
2. No se han obtenido resultados positivos en la búsqueda de carbapenemasas de clase A en ningún caso. Hemos detectado una elevada prevalencia en el tracto respiratorio inferior de *P. aeruginosa* con fenotipo metalobetalactamasa positivo.
3. Hemos identificado la presencia de integrones de clase 1 portadores del gen *bla_{VIM-2}* así como de casetes génicos de resistencia a aminoglucósidos, en las cepas con fenotipo MBL. Se han detectado cepas que portaban dos y hasta tres integrones de clase 1 simultáneamente. No se han detectado integrones de clase 2 o de clase 3. El gen *bla_{VIM-2}* fue el único gen detectado en todas las cepas con fenotipo MBL siempre asociado a integrones de clase 1 y adscrito al ST973 y, mayoritariamente, al clon de alto riesgo ST235.
4. Se observa un elevado polimorfismo en la proteína OprD tanto en cepas sensibles como resistentes a imipenem, aunque determinadas mutaciones como la presencia de codones de finalización prematuros, secuencias de inserción truncando el gen *oprD* e inserciones y deleciones de pares de bases se detectaron únicamente en aislados resistentes a imipenem.
5. El genotipo de virulencia *exoU⁺/exoS⁻* fue mayoritario en los aislados clínicos, todos adscritos al ST235, excepto uno adscrito al ST253. También amplificaron la mayoría de los genes implicados en el sistema QS.

Conclusiones

6. Los clones de alto riesgo detectados en los aislados de origen hospitalario han sido ST235 y ST175, siendo el primero el mayoritario.
7. Hemos encontrado una baja prevalencia de colonización intestinal por *P. aeruginosa* en niños no hospitalizados, inferior a la detectada en otros estudios. Ninguno de estos aislados presentó multirresistencia ni se detectaron cepas con fenotipo de carbapenemasa de clase A o MBL. No se detectó la presencia de integrones de clase 1, 2 ni 3 en cepas de portadores.
8. Únicamente un aislado procedente de portadores fecales fue resistente a imipenem, siendo la presencia de un codón de finalización prematuro en la proteína OprD responsable de esta resistencia. No se encontraron inserciones o deleciones en esta proteína, aunque se evidenció un alto grado de polimorfismo en el gen *oprD* en esta colección de cepas.
9. El genotipo mayoritario de virulencia en portadores fue *exoU⁻/exoS⁺*, aunque el genotipo *exoU⁺/exoS⁻* se encontró en un número considerable de aislados. Estos aislados también amplificaron la mayoría de los genes implicados en el sistema QS.
10. Se ha evidenciado una elevada variabilidad clonal en las cepas de portadores, describiéndose nuevas combinaciones alélicas. No se detectaron clones de alto riesgo (ST111, ST175 o ST235) en este grupo.

Bibliografía

Bibliografía

- Abdel-Mawgoud, A. M., F. Lépine, and E. Déziel, 2010, Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 86, p. 1323-36.
- Abidi, S. H., S. K. Sherwani, T. R. Siddiqui, A. Bashir, and S. U. Kazmi, 2013, Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan: *BMC Ophthalmol*, v. 13, p. 57.
- Abraham, N., and D. H. Kwon, 2009, A single amino acid substitution in PmrB is associated with polymyxin B resistance in clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*: *FEMS Microbiol Lett*, v. 298, p. 249-54.
- Aeschlimann, J. R., 2003, The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists: *Pharmacotherapy*, v. 23, p. 916-24.
- Agnello, M., S. E. Finkel, and A. Wong-Beringer, 2016, Fitness Cost of Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Differs by Type III Secretion Genotype: *Front Microbiol*, v. 7, p. 1591.
- Agnello, M., and A. Wong-Beringer, 2012, Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*: *PLoS One*, v. 7, p. e42973.
- Alasil, S. M., R. Omar, S. Ismail, and M. Y. Yusof, 2015, Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* by Culture Extract from Novel Bacterial Species of *Paenibacillus* Using a Rat Model of Chronic Lung Infection: *Int J Bacteriol*, v. 2015, p. 671562.
- Ali, Z., N. Mumtaz, S. A. Naz, N. Jabeen, and M. Shafique, 2015, Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a threat of nosocomial infections in tertiary care hospitals: *J Pak Med Assoc*, v. 65, p. 12-6.
- Ambler, R. P., 1980, The structure of beta-lactamases: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 289, p. 321-31.
- Armand-Lefèvre, L., C. Angebault, F. Barbier, E. Hamelet, G. Defrance, E. Ruppé, R. Bronchard, R. Lepeule, J. C. Lucet, A. El Mniai, M. Wolff, P. Montravers, P. Plésiat, and A. Andremont, 2013, Emergence of imipenem-resistant gram-negative bacilli in intestinal flora of intensive care patients: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, p. 1488-95.
- Aybey, A., and E. Demirkan, 2016, Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by human serum paraoxonase: *J Med Microbiol*, v. 65, p. 105-13.
- Balasubramanian, D., L. Schneper, H. Kumari, and K. Mathee, 2013, A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence: *Nucleic Acids Res*, v. 41, p. 1-20.
- Ballarini, A., G. Scalet, M. Kos, N. Cramer, L. Wiehlmann, and O. Jousson, 2012, Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonucleotide-microarray: *BMC Microbiol*, v. 12, p. 152.
- Bardoel, B. W., K. P. van Kessel, J. A. van Strijp, and F. J. Milder, 2012, Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence: characterization of the AprA-AprI interface and species selectivity: *J Mol Biol*, v. 415, p. 573-83.

Bibliografía

- Barrow, K., and D. H. Kwon, 2009, Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, p. 5150-4.
- Bassetti, M., and E. Righi, 2013, Multidrug-resistant bacteria: what is the threat?: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, v. 2013, p. 428-32.
- Bassetti, M., G. Villa, and D. Pecori, 2014, Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: focus on care in patients receiving assisted ventilation: *Future Microbiol*, v. 9, p. 465-74.
- Battle, S. E., F. Meyer, J. Rello, V. L. Kung, and A. R. Hauser, 2008, Hybrid pathogenicity island PGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals: *J Bacteriol*, v. 190, p. 7130-40.
- Brauner, A., O. Fridman, O. Gefen, and N. Q. Balaban, 2016, Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment: *Nat Rev Microbiol*, v. 14, p. 320-30.
- Brolund, A., S. Hæggman, P. J. Edquist, L. Gezelius, B. Olsson-Liljequist, K. T. Wisell, and C. G. Giske, 2010, The DiversiLab system versus pulsed-field gel electrophoresis: characterisation of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: *J Microbiol Methods*, v. 83, p. 224-30.
- Bugden, D. L., 2013, Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia: *Aust Vet J*, v. 91, p. 43-6.
- Bush, K., and G. A. Jacoby, 2010, Updated functional classification of beta-lactamases: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, p. 969-76.
- Bush, L. M., J. Calmon, and C. C. Johnson, 1995, Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors: *Infect Dis Clin North Am*, v. 9, p. 653-86.
- Cabot, G., A. A. Ocampo-Sosa, M. A. Domínguez, J. F. Gago, C. Juan, F. Tubau, C. Rodríguez, B. Moyà, C. Peña, L. Martínez-Martínez, A. Oliver, and S. N. f. R. i. I. D. (REIPI), 2012, Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, p. 6349-57.
- Casilag, F., A. Lorenz, J. Krueger, F. Klawonn, S. Weiss, and S. Häussler, 2015, The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition: *Infect Immun*, v. 84, p. 162-71.
- Castanheira, M., L. M. Deshpande, A. Costello, T. A. Davies, and R. N. Jones, 2014, Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries: *J Antimicrob Chemother*, v. 69, p. 1804-14.
- Castillo García, F. J., C. Seral García, M. Pardos De la Gandara, M. I. Millán Lou, and C. Pitart Ferré, 2007, Prevalence of fecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in hospitalized and ambulatory patients during two non-outbreak periods: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 26, p. 77-8.
- Chaignon, P., I. Sadvovskaya, C. Ragunah, N. Ramasubbu, J. B. Kaplan, and S. Jabbouri, 2007, Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 75, p. 125-32.
- Cheer, S. M., J. Waugh, and S. Noble, 2003, Inhaled tobramycin (TOBI): a review of its use in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: *Drugs*, v. 63, p. 2501-20.

- Chen, Y., M. Sun, M. Wang, Y. Lu, and Z. Yan, 2014, Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 33, p. 1181-7.
- Chi, C. Y., C. H. Lai, C. P. Fung, and J. H. Wang, 2005, *Pseudomonas mendocina* spondylodiscitis: a case report and literature review: *Scand J Infect Dis*, v. 37, p. 950-3.
- Cholley, P., R. Ka, C. Guyeux, M. Thouverez, N. Guessennd, B. Ghebremedhin, T. Frank, X. Bertrand, and D. Hocquet, 2014, Population structure of clinical *Pseudomonas aeruginosa* from West and Central African countries: *PLoS One*, v. 9, p. e107008.
- Cholley, P., M. Thouverez, D. Hocquet, N. van der Mee-Marquet, D. Talon, and X. Bertrand, 2011, Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types: *J Clin Microbiol*, v. 49, p. 2578-83.
- Collis, C. M., and R. M. Hall, 1995, Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, p. 155-62.
- Collis, C. M., M. J. Kim, S. R. Partridge, H. W. Stokes, and R. M. Hall, 2002, Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines: *J Bacteriol*, v. 184, p. 3017-26.
- Coque-González, M. T., 2005, [Role of integrons in antimicrobial resistance]: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 23, p. 251-3.
- Cullen, L., R. Weiser, T. Olszak, R. F. Maldonado, A. S. Moreira, L. Slachmuylders, G. Brackman, T. S. Paunova-Krasteva, P. Zarnowicz, G. Czerwonka, J. Reilly, P. Drevinek, W. Kaca, O. Melter, A. De Soyza, A. Perry, C. Winstanley, S. R. Stoitsova, R. Lavigne, E. Mahenthiralingam, I. Sá-Correia, T. Coenye, Z. Drulis-Kawa, D. Augustyniak, M. A. Valvano, and S. McClean, 2015, Phenotypic characterization of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel: strains of cystic fibrosis (CF) origin show less in vivo virulence than non-CF strains: *Microbiology*, v. 161, p. 1961-77.
- Curran, B., D. Jonas, H. Grundmann, T. Pitt, and C. G. Dowson, 2004, Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 5644-9.
- Cury, J., T. Jové, M. Touchon, B. Néron, and E. P. Rocha, 2016, Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes: *Nucleic Acids Res*, v. 44, p. 4539-50.
- D'Arezzo, S., S. Lanini, V. Puro, G. Ippolito, and P. Visca, 2012, High-level tolerance to triclosan may play a role in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in immunocompromised hosts: evidence from outbreak investigation: *BMC Res Notes*, v. 5, p. 43.
- D'Argenio, D. A., M. Wu, L. R. Hoffman, H. D. Kulasekara, E. Déziel, E. E. Smith, H. Nguyen, R. K. Ernst, T. J. Larson Freeman, D. H. Spencer, M. Brittnacher, H. S. Hayden, S. Selgrade, M. Klausen, D. R. Goodlett, J. L. Burns, B. W. Ramsey, and S. I. Miller, 2007, Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients: *Mol Microbiol*, v. 64, p. 512-33.
- de Kievit, T. R., and B. H. Iglewski, 2000, Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships: *Infect Immun*, v. 68, p. 4839-49.
- Dekimpe, V., and E. Déziel, 2009, Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors: *Microbiology*, v. 155, p. 712-23.

Bibliográfia

- Docquier, J. D., M. L. Riccio, C. Mugnaioli, F. Luzzaro, A. Endimiani, A. Toniolo, G. Amicosante, and G. M. Rossolini, 2003, IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 1522-8.
- Edelstein, M. V., E. N. Skleenova, O. V. Shevchenko, J. W. D'souza, D. V. Tapalski, I. S. Azizov, M. V. Sukhorukova, R. A. Pavlukov, R. S. Kozlov, M. A. Toleman, and T. R. Walsh, 2013, Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study: *Lancet Infect Dis*, v. 13, p. 867-76.
- El-Gamal, M. I., and C. H. Oh, 2010, Current status of carbapenem antibiotics: *Curr Top Med Chem*, v. 10, p. 1882-97.
- Ellington, M. J., J. Kistler, D. M. Livermore, and N. Woodford, 2007, Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases: *J Antimicrob Chemother*, v. 59, p. 321-2.
- Empel, J., K. Filczak, A. Mrówka, W. Hryniewicz, D. M. Livermore, and M. Gniadkowski, 2007, Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex: *J Clin Microbiol*, v. 45, p. 2829-34.
- Epp, S. F., T. Köhler, P. Plésiat, M. Michéa-Hamzehpour, J. Frey, and J. C. Pechère, 2001, C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, p. 1780-7.
- Eren, E., J. Parkin, A. Adelanwa, B. Cheneke, L. Movileanu, S. Khalid, and B. van den Berg, 2013, Toward understanding the outer membrane uptake of small molecules by *Pseudomonas aeruginosa*: *J Biol Chem*, v. 288, p. 12042-53.
- Estepa, V., B. Rojo-Bezares, J. M. Azcona-Gutiérrez, I. Olarte, C. Torres, and Y. Sáenz, 2016, [Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital]: *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Estepa, V., B. Rojo-Bezares, C. Torres, and Y. Sáenz, 2014, Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: antimicrobial susceptibility and global genetic lineages: *FEMS Microbiol Ecol*, v. 89, p. 15-9.
- Estepa, V., B. Rojo-Bezares, C. Torres, and Y. Sáenz, 2015, Genetic Lineages and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas* spp. Isolates Recovered from Food Samples: *Foodborne Pathog Dis*, v. 12, p. 486-91.
- Evans, B. A., and S. G. Amyes, 2014, OXA β -lactamases: *Clin Microbiol Rev*, v. 27, p. 241-63.
- Falagas, M. E., G. S. Tansarli, D. E. Karageorgopoulos, and K. Z. Vardakas, 2014, Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: *Emerg Infect Dis*, v. 20, p. 1170-5.
- Feltman, H., G. Schulert, S. Khan, M. Jain, L. Peterson, and A. R. Hauser, 2001, Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: *Microbiology*, v. 147, p. 2659-69.
- Feltner, J. B., D. J. Wolter, C. E. Pope, M. C. Groleau, N. E. Smalley, E. P. Greenberg, N. Mayer-Hamblett, J. Burns, E. Déziel, L. R. Hoffman, and A. A. Dandekar, 2016, LasR Variant Cystic Fibrosis Isolates Reveal an Adaptable Quorum-Sensing Hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: *MBio*, v. 7.

- Fernández Cuenca, F., L. López Cerero, and Á. Pascual Hernández, 2013, [Molecular typing methods for infection monitoring and control]: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 31 Suppl 1, p. 20-5.
- Fernández-Olmos, A., M. García-Castillo, J. M. Alba, M. I. Morosini, A. Lamas, B. Romero, J. C. Galán, R. del Campo, and R. Cantón, 2013, Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients: *J Clin Microbiol*, v. 51, p. 2761-5.
- Fluit, A. C., and F. J. Schmitz, 2004, Resistance integrons and super-integrons: *Clin Microbiol Infect*, v. 10, p. 272-88.
- Fournier, D., C. Richardot, E. Müller, M. Robert-Nicoud, C. Llanes, P. Plésiat, and K. Jeannot, 2013, Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*: *J Antimicrob Chemother*, v. 68, p. 1772-80.
- Fuqua, C., and E. P. Greenberg, 2002, Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 3, p. 685-95.
- Gallego, M., X. Pomares, M. Espasa, E. Castañer, M. Solé, D. Suárez, E. Monsó, and C. Montón, 2014, *Pseudomonas aeruginosa* isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors: *BMC Pulm Med*, v. 14, p. 103.
- García-Castillo, M., R. Del Campo, M. I. Morosini, E. Riera, G. Cabot, R. Willems, R. van Mansfeld, A. Oliver, and R. Cantón, 2011, Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals: *J Clin Microbiol*, v. 49, p. 2905-10.
- Gellatly, S. L., and R. E. Hancock, 2013, *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses: *Pathog Dis*, v. 67, p. 159-73.
- Giakkoupi, P., L. S. Tzouveleki, A. Tsakris, V. Loukova, D. Sofianou, and E. Tzelepi, 2000, IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 2247-53.
- Glaeser, S. P., and P. Kämpfer, 2015, Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy: *Syst Appl Microbiol*, v. 38, p. 237-45.
- González, G., S. Mella, R. Zemelman, H. Bello, and M. Domínguez, 2004, [Integrons and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials]: *Rev Med Chil*, v. 132, p. 619-26.
- Gutiérrez, O., C. Juan, E. Cercenado, F. Navarro, E. Bouza, P. Coll, J. L. Pérez, and A. Oliver, 2007, Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, p. 4329-35.
- Guzvinec, M., R. Izdebski, I. Butic, M. Jelic, M. Abram, I. Koscak, A. Baraniak, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski, and A. Tambic Andrasevic, 2014, Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, p. 6277-83.
- Gómez-Zorrilla, S., C. Juan, G. Cabot, M. Camoez, F. Tubau, A. Oliver, M. A. Dominguez, J. Ariza, and C. Peña, 2016, Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies: *Int J Antimicrob Agents*, v. 47, p. 368-74.
- Hammond, J. H., W. P. Hebert, A. Naimie, K. Ray, R. D. Van Gelder, A. DiGiandomenico, P. Lalitha, M. Srinivasan, N. R. Acharya, T. Lietman, D. A. Hogan, and M. E. Zegans, 2016,

Bibliografia

- Environmentally Endemic *Pseudomonas aeruginosa* Strains with Mutations in *lasR* Are Associated with Increased Disease Severity in Corneal Ulcers: *mSphere*, v. 1.
- Hansson, K., L. Sundström, A. Pelletier, and P. H. Roy, 2002, *IntI2* integron integrase in *Tn7*: *J Bacteriol*, v. 184, p. 1712-21.
- Hardalo, C., and S. C. Edberg, 1997, *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water: *Crit Rev Microbiol*, v. 23, p. 47-75.
- Hardjo Lugito, N. P., C. Nawangsih, J. C. Moksidy, A. Kurniawan, and M. M. Tjiang, 2015, Diabetic Foot Gangrene Patient with Multi-drug Resistant *Pseudomonas Putida* Infection in Karawaci District, Indonesia: *J Glob Infect Dis*, v. 7, p. 37-9.
- Hauser, A. R., 2009, The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection: *Nat Rev Microbiol*, v. 7, p. 654-65.
- Hoffman, L. R., H. D. Kulasekara, J. Emerson, L. S. Houston, J. L. Burns, B. W. Ramsey, and S. I. Miller, 2009, *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression: *J Cyst Fibros*, v. 8, p. 66-70.
- Hong, J. S., J. O. Kim, H. Lee, I. K. Bae, S. H. Jeong, and K. Lee, 2015, Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Korea: *Infect Chemother*, v. 47, p. 33-40.
- Horiike, T., D. Miyata, Y. Tateno, and R. Minai, 2011, HGT-Gen: a tool for generating a phylogenetic tree with horizontal gene transfer: *Bioinformatics*, v. 7, p. 211-3.
- Huang, H., D. Jeanteur, F. Pattus, and R. E. Hancock, 1995, Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin *OprD*: *Mol Microbiol*, v. 16, p. 931-41.
- Ito, H., Y. Arakawa, S. Ohsuka, R. Wacharotayankun, N. Kato, and M. Ohta, 1995, Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, p. 824-9.
- Jansen, G., N. Mahrt, L. Tueffers, C. Barbosa, M. Harjes, G. Adolph, A. Friedrichs, A. Kreinz-Weinreich, P. Rosenstiel, and H. Schulenburg, 2016, Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of *Pseudomonas* in the cystic fibrosis lung: *Evol Med Public Health*.
- Jimenez, P. N., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool, and W. J. Quax, 2012, The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 76, p. 46-65.
- Jones-Dias, D., V. Manageiro, E. Ferreira, P. Barreiro, L. Vieira, I. B. Moura, and M. Caniça, 2016, Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables: *Front Microbiol*, v. 7, p. 1400.
- Jové, T., S. Da Re, F. Denis, D. Mazel, and M. C. Ploy, 2010, Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons: *PLoS Genet*, v. 6, p. e1000793.
- Juan, C., L. Zamorano, A. Mena, S. Albertí, J. L. Pérez, and A. Oliver, 2010, Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones: *J Antimicrob Chemother*, v. 65, p. 474-8.
- Juan Nicolau, C., and A. Oliver, 2010, [Carbapenemases in *Pseudomonas* spp]: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 28 Suppl 1, p. 19-28.

- Kaiser, S. J., N. T. Mutters, A. DeRosa, C. Ewers, U. Frank, and F. Günther, 2016, Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Kalantar-Neyestanaki, D., M. Emaneini, F. Jabalameli, M. Taherikalani, and A. Mirsalehian, 2015, ISPpu22, a novel insertion sequence in the oprD porin gene of a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a burn patient in Tehran, Iran: *Iran J Microbiol*, v. 7, p. 247-50.
- Kalra, D., A. Sati, S. Shankar, and A. Jha, 2015, Corneal infection by *Pseudomonas stutzeri* following excision of trigeminal nerve schwannoma: *BMJ Case Rep*, v. 2015.
- Kaye, K. S., and J. M. Pogue, 2015, Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: *Epidemiology and Management: Pharmacotherapy*, v. 35, p. 949-62.
- Kerckhoffs, A. P., K. Ben-Amor, M. Samsom, M. E. van der Rest, J. de Vogel, J. Knol, and L. M. Akkermans, 2011, Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome: *J Med Microbiol*, v. 60, p. 236-45.
- Khan, A. A., and C. E. Cerniglia, 1994, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR: *Appl Environ Microbiol*, v. 60, p. 3739-45.
- Kidd, T. J., K. Grimwood, K. A. Ramsay, P. B. Rainey, and S. C. Bell, 2011, Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis: *J Clin Microbiol*, v. 49, p. 263-8.
- Kidd, T. J., S. R. Ritchie, K. A. Ramsay, K. Grimwood, S. C. Bell, and P. B. Rainey, 2012, *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting: *PLoS One*, v. 7, p. e44199.
- Knoester, M., M. G. de Boer, J. J. Maarleveld, E. C. Claas, A. T. Bernards, E. de Jonge, J. T. van Dissel, and K. E. Veldkamp, 2014, An integrated approach to control a prolonged outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit: *Clin Microbiol Infect*, v. 20, p. O207-15.
- Korpi, F., F. B. Hashemi, G. Irajian, M. J. Fatemi, P. Laghaei, and B. Behrouz, 2016, Flagellin and pilin immunization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* protects mice in the burn wound sepsis model: *Immunol Lett*.
- Kosaka, T., Y. Yamada, T. Kimura, M. Kodama, Y. Fujitomo, N. Masaki, K. Toshiaki, S. Keisuke, and N. Fujita, 2016, [Susceptibility of clinically-isolated bacteria strains to respiratory quinolones and evaluation of antimicrobial agent efficacy by Monte Carlo simulation]: *Jpn J Antibiot*, v. 69, p. 27-40.
- Kulasekara, B. R., H. D. Kulasekara, M. C. Wolfgang, L. Stevens, D. W. Frank, and S. Lory, 2006, Acquisition and evolution of the exoU locus in *Pseudomonas aeruginosa*: *J Bacteriol*, v. 188, p. 4037-50.
- Kulich, S. M., T. L. Yahr, L. M. Mende-Mueller, J. T. Barbieri, and D. W. Frank, 1994, Cloning the structural gene for the 49-kDa form of exoenzyme S (exoS) from *Pseudomonas aeruginosa* strain 388: *J Biol Chem*, v. 269, p. 10431-7.
- Kwee, F., S. A. Walker, M. Elligsen, L. Palmay, A. Simor, and N. Daneman, 2015, Outcomes in Documented *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia Treated with Intermittent IV Infusion of Ceftazidime, Meropenem, or Piperacillin-Tazobactam: A Retrospective Study: *Can J Hosp Pharm*, v. 68, p. 386-94.

Bibliografia

- Lanini, S., S. D'Arezzo, V. Puro, L. Martini, F. Imperi, P. Piselli, M. Montanaro, S. Paoletti, P. Visca, and G. Ippolito, 2011, Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser: *PLoS One*, v. 6, p. e17064.
- Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G. M. Rossolini, 1999, Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, p. 1584-90.
- Lee, D., S. Das, N. L. Dawson, D. Dobrijevic, J. Ward, and C. Orengo, 2016a, Novel Computational Protocols for Functionally Classifying and Characterising Serine Beta-Lactamases: *PLoS Comput Biol*, v. 12, p. e1004926.
- Lee, J. Y., Y. K. Park, E. S. Chung, I. Y. Na, and K. S. Ko, 2016b, Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa*: *Sci Rep*, v. 6, p. 25543.
- Lee, J. Y., K. R. Peck, and K. S. Ko, 2013, Selective advantages of two major clones of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates (CC235 and CC641) from Korea: antimicrobial resistance, virulence and biofilm-forming activity: *J Med Microbiol*, v. 62, p. 1015-24.
- Lee, K., Y. Chong, H. B. Shin, Y. A. Kim, D. Yong, and J. H. Yum, 2001, Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species: *Clin Microbiol Infect*, v. 7, p. 88-91.
- Li, H., Y. F. Luo, B. J. Williams, T. S. Blackwell, and C. M. Xie, 2012, Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies: *Int J Med Microbiol*, v. 302, p. 63-8.
- Li, X. Z., P. Plésiat, and H. Nikaido, 2015, The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria: *Clin Microbiol Rev*, v. 28, p. 337-418.
- Libisch, B., J. Watine, B. Balogh, M. Gacs, M. Muzslay, G. Szabó, and M. Füzi, 2008, Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary: *Res Microbiol*, v. 159, p. 162-8.
- Lin, L., J. Kim, H. Chen, R. Kowalski, and V. Nizet, 2016, Component Analysis of Multi-Purpose Contact Lens Solutions to Enhance Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: *Antimicrob Agents Chemother*.
- Lister, P. D., D. J. Wolter, and N. D. Hanson, 2009, Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms: *Clin Microbiol Rev*, v. 22, p. 582-610.
- Liu, L., H. Chi, and L. Sun, 2015, *Pseudomonas fluorescens*: identification of Fur-regulated proteins and evaluation of their contribution to pathogenesis: *Dis Aquat Organ*, v. 115, p. 67-80.
- Liu, Y., K. Liu, X. Yu, B. Li, and B. Cao, 2014, Identification and control of a *Pseudomonas* spp (*P. fulva* and *P. putida*) bloodstream infection outbreak in a teaching hospital in Beijing, China: *Int J Infect Dis*, v. 23, p. 105-8.
- Livermore, D., 2006, The beta-lactamase threat in enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*., in N. Woodford, ed., *Trends in Microbiology*, p. 413-420.
- Livermore, D. M., 2001, Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems: *J Antimicrob Chemother*, v. 47, p. 247-50.

- Livermore, D. M., S. Mushtaq, and M. Warner, 2005, Selectivity of ertapenem for *Pseudomonas aeruginosa* mutants cross-resistant to other carbapenems: *J Antimicrob Chemother*, v. 55, p. 306-11.
- Logan, L. K., S. Gandra, S. Mandal, E. Y. Klein, J. Levinson, R. A. Weinstein, R. Laxminarayan, and U. S. C. f. D. C. a. P. Prevention Epicenters Program, 2016, Multidrug- and Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Children, United States, 1999-2012: *J Pediatric Infect Dis Soc*.
- Lund-Palau, H., A. R. Turnbull, A. Bush, E. Bardin, L. Cameron, O. Soren, N. Wierre-Gore, E. W. Alton, J. G. Bundy, G. Connett, S. N. Faust, A. Filloux, P. Freemont, A. Jones, V. Khoo, S. Morales, R. Murphy, R. Pabary, A. Simbo, S. Schelenz, Z. Takats, J. Webb, H. D. Williams, and J. C. Davies, 2016, *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches: *Expert Rev Respir Med*, v. 10, p. 685-97.
- Maatallah, M., J. Cheriaa, A. Bakhrouf, A. Iversen, H. Grundmann, T. Do, P. Lanotte, M. Mastouri, M. S. Elghmati, F. Rojo, S. Mejdji, and C. G. Giske, 2011, Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235: *PLoS One*, v. 6, p. e25617.
- Maldonado, R. F., I. Sá-Correia, and M. A. Valvano, 2016, Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection: *FEMS Microbiol Rev*.
- Marin, M. A., and A. C. Vicente, 2013, Architecture of the superintegron in *Vibrio cholerae*: identification of core and unique genes: *F1000Res*, v. 2, p. 63.
- Markou, P., and Y. Apidianakis, 2014, Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer: *Front Cell Infect Microbiol*, v. 3, p. 115.
- Martínez-Martínez, L., and J. Calvo, 2010, [The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation]: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 28 Suppl 2, p. 25-31.
- Martínez-Ramos, I., X. Mulet, B. Moyá, M. Barbier, A. Oliver, and S. Albertí, 2014, Overexpression of MexCD-OprJ reduces *Pseudomonas aeruginosa* virulence by increasing its susceptibility to complement-mediated killing: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, p. 2426-9.
- May, T. B., D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. D. DeVault, S. Roychoudhury, N. A. Zielinski, A. Berry, and R. K. Rothmel, 1991, Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients: *Clin Microbiol Rev*, v. 4, p. 191-206.
- Mayhall, C. G., 1997, Nosocomial pneumonia. Diagnosis and prevention: *Infect Dis Clin North Am*, v. 11, p. 427-57.
- Maâtallah, M., A. Bakhrouf, M. A. Habeeb, A. Turlej-Rogacka, A. Iversen, C. Pourcel, O. Sioud, and C. G. Giske, 2013, Four genotyping schemes for phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of their congruence with multi-locus sequence typing: *PLoS One*, v. 8, p. e82069.
- Meyer, J. M., V. A. Geoffroy, N. Baida, L. Gardan, D. Izard, P. Lemanceau, W. Achouak, and N. J. Palleroni, 2002, Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads: *Appl Environ Microbiol*, v. 68, p. 2745-53.
- Micek, S. T., R. G. Wunderink, M. H. Kollef, C. Chen, J. Rello, J. Chastre, M. Antonelli, T. Welte, B. Clair, H. Ostermann, E. Calbo, A. Torres, F. Menichetti, G. E. Schramm, and V. Menon,

Bibliografía

- 2015, An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance: *Crit Care*, v. 19, p. 219.
- Michalska, M., and P. Wolf, 2015, *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing: *Front Microbiol*, v. 6, p. 963.
- Mikucionyte, G., L. Zamorano, A. Vitkauskiene, C. López-Causapé, C. Juan, X. Mulet, and A. Oliver, 2016, Nosocomial dissemination of VIM-2-producing ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Lithuania: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 35, p. 195-200.
- Miller, M. B., and B. L. Bassler, 2001, Quorum sensing in bacteria: *Annu Rev Microbiol*, v. 55, p. 165-99.
- Moazami Goudarzi, S., and F. Eftekhari, 2015, Multidrug resistance and integron carriage in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran: *Turk J Med Sci*, v. 45, p. 789-93.
- Moura, A., T. Jové, M. C. Ploy, I. Henriques, and A. Correia, 2012, Diversity of gene cassette promoters in class 1 integrons from wastewater environments: *Appl Environ Microbiol*, v. 78, p. 5413-6.
- Moyo, S., B. Haldorsen, S. Aboud, B. Blomberg, S. Y. Maselle, A. Sundsfjord, N. Langeland, and Ø. Samuelsen, 2015, Identification of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania is associated with sequence types 244 and 640 and the location of blaVIM-2 in a TniC integron: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, p. 682-5.
- Mulet, X., G. Cabot, A. A. Ocampo-Sosa, M. A. Domínguez, L. Zamorano, C. Juan, F. Tubau, C. Rodríguez, B. Moyà, C. Peña, L. Martínez-Martínez, A. Oliver, and S. N. f. R. i. I. D. (REIPI), 2013, Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, p. 5527-35.
- Neves, M. T., M. E. Lorenzo, R. A. Almeida, and C. M. Fortaleza, 2010, Antimicrobial use and incidence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital: an ecological approach: *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 43, p. 629-32.
- Ocampo-Sosa, A. A., G. Cabot, C. Rodríguez, E. Roman, F. Tubau, M. D. Macia, B. Moya, L. Zamorano, C. Suárez, C. Peña, M. A. Domínguez, G. Moncalián, A. Oliver, L. Martínez-Martínez, and S. N. f. R. i. I. D. (REIPI), 2012, Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, p. 1703-13.
- Ochs, M. M., M. Bains, and R. E. Hancock, 2000, Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 1983-5.
- Odumosu, B. T., B. A. Adeniyi, and R. Chandra, 2015, Occurrence of aminoglycoside-modifying enzymes genes (aac(6')-I and ant(2'')-I) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria: *Afr Health Sci*, v. 15, p. 1277-81.
- Oliver, A., R. Cantón, P. Campo, F. Baquero, and J. Blázquez, 2000, High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection: *Science*, v. 288, p. 1251-4.
- Oliver, A., X. Mulet, C. López-Causapé, and C. Juan, 2015, The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones: *Drug Resist Updat*, v. 21-22, p. 41-59.

- Ozer, E. A., J. P. Allen, and A. R. Hauser, 2014, Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt: *BMC Genomics*, v. 15, p. 737.
- Palleroni, N. J., 1993, *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria: *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 64, p. 231-51.
- Palleroni, N. J., 2003, Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view: *Microbiology*, v. 149, p. 1-7.
- Papp-Wallace, K. M., A. Endimiani, M. A. Taracila, and R. A. Bonomo, 2011, Carbapenems: past, present, and future: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, p. 4943-60.
- Pasteran, F., T. Mendez, L. Guerriero, M. Rapoport, and A. Corso, 2009, Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae: *J Clin Microbiol*, v. 47, p. 1631-9.
- Paul, D., D. Dhar, A. P. Maurya, S. Mishra, G. D. Sharma, A. Chakravarty, and A. Bhattacharjee, 2016, Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India: *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v. 15, p. 31.
- Pellegrini, C., P. S. Mercuri, G. Celenza, M. Galleni, B. Segatore, E. Sacchetti, R. Volpe, G. Amicosante, and M. Perilli, 2009, Identification of bla(IMP-22) in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location: *J Antimicrob Chemother*, v. 63, p. 901-8.
- Petit, S. M., R. Lavenir, C. Colinet-Dupuich, A. M. Boukerb, P. Cholley, X. Bertrand, J. Freney, A. Doléans-Jordheim, S. Nazaret, F. Laurent, and B. Cournoyer, 2013, Lagooning of wastewaters favors dissemination of clinically relevant *Pseudomonas aeruginosa*: *Res Microbiol*, v. 164, p. 856-66.
- Peña, C., G. Cabot, S. Gómez-Zorrilla, L. Zamorano, A. Ocampo-Sosa, J. Murillas, B. Almirante, V. Pomar, M. Aguilar, A. Granados, E. Calbo, J. Rodríguez-Baño, F. Rodríguez-López, F. Tubau, L. Martínez-Martínez, A. Oliver, and S. N. f. R. i. I. D. (REIPI), 2015, Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: *Clin Infect Dis*, v. 60, p. 539-48.
- Peña, C., C. Suarez, M. Gozalo, J. Murillas, B. Almirante, V. Pomar, M. Aguilar, A. Granados, E. Calbo, J. Rodríguez-Baño, F. Rodríguez, F. Tubau, L. Martínez-Martínez, A. Oliver, and S. N. f. R. i. I. D. REIPI, 2012, Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, p. 1265-72.
- Pirnay, J. P., F. Bilocq, B. Pot, P. Cornelis, M. Zizi, J. Van Eldere, P. Deschaght, M. Vanechoutte, S. Jennes, T. Pitt, and D. De Vos, 2009, *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited: *PLoS One*, v. 4, p. e7740.
- Pobiega, M., J. Maciag, M. Pomorska-Wesolowska, A. Chmielarczyk, D. Romaniszyn, G. Ziolkowski, P. B. Heczko, J. Wojkowska-Mach, and M. Bulanda, 2016, Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* among children in Southern Poland: Virulence factors and antibiotic resistance: *J Pediatr Urol*, v. 12, p. 36.e1-6.
- Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordmann, 2000, Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 622-32.

Bibliografía

- Poole, K., 2005, Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 479-87.
- Poole, K., 2011, *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max: *Front Microbiol*, v. 2, p. 65.
- Prestinaci, F., P. Pezzotti, and A. Pantosti, 2015, Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon: *Pathog Glob Health*, v. 109, p. 309-18.
- Queenan, A. M., and K. Bush, 2007, Carbapenemases: the versatile beta-lactamases: *Clin Microbiol Rev*, v. 20, p. 440-58, table of contents.
- Raineri, E., L. Crema, S. Dal Zoppo, A. Acquarolo, A. Pan, G. Carnevale, F. Albertario, and A. Candiani, 2010, Rotation of antimicrobial therapy in the intensive care unit: impact on incidence of ventilator-associated pneumonia caused by antibiotic-resistant Gram-negative bacteria: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 29, p. 1015-24.
- Ramírez-Estrada, S., B. Borgatta, and J. Rello, 2016, *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management: *Infect Drug Resist*, v. 9, p. 7-18.
- Rasko, D. A., and V. Sperandio, 2010, Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease: *Nat Rev Drug Discov*, v. 9, p. 117-28.
- Ren, H., J. Wu, A. Colletta, M. E. Meyerhoff, and C. Xi, 2016, Efficient Eradication of Mature *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm via Controlled Delivery of Nitric Oxide Combined with Antimicrobial Peptide and Antibiotics: *Front Microbiol*, v. 7, p. 1260.
- Rodríguez-Martínez, J. M., L. Poirel, and P. Nordmann, 2009, Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, p. 4783-8.
- Rajo-Bezares, B., L. Cavalié, D. Dubois, E. Oswald, C. Torres, and Y. Sáenz, 2016, Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital: *J Med Microbiol*, v. 65, p. 311-9.
- Rajo-Bezares, B., V. Estepa, R. Cebollada, M. de Toro, S. Somalo, C. Seral, F. J. Castillo, C. Torres, and Y. Sáenz, 2014, Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons: *Int J Med Microbiol*, v. 304, p. 405-14.
- Rowe-Magnus, D. A., and D. Mazel, 2002, The role of integrons in antibiotic resistance gene capture: *Int J Med Microbiol*, v. 292, p. 115-25.
- Roy-Burman, A., R. H. Savel, S. Racine, B. L. Swanson, N. S. Revadigar, J. Fujimoto, T. Sawa, D. W. Frank, and J. P. Wiener-Kronish, 2001, Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections: *J Infect Dis*, v. 183, p. 1767-74.
- Ruffin, M., C. Bilodeau, É. Maillé, S. L. LaFayette, G. A. McKay, N. T. Trinh, T. Beaudoin, M. Y. Desrosiers, S. Rousseau, D. Nguyen, and E. Brochiero, 2016, Quorum-sensing inhibition abrogates the deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on airway epithelial repair: *FASEB J*.
- Ruiz-Martínez, L., L. López-Jiménez, V. d'Ostuni, E. Fusté, T. Vinuesa, and M. Viñas, 2011, A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*: *Int Microbiol*, v. 14, p. 51-8.
- Rumbaugh, K. P., J. A. Griswold, and A. N. Hamood, 2000, The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*: *Microbes Infect*, v. 2, p. 1721-31.

- Sabaté, M., and G. Prats, 2002, [Structure and function of integrins]: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 20, p. 341-5.
- Sawa, T., M. Shimizu, K. Moriyama, and J. P. Wiener-Kronish, 2014, Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review: *Crit Care*, v. 18, p. 668.
- Schaber, J. A., N. L. Carty, N. A. McDonald, E. D. Graham, R. Cheluvappa, J. A. Griswold, and A. N. Hamood, 2004, Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: *J Med Microbiol*, v. 53, p. 841-53.
- Shamaeva, S. K., U. S. Portnyagina, M. V. Edelstein, A. A. Kuzmina, S. Maloguloval, and N. A. Varfolomeeva, 2015, RESULTS OF MONITORING METALLO-BETA-LACTAMASE-PRODUCING STRAINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IN A MULTI-PROFILE HOSPITAL: *Wiad Lek*, v. 68, p. 546-8.
- Sharma, R., T. Eun Park, and S. Moy, 2016, Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Resistant Gram-negative Organisms: *Clin Ther*, v. 38, p. 431-44.
- Silby, M. W., C. Winstanley, S. A. Godfrey, S. B. Levy, and R. W. Jackson, 2011, *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable: *FEMS Microbiol Rev*, v. 35, p. 652-80.
- Skurnik, D., D. Roux, V. Cattoir, O. Danilchanka, X. Lu, D. R. Yoder-Himes, K. Han, T. Guillard, D. Jiang, C. Gaultier, F. Guerin, H. Aschard, R. Leclercq, J. J. Mekalanos, S. Lory, and G. B. Pier, 2013, Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant *oprD* mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, p. 20747-52.
- Smith, E. E., D. G. Buckley, Z. Wu, C. Saenphimmachak, L. R. Hoffman, D. A. D'Argenio, S. I. Miller, B. W. Ramsey, D. P. Speert, S. M. Moskowitz, J. L. Burns, R. Kaul, and M. V. Olson, 2006, Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 8487-92.
- Smith, R. S., and B. H. Iglewski, 2003, *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence: *Curr Opin Microbiol*, v. 6, p. 56-60.
- Snitkin, E. S., A. M. Zelazny, J. Gupta, T. N. Palmore, P. R. Murray, J. A. Segre, and N. C. S. Program, 2013, Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment: *Genome Res*, v. 23, p. 1155-62.
- Solé, M., A. Fàbrega, N. Cobos-Trigueros, L. Zamorano, M. Ferrer-Navarro, C. Ballesté-Delpierre, A. Reustle, P. Castro, J. M. Nicolás, A. Oliver, J. A. Martínez, and J. Vila, 2015, In vivo evolution of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients admitted to an intensive care unit: mechanisms of resistance and antimicrobial exposure: *J Antimicrob Chemother*, v. 70, p. 3004-13.
- Souli, M., I. Galani, and H. Giamarellou, 2008, Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe: *Euro Surveill*, v. 13.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff, 1966, The aerobic pseudomonads: a taxonomic study: *J Gen Microbiol*, v. 43, p. 159-271.
- Suel, P., P. Martin, G. Berthelot, S. Robaday, M. Etienne, and A. Chibani, 2011, [A case of *Pseudomonas mendocina* endocarditis]: *Med Mal Infect*, v. 41, p. 109-10.
- Sugawara, E., K. Nagano, and H. Nikaido, 2012, Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*: *FEBS J*, v. 279, p. 910-8.

Bibliografía

- Sun, Q., Z. Ba, G. Wu, W. Wang, S. Lin, and H. Yang, 2016, Insertion sequence ISRP10 inactivation of the oprD gene in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: *Int J Antimicrob Agents*, v. 47, p. 375-9.
- Suárez, C., and F. Gudiol, 2009, [Beta-lactam antibiotics]: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 27, p. 116-29.
- Takumida, M., and M. Anniko, 2006, Protective effect of edaravone against the ototoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: *Acta Otolaryngol*, v. 126, p. 15-9.
- Tashiro, Y., Y. Yawata, M. Toyofuku, H. Uchiyama, and N. Nomura, 2013, Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms: *Microbes Environ*, v. 28, p. 13-24.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan, 1995, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing: *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 2233-9.
- Tissot, F., D. S. Blanc, P. Basset, G. Zanetti, M. M. Berger, Y. A. Que, P. Eggimann, and L. Senn, 2016, New genotyping method discovers sustained nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care burn unit: *J Hosp Infect*, v. 94, p. 2-7.
- Torres, C., M. Moreno, and M. Zarazaga, 2010, Prudent use of antimicrobial agents: not just for humans: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 28, p. 669-71.
- Valenza, G., C. Tuschak, S. Nickel, E. Krupa, V. Lehner-Reindl, and C. Höller, 2015, Prevalence, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* as intestinal colonizer in the community: *Infect Dis (Lond)*, v. 47, p. 654-7.
- van der Plas, M. J., R. K. Bhongir, S. Kjellström, H. Siller, G. Kasetty, M. Mörgelin, and A. Schmidtchen, 2016, *Pseudomonas aeruginosa* elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses: *Nat Commun*, v. 7, p. 11567.
- Viedma, E., V. Estepa, C. Juan, J. Castillo-Vera, B. Rojo-Bezares, C. Seral, F. J. Castillo, Y. Sáenz, C. Torres, F. Chaves, and A. Oliver, 2014, Comparison of local features from two Spanish hospitals reveals common and specific traits at multiple levels of the molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, p. 2454-8.
- Viedma, E., C. Juan, J. Acosta, L. Zamorano, J. R. Otero, F. Sanz, F. Chaves, and A. Oliver, 2009, Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, p. 4930-3.
- Vila, J., and F. Marco, 2002, [Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram]: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 20, p. 304-10; quiz 311-2.
- Villegas, M. V., K. Lolans, A. Correa, J. N. Kattan, J. A. Lopez, J. P. Quinn, and C. N. R. S. Group, 2007, First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, p. 1553-5.
- von Wintersdorff, C. J., J. Penders, J. M. van Niekerk, N. D. Mills, S. Majumder, L. B. van Alphen, P. H. Savelkoul, and P. F. Wolffs, 2016, Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer: *Front Microbiol*, v. 7, p. 173.

- Vílchez, G., and G. Alonso, 2009, Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos: *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 29, p. 6-12.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann, 2005, Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?: *Clin Microbiol Rev*, v. 18, p. 306-25.
- Walsh, T. R., J. Weeks, D. M. Livermore, and M. A. Toleman, 2011, Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study: *Lancet Infect Dis*, v. 11, p. 355-62.
- Wang, J., J. Y. Zhou, T. T. Qu, P. Shen, Z. Q. Wei, Y. S. Yu, and L. J. Li, 2010, Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals: *Int J Antimicrob Agents*, v. 35, p. 486-91.
- Waters, V., J. E. Zlosnik, Y. C. Yau, D. P. Speert, S. D. Aaron, and D. S. Guttman, 2012, Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 31, p. 3341-50.
- Whitehead, N. A., A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson, and G. P. Salmond, 2001, Quorum-sensing in Gram-negative bacteria: *FEMS Microbiol Rev*, v. 25, p. 365-404.
- Wiehlmann, L., A. Munder, T. Adams, M. Juhas, H. Kolmar, P. Salunkhe, and B. Tümmler, 2007a, Functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* to identify habitat-specific determinants of pathogenicity: *Int J Med Microbiol*, v. 297, p. 615-23.
- Wiehlmann, L., G. Wagner, N. Cramer, B. Siebert, P. Gudowius, G. Morales, T. Köhler, C. van Delden, C. Weinelt, P. Slickers, and B. Tümmler, 2007b, Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, p. 8101-6.
- Wolter, D. J., N. D. Hanson, and P. D. Lister, 2004, Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance: *FEMS Microbiol Lett*, v. 236, p. 137-43.
- Wolter, D. J., P. M. Kurpiel, N. Woodford, M. F. Palepou, R. V. Goering, and N. D. Hanson, 2009, Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, p. 557-62.
- Wright, L. L., J. F. Turton, D. M. Livermore, K. L. Hopkins, and N. Woodford, 2015, Dominance of international 'high-risk clones' among metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK: *J Antimicrob Chemother*, v. 70, p. 103-10.
- Yadav, R., C. B. Landersdorfer, R. L. Nation, J. D. Boyce, and J. B. Bulitta, 2015, Novel approach to optimize synergistic carbapenem-aminoglycoside combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, p. 2286-98.
- Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh, 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: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, p. 5046-54.
- Zalacain, M., D. J. Biedenbach, R. E. Badal, K. Young, M. Motyl, and D. F. Sahm, 2016, Pathogen Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Among Enterobacteriaceae Causing Hospital-Associated Intra-abdominal Infections in Adults in the United States (2012-2013): *Clin Ther*.
- Zhanel, G. G., P. Chung, H. Adam, S. Zelenitsky, A. Denisuik, F. Schweizer, P. R. Lagacé-Wiens, E. Rubinstein, A. S. Gin, A. Walkty, D. J. Hoban, J. P. Lynch, and J. A. Karlowsky, 2014,

Bibliográfia

Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli: *Drugs*, v. 74, p. 31-51.

Zhao, C., H. Chen, H. Wang, W. Liu, C. Zhuo, Y. Chu, J. Zeng, Y. Jin, Z. Hu, R. Zhang, B. Cao, K. Liao, B. Hu, X. Xu, Y. Luo, M. Zou, D. Su, Y. Wang, B. Tian, H. Zhou, Y. Liu, P. Guo, C. Zhou, X. Chen, Z. Wang, and F. Zhang, 2015, [Analysis of pathogen spectrum and resistance of clinical common organisms causing bloodstream infections, hospital-acquired pneumonia and intra-abdominal infections from thirteen teaching hospitals in 2013]: *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, v. 95, p. 1739-46.

Anexo I

ANEXO I

Tabla 25. Características de las cepas de *P. aeruginosa* procedentes del tracto respiratorio inferior incluidas en esta tesis

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
1	M	68	Espuito	SI	UCI Quirúrgica	IMI, CIP, LEV	Meropenem, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, gentamicina, ciprofloxacino
2	M	81	Espuito	SI	E. Infecciosas	-	Moxifloxacino, anfotericina B
3	M	59	Espuito	SI	Neumología	-	Ceftazidima, ciprofloxacino
4 ^b	M	62	Espuito	SI	Cirugía	IMI, MER, TIC, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Imipenem, colistina, ciprofloxacino
5	M	86	Espuito	SI	Neumología	IMI, TIC, GEN, CIP, LEV	Imipenem, ceftriaxona
6 ^b	F	70	Aspirado traqueal	SI	Neumología	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Ertapenem, colistina
7	F	64	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	IMI, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, AMK	Trimetoprim-sulfametoxazol
8	F	65	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Ciprofloxacino, azitromicina
9	M	73	Espuito	SI	Neumología	-	Imipenem, ceftazidima, ciprofloxacino
10	M	41	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, CIP, LEV	Meropenem, piperacilina-tazobactam, cefepime, gentamicina, colistina, ciprofloxacino, vancomicina

Anexo I

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
11	F	73	Aspirado traqueal	SI	UCI Médica	-	Meropenem + Daptomicina + Metronidazol
12	M	86	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI	Imipenem
13	M	73	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	NO
14	M	56	Broncoaspirado	SI	Medicina interna	IMI, MER, TIC, GEN, CIP, LEV	Levofloxacino, ceftriaxona, azitromicina
15	M	82	Espuito	SI	Medicina interna	-	Ceftazidima, tobramicina, moxifloxacino
16	M	67	Espuito	SI	Medicina interna	ATM, CIP, LEV	Levofloxacino
17	F	84	Espuito	SI	Medicina interna	TIC	Amoxicilina-clavulánico
18	F	45	Espuito	NO	Centro Salud Ejea	-	Colistina, azitromicina
19	M	78	Espuito	NO	Centro Salud Ejea	-	Desconocido
20	F	37	Espuito	SI	Hematología	IMI	Meropenem, colistina, daptomicina
21	M	81	Espuito	NO	Centro Salud Universitas	-	NO
22	M	81	Espuito	SI	Neumología	-	Amoxicilina-clavulánico
23	M	75	Broncoaspirado	SI	Broncoscopias	TIC	NO
24	M	82	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Levofloxacino
25	M	76	Espuito	NO	Neumología	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, CIP, LEV	Meropenem

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
26	F	76	Aspirado traqueal	SI	UCI Médica	-	Levofloxacino, Amoxicilina-clavulánico, ceftriaxona
27	F	53	Aspirado traqueal	SI	Medicina interna	-	Piperacilina-tazobactam
28	M	66	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Claritromicina + Rifampicina
29	M	83	Espuito	NO	Centro de salud Delicias Norte	-	NO
30	M	47	Espuito	NO	Centro de salud Oliver	-	Colistina
31	F	81	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TPZ, FEP, GEN, CIP, LEV	Levofloxacino
32	M	78	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	GEN, CIP, LEV	Colistina
33	F	61	Espuito	NO	Centro de salud Bombarda	-	Colistina, azitromicina
34	M	34	Aspirado traqueal	SI	Neumología	-	NO
35	M	77	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	-	Ertapenem, ceftriaxona
36	M	82	Espuito	NO	Centro de salud Tarazona	-	Colistina
37	F	78	Espuito	NO	Centro de salud Delicias Norte	-	NO
38	F	66	Espuito	NO	Urgencias	-	Amoxicilina-clavulánico, cefixima

Anexo I

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
39	F	68	Espuito	NO	Centro de salud Universitas	ATM	Desconocido
40	M	83	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Azitromicina
41	M	71	Espuito	SI	Neumología	IMI, MER, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Meropenem, colistina
42	M	64	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB	Meropenem, linezolid
43	F	74	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TIC, ATM, FEP, CIP, LEV	Meropenem
44	M	79	Espuito	SI	Medicina interna	-	Cefonicid
45	M	77	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	NO
46 ^b	F	70	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Antituberculoso
47 ^b	M	62	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Meropenem
48	M	62	Espuito	NO	Centro de salud Ejea	-	Meropenem, levofloxacino
49 ^b	M	75	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB	Imipenem
50	M	72	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Amoxicilina-clavulánico
51	M	66	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB	Desconocido
52 ^b	F	76	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, ATM, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Meropenem, colistina, ciprofloxacino, ampicilina, ceftriaxona, linezolid, tigeciclina
53	M	77	Espuito	SI	Neumología	CIP, LEV	Ceftriaxona
54	M	89	Espuito	SI	Neumología	TIC, ATM	Ceftazidima, Tobramicina

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
55 ^b	M	68	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TIC, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Meropenem, linezolid
56	M	90	Espuito	NO	Centro de salud Valdefierro	-	NO
57	F	67	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Azitromicina
58	M	79	Espuito	NO	Centro salud Ejea	-	Colistina
59	M	75	Aspirado traqueal	SI	Neumología	-	Amoxicilina-clavulánico
60	M	80	Espuito	SI	Neumología	-	Meropenem, ceftazidima, tobramicina, ciprofloxacino
61 ^b	F	77	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Imipenem, vancomicina
62	F	81	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Azitromicina
63	F	34	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	-	NO
64	M	81	Espuito	NO	Centro de salud Ejea	CIP, LEV	Levofloxacino, amoxicilina-clavulánico
65 ^b	M	76	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Desconocido
66	M	73	Espuito	NO	Consultas externas Medicina Interna	-	Cefuroxima
68	M	62	Espuito	NO	Centro salud Utebo	-	Antituberculoso

Anexo I

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
69	M	40	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	GEN, TOB, AMK, CIP	Colistina, azitromicina
70	M	82	Espuito	NO	Centro salud Ejea	-	Amoxicilina-clavulánico
71	M	60	Aspirado traqueal	NO	Centro salud Ejea	TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Piperacilina-tazobactam, vancomicina
72	M	71	Broncoaspirado	SI	Broncoscopias	IMI, MER, TIC	Imipenem, ciprofloxacino
73	M	64	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Colistina
74	M	70	Broncoaspirado	SI	Broncoscopias	TZP, TIC, ATM, CAZ	NO
75	M	78	Espuito	NO	Centro de salud Bombarda	TIC	Ciprofloxacino
76	F	83	Espuito	NO	Centro de salud Bombarda	GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Amoxicilina-clavulánico, azitromicina
77	F	53	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Levofloxacino, azitromicina
78 ^b	F	59	Broncoaspirado	SI	Uci Médica	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP	Meropenem, cefatzidima, aztreonam
79	F	4	Espuito inducido	NO	Consultas externas Pediatría	-	Colistina
81 ^b	F	67	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Desconocido
82	F	46	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Colistina

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
83 ^b	F	80	Broncoaspirado	SI	UCI médica	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Ceftriaxona
84	M	79	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Azitromicina
85	F	83	Espuito	NO	Centro de salud Ejea	IMI, MER, TIC, ATM, CAZ	Levofloxacino
86 ^b	M	64	Espuito	SI	E. Infecciosas	IMI, MER, TIC, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Colistina, levofloxacino, clindamicina
87	F	58	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER TZP, TIC, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Desconocido
88	F	59	Espuito	SI	Medicina Interna	-	Amoxicilina-clavulánico, ceftriaxone, azitromicina
89	F	73	Espuito	NO	Consultas externas Medicina Interna	-	Desconocido
92	F	54	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Claritromicina
93	F	60	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	TIC	Colistina, azitromicina
94	M	50	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	TIC, ATM, CAZ, FEP	Meropenem, trimetoprim-sulfametoxazol, linezolid
95	M	90	Broncoaspirado	SI	Medicina Interna	TIC, FEP	Ertapenem, Amoxicilina-clavulánico
96	M	72	Espuito	SI	Neumología	TZP, TIC, CAZ, FEP	Levofloxacino
97	F	54	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	NO

Anexo I

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
98	F	4	Espuito inducido	NO	Consultas externas Pediatría	TZP, TIC, ATM, CAZ	Amoxicilina-clavulánico
99 ^b	M	51	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, GEN, TOB, CIP, LEV	Ceftriaxona, metronidazol, rifampicina
100	M	76	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	Colistina, azitromicina
101	M	81	Espuito	NO	Centro salud Ejea	-	Desconocido
102	M	68	Espuito	SI	Ejea	CIP, LEV	Desconocido
103	M	81	Broncoaspirado	SI	Broncoscopias	-	NO
104 ^b	M	76	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, GEN, TOB, CIP, LEV	Imipenem, meropenem, amikacina, colistina, clindamicina
105	M	33	Espuito inducido	NO	Consultas externas Pediatría	-	Colistina, azitromicina
106	M	53	Espuito	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER	Imipenem
107	M	79	Espuito	SI	Neumología	-	Levofloxacino
108	M	72	Espuito	NO	Centro salud Ejea	FEP	Desconocido
109 ^b	M	52	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, GEN, TOB, CIP, LEV	Ceftriaxona, metronidazol, rifampicina
110	M	43	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, ATM	Meropenem, piperacilina- tazobactam, colistina, amoxicilina clavulánico
111	F	49	Espuito	NO	Centro salud Ejea	-	Azitromicina

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
112	M	68	Espuito	NO	Centro salud Tarazona	CIP, LEV	NO
113	M	84	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP	Meropenem, piperacilina-tazobactam, linezolid, colistina
114	M	76	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	-	Piperacilina-tazobactam
115	M	72	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP	Ciprofloxacino, amoxicilina-clavulánico
116	F	82	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	-	Ceftriaxona
117	M	64	Espuito	SI	Medicina interna	-	NO
118	M	79	Broncoaspirado	SI	Enfermedades infecciosas	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP	Ertapenem, piperacilina-tazobactam, vancomicina
119	M	45	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, CIP, LEV	Imipenem, colistina, levofloxacino, cefotaxima, linezolid
120	F	60	Espuito	NO	Urgencias	TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK	Piperacilina-tazobactam, tobramicina, levofloxacino
121	M	76	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	TIC	Desconocido
122	M	82	Líquido pleural	SI	UCI Quirúrgica	TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP	Ceftriaxona, clindamicina
123	M	79	Espuito	SI	Neumología	IMI	Imipenem, ceftazidima
124	F	60	Espuito	NO	Centro salud Delicias Norte	TZP, TIC, ATM, CAZ	Colistina
126	M	78	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	-	NO

Anexo I

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
127 ^b	M	70	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TIC, GEN, TOB, CIP, LEV	Imipenem, meropenem, levofloxacin, linezolid
128	M	70	Espuito	SI	Neumología	-	Amoxicilina-clavulánico
129	M	73	Broncoaspirado	SI	Medicina Interna	-	Amoxicilina-clavulánico
130	M	73	Espuito	NO	Centro salud Ejea	ATM	NO
131	F	67	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	TIC, ATM, CIP, LEV	NO
132	F	86	Espuito	NO	Urgencias	CIP, LEV	Levofloxacin, ceftriaxona
133	F	73	Espuito	SI	Cardiología	-	Azitromicina
134	F	75	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	-	NO
135	M	77	Espuito	SI	Enfermedades infecciosas	-	NO
136	M	85	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	-	Aztreonam, gentamicina, tigeciclina, metronidazol
137	M	87	Espuito	SI	Neumología	ATM	Levofloxacin, amoxicilina-clavulánico, azitromicina
138	F	79	Espuito	NO	Urgencias	-	Meropenem, amikacina, colistina, levofloxacin
139	M	67	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	TIC, GEN, CIP, LEV	Amoxicilina-clavulánico
140	F	67	Espuito	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, CIP, LEV	Meropenem, tobramicina
141	F	75	Espuito	NO	Consultas externas Neumología	CIP, LEV	Colistina, azitromicina

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
142	M	77	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	-	NO
143	F	79	Espuito	NO	Centro salud Delicias	IMI, GEN, CIP, LEV	Moxifloxacino
144	F	89	Espuito	SI	Medicina Interna	CIP, LEV	Amoxicilina clavulánico
145	M	48	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP	Piperacilina-tazobactam, linezolid
146	M	51	Espuito	SI	Oncología	-	Ciprofloxacino
147 ^b	M	69	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Ertapenem, meropenem
148	F	36	Espuito	SI	Neumología	TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP	NO
149	M	77	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	TIC, ATM, CAZ	Amoxicilina-clavulánico
150 ^b	M	57	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TIC, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Meropenem
151	F	78	Espuito	NO	Centro salud Universitas	-	Cefixima
152	M	91	Espuito	NO	Centro salud Borja	CIP, LEV	Azitromicina
153	M	76	Espuito	SI	Neumología	ATM	Amoxicilina
154	M	83	Espuito	SI	Traumatología	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP	Meropenem, daptomicina, linezolid, rifampicina
155	M	62	Aspirado traqueal	SI	Enfermedades Infecciosas	IMI, EMR, TIC, ATM	Meropenem, colistina
156	M	54	Broncoaspirado	SI	Broncoscopias	-	NO
157	F	82	Espuito	SI	Medicina Interna	TZP	Cefuroxima
158 ^b	M	67	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Desconocido

Anexo I

Nº cepa (Ps)	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Ingreso	Servicio	Fenotipo de resistencia	Tratamiento previo ^a
159	M	94	Espuito	NO	Centro salud Ejea	TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP	Desconocido
160 ^b	M	67	Broncoaspirado	SI	UCI Médica	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	Desconocido
161	M	84	Espuito	SI	Neumología	-	Amoxicilina-clavulánico
162	M	84	Espuito	SI	Medicina Interna	TIC	Amoxicilina-clavulánico
163	M	89	Espuito	SI	Medicina interna	TIC, GEN, CIP, LEV	Levofloxacino
164	M	63	Espuito	NO	Consultas externas medicina interna	ATM, GEN	Desconocido
165	F	82	Espuito	NO	Centro salud Pedrola	TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, CIP, LEV	Azitromicina
166	M	82	Espuito	NO	Centro salud Tarazona	-	Moxifloxacino, amoxicilina-clavulánico
167	F	78	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, GEN, CIP, LEV	Imipenem
168 ^b	M	32	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	Meropenem, levofloxacino, amoxicilina, linezolid, azitromicina
169	F	52	Broncoaspirado	SI	UCI Quirúrgica	-	Levofloxacino, bencilpenicilina, ceftriaxona

Abreviaturas: IMI = imipenem; MER = meropenem; TZP = piperacilina-tazobactam; TIC = ticarcilina; ATM = aztreonam; CAZ = ceftazidime; FEP = cefepime; GEN = gentamicina; TOB = tobramicina; AMK = amikacina; CIP = ciprofloxacino; LEV = levofloxacino.

^aTratamiento recibido en los 30 días previos al aislamiento de *P. aeruginosa*.

^bAislados con fenotipo MBL positivo.

Tabla 26. Alteraciones en la proteína OprD detectadas en cepas con fenotipo MBL negativo de los aislados de *P. aeruginosa* del tracto respiratorio inferior

	Patrón OprD (Nº aislamientos)	Nº de cepa	CIM		Tamaño (nº aa)	Mutaciones ^a
			IMI	MER		
No productoras de MBL (n=141)	a (1)	Ps155	>8	>8	55	D43N, K56STOP
	b (1)	Ps145	>8	8	>443	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, inserción de 1 pb (nt 775)
	c (2)	Ps1	8	4	>443	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q Q301E, R310G, V359L, loop L7-corto, inserción de 1 bp (nt 1206)
		Ps143	>8	2		
	A (54)	(54 cepas) ^b	≤4 ^b	≤4 ^b	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310E, V359L, Loop L7-corto
	d (1)	Ps7	>8	2	295	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296STOP
	e (1)	Ps118	>8	>8	>443	D43N, S57E, S59R, inserción de 5 pb (nt 490)
	f (3)	Ps41, Ps45, Ps85	>8	>8	141	D43N, S57E, S59R, Q142STOP
	g (3)	Ps19, Ps35, Ps76	2	≤1	443	D43N, T103S, K115T, F170L
	h (1)	Ps140	>8	>8	16	Delección de 7 pb (nt 50)
	i (1)	Ps167	>8	2	-	Secuencia de inserción-1
	j (1)	Ps113	>8	>8	-	Secuencia de inserción-2
	k (1)	Ps154	>8	8	-	Secuencia de inserción-3

Anexo I

	Patrón OprD (Nº aislamientos)	Nº de cepa	CIM		Tamaño (nº aa)	Mutaciones ^a
			IMI	MER		
	l (1)	Ps51	>8	>8	443	L11P
	m (1)	Ps72	>8	>8	285	S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, deleción de 1pb (nt 855)
	n (13)	(13 cepas) ^c	≤4 ^c	≤4 ^c	441	S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, E301Q, R310E, A315G, L347M, S403A, Q424E, Loop L-7 corto
	o (1)	Ps5	8	4	126	T103S, K115T, A126P, V127STOP
	p (2)	Ps43	>8	8	134	T103S, K115T, deleción de 2 pb (nt405)
		Ps110	8	>8		
	q (5)	Ps3, Ps38, Ps50, Ps69	≤1	≤1	443	T103S, K115T, F170L
		Ps142	2	≤1		
	F (28)	(28 cepas) ^d	≤4 ^d	≤4 ^d	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A
	r (2)	Ps71	8	8	>443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, inserción de 1 pb (nt 1206)
		Ps87	>8	>8		
	G (1)	Ps12	>8	4	423	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, Q424STOP
	s (1)	Ps123	>8	4	157	V127L, deleción de 11 pb (nt 472)

	Patrón OprD (Nº aislamientos)	Nº de cepa	CIM		Tamaño (nº aa)	Mutaciones ^a
			IMI	MER		
t (6)		Ps16, Ps48, Ps107, Ps166	≤1	≤1	441	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, E301Q, R310E, G312R, A315G, L347M, S403A, Q424E, Loop L-7 corto
		Ps93	4	≤1		
		Ps157	2	≤1		
u (1)		Ps42	>8	8	72	Y73STOP
v (8)		(8 cepas) ^e	≤ 2	≤ 1	443	No se detectan mutaciones
w (1)		Ps106	>8	8	-	PCR negativa

^aAbreviaturas: nt=nucleótido; pb= pares de bases; L-7 corto= 372-VDSSSSYAGL-383; STOP= codón de parada

^bLas 54 cepas son (Ps): 13, 15, 20, 22, 23, 24, 27, 29, 30, 33, 34, 39, 40, 54, 58, 64, 66, 68, 74, 77, 79, 82, 84, 88, 89, 94, 95, 96, 97, 98, 105, 108, 111, 115, 116, 120, 122, 124, 128, 129, 130, 131, 132, 134, 141, 149, 151, 152, 153, 156, 159, 161, 162 y 164. Todas ellas fueron sensibles a carbapenems con CIM ≤1 ó 2, excepto Ps20 (imi >8 mer 4)

^cLas 13 cepas son (Ps): 9, 28, 36, 44, 59, 60, 62, 70, 100, 114, 121, 135 y 148

^dLas 28 cepas son (Ps): 2, 8, 10, 14, 18, 21, 25, 26, 31, 32, 37, 53, 56, 57, 73, 75, 92, 101, 102, 112, 126, 133, 136, 139, 144, 163, 165 y 169. Todas ellas sensibles a carbapenems excepto Ps10, Ps14, Ps25 y Ps31 (imi>8 mer >8)

Tabla 27. Alteraciones en la proteína OprD detectadas en cepas con fenotipo MBL de los aislados de *P. aeruginosa* del tracto respiratorio inferior

	Patrón OprD (nº aislamientos)	Nº de cepa	CIM		Tamaño (nº aa)	Mutaciones ^a
			IMI	MER		
Productoras de MBL (n=23)	H (4)	Ps49, Ps99, Ps109, Ps150	>8	>8	>443	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, loop L-7 short inserción de 2 pb (nt 1160)
	B (1)	Ps160	>8	>8	73	Delección de 1 pb en el codón 74 (nt 222)
	C (1)	Ps65	>8	>8	-	Secuencia de inserción-4
	D (10)	Ps52, Ps55, Ps61, Ps78, Ps83, Ps86, Ps104, Ps127, Ps158, Ps168	>8	>8	0	Sin codón de inicio (M1T)
	E (5)	Ps4, Ps47, Ps81, Ps119, Ps147	>8	>8	66	Q67STOP
	F (1)	Ps46	>8	>8	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A
	G (1)	Ps6	>8	>8	423	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, Q424STOP

^aAbreviaturas: nt=nucleótido; pb= pares de bases; L-7 corto= 372-VDSSSYAGL-383; STOP= codón de parada

Tabla 28. Características de los aislados de *P.aeruginosa* procedentes del tracto respiratorio inferior: relación del fenotipo de resistencia con el patrón de la proteína OprD, estructura de integrones, PFGE y MLST

Nº cepa (Ps)	Fenotipo de resistencia ^a	MBL	Patrón OprD	Estructura genética de los integrones de clase 1		PFGE	MLST
				Promotor	Región variable		
4	IMI, MER, TIC, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	E	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P7	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
5	IMI, TIC, GEN, CIP, LEV	-	o	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P24	ST235
6	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	+	G	PcH2	<i>aacA4+ bla_{VIM-2}</i>	P8	ST235
8	-	-	F	PcH1	<i>aadA6-orfD</i>	P14	ST253
10	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, CIP, LEV	-	F	PcH1	<i>aadA6-orfD</i>	P25	ST235
14	IMI, MER, TIC, GEN, CIP, LEV	-	F	PcH1	<i>aadA6-orfD</i>	P12a	ST235
25	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, CIP, LEV	-	F	PcH1	<i>aadA6-orfD</i>	P15	ST235
31	IMI, MER, TPZ, FEP, GEN, CIP, LEV	-	F	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P16	ST235
				PcH1	<i>aadA6-orfD</i>		
41	IMI, MER, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	-	f	PcH1	<i>aadB</i>	P17a	-
42	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB	-	u	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P12b	ST235
				PcH1	<i>aadA6-orfD</i>		

Anexo I

Nº cepa (Ps)	Fenotipo de resistencia ^a	MBL	Patrón OprD	Estructura genética de los integrones de clase 1		PFGE	MLST
				Promotor	Región variable		
45	IMI, MER TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	-	f	PcH1	<i>aadB</i>	P17b	ST175
46	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	+	F	PcH2	<i>aacA4+ bla_{VIM-2}</i>	P5c	ST235
47	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	E	PcH2	<i>aac(3)-I + ISPa34 + aadA1</i>	P10	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
49	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB	+	H	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	P9b	ST973
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
52	IMI, MER, TIC, ATM, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P2	-
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
55	IMI, MER, TIC, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P4	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
61	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P6a	-
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
65	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	+	C	PcH2	<i>aacA4+ bla_{VIM-2}</i>	P5b	ST235

Nº cepa (Ps)	Fenotipo de resistencia ^a	MBL	Patrón OprD	Estructura genética de los integrones de clase 1		PFGE	MLST
				Promotor	Región variable		
78	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P6a	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
81	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	E	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P11	-
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
83	IMI, MER, TZP, TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P11	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
85	IMI, MER, TIC, ATM, CAZ	-	f	PcH1	<i>aadB</i>	P17a	ST175
86	IMI, MER, TIC, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P6b	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
87	IMI, MER TZP, TIC, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	-	r	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P13	ST235
				PcH1	<i>aadA6-orfD</i>		
99	IMI, MER, TIC, GEN, TOB, CIP, LEV	+	H	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	P9a	ST973
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
101	-	-	F	PcH1	<i>aadA6-orfD</i>	P23	ST253

Anexo I

Nº cepa (Ps)	Fenotipo de resistencia ^a	MBL	Patrón OprD	Estructura genética de los integrones de clase 1		PFGE	MLST
				Promotor	Región variable		
104	IMI, MER, TIC, GEN, TOB, CIP, LEV	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P2	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
109	IMI, MER, TIC, GEN, TOB, CIP, LEV	+	H	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	P9a	-
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
119	IMI, MER, TZP, TIC , ATM, CAZ, FEP, CIP, LEV	+	E	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	P1a	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
127	IMI, MER, TIC, GEN, TOB, CIP, LEV	+	D	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	P3	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
139	TIC, GEN, CIP, LEV	-	F	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P19	ST235
147	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	E	PcH2	<i>aac(3)-I + ISPa34 + aadA1</i>	P1b	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
150	IMI, MER, TIC, FEP, GEN ,TOB, CIP, LEV	+	H	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	P9b	-
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		
158	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P2	-
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		

Nº cepa (Ps)	Fenotipo de resistencia ^a	MBL	Patrón OprD	Estructura genética de los integrones de clase 1		PFGE	MLST
				Promotor	Región variable		
160	IMI, MER, TZP, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP, LEV	+	B	PcH2	<i>aacA4+ bla_{VIM-2}</i>	P4	-
163	TIC, GEN, CIP, LEV	-	F	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P20	ST235
				PcH1	<i>aadA6-orfD</i>		
165	TIC, ATM, CAZ, FEP, GEN, CIP, LEV	-	F	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P18	ST235
				PcH1	<i>aadA6-orfD</i>		
167	IMI, GEN, CIP, LEV	-	i	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P21	ST235
168	IMI, MER, TIC, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP, LEV	+	D	PcH2	<i>aac(3)-I + aadA1</i>	P5a	ST235
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>		
				PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aacA4 + aadA1+ ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>		

^a**Abreviaturas** IMI: imipenem, MEM: meropenem, TZP: piperacilina-tazobactam, CAZ: ceftazidima, TIC: ticarcilina, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, AMK: amikacina, CIP: ciprofloxacino, LEV: levofloxacino

