

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Detección de genes que codifican la resistencia a carbapenemes  
(tipo Serin- $\beta$ -lactamasas) en *Pseudomonas aeruginosa***

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en  
Ciencias Biológicas**

**SOFÍA CRISTINA AYALA SÁNCHEZ**

**QUITO, 2011**

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Sofía Cristina Ayala Sánchez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer Negrete

Directora de la Disertación

Quito, 22 de septiembre de 2011

A mis Padres y hermana

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Madre, por su sacrificio, amor y constante apoyo durante toda mi vida.

A mi Padre por estar en mi corazón siempre dándome fuerzas y todas las bendiciones que necesité.

A mi hermana por ser mi apoyo siempre, y la motivación en cada paso que doy.

A mis Abuelos y familia por acompañarme y ayudarme a ser la persona que soy ahora.

A la Dra. Iliana Alcocer por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por apoyarme en este largo proceso, siendo más que una maestra, una amiga.

A la Mtr. Mercedes Rodríguez por su apoyo y preocupación. A la Dra. Jeannete Zurita por la colaboración brindada a todo el equipo del Laboratorio de Microbiología.

Agradezco a mis todos compañeros de laboratorio, en especial a María Fernanda, Pedro e Irina, por su ayuda incondicional y por convertirse en mis amigos.

A Sebastián por darme el impulso que en ciertos momentos necesité.

## TABLA DE CONTENIDOS

1	RESUMEN.....	1
2	ABSTRACT .....	2
3	INTRODUCCIÓN.....	3
	3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	3
	3.2 Carbapenemes.....	5
	3.3 $\beta$ -Lactamasas.....	7
	3.3.1 $\beta$ -Lactamasas Clase A .....	8
	3.3.2 $\beta$ -Lactamasas Clase B .....	11
	3.3.3 $\beta$ -Lactamasas Clase C .....	12
	3.3.4 $\beta$ -Lactamasas Clase D .....	13
	3.4 Integrones y su papel en la resistencia antimicrobiana .....	14
	3.4.1 Clasificación .....	15
	3.4.2 Estructura del Integrón de Clase 1 .....	15
	3.4.3 Gen Cassette .....	16
	3.4.4 Expresión de Genes Cassette.....	17
	3.4.5 Diseminación.....	17
	3.5 Importancia de la Biología Molecular en Microbiología .....	18
	3.6 Objetivos .....	20

4	METODOLOGÍA.....	21
	4.1 Población de Estudio.....	21
	4.2 Extracción de ADN.....	22
	4.2.1 Calidad de ADN.....	23
	4.2.2 Visualización y análisis de electroforesis .....	24
	4.3 Detección de genes codificantes para tipo Serin $\beta$ -Lactamasas .....	24
	4.4 Determinación de la localización del gen codificante para tipo Serin $\beta$ -Lactamasas <i>bla</i> <sub>GES</sub> en Integrones Clase 1 .....	27
	4.4.1 Amplificación de <i>IntI</i> .....	27
	4.4.2 Amplificación de región variable de Integrón de Clase 1.....	28
	4.4.3 Localización de <i>bla</i> <sub>GES</sub> dentro del Integrón de Clase 1.....	28
	4.5 Análisis Estadístico .....	29
5	RESULTADOS .....	30
	5.1 Extracción de ADN.....	30
	5.2 Detección de genes codificantes para tipo Serin $\beta$ -Lactamasas .....	30
	5.3 Determinación de la localización del gen codificante para tipo Serin $\beta$ -lactamasas <i>bla</i> <sub>GES</sub> en Integrones Clase 1 .....	31
	5.3.1 Amplificación de <i>IntI</i> .....	31
	5.3.2 Digestión con endonucleasa SphI .....	31

	5.3.3 Amplificación de región variable del Integrón de Clase 1 .....	32
	5.3.4 Localización del gen <i>bla</i> <sub>GES</sub> dentro del Integrón de Clase 1 .....	32
6	DISCUSIÓN.....	33
7	CONCLUSIONES.....	40
8	LITERATURA CITADA .....	42
9	FIGURAS.....	55
10	TABLAS.....	64
11	ANEXOS.....	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gel representativo de ADN extraído a partir de aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	56
Figura 2	Gel representativo de la identificación de <i>bla</i> <sub>GES</sub> en aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	57
Figura 3	Gel representativo de la detección del gen <i>bla</i> <sub>KPC</sub> en aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	58
Figura 4	Frecuencia en la presencia de genes codificantes para Serin- $\beta$ -lactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	59
Figura 5	Gel representativo de la amplificación del gen <i>Int1</i> , codificante para integrasa.....	60
Figura 6	Gel representativo de la digestión de <i>Int1</i> con la endonucleasa SphI en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61
Figura 7	Gel representativo de la amplificación de la región variable del integrón de clase 1 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	62
Figura 8	Gel representativo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para la localización del gen <i>bla</i> <sub>GES</sub> dentro de la región variable del integrón clase 1 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos de origen de los aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> analizados en el presente estudio .....	65
Tabla 2. Iniciadores utilizados para la detección de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrón de clase 1 .....	71
Tabla 3. Presencia-ausencia de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrones clase 1 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	72

## 1 RESUMEN

En las últimas décadas, el apareamiento de nuevos elementos de resistencia en las poblaciones bacterianas ha dado lugar a una serie de problemas en la salud pública. En el ambiente hospitalario, *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos más importantes, causante de un sin número de infecciones. La patogenicidad de *P. aeruginosa* se intensifica debido a su resistencia intrínseca y/o adquirida a varios agentes antimicrobianos, incluyendo los carbapenemes. El objetivo del presente estudio fue identificar los genes codificantes para carbapenemasas tipo Serin en aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Mediante pruebas moleculares se detectó los genes *bla<sub>GES</sub>* y *bla<sub>KPC</sub>*, codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas en *P. aeruginosa*. Este estudio constituye el cuarto reporte de los genes *bla<sub>GES</sub>* y tercer reporte y de los genes *bla<sub>KPC</sub>* en *P. aeruginosa* en América Latina. Previamente, el gen *bla<sub>GES</sub>* ha sido reportado en Brasil y Argentina; mientras que, el gen *bla<sub>KPC</sub>* has sido reportado en Colombia y Puerto Rico. De los 129 aislados clínicos estudiados 44 aislados (34,11%) presentaron genes que codifican para Serin- $\beta$ -lactamasas. Treinta y siete aislados (28,68%) presentaron el gen *bla<sub>GES</sub>* y 7 aislados presentaron el gen *bla<sub>KPC</sub>* (5,43%). De los aislados portadores del gen *bla<sub>GES</sub>*, 24 aislados (64,86%) presentaron este gen dentro de la región variable de integrones de clase 1, mientras que, 13 aislados (35,14%) presentaron este gen fuera la región variable de integrones de clase 1. El estudio de los elementos genéticos de resistencia antimicrobiana, facilitará el diagnóstico de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y optimizará las estrategias de tratamiento de las mismas, disminuyendo así, el apareamiento de nuevas resistencias a los antimicrobianos.

Palabras clave: carbapenemes, genes de resistencia, integrones, *Pseudomonas aeruginosa*, Serin- $\beta$ -lactamasas.

## 2 ABSTRACT

In recent decades, the emergence of new elements of resistance in bacterial populations has developed a number of problems in public health. In the hospital setting, *Pseudomonas aeruginosa*, is one of the most important pathogens, causing many of infections. The pathogenicity of *P.aeruginosa* is enhanced due to its intrinsic or acquired resistance to several antimicrobial agents, including carbapenems. The aim of this study was to identify genes coding for Serin  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *P. aeruginosa*. A molecular analysis was made to detect the *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> genes, which encode for Serin  $\beta$ -lactamase. This study is the fourth report of the gene *bla*<sub>GES</sub> and the third report of *bla*<sub>KPC</sub> in *P. aeruginosa* in Latin America. Previously, the gene *bla*<sub>GES</sub> has been reported in Brazil and Argentina, while the gene *bla*<sub>KPC</sub> has been reported in Colombia and Puerto Rico. Of the 129 clinical isolates studied, 34.11% had genes that encode Serin  $\beta$ -lactamases; of that percentage, 28,68% had the *bla*<sub>GES</sub> gene and 5,43% of the isolates presented the *bla*<sub>KPC</sub> gene. From the isolates that carry the gene *bla*<sub>GES</sub>, 24 isolates (64.86%) showed this gene within the variable region of class 1 integrons, while 13 isolates (35.14%) had this gene outside the variable region of integrons class 1. The study of the genetic elements responsible for the antimicrobial resistance would facilitate the diagnosis of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and optimize treatment strategies for them, thus reducing the appearance of new antimicrobial resistance.

Key words: carbapenems, integrons, *Pseudomonas aeruginosa*, resistance genes, Serin  $\beta$ -lactamases.

## 3 INTRODUCCIÓN

### 3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un importante patógeno oportunista. Se encuentra ampliamente distribuida, y en la actualidad es responsable de un gran número de infecciones, principalmente en ambientes hospitalarios (Cantón *et al.*, 2002). Su amplia distribución se debe a que esta bacteria requiere de una mínima concentración de nutrientes para alcanzar un crecimiento óptimo, por lo que cualquier ambiente húmedo representa un ecosistema propicio para su colonización (Waterer y Wunderink, 2003).

*P. aeruginosa* pertenece a la familia Pseudomonadaceae, es un bacilo Gram negativo aerobio, no fermentador. Su movilidad se debe a la presencia de flagelos monótricos polares (Brito *et al.*, 2000). Es oxidasa y catalasa positiva. Además es capaz de producir pigmentos fluorescentes, como la pioverdina, no fluorescentes como la piocianina, la cual proporciona una coloración azul verdosa y la piorubina que da una coloración rojiza. Crece en suelos y en ambientes acuáticos cuyo rango de temperatura se encuentre entre 4 a 42 °C, con un pH entre 4 a 8 (Van Delden y Igkewski, 1998).

Esta bacteria no se encuentra en la flora normal del cuerpo humano, sin embargo, resulta difícil no ingerirla debido a que se encuentra en agua corriente y empozada, en cocinas, baños, incluso podemos encontrarla en desinfectantes y

detergentes (Madigan *et al.*, 2003). Se necesita de un inóculo mayor o igual a  $10^5$  UFC/ml, para que la bacteria llegue a desarrollar una infección en personas sanas (Echeverría-Zárate *et al.*, 2006); no obstante, cuando no hay una buena higiene las personas sanas podrían convertirse en un medio de transporte para la bacteria (Hatchette *et al.*, 2000).

La tasa de colonización de *Pseudomonas aeruginosa* es mucho más alta en individuos inmunocomprometidos. El portal de entrada de la misma difiere según el paciente y el tratamiento al que está siendo sometido (Wiehlmann *et al.*, 2007). Las infecciones de *Pseudomonas aeruginosa* generalmente se presentan en pacientes que han sufrido quemaduras severas, en aquellos que tienen el epitelio pulmonar comprometido por fibrosis quística o en individuos que han sufrido laceraciones mecánicas por la colocación de catéteres y tubos endotraqueales (Poole, 2001). Dependiendo del sitio de entrada o del paciente, la infección de *P. aeruginosa* puede causar: septicemia, meningitis, otitis, osteomielitis, infecciones urogenitales y neumonía (Nataro *et al.*, 2000).

En medicina generalmente se opta por un tratamiento empírico combinado con al menos dos antimicrobianos contra las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Los antibióticos utilizados pueden ser penicilinas con actividad antipseudomonadal (Piperaciclina, Ticarciclina); penicilinas junto con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (Ticarciclina y Ácido clavulánico, Piperaciclina y Tazobactam), cefalosporinas de tercera generación (Ceftacidima); cefalosporinas de cuarta generación (Cefepima); monobactámicos (Aztreonam); carbapenemes (Imipenem y Meropenem); fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) y aminoglucósidos

(Gentamicina, Tobramicina, Amikacina) (Sun *et al.*, 2010). Los aminoglucósidos son usados frecuentemente en combinación con otro antimicrobiano, raramente se los utiliza en monoterapia excepto contra infecciones al tracto urinario (Poole, 2005). Sin embargo, las estrategias para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* son controversiales, existen discrepancias en el uso de una terapia combinada y la monoterapia. Estas diferencias se deben principalmente a que al aumentar el número de agentes antimicrobianos se amplía el espectro de actividad antimicrobiana pero se corre el riesgo de desarrollar resistencias (Sun *et al.*, 2010).

No obstante, el tratamiento con antimicrobianos de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* muchas veces tiene dificultades debido a que esta bacteria posee varios mecanismos de resistencia intrínsecos, tales como el cambio en la permeabilidad de la membrana externa por disminución del número de porinas, expulsión del antibiótico por la presencia de bombas de eflujo, la modificación del sitio blanco o diana del antibiótico y la producción de  $\beta$ -lactamasas (Lister *et al.*, 2009).

### **3.2 CARBAPENEMES**

Los carbapenemes son los antimicrobianos más usados en el caso de infecciones severas causadas por *P. aeruginosa*, estos antibióticos pertenecen a la familia de las penicilinas cuyo mecanismo de acción sobre el microorganismo se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular del mismo, ya que posee una alta afinidad por la proteína PBP (proteína de unión a la penicilina) la cual

participa en la síntesis de enlaces peptídicos de la pared celular (Zhanet *et al.*, 2007).

Los carbapenemes son antibióticos  $\beta$ -lactámicos bicíclicos que derivan de la Tienamicina, la cual es un producto natural encontrado en el hongo *Streptomyces catleya*, y es uno de los antibióticos naturales más potentes encontrados hasta la actualidad. Dichos antimicrobianos difieren de las penicilinas por la sustitución de un átomo de carbono por un átomo de sulfuro y la adición de un doble enlace al núcleo pentacíclico de la penicilina (Samaniego, 2005).

Estos antimicrobianos poseen un amplio espectro, es decir, son capaces de actuar sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se ha confirmado su actividad contra varias bacterias de gran importancia clínica, tales como: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y *Bacteroides fragilis* (Arcángelo y Peterson, 2006). Sin embargo, el uso excesivo de estos antimicrobianos puede inducir a la aparición de resistencias; actualmente existen bacterias Gram negativas y algunas enterobacterias resistentes a carbapenemes (Kitchel *et al.*, 2010).

En nuestro medio, generalmente se comercializan tres carbapenemes, Imipenem, Meropenem y Ertapenem. Debido a su amplio espectro, el uso de

carbapenémicos está restringido para infecciones leves, son recetados en caso de infecciones severas que pongan en peligro la vida del paciente tales como bacteremias, neumonías, infecciones urinarias complicadas, neutropenia febril, infecciones intra-abdominales, osteomielitis, meningitis e infecciones graves de piel y tejidos blandos (Mendoza, 2008).

La resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* es un evento muy frecuente y constante, el cual generalmente se debe a la combinación de dos mecanismos de resistencia. La combinación más importante descrita hasta el momento es la producción de enzimas que desactivan al antimicrobiano llamadas  $\beta$ -lactamasas junto a la disminución de la permeabilidad de la membrana externa por pérdida de porinas (Weldhagen *et al.*, 2003). El aumento en los mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* dificulta la selección de un tratamiento adecuado para las infecciones causadas por este patógeno.

### 3.3 $\beta$ -LACTAMASAS

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas bacterianas que hidrolizan a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos: penicilinas (carbapenémicos) y cefalosporinas. Estas enzimas destruyen el anillo  $\beta$ -lactámico característico del antibiótico, dejándolo inactivo (Marín y Gudiol, 2003). La clasificación de las  $\beta$ -lactamasas según Ambler (1980) las divide en clases llamadas A, B, C y D basada en la secuencia aminoacídica de estas enzimas.

Las  $\beta$ -lactamasas clase A, C y D necesitan de un residuo de serina para la inactivación del antibiótico  $\beta$ -lactámico, mientras que las  $\beta$ -lactamasas de la Clase B requieren del Zinc como cofactor para poder realizar su actividad catalítica (Walther-Rasmussen y Høiby, 2007).

### 3.3.1 $\beta$ -LACTAMASAS CLASE A

Dentro de las  $\beta$ -lactamasas clase A, también llamadas  $\beta$ -lactamasas del tipo Serin, se pueden identificar cinco miembros GES, KPC, SME, IMI y NMC-A. Las enzimas SME, IMI y NMC son codificadas por el cromosoma bacteriano mientras que las enzimas GES y KPC son codificadas por genes encontrados en elementos móviles como plásmidos (Queenan y Bush, 2007).

Las  $\beta$ -lactamasas tipo SME (“*Serratia marcescens* enzyme”) fueron descritas por primera vez en Inglaterra en 1982 a partir de dos aislados de *Serratia marcescens* y hasta la actualidad se han descubierto dos nuevas variantes SME-2 y SME-3, provenientes de aislados de *S. marcescens* en Estados Unidos (Queenan *et al.*, 2006).

Las enzimas IMI (“imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase”) y NMC-A (“not metalloenzyme carbapenemase”) son muy similares en cuanto a su composición aminoacídica. La carbapenemasa IMI fue descrita en 1984 en Estados Unidos a partir de una cepa de *Enterobacter cloacae*, en el año 2001 se encontró una nueva variante en China. Por otro lado, la enzima NMC-A fue aislada a partir de *Enterobacter cloacae* en 1990 en Francia y hasta el año 2003 ya se había

registrado su presencia en Argentina y Estados Unidos (Queenan y Bush, 2007). Muchas veces se agrupa a estas dos enzimas en un mismo miembro de las  $\beta$ -lactamasas clase A, debido a su alta similitud estructural, llamándolas IMI/NMC-A.

Actualmente, se han descrito dos  $\beta$ -lactamasas del tipo Serin para *Pseudomonas aeruginosa* las cuales son KPC y GES (Walther-Rasmussen y Høiby, 2007).

La enzima KPC (“*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase”) fue descrita por primera vez en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* en el año 2001 en Carolina del Norte, Estados Unidos (Yigit *et al.*, 2001). Hasta el momento se han registrado seis variantes de KPC, la mayoría de registros han ocurrido en Estados Unidos e Israel, sin embargo, se ha reportado la presencia de la enzima en Reino Unido, Francia, China, Centro y Sudamérica (Woodford, *et al.*, 2008). En Ecuador, en el año 2010 se realizó el primer reporte de la presencia de KPC en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* por el Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Íñiguez *et al.*, 2010). A pesar de que el gen  $bla_{KPC}$  fue registrado por primera vez en *K. pneumoniae*, éste se ha diseminado rápidamente a otras especies de Enterobacterias tales como *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, entre otras (Li *et al.*, 2011; Petrella *et al.*, 2008); asimismo, en el año 2007, en Medellín, Colombia, se reportó por primera vez la presencia del gen  $bla_{KPC}$  en un aislado de *Pseudomonas aeruginosa* (Villegas *et al.*, 2007).

La serin- $\beta$ -lactamasa KPC posee una baja identidad en su estructura aminoacídica con otras carbapenemasas clase A como SME (45%), NMC-A (44%) e IMI (43%). Tiene actividad no sólo contra antibióticos carbapenémicos sino también hidroliza penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación (Nordmann y Poirel, 2002). El gen *bla*<sub>KPC</sub> y todas las variantes codificantes para KPC carbapenemasas excepto el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> de *Pseudomonas aeruginosa*, se encuentra en plásmidos conjugativos; asimismo, el gen *bla*<sub>KPC</sub> se encuentra asociado a elementos móviles como transposones (Hindiyeh *et al.*, 2008). El hecho que este gen se encuentre en asociación con elementos genéticos, dentro de plásmidos conjugativos, le provee a la enzima KPC una capacidad de rápida diseminación y transmisión entre bacterias.

Una segunda  $\beta$ -lactamasa tipo serin que ha sido descrita para *Pseudomonas aeruginosa* es GES (“Guiana Extended Spectrum). En un principio dicha  $\beta$ -lactamasa fue agrupada en una misma familia llamada GES/IBC (“integron borne cephalosporinasa”), la cual fue descrita por primera vez en en año 2000 (Queenan y Bush, 2007), sin embargo, la nomenclatura de la familia fue revisada y se llegó a un consenso de cambiar las IBC por GES. La primer variante de GES reportada (GES-1) fue descrita por primera vez en Francia en 1998, a partir de un aislado de *Klebsiella pneumoniae* y fue llamada GES-1. Sin embargo esta variante pertenecía al grupo de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), y no presentaba actividad sobre carbapenemes (Walther-Rasmussen y Høiby, 2007). La tipo serin- $\beta$ -lactamasa GES-2 fue reportada por primera vez en *P. aeruginosa* en Sudáfrica (Weldhagen y Prinsloo, 2004), aparece por una sustitución sencilla en la estructura aminoacídica de GES-1. Con este cambio en

su estructura GES-2 se convierte en una  $\beta$ -lactamasa con actividad carbapenemasa. GES ha sido encontrada principalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, no obstante, se ha registrado su presencia en algunas especies de Enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae* (Walther-Rasmussen y Høiby, 2007).

La expresión del gen *bla*<sub>GES</sub> le confiere a la bacteria resistencia a los carbapenemes, penicilinas y aztreonam. Por otro lado, la actividad hidrolítica de GES puede ser inhibida por el ácido clavulánico (Bonnin *et al.*, 2011).

En general la *Pseudomonas aeruginosa* productoras de GES con actividad carbapenemasa presenta resistencia a Imipenem, Meropenem y Ertapenem, pero son sensibles a Aztreonam. Mientras que las *P. aeruginosa* productoras de GES tipo BLEE son sensibles a Imipenem, Meropenem y Ertapenem, pero son resistentes a Aztreonam (Poirel *et al.*, 2005).

GES muestra baja identidad en cuanto a su estructura aminoacídica con el resto de carbapenemasas del tipo serin, siendo KPC la enzima con la que posee mayor identidad en un 36%, seguido de SME en un 35% y NMC-A en un 31% (Poirel *et al.*, 2001). A diferencia del gen *bla*<sub>KPC</sub>, el gen *bla*<sub>GES</sub> se encuentra en forma de gen cassette dentro de estructuras genéticas llamadas integrones (ver sección 3.4); *bla*<sub>GES</sub> ha sido reportado en el integrón de clase 1 (Nordmann y Poirel, 2002).

El hallazgo de GES en *Pseudomonas aeruginosa* no es tan frecuente como el de otras carbapenemasas aunque se han descrito prácticamente en todo el mundo desde América hasta el sudeste asiático pasando por Europa e incluso Sudáfrica (Walther-Rasmussen y Høiby, 2007).

### 3.3.2 $\beta$ -LACTAMASAS CLASE B

Son conocidas como Metallo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) debido a que requieren de la presencia de Zinc ( $Zn^{2+}$ ) para iniciar su actividad hidrolítica. Los microorganismos que producen MBLs poseen resistencia contra cefalosporinas, penicilinas y carbapenemes. Se han registrado cuatro familias de Metallo- $\beta$ -lactamasas principales: “Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase”, VIM; “active on imipenem”, IMP; “German imipenemase”, GIM y “Seoul imipenemase”, SPM (Queenan y Bush, 2007). Los genes que codifican para MBLs pueden localizarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, asimismo, muchas veces se encuentran asociados a estructuras genéticas llamadas integrones (Drawz y Bonomo, 2010).

### 3.3.3 $\beta$ -LACTAMASAS CLASE C

Llamadas AmpC  $\beta$ -lactamasas, pueden ser de dos tipos: aquellas que son codificadas por genes encontrados en el cromosoma bacteriano y las  $\beta$ -lactamasas del tipo AmpC codificadas por genes plasmidiales (Drawz y Bonomo, 2010). La presencia de AmpC ha sido reportada en varios géneros de enterobacterias como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Shigella* spp.,

*Escherichia* spp. y *Klebsiella* spp. Estas enzimas también han sido reportadas en *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter baylyi*. Las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC hidrolizan a las cefalosporinas de tercera generación, cefamicinas y monobactámicos (Jacoby, 2009). Presentan baja afinidad a los carbapenemes, sin embargo cuando la enzima AmpC se produce en exceso y la bacteria cierra las porinas, la enzima puede hidrolizar la poca cantidad de antibiótico presente en el espacio periplasmático, produciéndose resistencia a los carbapenemes (Jacoby, 2009).

#### 3.3.4 $\beta$ -LACTAMASAS CLASE D

Son llamadas Oxacilinasas (OXAs) o  $\beta$ -lactamasas tipo OXA. A pesar de ser muy diversas, estas enzimas aún no son muy conocidas. Se han descrito aproximadamente 140 variantes, la mayoría de ellas han sido aisladas a partir de cepas de *Acinetobacter baumannii*, también han sido reportadas en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Drawz et al., 2010).

Algunas variantes de OXAs son capaces de hidrolizar la cloxacilina, oxacilina, la benzylpenicilina, ceftacidima, carbapenémicos y penicilinas; sin embargo, no todas las enzimas poseen esta capacidad (Poirel et al., 2010a). Generalmente  $\beta$ -lactamasas tipo OXA están asociadas a integrones o transposones lo que permite su movilización y conservación (Maveyraud et al., 2000).

Debido a su gran diversidad y a que se encuentran en bacterias de gran interés a nivel nosocomial, la investigación de las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA es de suma importancia ya que estas enzimas tienen o podrían tener la misma relevancia clínica que poseen otras  $\beta$ -lactamasas.

### **3.4 INTEGRONES Y SU PAPEL EN LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

Desde hace aproximadamente medio siglo parte de la comunidad científica ha centrado su atención en el estudio de las bases genéticas de la resistencia a antibióticos en bacterias. Se han identificado varios elementos genéticos que intervienen en la transferencia de genes de resistencia, entre los cuales se destacan: los plásmidos R o plásmidos de resistencia, los transposones y el ADN de bacteriófagos. Posteriormente, con el desarrollo y la optimización de los métodos de análisis molecular, se han logrado identificar nuevas plataformas genéticas llamadas integrones (Di Conza y Gutkind, 2010).

Los integrones fueron descubiertos a principios de 1980, a partir de estudios moleculares de genes de resistencia en los cuales se observó una región conservada en el extremo 5', la cual tenía un promotor y un gen codificante para la integrasa (similar a la de bacteriófagos); a esta región conservada se la llamó Integrón (Sabaté y Prats, 2002). Los integrones son definidos como elementos genéticos dinámicos que contienen la maquinaria completa para una eficaz adquisición y escisión de genes, en forma de genes cassette, a través de eventos de recombinación específica de sitio (Bennett, 1999). Se dice que los integrones son "dinámicos" ya que los genes estructurales que los componen tienen la

capacidad de separarse del integrón en forma de partículas circulares independientes (no replicativas) y la capacidad de integrarse en un integrón distinto.

### 3.4.1 CLASIFICACIÓN

En un principio la clasificación de integrones estuvo dada según la secuencia de la integrasa que los componían, sin embargo, esta clasificación fue descartada debido a la gran variedad de integrasas descritas. Actualmente se divide a los integrones en dos grandes grupos: los integrones de resistencia (RI) y los superintegrones (SI). Estos últimos son aquellos integrones que están presentes en el cromosoma bacteriano, y pocas veces llevan genes de resistencia (Fluit y Schmitz, 2004). Los integrones de resistencia se dividen a su vez en tres clases (I, II y III), siendo los integrones de clase 1 los más estudiados, principalmente por rápida diseminación y debido a que son comunes en aislados clínicos (Di Conza y Gutkind, 2010).

### 3.4.2 ESTRUCTURA DEL INTEGRÓN DE CLASE 1

La estructura básica del integrón de clase 1 consiste de dos regiones conservadas (5'CS y 3'CS) las cuales flanquean a una región central, llamada comúnmente región variable, que es donde se insertan los genes cassette. En el sitio 5'CS se encuentra el gen codificante para la integrasa (*intI*) y el sitio adyacente de recombinación *attI*. El sitio conservado 3'CS es menos conocido, se

sabe que contiene un gen que codifica para la resistencia a las sulfamidas y marcos de lectura cuya función se desconoce (Fluit y Schmitz, 2004).

### 3.4.3 GEN CASSETTE

El gen cassette es una partícula de ADN de tamaño variable que puede estar dentro de un integrón o puede estar libre como molécula de ADN circular. Está compuesto por una secuencia codificante la cual carece de promotor y está flanqueada por dos secuencias palindrómicas que participan en la recombinación específica y aseguran que los “cassettes” se inserten en la orientación que permita su expresión. Esta estructura tiene un tamaño de aproximadamente 59 pb y se la conoce como secuencia attC (Michael *et al.*, 2004).

La secuencia attC se recombina con el sitio attI del integrón gracias a la actividad de la integrasa (intI). Según Bouvier y colaboradores (2005) tanto la inserción de genes cassette en un integrón como su escisión requiere estructuras de ADN de cadena simple para una mejor recombinación, es por esta razón que ambos procesos ocurren ya sea durante la replicación del ADN o durante la conjugación de elementos móviles (Bouvier *et al.*, 2005; MacDonald *et al.*, 2006). En un mismo integrón pueden insertarse uno o más genes cassette, sin embargo, la recombinación específica mediada por intI es más eficiente entre un sitio attI y attC, que cuando ocurre entre dos sitios attC; es por esta razón que la mayoría de los integrones, especialmente los integrones de resistencia, llevan pocos genes cassette (Bouvier *et al.*, 2009).

#### 3.4.4 EXPRESIÓN DE GENES CASSETTE

La expresión de los genes cassette está mediada por el promotor Pc presente en la región 5'CS del integrón. En los integrones de clase 1 se han descrito 4 variantes del promotor Pc, estas variantes difieren en la fuerza promotora, lo que proporciona diferentes niveles de resistencia ante la presencia de un mismo gen (Collis y Hall, 1995; Rowe-Magnus *et al.*, 2002).

#### 3.4.5 DISEMINACIÓN

Los integrones no son móviles, sin embargo, tienen la capacidad de asociarse a elementos, los cuales poseen la maquinaria necesaria para su movilización, como transposones y plásmidos conjugativos. Así, los integrones han podido ser movilizados y diseminados entre microorganismos de ambientes distintos, a través de mecanismos de reproducción bacteriana conocidos, como son la transformación y la conjugación (Martínez *et al.*, 2007). La diseminación de los integrones tanto intra como inter especies ha sido demostrada en varias ocasiones, lo que demuestra su gran importancia en el transporte de factores genéticos de resistencia tales como los genes codificantes para  $\beta$ -lactamasas. Se ha observado la presencia de un mismo integrón (con región variable similar) en microorganismos con genotipos diferentes, asimismo, se han identificado microorganismos con integrones que poseen el mismo orden en sus genes cassette, lo que sugiere la transferencia de toda la estructura del integrón (Martínez-Freijó *et al.*, 1999).

A pesar de que sólo una pequeña fracción de todos los genes cassette conocidos hasta la actualidad codifica para resistencia a antibióticos (menos del 10%), se ha reconocido que dichos genes cassette confieren resistencia a casi todas las familias de antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, sulfamidas, rifampicina, cloranfenicol, quinolonas y macrólidos) (Hall y Collis, 1998).

### **3.5 IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN MICROBIOLOGÍA**

En las últimas décadas, la introducción de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la Microbiología, han resultado ser significativamente útiles en el estudio de las bases genéticas de la resistencia antimicrobiana (Álvarez y Pérez, 2004). La PCR es una técnica de biología molecular que permite identificar y obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico (McDowell, 2006).

En Microbiología, la PCR permite identificar bacterias o agentes patógenos de difícil diagnóstico a través del uso de marcadores moleculares específicos. Asimismo, con la ayuda de la PCR es posible detectar y amplificar genes específicos responsables de factores de virulencia o de resistencia de los microorganismos. Debido a estas y otros beneficios de la PCR y de la biología molecular, es posible realizar un mejor diagnóstico en un lapso de tiempo relativamente corto (Yamamoto, 2002).

Sin embargo, la implementación de técnicas moleculares de manera rutinaria en los laboratorios clínicos lleva tiempo, se necesita toda la maquinaria y

reactivos necesarios, los cuales son costosos. Además, se debe tomar todas las medidas necesarias para evitar contaminación, posibles agentes o condiciones de laboratorio, que podrían afectar la investigación, ya que la mayoría de técnicas moleculares, especialmente la PCR, son muy sensibles (Yamamoto, 2002).

El conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a antibióticos y el estudio de su persistencia en aislados hospitalarios de nuestro país, es imprescindible para optimizar el tratamiento, con dichos antimicrobianos, de infecciones causadas por un agente nosocomial tan importante como lo es *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.6 OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Identificar los genes de resistencia relacionados con la producción de tipo Serin- $\beta$ -lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* por métodos moleculares.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar la presencia o ausencia de genes que codifican para la resistencia a carbapenemes (tipo Serin- $\beta$ -lactamasas) en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* por métodos moleculares.
- Localizar el gen *bla<sub>GES</sub>*, codificante para Serin- $\beta$ -lactamasas, mediante la amplificación del Integrón Clase 1, en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Confirmar la presencia de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas en el Integrón de Clase 1.

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio fue realizado en 129 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* donados por los Zurita&Zurita Laboratorios. Dichos aislados provienen de muestras clínicas de varios centros hospitalarios de la ciudad de Quito, cuya selección fue realizada en un periodo comprendido entre enero del 2005 a diciembre del 2008. Las muestras fueron tomadas de pacientes que presentaron diversas patologías infecciosas. La Tabla 1 detalla la fecha de aislamiento, el origen de la muestra y el sexo de cada paciente.

En el año 2008, los 129 aislados estudiados fueron previamente identificados y sometidos a la determinación del perfil de resistencia a antibióticos, en los Zurita&Zurita Laboratorios, utilizando un MicroScan® (Dade Behring), acorde con los criterios de sensibilidad diseñados por el Instituto Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), cuyos resultados se encuentran detallados en el Anexo 2. Tanto el transporte como la identificación mediante pruebas bioquímicas fueron realizados por la Lic. María Fernanda Yauri y el Lic. Pedro Barba (Yauri, 2009; Barba, 2010).

Una vez en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, los 129 aislados de *P. aeruginosa* fueron conservados en agar nutriente con crecimiento a 37 °C por 18 a 24 horas en tubos 10x120 mm con tapa

de caucho hermética. Estos cultivos fueron mantenidos en recipientes cerrados a temperatura ambiente. Adicionalmente, los aislados se conservaron en congelamiento. Para esto, los aislados crecieron en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Difco) a 37 °C por 18 a 24 horas. Los cultivos fueron adicionados de 30% de glicerol estéril, alícuotas de 1,5 mL se transfirieron a tubos Eppendorf estériles, en 6 copias, para ser congeladas, 3 copias a -20 °C y tres copias a -85 °C, estableciendo de esta manera una bacterioteca en temperatura ambiente y otra en congelamiento.

## 4.2 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN total de cada aislado se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Alcocer, 2004.

Cada aislado fue inoculado, a partir de la alícuota mantenida a -20 °C, en 5 ml de caldo Tripticasa de Soya (Tryptic Soy Broth, TSB) (Difco <sup>TM</sup>) y se incubó a 37 °C por 48 horas. De cada aislado cultivado, se tomó 1,5 ml del caldo y se colocó en microtubos estériles de 1,5 ml, y se centrifugó a 14 000 rpm (centrífuga Spectrafuge 16M Labnet) durante un minuto. Una vez centrifugado, se desechó el sobrenadante y al precipitado bacteriano se le realizó un primer lavado añadiendo 1 ml de tampón Tris 50 mM y EDTA 20mM, pH 8 (Tris-EDTA). La solución fue centrifugada nuevamente a 14 000 rpm por dos minutos, se descartó el sobrenadante, y se añadió 400 µL de Tris-EDTA para resuspender el pellet obtenido; posteriormente se añadió 50 µL de dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS), 10 µL de Lisozima 5 mg/ml y 5 µL de Proteinasa K 20 mg/ml, esta solución

fue incubada a 37 °C durante una hora. Posterior a la incubación, se centrifugó la solución por dos minutos a 14 000 rpm y el sobrenadante fue colectado en microtubos estériles de 1,5 ml de capacidad, al realizar la transferencia, dicho sobrenadante fue mezclado, agitándolo de 5 a 10 veces con la ayuda de una pipeta P1000, este movimiento mecánico permite la ruptura de las proteínas. Consecutivamente, se añadió 23,25 µL de Cloruro de Sodio 5M y 46,5 µL de solución de Acetato de Sodio 3M, y se incubó a 4 °C por una hora. Posterior a la incubación, se centrifugó el producto (aproximadamente 330 µL) por 15 minutos a 14 000 rpm; a continuación se adicionó 660 µL, equivalente a dos volúmenes, de etanol helado al 100% y se dejó reposar a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos. La solución fue centrifugada por 15 minutos a máxima velocidad; una vez centrifugada, se descartó el sobrenadante que contiene elementos de desecho como proteínas desnaturadas y se colocó los microtubos en la cámara de flujo laminar para secarlos completamente. Finalmente, el producto conteniendo el ADN fue resuspendido con 200 µL de buffer Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5 (Tris-EDTA).

#### 4.2.1 CALIDAD DE ADN

La integridad del templado obtenido fue determinada por electroforesis horizontal en geles de agarosa ultra pura al 1% (Invitrogen) disuelta en tampón Tris Base 88,9 mM, ácido bórico 88,9 mM y ácido etilendiaminotetraacético 2,3 mM, pH 8,5 (TBE 1X). A cada muestra se añadió 5X Green GoTaq® Flexi Buffer en una proporción 3:1 (tres partes de buffer y una parte de muestra). La electroforesis se realizó en una cámara WWR™ a 125 voltios durante 45 minutos,

en tampón Tris Base 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM y ácido etilendiaminotetraacético 2,5 mM, pH 8,5 (TBE 0,5X).

#### 4.2.2 VISUALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS

La tinción del gel fue realizada con 1  $\mu$ L SYBR<sup>®</sup> SAFE 10 000X en dimetilsulfóxido, DMSO por sus siglas en inglés (Promega), y la visualización de los productos de la extracción se realizó en el sistema de captura de imágenes MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems) y el programa informático GelCapture versión 2010 freeware.

#### 4.3 DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA TIPO SERIN- $\beta$ -LACTAMASAS

Usando como templado el ADN total (ADN cromosómico y ADN vegetativo) extraído de los 129 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, se realizó la amplificación de dos genes productores de  $\beta$ -lactamasas tipo serin, *bla*<sub>GES</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>.

La reacción de PCR para la amplificación tanto de *bla*<sub>GES</sub> como de *bla*<sub>KPC</sub> tuvo un volumen final de 25  $\mu$ L la cual incluía: 12,5  $\mu$ L GoTaq<sup>®</sup> Master Mix (Promega), 0,5  $\mu$ L de cada iniciador, 10,5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Promega) y 1  $\mu$ L de ADN.

Los iniciadores utilizados para la amplificación de *bla<sub>GES</sub>* son aquellos propuestos por Poirel *et al.* (2000) y se encuentran detallados en la Tabla 2. El programa de amplificación para dicho gen fue diseñado y estandarizado en el Laboratorio de Microbiología, y fue realizado en un termociclador Labnet Multigene Model TC9600-G. El programa consistió en una denaturación inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos, una hibridización a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos; por último, un periodo de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Por otro lado, la amplificación del gen *bla<sub>KPC</sub>* fue realizada según lo propuesto por Hindiyeh *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Los iniciadores utilizados se encuentran detallados en la Tabla 2. El proceso de amplificación de *bla<sub>KPC</sub>* estandarizado en laboratorio consistió en un primer paso de denaturación a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 95 °C por un minuto, anillamiento a 55,6 °C por un minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto; finalmente, un periodo de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa ultra pura al 1% (Invitrogen) disuelta en tampón Tris Base 88,9 mM, ácido bórico 88,9 mM y ácido etilendiaminotetraacético 2,3 mM, pH 8,5 (TBE 1X). A cada muestra se añadió 5X Green GoTaq® Flexi Buffer en una proporción 3:1 (tres partes de buffer y una parte de muestra). La electroforesis se realizó en una cámara WWR™ a 125 voltios durante 45 minutos, en tampón Tris Base 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM y ácido etilendiaminotetraacético 2,5 mM, pH 8,5 (TBE 0,5X).

La tinción del gel fue realizada con 1  $\mu$ L SYBR<sup>®</sup> SAFE 10 000X en dimetilsulfóxido (DMSO) (Promega), y la visualización de los productos de la extracción se realizó en el sistema de captura de imágenes MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems) y el programa informático GelCapture versión 2010 freeware.

La determinación del peso molecular de las muestras se realizó comparándolas con un marcador de peso molecular Trackit 100pb ladder (Invitrogen).

Conjuntamente, los productos PCR fueron examinados considerando una muestra positiva para cada gen amplificado. El control positivo utilizado para el análisis de la amplificación de *bla*<sub>GES</sub> fue una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* positiva para el gen, la cual fue donada por el Dr. Patrice Nordmann, del hospital de Bicêtre, Francia, y está representada en geles de agarosa, una vez que haya sido amplificada, como una banda visible de 864pb.

Por otro lado, la muestra positiva utilizada para el análisis de *bla*<sub>KPC</sub> consistió en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* positiva para el gen, donada por el Hospital Vozandes, cuya representación en el gel es de una banda de 738pb.

Para el análisis de ambos genes se utilizó como control negativo agua molecular estéril.

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DEL GEN CODIFICANTE PARA TIPO SERIN- $\beta$ -LACTAMASAS *bla*<sub>GES</sub> EN INTEGRONES CLASE 1

En los 129 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó la amplificación de los genes codificantes para la enzima Integrasa (*IntI*) y para la región variable, propias del Integrón de clase 1. La PCR de ambos genes se realizó con una reacción cuyo volumen final fue de 25  $\mu$ L, en la cual se incluía 12,5  $\mu$ L de GoTaq® Master Mix (Promega), 0,5  $\mu$ L de cada iniciador, 10,5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ L de ADN.

##### 4.4.1 AMPLIFICACIÓN DE *IntI*

Para la amplificación de *IntI* (integrasa) se emplearon los iniciadores IntA e IntB (Integrated DNA Technologies) descritos por Rosser y Young (1999) los cuales se encuentran detallados en la Tabla 2. El programa de amplificación fue realizado en un termociclador Labnet Multigene Model TC9600-G. El protocolo utilizado fue aquel propuesto por Reyes *et al.* (2003), éste inició con una denaturación inicial a 98 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 96 °C por 15 segundos, hibridización a 54 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

En aquellos amplicones positivos para Integrasa, se realizó la digestión con la endonucleasa SphI (Invitrogen) para confirmar que el amplificado sea en efecto parte del integrón de clase 1. La digestión fue realizada, colocando 1,5 unidades de la enzima en 20  $\mu$ L de amplicón, y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Los resultados de la amplificación y de la digestión fueron observados y analizados mediante electroforesis horizontal como se detalla en la sección 4.3.1.

#### 4.4.2 AMPLIFICACIÓN DE REGIÓN VARIABLE DE INTEGRÓN DE CLASE 1

La región variable del integrón fue identificada para analizar los sitios de inserción de genes cassette en el mismo. Para la amplificación de la región variable se emplearon los iniciadores 5'CS y 3'CS, detallados en la Tabla 2, sugeridos por Pitout *et al.* (2005). El programa de amplificación fue llevado a cabo en un termociclador Labnet Multigene Model TC9600-G y consistió en una denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 95 °C por un minuto, hibridización a 52 °C por un minuto y extensión de 72 °C por dos minutos; y una extensión final a 72 °C durante 20 minutos (Lévesque *et al.*, 1995).

La visualización, análisis y fotodocumentación de los productos de PCR se la realizó mediante electroforesis horizontal como se detalla en el punto 4.3.1.

#### 4.4.3 LOCALIZACIÓN DE *bla*<sub>GES</sub> DENTRO DEL INTEGRÓN DE CLASE 1

Utilizando como templado los productos PCR positivos de la amplificación de región variable, se realizó una PCR anidada para verificar la localización del

gen *bla*<sub>GES</sub> dentro del integrón de clase 1. Los parámetros de amplificación fueron los mismos señalados en el punto 4.3.

La visualización, análisis y fotodocumentación de los productos de PCR se la realizó mediante electroforesis horizontal como se detalla en el punto 4.3.1.

#### **4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos de la identificación de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas y de localización del gen *bla*<sub>GES</sub>, serán tabulados en matrices de presencia-ausencia, para luego ser analizados en el programa estadístico SPSS versión 16.0.

Se realizará un análisis descriptivo inicial de las variables, para lo que se utilizarán tablas de frecuencias de variables cualitativas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXTRACCIÓN DE ADN

El protocolo de extracción utilizado con los 129 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resultó ser práctico y efectivo para la obtención de ADN total. Se confirmó mediante electroforesis horizontal que la calidad del ADN extraído fue buena, como se puede observar en la Figura 1. Asimismo, utilizando como control negativo caldo Tripticasa de Soya estéril (TSB) se corroboró que el proceso de extracción y su resultado estuvo libre de contaminantes.

### 5.2 DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA TIPO SERIN- $\beta$ -LACTAMASAS

La visualización de los productos PCR para la amplificación de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas, permitió observar claramente 2 bandas diferenciadas. Al comparar estos resultados con el marcador de peso molecular se puede verificar una banda de 864 pb correspondiente al gen *bla<sub>GES</sub>* (Figura 2) y una segunda banda de aproximadamente 740 pb, la cual corresponde al gen *bla<sub>KPC</sub>* (Figura 3).

De los 129 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* analizados, 44 (34,11%) presentaron uno o ambos genes que codifican para Serin- $\beta$ -lactamasas, y 85 aislados (65,89%) no presentaron ningún gen codificante para tipo Serin- $\beta$ -

lactamasas. El gen *bla*<sub>GES</sub> estuvo presente en 37 aislados (28,68%) de los 129 aislados *Pseudomonas aeruginosa*. El gen *bla*<sub>KPC</sub> se lo encontró en 7 aislados (5,43%) (Tabla 3); por otro lado, tres aislados presentaron ambos genes, representando el 2,32% (Figura 4).

### **5.3 DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DEL GEN CODIFICANTE PARA TIPO SERIN- $\beta$ -LACTAMASAS *bla*<sub>GES</sub> EN INTEGRONES CLASE 1**

#### **5.3.1 AMPLIFICACIÓN DE *IntI***

El gen *IntI* codificante para la integrasa propia del integrón de clase 1, fue identificado en 49 (37,98%) de los 129 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*. El análisis electroforético permitió identificar una banda diferenciada de aproximadamente 800 pb correspondiente al gen *IntI*, sin embargo en algunas muestras, la amplificación de *IntI* dio como resultado dos bandas de aproximadamente 800 y 400 pb; dichas muestras también fueron considerados como positivas para el gen (Figura 5).

#### **5.3.2 DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASA *SphI***

La digestión de los productos PCR positivos para *IntI*, confirmó que la integrasa identificada se trataba efectivamente de integrasa I perteneciente al integrón de clase 1. En las canaletas 1 a 6 de la Figura 6, se puede observar una banda de aproximadamente 890 pb correspondiente a la amplificación del gen *IntI*, mientras que las dos bandas de 500 y 390 pb corresponden al resultado de la

digestión con SphI. La enzima no tuvo efecto en aquellas muestras que presentaron una banda de 400 pb adicional en la amplificación de *IntI*; probablemente, porque se trataba de aislados cuyo gen *IntI* pudo haber sufrido alguna mutación por lo que la enzima no reconoció su sitio de corte. SphI digirió únicamente la banda de aproximadamente 800 pb.

### 5.3.3 AMPLIFICACIÓN DE REGIÓN VARIABLE DEL INTEGRÓN DE CLASE 1

De los 129 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, 79 (61,24%) presentaron región variable típica del integrón clase 1. Los amplicones positivos presentaron una o varias bandas de 200, 750, 1200, 1300 y 2100 pb (Figura 7).

### 5.3.4 LOCALIZACIÓN DEL GEN *bla<sub>GES</sub>* DENTRO DEL INTEGRÓN DE CLASE 1

De los 37 aislados que presentaron el gen *bla<sub>GES</sub>*, 24 (64,86%) fueron ubicados dentro de la región variable del integrón de clase 1 (Tabla 3; Figura 8); mientras que, 13 aislados (35,14%) presentaron este gen fuera la región variable de integrones de clase 1.

## 6 DISCUSIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos Gram negativos más importantes a nivel nosocomial (Vojtová, *et al.*, 2011). Según el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de los Estados Unidos (NNIS, por sus siglas en Inglés), *P. aeruginosa* es el segundo patógeno más importante causante de neumonías a nivel mundial; el tercer patógeno más común causante de infecciones urinarias y el octavo patógeno más frecuentemente aislado a partir de muestras de sangre (Gaynes y Edwards, 2005).

Además del elevado nivel de resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* a varios antimicrobianos y de su extraordinaria capacidad para desarrollar resistencias adicionales por mutaciones cromosómicas, el uso indiscriminado de los antibióticos ha tenido un profundo impacto en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria (Nikaido, 2009). El aumento del número de cepas resistentes a la mayoría de agentes antipseudomonadales es constante, perjudicando así la selección de un tratamiento apropiado para las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e incrementando la morbilidad y mortalidad de pacientes infectados con dicho patógeno (Obritsch *et al.*, 2004; Ibrahim *et al.*, 2000).

La producción de  $\beta$ -lactamasas es uno de los mecanismos de resistencia más comunes en *Pseudomonas aeruginosa* y puede tener mayor impacto en la resistencia antimicrobiana si esta combinado con otros mecanismos, como la disminución de la permeabilidad de la membrana por la pérdida de porinas

(Nicolau y Oliver, 2010). Las  $\beta$ -lactamasas hidrolizan a la mayoría de antibióticos  $\beta$ -lactámicos incluidos los carbapenemes (Bodí y Garnacho, 2007).

En el presente estudio se detectó dos genes codificantes para dos  $\beta$ -lactamasas tipo Serin, GES y KPC, en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, dichas carbapenemasas pertenecen al grupo de las  $\beta$ -lactamasas Clase A según la clasificación de Ambler. Uno o ambos genes fueron identificados en 34,11% de los aislados estudiados y 65,89% no presentó ningún gen; los resultados obtenidos concuerdan con los estudios realizados previamente, los cuales revelan que las  $\beta$ -lactamasas tipo serin son muy poco frecuentes en América Latina, hasta el momento, éstas predominan en Norteamérica, Asia, y Europa (Walther-Rasmussen y Høiby, 2007).

El gen *bla*<sub>GES</sub> fue identificado en 37 aislados representando un 28,68% de los aislados de *P. aeruginosa* analizados. Estas observaciones coinciden con los datos de prevalencia para *bla*<sub>GES</sub> reportados en América Latina. El primer reporte de *bla*<sub>GES</sub> en América Latina fue realizado en Brasil en el año 2001 (Castanheira *et al.*, 2004), un segundo reporte de una variante del gen, *bla*<sub>GES-5</sub>, fue realizado en el mismo año, en la ciudad de São Luís, Brasil (da Fonseca *et al.*, 2007), y por último, un tercer reporte del gen se realizó en Argentina, en el año 2002 (Pasteran *et al.*, 2005). El presente estudio representa el cuarto reporte de la presencia de *bla*<sub>GES</sub> en América Latina en *Pseudomonas aeruginosa*, y es el primer reporte de la presencia de *bla*<sub>GES</sub> en dicho patógeno en Ecuador.

A lo largo del tiempo se han ido descubriendo nuevas variantes de GES, hasta el momento se han descrito 12 variantes; sin embargo, la mayoría de ellas son  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y sólo cuatro variantes tienen actividad carbapenemasas las cuales son: GES-2, GES-4, GES-5 y GES-6 (Poirel *et al.*, 2001; Weldhagen, 2006). Se ha propuesto que la presencia de un residuo de asparagina o serina en la posición 170 de la proteína es el causante de la actividad carbapenemasa de la enzima, no obstante hay excepciones y no existen estudios necesarios que corroboren dicha hipótesis (Fraser *et al.*, 2011).

Algunos GES con actividad carbapenemasa pueden tener actividad modesta sobre los monobactámicos (Aztreonam), por ejemplo la variante GES-9, que es una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) fue descrita en *Pseudomonas aeruginosa* y posee una importante actividad sobre el aztreonam, sin embargo dicha variable también posee actividad detectable sobre carbapenemes (Poirel *et al.*, 2005). Por lo tanto, es relevante definir la variante del gen *bla*<sub>GES</sub>, ya que dicho gen podría estar codificando para cualquiera de las 12 variantes de GES, de las cuales solo cuatro tienen actividad sobre carbapenémicos.

Por otro lado, el gen *bla*<sub>KPC</sub> fue identificado en 5,43% de los aislados estudiados, estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que hasta el momento el gen *bla*<sub>KPC</sub> solamente ha sido reportado dos veces en América Latina. El primer reporte de *bla*<sub>KPC</sub> en *Pseudomonas aeruginosa* en América Latina fue realizado en la ciudad de Medellín, Colombia, en el año 2006 (Villegas *et al.*, 2007), a partir de una muestra clínica donde se identificó la variante KPC-2.

Un segundo reporte fue realizado en Puerto Rico donde se identificó la variante KPC-5 (Wolter *et al.*, 2009). El tercer reporte fue realizado en en Trinidad y Tobago (Akpaka *et al.*, 2009) donde se identificó la variante KPC-2. En Estados Unidos se realizó el cuarto reporte de la presencia del gen *bla*<sub>KPC</sub> en *Pseudomonas aeruginosa* (Poirel *et al.*, 2010b). El presente estudio representa el tercer reporte de la presencia de *bla*<sub>KPC</sub> en América Latina en *Pseudomonas aeruginosa*, luego de Colombia y Puerto Rico y es el primer reporte de la presencia de *bla*<sub>KPC</sub> en dicho patógeno en Ecuador.

A pesar de la baja incidencia de *bla*<sub>KPC</sub> en *P. aeruginosa*, su presencia ha sido detectada en otras especies bacterianas, principalmente enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, entre otras (Ge *et al.*, 2011).

Pese a que ambas  $\beta$ -lactamasas identificadas en este estudio, presentaron porcentajes de prevalencia bajos, su sola presencia es preocupante. Tanto *bla*<sub>GES</sub> como *bla*<sub>KPC</sub> son genes que se encuentran en plásmidos conjugativos, lo cual resulta altamente problemático ya que dichos plásmidos pueden ser transferidos de bacteria a bacteria, de diferente especie, incluso de diferente género (Svara y Rankin, 2011), propagando así los elementos de resistencia.

Los plásmidos también son vehículos de transposones e integrones, por lo que a través de éstos, las bacterias están expuestas a una gran cantidad de genes del acervo genético móvil, entre los cuales pueden encontrarse genes de resistencia (Williams y Hergenrother, 2008).

Los integrones son plataformas de recombinación específica de sitio, los cuales son capaces de capturar y expresar genes cassette, así como también escindirlos (Coque-González, 2005).

En la presente investigación, de los 129 aislados estudiados 79 (61,24%) presentaron una región variable típica de la estructura de un integrón, mientras que la amplificación del gen codificante para integrasa *IntI*, fue positiva en 49 aislados (37,98%) de los 129 aislados; esta discordancia entre las frecuencias encontradas de región variable e integrasa puede deberse a la presencia de integrones de clase 1 inusuales (Evershed *et al.*, 2009), los cuales no fueron incluidos en esta investigación debido a la poca información que se tiene sobre ellos.

Se identificó 24 aislados de *P. aeruginosa* portadores del gen *bla<sub>GES</sub>*, en los cuales dicho gen estuvo localizado dentro de la región variable del integrón de clase 1; los aislados mencionados representan el 64,86% de los aislados portadores de *bla<sub>GES</sub>* identificados en este estudio. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, debido a que en numerosos estudios el gen codificante para la serin- $\beta$ -lactamasa GES y la mayoría de sus variantes, ha sido localizado en integrones, principalmente en integrones de clase 1 (Queenan y Bush, 2007). Aquellos aislados con integrones portadores de *bla<sub>GES</sub>* o cualquier elemento genético de resistencia, representan una plataforma efectiva para el transporte y diseminación de resistencias tanto intra como inter especies, por lo tanto tienen un papel importante en el desarrollo de cepas multirresistentes (Rowe-Magnus y Mazel, 2002). Además recientemente se han descrito por

primera vez la asociación de dos GES en un mismo integrón (GES-1 y GES-5) en *P. aeruginosa* (Viedma *et al.*, 2009), por lo tanto es importante determinar la estructura genética del integrón y de los genes cassette de los que éste pueda estar constituido.

En cuanto a la observación de dos bandas distintas de 800 y 400 pb respectivamente en algunos aislados, como resultado de la amplificación de *IntI*, la digestión con la endonucleasa SphI demostró solamente el amplicón de aproximadamente 890 pb corresponde al gen *IntI*, estos resultados están acorde con lo esperado y lo reportado en estudios previos (Rosser y Young, 1999). De igual manera, la observación de una banda adicional de aproximadamente 400 pb en algunos aislados, puede explicar la presencia de integrones inusuales, cuyo gen codificante para integrasa posiblemente ha sufrido alguna mutación por lo que la digestión con SphI fue inefectiva, a pesar de que su amplificación con los iniciadores específicos para *IntI* haya sido exitosa.

En la última década, la resistencia a antimicrobianos se ha convertido en un problema grave en la salud pública de todo el mundo. El uso inapropiado de los antibióticos es la causa principal para el desarrollo de resistencias, inhibiendo el crecimiento de organismos susceptibles, favoreciendo la dispersión de organismos resistentes y produciendo serias consecuencias a los pacientes (Franco *et al.*, 2009).

El presente estudio amplía la investigación de la resistencia bacteriana en *Pseudomonas aeruginosa* en el Laboratorio de Microbiología de la Pontificia

Universidad Católica del Ecuador. En los últimos 3 años, junto con los trabajos de Yauri (2009) y Barba (2010) se ha logrado realizar un perfil completo de resistencia a carbapenemes y aminoglucósidos en 129 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Tal como se observa en el Anexo 1, la detección de genes codificantes para enzimas tipo Serin- $\beta$ -lactamasas, podría explicar la resistencia a carbapenemes en ciertas cepas resistentes a Imipenem y/o Meropenem (por ejemplo las cepas Ps aer 191 y Ps aer 236), las cuales no presentaron otro tipo de genes de resistencia a tales antimicrobianos, como los genes codificantes para Metallo- $\beta$ -lactamasas. Asimismo, con la construcción del mencionado perfil de resistencia, se podría determinar aquellas cepas cuya infección podría verse limitada en cuanto a su tratamiento con aminoglucósidos y carbapenémicos, debido a la alta prevalencia de elementos genéticos responsables de la resistencia a dichos antibióticos, por ejemplo las cepas Ps aer 44, Ps aer 95, Ps aer 97, Ps aer 237, Ps aer 319 y Ps aer 330.

Este tipo de investigaciones son necesarias para poder seleccionar un tratamiento antimicrobiano conveniente contra las infecciones causadas por *P. aeruginosa*, ya que se requiere una vigilancia continua del desarrollo o apareamiento de nuevas resistencias (Obritsch *et al.*, 2004), para evitar el surgimiento y diseminación de los elementos genéticos que las codifican.

## 7 CONCLUSIONES

1. De los 129 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* estudiados, el 34,11% presentó genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas.
2. El gen  $bla_{GES}$  fue identificado con mayor frecuencia y pudo ser detectado en 28,68% de los aislados de *P. aeruginosa* portadores de genes que codifican para tipo serin- $\beta$ -lactamasas. Mientras que el gen  $bla_{KPC}$  fue identificado con menor frecuencia, estuvo presente en 5,43% de los aislados. El 65,89% de los aislados no presentó ningún gen codificante para tipo serin- $\beta$ -lactamasas.
3. El 64,86% de aislados portadores de  $bla_{GES}$ , fueron ubicados dentro de la región variable del integrón de clase 1, mientras que el 35,14% de los aislados portadores del gen estuvieron ubicados fuera de la región variable del integrón.
4. Más de la mitad de los 129 aislados de *P. aeruginosa* estudiados presentaron región variable, típica del integrón. La alta prevalencia de integrones en nuestro medio es preocupante ya que éstos pueden actuar como los perfectos acarreadores de genes de resistencia.
5. Los resultados obtenidos en la presente investigación representan el primer reporte de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas ( $bla_{GES}$  y  $bla_{KPC}$ ) en *Pseudomonas aeruginosa* en Ecuador.

6. La prevalencia de tipo Serin- $\beta$ -lactamasas en América Latina es relativamente baja, sin embargo, los genes que las codifican son transportados en plásmidos lo que facilita su propagación a otras bacterias.
7. Se debe realizar estudios que identifiquen las bases genéticas de la resistencia antimicrobiana, éstos facilitarían el diagnóstico y optimizarían las estrategias de tratamiento de las infecciones causadas por un patógeno nosocomial tan importante como lo es *Pseudomonas aeruginosa*.
8. Se necesita realizar una vigilancia continua del apareamiento de nuevas resistencias. Además se debe educar permanentemente a la población para evitar el uso indiscriminado de los antimicrobianos eficientes disponibles en la actualidad.

## 8 LITERATURA CITADA

- Akpaka, P. E. Swanston, W. H., Ihemere, H. N., Correa, A., Torres, J. A., Tafur, J. D., Montealegre, M. C., Quinn, J. P., Villegas, M. V. 2009. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 2670-2671.
- Alcocer, I. 2004. Sorotipagem, fagotipagem, caracterização molecular de cepas de *Salmonella* spp. E Avaliação epidemiológica de surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2004. Tesis de Doctorado. Universidad Estadual de Londrina, Londrina, Brasil, 216p.
- Álvarez, S., Pérez, E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22: 183-192.
- Ambler, R. P. 1980. The structure of  $\beta$ -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Biological Sciences* 289: 321-331.
- Arcángelo, V. P., Peterson, A. M. 2006. *Pharmacotherapeutics for advanced practice: a practical approach*, Editorial Lippincott William & Wilkins, Filadelfia, U.S.A.
- Barba Estrella, Pedro. 2010. Detección de genes productores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAS) en aislados hospitalarios de *Pseudomonas aeruginosa*. Disertación (Licenciatura en Ciencias Biológicas). Quito, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 93p.

- Bennett, P. M. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43: 1-4.
- Bodí, M., Garnacho, J. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a monoterapia. *Medicina Intensiva* 31: 83-87.
- Bonnin, R. A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J. R., Poirel, L. 2011. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 349-354.
- Bouvier, M., Ducos-Galand, M., Loot, C., Bikard, D., Mazel, D. 2009. Structural features of single-stranded integrón cassette *attC* sites and their role in strand selection. *Public Library of Science: Genetics Journal* 5: 1-14.
- Bouvier, M., Demarre, G., Mazel, D. 2005. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *The EMBO Journal* 24: 4356-4367.
- Brito, A., Landaeta, J. M., Roldán, Y., Marcano, M., Santos, J. R., Guzmán, M., Carmona, O. 2000. Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a la gentamicina, tobramicina y amikacina en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 20: 1-1.
- Cantón, R., Girón, R., Martínez, L., Oliver, A., Solé, A., Valdezate, S., Máiz, L. 2002. Patógenos multirresistentes en la fibrosis quística. *Archivos de Bronco neumología* 38: 376-385.
- Castanheira, M., Mendes, R. E., Walsh, T. R. 2004. Emergence of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil:

- report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 2344-2345.
- Collis, C. M., Hall, R. M. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 155-162.
- Coque-González, M. T. 2005. Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 23: 251-253.
- Da Fonseca, E. L., Vieira, V. V., Cipriano, R., Paulo, A. C. 2007. Emergence of *bla*<sub>GES-5</sub> in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 576-577.
- Di Conza, J. A., Gutkind, G. O. 2010. Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 63-78.
- Drawz, S. M., Bonomo, R. A. 2010. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 160-201.
- Drawz, S. M., Bethel, C. R., Doppalapudi, V. R., Sheri, A., Pagadala, S. M., Hujer, A. M., Skalweit, M. J., Bonomo, R. A. 2010. Penicillin sulfone inhibitors of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 1414-1424.
- Echeverría-Zárate, J., Aguilar, E., Osoro-Plenge, F. 2006. Infección del tracto urinario y manejo del antibiótico. *Acta Médica Peruana* 23: 26-31.
- Evershed, N. J., Levings, R. S., Wilson, N. L., Djordjevic, S. P., Hall, R. M. 2009. Unusual class 1 integron-associated gene cassette configuration found in

- IncA/C plasmids from *Salmonella enteric*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 2640-2642.
- Fluit, A. C., Schmitz, F. J. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 272-288.
- Franco, B., Martínez, M., Rodríguez, M., Wertheimer, A. 2009. The determinants of the antibiotic resistance process. *Infection and Drug Resistance* 2: 1-11.
- Frase, H., Toth, M., Champion, M. M., Atunes, N. T. Vakulenko, S. B. 2011. Importance of position 170 in the inhibition of GES-Type  $\beta$ -lactamases by clavulanic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 1556-1562.
- Gaynes, R., Edwards, J. R. 2005. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 41: 848-854.
- Ge, C., Wei, Z., Jiang, Y., Shen, P., Yu, Y., Li, L. 2011. Identification of KPC-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66: 1184-1186.
- Goldfarb, D., Harvey, S. B., Jessamine, K., Jessamine, P., Toye, B., Desjardins; M. 2009. Detection of plasmid-mediated KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 1920-1922.
- Hall, R., Collis, C. 1998. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates* 1: 109-119.

- Hatchette, T. F., Gupta, R., Marrie, T. J. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* 31: 1349-1356.
- Hindiye, M., Smollen, G., Grossman, Z., Ram, D., Davidson, Y., Mileguir, F., Vax, M., David, D. B., Ilana, T., Rahav, G., Shamiss, A., Mendelson, E., Keller, N. 2008. Rapid detection of bla<sub>KPC</sub> carbapenemase genes by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 2879-2883.
- Ibrahim, E. H., Sherman, G., Ward, S., Fraser, V. J., Kollef, M. H. 2000. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Journal of the American College of Chest Physicians* 118: 146-155.
- Íñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A. M., Maldonado, L. 2010. *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC: primer reporte en el Ecuador. Abstract. XX Congreso Latinoamericano de Patología Clínica ALAPAC/ML 17-19 noviembre, Quito, Ecuador, 2010.
- Jacoby, G. A., 2009. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 161-182.
- Kitchel, B., Rasheed, J. K., Endimiani, A., Hujer, A. M., Anderson, K. F., Bonomo, R. A., Patel, J. B. 2010. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 4201-4207.

- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 185-191.
- Li, G., Wei, Q., Wang, Y., Du, X., Zhao, Y., Jiang, X. 2011. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 30: 575-580.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., Hanson, N. D. 2009. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 582-610.
- MacDonald, D., Demarre, G., Bouvier, M., Mazel, D., Gopaul, D. 2006. Structural basis for broad DNA-Specificity in integron recombination. *Nature* 440: 1157-1162.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*, Prentice Hall Hispanoamericana, Octava Edición, Madrid, España.
- Marín, M., Gudiol, F. 2003. Antibióticos Betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 21: 42-55.
- Martínez, N., Mendoza, M. C., Rodríguez, I. Soto, S., Bances, M., Rodicio, M. R. 2007. Detailed structure of integrons and transposons carried by large conjugative plasmids responsible for multidrug resistance in diverse genomic

- types of *Salmonella enteric* serovar Brandenburg. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60: 1227-1234.
- Martínez-Freijó, P., Fluit, C., Schmitz, F. J., Verhoef, J., Jones, M. E. 1999. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 686-689.
- Maveyraud, L., Golemi, D., Kotra, L. P., Tranier, S., Vakulenko, S., Mobashery, S., Samama, J. P. 2000. Insights into class D  $\beta$ -lactamases are revealed by the crystal structure of the OXA10 Enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure* 8: 1289-1298.
- McDowell, D. 2006. The polymerase chain reaction patents: going, going,... still going. *Journal of the Royal Society of Medicine* 99: 62-64.
- Mendoza, R. 2008. *Farmacología Médica*, Editorial Médica Panamericana, México D. F., México.
- Michael, C. A., Gillings, M. R., Holmes, A. J., Hughes, L., Andrew, N. R., Holley, M. P., Stokes, H. W. 2004. Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. *The American Naturalist* 164: 1-12.
- Nataro, J., Blaser, M., Cunningham-Rendles, S. 2000. *Persistent bacterial infections*, American Society of Microbiology, Washington, U.S.A.
- Nicolau, C. J., Oliver, A. 2010. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28: 19-28.

- Nikaido, H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 78: 119-146.
- Nordmann, P., Poirel, L. 2002. Emerging carbapenemas in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection* 8: 321-331.
- Obritsch, M. D., Fish, D. D., MacLaren, R., Jung, R. 2004. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 4606-4610.
- Pasteran, F., Faccone, D., Petroni, A., Rapoport, M., Galas, M. 2005. Novel variant (*bla*<sub>VIM-11</sub>) of the Metallo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>VIM</sub> family in a GES-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 474-475.
- Petrella, S., Ziental-Gelus, N., Mayer, C., Renard, M., Jarlier, V., Sougakoff, W. 2008. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A  $\beta$ -lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 3725-3736.
- Pitout, J. D., Gregson, D. B., Poirel, L., McClure, J. A., Le, P., Church, D. L. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo- $\beta$ -lactamases in large centralized laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 3129-3135.
- Poirel, L., Nass, T., Nordmann, P. 2010a. Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 24-38.

- Poirel, L., Nordmann, P., Lagrutta, E. 2010b. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 3072.
- Poirel, L., Brinas, L., Fortineau, N., Nordmann, P. 2005. Integron-encoded GES-Type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase with increased activity toward Aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 3593-3597.
- Poirel, L., Weldhagen, G. F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M. G., Nordmann, P. 2001. GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increases hydrolysis of Imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 2598-2603.
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., Nordmann, P. 2000. Biochemical sequence analysis of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:622-632.
- Poole, K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 479-487.
- Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3: 255-264.
- Queenan, A. M., Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 440-458.

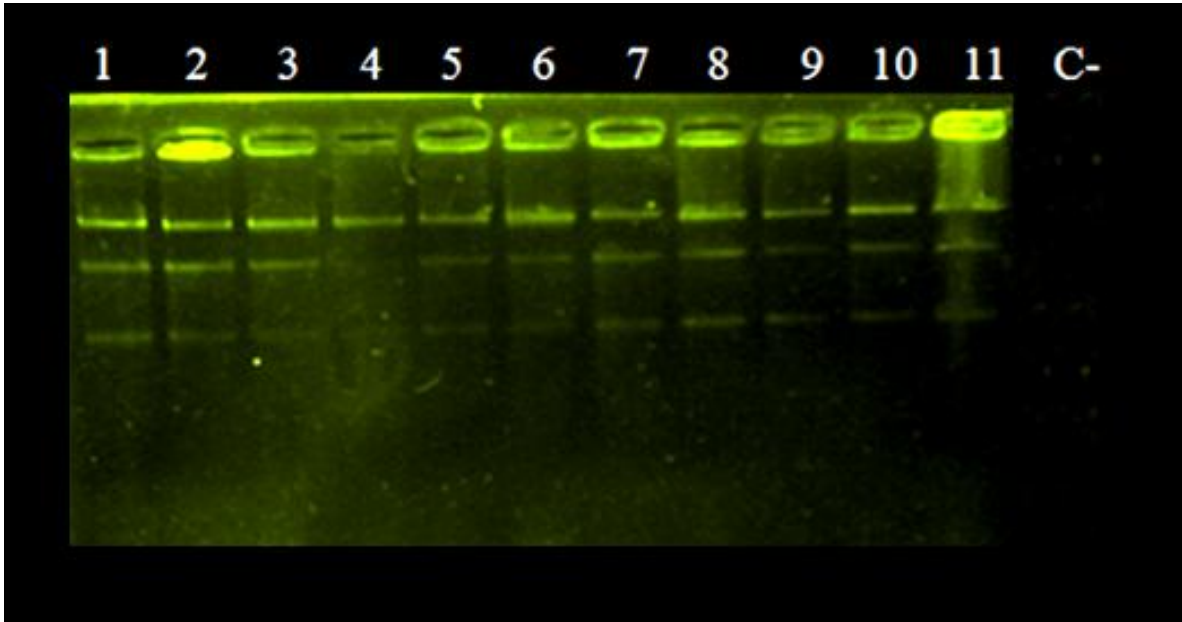
- Queenan, A. M., Shang, W., Schreckenberger, P., Lolans, K., Bush, K., Quinn, J. 2006. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3485-3487.
- Reyes, A., Bello, H., Domínguez, M., Mella, S., Zemelman, R., González, G. 2003. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae from several Chilean hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 317-321.
- Rosser, S., Young, H. K. 1999. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41: 11-18.
- Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A. M., Mazel, D. 2002. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Molecular Microbiology* 43: 1657-1669.
- Rowe.Magnus, D. A., Mazel, D. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 115-125.
- Sabaté, M., Prats, G. 2002. Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 20: 341-345.
- Samaniego, E. 2005. *Fundamentos de Farmacología Médica*, Editorial Pedro Jorge Vera de la casa de la Cultura Ecuatoriana, Quito, Ecuador.
- Sun, H. Y., Fujitani, S., Quintiliani, R., Yu, V. L. 2010. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Recent Advances in Chest Medicine* 139: 1172-1185.

- Svara, F., Rankin, D. J. 2011. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. *BMC Evolutionary Biology* 11: 1-10.
- Van Delden, C., Igkewski, B. H. 1998. Cell-to-Cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerging Infectious Diseases* 4: 551-560.
- Viedma, E., Juan, C., Acosta, J., Zamorano, L., Otero, J., Sanz, F., Chaves, F., Oliver, A. 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 4930-4933.
- Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., López, J. A., Quinn, J. P. 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 1553-1555.
- Vojtová, V., Kolář, Hricová, K., Uvízl, R., Neiser, J., Blahut, L., Urbánek, K. 2011. Antibiotic utilization and *Pseudomonas aeruginosa* resistance in intensive care units. *New Microbiologica* 34: 291-298.
- Walther-Rasmussen, J., Høiby, N. 2007. Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60: 470-482.
- Waterer, G., Wunderink, R. 2003. Hospital-acquired pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa* pp. 42. Kluwer Academic Publishers, Norwell, U.S.A.
- Weldhagen, G. F. 2006. GES: an emerging family of extended spectrum beta-lactamase. *Clinical Microbiology Newsletter* 28: 145-149.

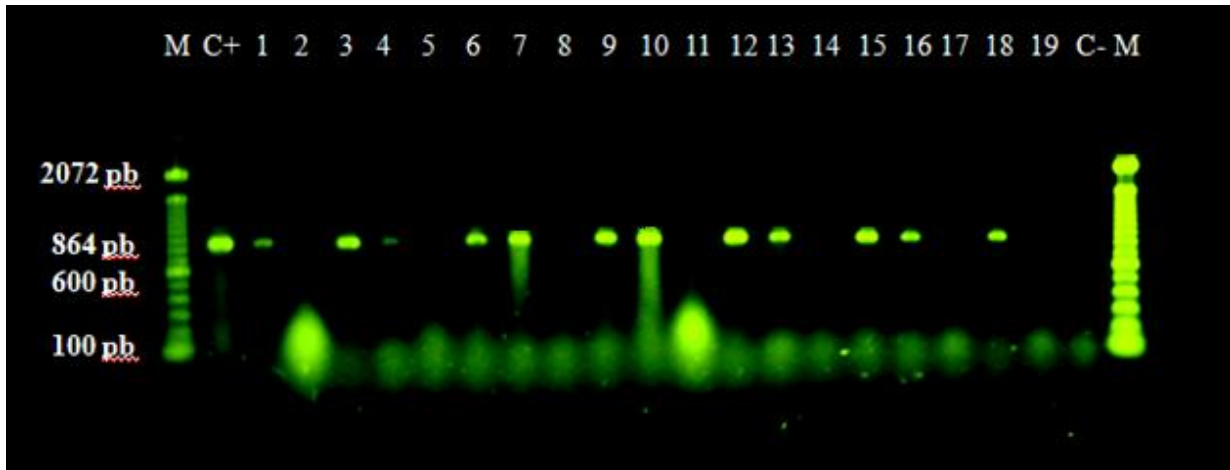
- Weldhagen, G. F., Prinsloo, A. 2004. Molecular detection of GES-2 extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24: 35-38.
- Weldhagen, G. F., Poirel, L., Nordmann, P. 2003. Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 2385-2392.
- Wiehlmann, L., Munder, A., Adams, T., Juhas, M., Kolmar, H., Salunkhe, P., Tümmler, B. 2007. Functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* to identify habitat-specific determinants of pathogenicity. *International Journal of Medical Microbiology* 297: 615-623.
- Williams, J. J., Hergenrother, P. J. 2008. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 12: 389-399.
- Wolter, D. J., Kurpiel, P. M., Woodford, N., Pelepou, M. F., Goering, R., Hanson, N. D. 2009. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 557-562.
- Woodford, N., Zhang, J., Warner, M., Kaufmann, M. E., Matos, J., MacDonald, A., Brudney, D., Sompolinsky, D., Navon-Venezia, S., Livermore, D. M. 2008. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62: 1261-1264.
- Yamamoto, Y. 2002. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9: 508-514.

- Yauri, Fernanda. 2010. Detección de genes que codifican la resistencia a carbapenemes (tipo metalo-Beta-lactamasas) en *Pseudomonas aeruginosa*. Disertación (Licenciatura en Ciencias Biológicas). Quito, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 75p.
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sánchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F. C. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1151-1161.
- Zhanel, G., Wiebe, R., Diley, L., Thompson, K., Rubinstein, E., Hoban, D., Noredinn, A., Karlowsky, J. 2007. Comparative review of the carbapenemes. *Drugs* 67: 1027-1052.

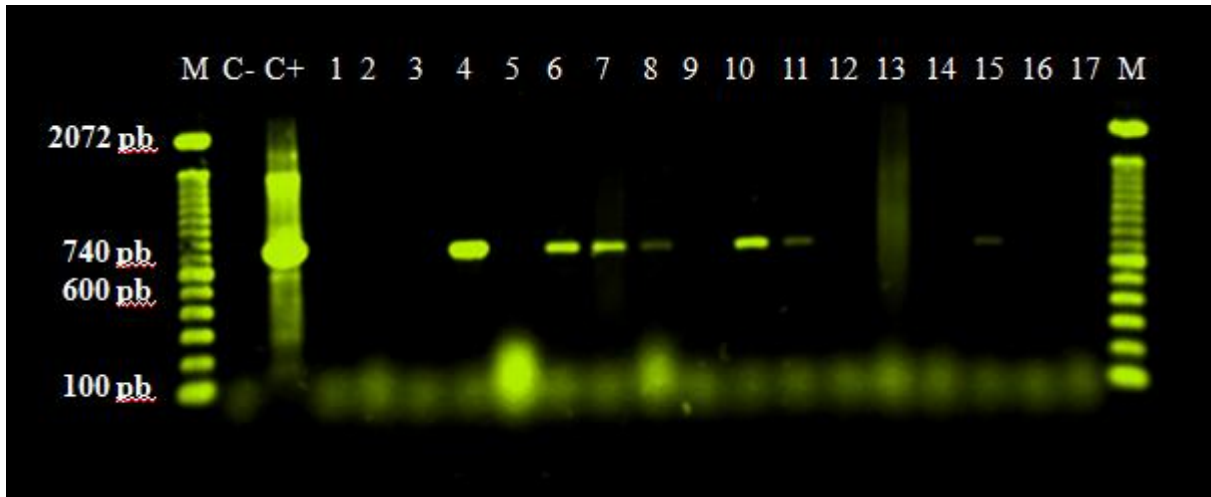
## 9 FIGURAS



**Figura 1** Gel representativo de ADN extraído a partir de aislados de *Pseudomonas aeruginosa*. Canaletas 1 a 11, presentan bandas que corresponden al ADN total extraído, siendo la canaleta 1, 13 Ps aer; 2, 16 Ps aer; 3, 17 Ps aer; 4, 21 Ps aer; 5, 23 Ps aer; 6, 28 Ps aer; 7, 29 Ps aer; 8, 31 Ps aer; 9, 38 Ps aer; 10, 40 Ps aer; 11, 44 Ps aer; C- corresponde al control negativo (caldo TSB estéril). Ps aer # es el código de cada muestra. Ps aer corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* acompañado del número de muestra.



**Figura 2** Gel representativo de la identificación de *bla*<sub>GES</sub> en aislados de *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular (100 pb); C-, control negativo; C+, control positivo; canaletas donde se visualiza banda de 864 pb, corresponden a aislados positivos para el gen *bla*<sub>GES</sub>. Ps aer # es el código de cada muestra. Ps aer corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* acompañado del número de muestra. Canaleta 1, Ps aer 16; 2 Ps aer 28; 3 Ps aer 31; 4 Ps aer 38; 5 Ps aer 175; 6 Ps aer 44; 7 Ps aer 45; 8 Ps aer 293; 9 Ps aer 55; 10 Ps aer 95; 11 Ps aer 104; 12 Ps aer 124; 13 Ps aer 144; 14 Ps aer 117; 15 Ps aer 145; 16 Ps aer 152; 17 Ps aer 181; 18 Ps aer 175; 19 Ps aer 310.



**Figura 3** Gel representativo de la detección del gen *bla*<sub>KPC</sub> en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular (100pb); C-, control negativo; C+, control positivo. Canaletas 4, 6, 7, 8, 10, 11 y 15, presentan una banda de alrededor de 740 pb, correspondiente al gen *bla*<sub>KPC</sub>. Ps aer # es el código de cada muestra. Ps aer corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* acompañado del número de muestra. Canaleta 4, Ps aer 316; 6, Ps aer 328; 7, Ps aer 335; 8, Ps aer 349; 10, Ps aer 386; 11, Ps aer 388; 15, Ps aer 422.

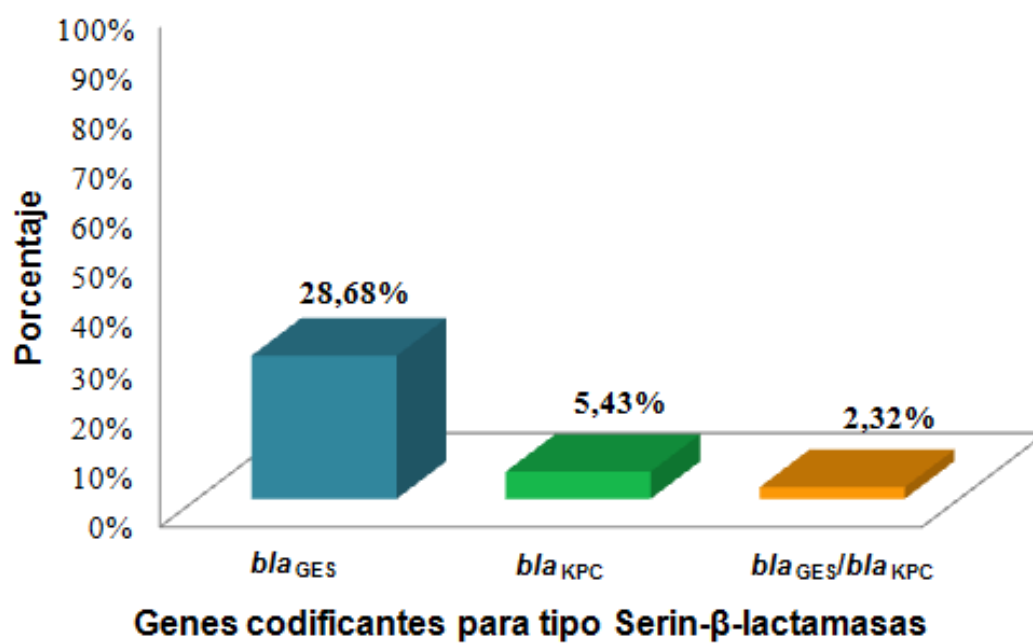
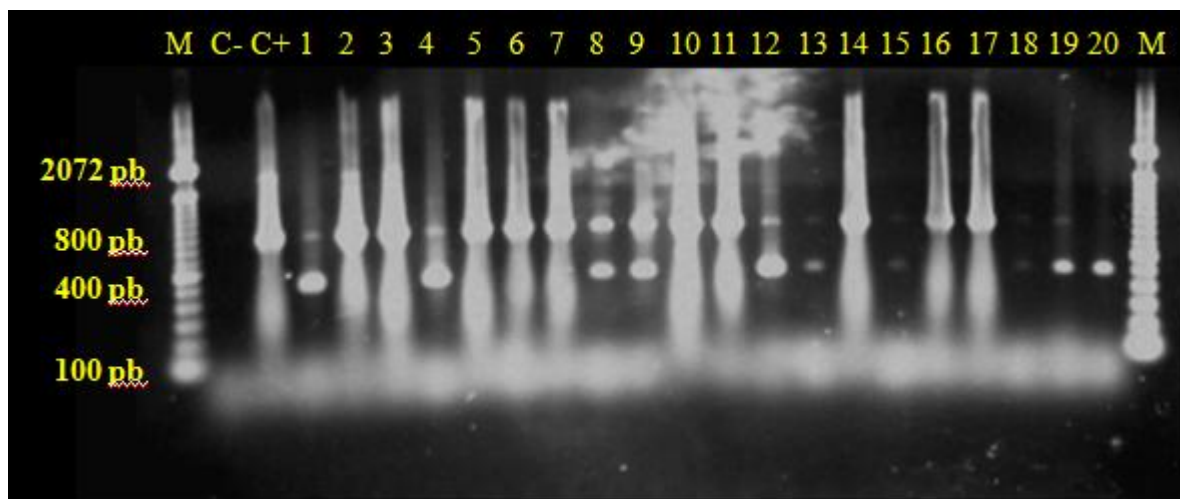
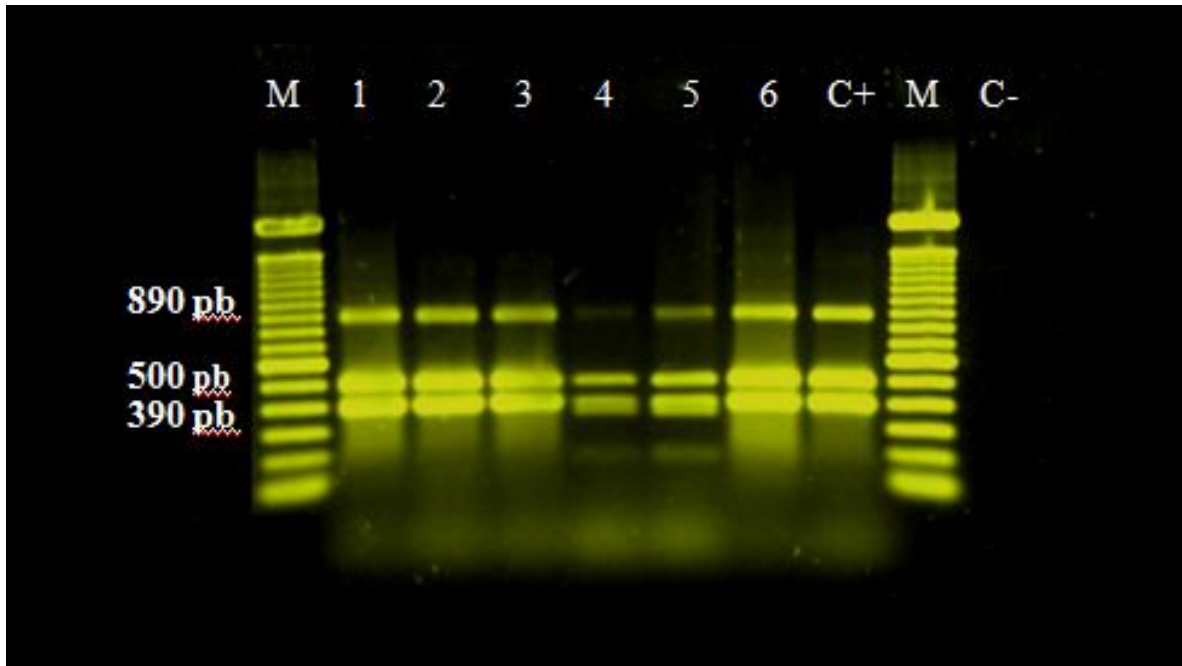


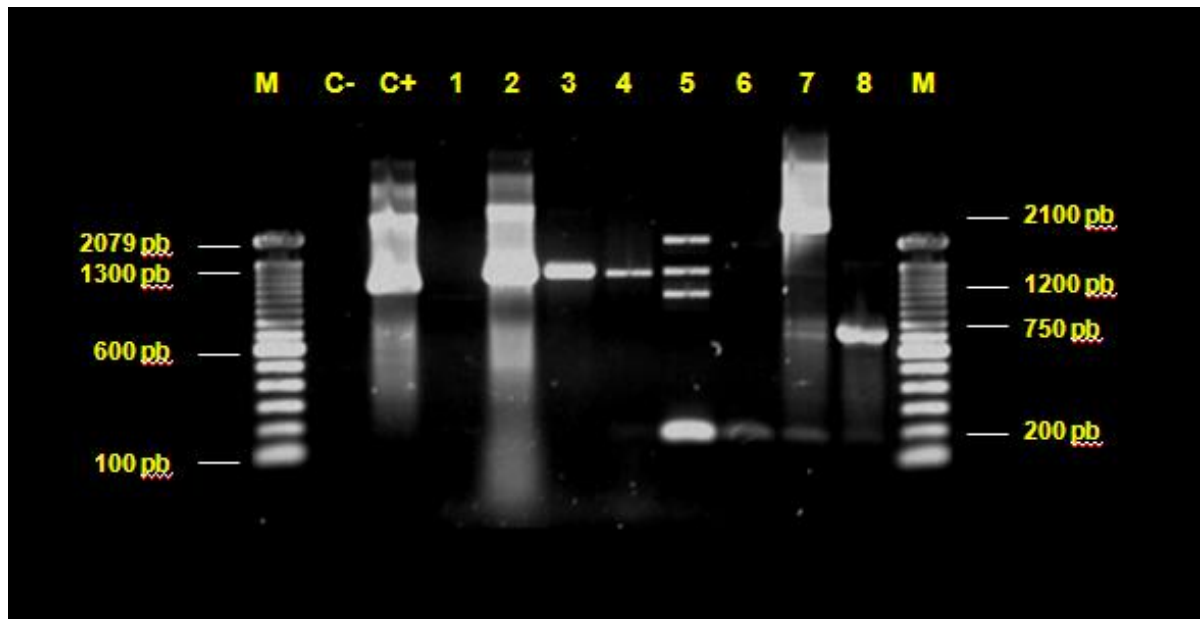
Figura 4 Frecuencia en la presencia de genes codificantes para Serin-β-lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*



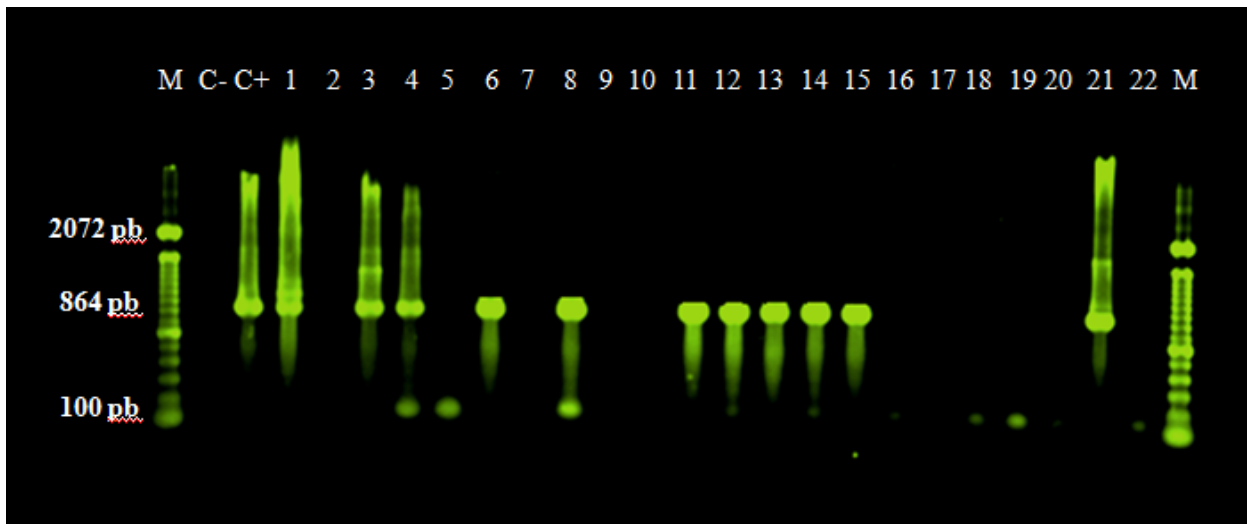
**Figura 5 Gel representativo de la amplificación del gen *IntI*, codificante para integrasa.** M, marcador de peso molecular (100 pb); C-, Control negativo; C+, control positivo. Canaletas 2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 14, 16 y 17, donde se observa una banda de aproximadamente 800 pb corresponden a *IntI*. Aquellas muestras donde se amplificó una banda adicional de aproximadamente 400 pb, también fueron consideradas como muestras positivas. Ps aer # es el código de cada muestra. Ps aer corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* acompañado del número de muestra. Canaleta 1, Ps aer 55; 2, Ps aer 227; 3, Ps aer 237; 4, Ps aer 238; 5, Ps aer 243; 6, Ps aer 263; 7, Ps aer 319; 8, Ps aer 351; 9, Ps aer 365; 10, Ps aer 366; 11, Ps aer 373; 12, Ps aer 380; 13, Ps aer 386; 14, Ps aer 388; 15, Ps aer 392; 16, Ps aer 406; 17, Ps aer 409; 18, Ps aer 411; 19, Ps aer 417; 20 Ps aer 420.



**Figura 6** Gel representativo de la digestión de *IntI* con la endonucleasa *SphI* en *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular (100pb); C-, control negativo; C+, control positivo. Las canaletas 1 a 7 presentan una banda de aproximadamente 890 pb, resultado de la amplificación del gen *IntI*; además se observan dos bandas adicionales de 500 y 390 pb respectivamente, las cuales corresponden al resultado de la digestión con *SphI*. Ps aer # es el código de cada muestra. Ps aer corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* acompañado del número de muestra. Canaleta 1, Ps aer 31; 2, Ps aer 38; 3, Ps aer 40; 4, Ps aer 44; 5 Ps aer 48; 6, Ps aer 55.



**Figura 7** Gel representativo de la amplificación de la región variable del integrón de clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular (100 pb); C-, control negativo; C+, control positivo. Los amplicones positivos presentaron una o más bandas de 200, 750, 1200, 1300 y 2100 pb. Ps aer # es el código de cada muestra. Ps aer corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* acompañado del número de muestra. Canaleta 1, Ps aer 144; 2, Ps aer 152; 3, Ps aer 175; 4, Ps aer 235; 5, Ps aer 237; 6, Ps aer 238; 7, Ps aer 293; 8, Ps aer 319.



**Figura 8** Gel representativo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para la localización del gen *bla<sub>GES</sub>* dentro de la región variable del integrón clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular (100 pb); C-, control negativo; C+, control positivo. Ps aer # es el código de cada muestra. Ps aer corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* acompañado del número de muestra. Canaletas 1, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15 y 21 presentan una banda de 864 pb correspondiente a aislados cuyo gen *bla<sub>GES</sub>* se encuentra dentro de la región variable del integrón de clase 1.

**10 TABLAS**

**Tabla 1. Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en el presente estudio**

	<b>Código de congelación</b>	<b>Código del Hospital</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Sexo del paciente</b>
1	13 Ps aer	10	01/07/2005	Herida	M
2	16 Ps aer	4	01/07/2005	Biopsia	M
3	17 Ps aer	7	08/07/2005	Herida	F
4	21 Ps aer	459	15/08/2005	Líquido biliar	ND
5	23 Ps aer	274	09/08/2005	Herida	F
6	28 Ps aer	60	09/09/2005	Herida	M
7	29 Ps aer	237	22/09/2005	Esputo	F
8	31 Ps aer	385	22/09/2005	Herida quirúrgica	M
9	38 Ps aer	202	10/09/2005	Herida quirúrgica	M
10	40 Ps aer	189	01/10/2005	Absceso	ND
11	44 Ps aer	848	27/09/2005	Lavado bronquial	F
12	45 Ps aer	773	10/01/2005	Absceso	ND
13	48 Ps aer	835	24/10/2005	Biopsia	M
14	55 Ps aer	925	19/06/2007	Líquido peritoneal	F
15	57 Ps aer	430	13/12/2005	Herida quirúrgica	M
16	95 Ps aer	714	22/03/2006	Herida	F
17	97 Ps aer	483	15/03/2006	Hemocultivo	M
18	98 Ps aer	1442	03/04/2006	Urocultivo	M
19	103 Ps aer	164	05/04/2006	Herida quirúrgica	M
20	104 Ps aer	1042	31/03/2006	Secreción traqueal	F
21	117 Ps aer	1812	25/04/2006	Secreción traqueal	F
22	120 Ps aer	1791	01/04/2006	Esputo	H
23	124 Ps aer	752	26/06/2006	Urocultivo	M
24	130 Ps aer	597	19/05/2006	Secreción traqueal	F

**Tabla 1. Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en el presente estudio (Continuación...)**

	<b>Código de congelación</b>	<b>Código del Hospital</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Sexo del paciente</b>
25	139 Ps aer	2581	20/06/2006	Urocultivo	M
26	140 Ps aer	638	22/06/2006	Secreción traqueal	F
27	142 Ps aer	632	22/06/2006	Líquido peritoneal	M
28	144 Ps aer	2678	26/06/2006	Esputo	F
29	145 Ps aer	639	21/07/2006	Esputo	M
30	150 Ps aer	899	30/06/2006	Secreción traqueal	M
31	152 Ps aer	880	29/06/2006	Herida	M
32	161 Ps aer	3131	15/08/2006	Urocultivo	F
33	167 Ps aer	3532	22/08/2006	Herida quirúrgica	F
34	175 Ps aer	67	01/09/2006	Herida quirúrgica	ND
35	177 Ps aer	276	08/09/2006	Secreción traqueal	M
36	178 Ps aer	259	09/09/2006	Urocultivo	F
37	180 Ps aer	352	11/09/2006	Urocultivo	F
38	181 Ps aer	3869	13/09/2006	Esputo	M
39	191 Ps aer	4149	03/10/2006	Absceso	M
40	192 Ps aer	3940	16/10/2006	Absceso	F
41	194 Ps aer	4272	12/10/2006	Herida	M
42	227 Ps aer	30	02/12/2006	Absceso	M
43	228 Ps aer	26	01/12/2006	Secreción traqueal	M
44	234 Ps aer	5091	29/12/2006	Esputo	M
45	235 Ps aer	565	20/06/2007	Hemocultivo	F
46	236 Ps aer	945	28/12/2006	Secreción traqueal	M
47	237 Ps aer	942	28/12/2006	Secreción traqueal	M
48	238 Ps aer	33	02/01/2007	Secreción traqueal	M
49	243 Ps aer	429	11/01/2007	Hemocultivo	M

**Tabla 1. Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en el presente estudio (Continuación...)**

	<b>Código de congelación</b>	<b>Código del Hospital</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Sexo del paciente</b>
50	262 Ps aer	561	09/02/2007	Líquido pericárdico	F
51	263 Ps aer	561	20/06/2007	Líquido pericárdico	F
52	293 Ps aer	2203	07/06/2007	Urocultivo	M
53	297 Ps aer	1011	30/07/2007	Esputo	M
54	310 Ps aer	4831	15/11/2007	Esputo	M
55	316 Ps aer	832	26/11/2007	Herida quirúrgica	F
56	317 Ps aer	993	30/11/2007	Herida quirúrgica	F
57	318 Ps aer	879	27/11/2007	Esputo	M
58	319 Ps aer	924	28/11/2007	Secreción traqueal	M
59	322 Ps aer	62	03/12/2007	Urocultivo	F
60	323 Ps aer	77	03/12/2007	Secreción traqueal	M
61	324 Ps aer	993	30/11/2007	Herida quirúrgica	F
62	325 Ps aer	87	03/12/2007	Herida quirúrgica	M
63	326 Ps aer	256	08/12/2007	Secreción traqueal	F
64	327 Ps aer	287	09/12/2007	Esputo	F
65	328 Ps aer	241	08/12/2007	Urocultivo	M
66	329 Ps aer	369	11/12/2007	Secreción traqueal	F
67	330 Ps aer	528	16/12/2007	Secreción traqueal	M
68	332 Ps aer	742	22/12/2007	Líquido pleural	M
69	333 Ps aer	768	23/12/2007	Secreción traqueal	F
70	334 Ps aer	744	22/12/2007	Esputo	M
71	335 Ps aer	800	24/12/2007	Herida quirúrgica	F
72	345 Ps aer	963	29/12/2007	Secreción traqueal	F
73	346 Ps aer	975	30/12/2007	Esputo	M
74	348 Ps aer	1	01/02/2008	Líquido pleural	M

**Tabla 1. Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en el presente estudio (Continuación...)**

	<b>Código de congelación</b>	<b>Código del Hospital</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Sexo del paciente</b>
75	349 Ps aer	99	03/02/2008	Líquido peritoneal	M
76	350 Ps aer	525	15/01/2008	Herida	M
77	351 Ps aer	1015	29/01/2008	Pie diabético	F
78	353 Ps aer	1088	31/01/2008	Herida	M
79	355 Ps aer	183	07/02/2008	Secreción traqueal	F
80	356 Ps aer	247	09/02/2008	Secreción faríngea	M
81	362 Ps aer	595	26/09/2008	Secreción traqueal	F
82	365 Ps aer	466	26/09/2008	Espuito	F
83	366 Ps aer	697	26/09/2008	Biopsia	M
84	367 Ps aer	830	26/09/2008	Lavado bronquial	M
85	368 Ps aer	902	26/09/2008	Hemocultivo	M
86	369 Ps aer	138	26/09/2008	Hemocultivo	M
87	373 Ps aer	134	26/09/2008	Prótesis	F
88	377 Ps aer	332	26/09/2008	Secreción traqueal	M
89	379 Ps aer	296	26/09/2008	Absceso	F
90	380 Ps aer	341	26/09/2008	Urocultivo	F
91	381 Ps aer	334	30/09/2008	Herida	F
92	385 Ps aer	468	30/09/2008	Catéter	M
93	386 Ps aer	512	30/09/2008	Líquido peritoneal	M
94	387 Ps aer	531	30/09/2008	Herida quirúrgica	M
95	388 Ps aer	599	30/09/2008	Absceso	F
96	391 Ps aer	873	30/09/2008	Secreción de úlcera	M
97	392 Ps aer	1005	28/03/2008	Espuito	F
98	393 Ps aer	792	30/09/2008	Urocultivo	F
99	402 Ps aer	466	30/09/2008	Secreción de úlcera	F

**Tabla 1. Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en el presente estudio (Continuación...)**

	<b>Código de congelación</b>	<b>Código del Hospital</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Sexo del paciente</b>
100	403 Ps aer	792	22/04/2008	Secreción traqueal	M
101	405 Ps aer	892	30/09/2008	Lavado bronquial	M
102	406 Ps aer	920	30/09/2008	Absceso	F
103	407 Ps aer	856	30/09/2008	Hemocultivo	F
104	408 Ps aer	798	30/09/2008	Esputo	F
105	409 Ps aer	741	30/09/2008	Herida quirúrgica	M
106	410 Ps aer	874	30/09/2008	Secreción traqueal	M
107	411 Ps aer	944	30/09/2008	Herida quirúrgica	F
108	413 Ps aer	153	30/09/2008	Hemocultivo	M
109	414 Ps aer	138	30/09/2008	Esputo	F
110	415 Ps aer	102	30/09/2008	Líquido peritoneal	F
111	416 Ps aer	484	30/09/2008	Urocultivo	M
112	417 Ps aer	580	30/09/2008	Esputo	F
113	418 Ps aer	687	30/09/2008	Herida quirúrgica	F
114	420 Ps aer	218	30/09/2008	Secreción de úlcera	M
115	421 Ps aer	98	01/10/2008	Secreción faríngea	M
116	422 Ps aer	226	01/10/2008	Líquido peritoneal	F
117	423 Ps aer	357	01/10/2008	Esputo	F
118	424 Ps aer	316	01/10/2008	Secreción traqueal	M
119	429 Ps aer	818	01/10/2008	Herida quirúrgica	F
120	430 Ps aer	300	01/10/2008	Esputo	F
121	431 Ps aer	300	01/10/2008	Esputo	F
122	432 Ps aer	299	01/10/2008	Esputo	F
123	433 Ps aer	302	01/10/2008	Esputo	M
124	434 Ps aer	302	01/10/2008	Esputo	M

**Tabla 1. Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en el presente estudio (Continuación)**

	<b>Código de congelación</b>	<b>Código del Hospital</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Sexo del paciente</b>
125	435 Ps aer	302	01/10/2008	Esputo	M
126	436 Ps aer	508	01/10/2008	Herida quirúrgica	M
127	437 Ps aer	508	01/10/2008	Herida quirúrgica	M
128	438 Ps aer	170	01/10/2008	Secreción traqueal	M
129	443 Ps aer	3560	01/10/2008	Esputo	F

Ps aer, *Pseudomonas aeruginosa*; M, masculino; F, femenino; ND, no determinado.

**Tabla 2. Iniciadores utilizados para la detección de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrón de clase 1**

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Blanco</b>	<b>Amplicón</b>	<b>Referencia</b>
<b>GES1A forward</b>	ATGCGCTTCATTCACGCAC	<i>blaGES</i>	864 pb	Poirel <i>et al.</i> , 2000
<b>GES1B reverse</b>	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	<i>blaGES</i>	864 pb	Poirel <i>et al.</i> , 2001
<b>KPC forward</b>	CGGAACCATTCGCTAAACTC	<i>blaKPC</i>	738 pb	Goldfarb <i>et al.</i> , 2009
<b>KPC reverse</b>	GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT	<i>blaKPC</i>	738 pb	Íñiguez, 2010
<b>IntA</b>	ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG	<i>Int1</i>	892 pb	Rosser y Young, 1999
<b>IntB</b>	GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGC	<i>Int2</i>	892 pb	Rosser y Young, 2000
<b>5'CS</b>	GGCATCCAAGCAGCAAG	5'CS	NA	Lévesque <i>et al.</i> , 1995
<b>3'CS</b>	AAGCAGACTTGACCTGA	3'CS	NA	Lévesque <i>et al.</i> , 1996

NA, no aplica; A, adenina; C, citocina; G, guanina y T, timina

**Tabla 3. Presencia-ausencia de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa***

#	Código de congelación	Código Hospital	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones <i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Integrón Clase 1	Región Variable
1	13 Ps aer	10	A	A	A	A	A
2	16 Ps aer	4	P	P	A	P	P
3	17 Ps aer	7	P	A	A	P	P
4	21 Ps aer	459	A	A	A	A	A
5	23 Ps aer	274	A	A	A	A	A
6	28 Ps aer	60	A	A	A	P	P
7	29 Ps aer	237	A	A	A	A	A
8	31 Ps aer	385	P	P	A	P	P
9	38 Ps aer	202	P	P	A	P	P
10	40 Ps aer	189	P	P	A	P	P
11	44 Ps aer	848	P	P	A	A	P
12	45 Ps aer	773	P	A	A	A	P
13	48 Ps aer	835	P	P	A	P	P
14	55 Ps aer	925	P	P	A	P	P
15	57 Ps aer	430	A	A	A	A	A
16	95 Ps aer	714	P	P	A	P	P
17	97 Ps aer	483	A	A	A	A	P
18	98 Ps aer	1442	A	A	A	A	A
19	103 Ps aer	164	P	P	A	P	P
20	104 Ps aer	1042	A	A	A	P	P
21	117 Ps aer	1812	A	A	A	A	A
22	120 Ps aer	1791	A	A	A	A	A
23	124 Ps aer	752	P	A	A	A	P
24	130 Ps aer	597	A	A	A	A	P
25	139 Ps aer	2581	A	A	A	A	P
26	140 Ps aer	638	A	A	A	A	A
27	142 Ps aer	632	A	A	A	A	P
28	144 Ps aer	2678	P	A	A	A	P

**Tabla 3. Presencia-ausencia de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código de congelación	Código Hospital	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones <i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Integrón Clase 1	Región Variable
29	145 Ps aer	639	P	A	A	A	A
30	150 Ps aer	899	A	A	A	A	P
31	152 Ps aer	880	P	A	A	A	P
32	161 Ps aer	3131	A	A	A	A	P
33	167 Ps aer	3532	A	A	A	A	A
34	175 Ps aer	67	P	A	A	P	P
35	177 Ps aer	276	A	A	A	A	P
36	178 Ps aer	259	A	A	A	A	P
37	180 Ps aer	352	A	A	A	A	A
38	181 Ps aer	3869	A	A	A	A	A
39	191 Ps aer	4149	P	P	A	P	A
40	192 Ps aer	3940	A	A	A	A	P
41	194 Ps aer	4272	A	A	A	P	P
42	227 Ps aer	30	A	A	A	P	A
43	228 Ps aer	26	P	P	A	A	P
44	234 Ps aer	5091	A	A	A	P	A
45	235 Ps aer	565	A	A	A	A	P
46	236 Ps aer	945	P	A	A	A	A
47	237 Ps aer	942	P	A	A	P	P
48	238 Ps aer	33	P	P	A	P	P
49	243 Ps aer	429	P	P	A	P	P
50	262 Ps aer	561	A	A	A	A	A
51	263 Ps aer	561	A	A	A	P	P
52	293 Ps aer	2203	A	A	A	A	P
53	297 Ps aer	1011	A	A	A	A	P

**Tabla 3. Presencia-ausencia de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código de congelación	Código Hospital	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones <i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Integrón Clase 1	Región Variable
54	310 Ps aer	4831	A	A	A	A	A
55	316 Ps aer	832	A	A	P	A	P
56	317 Ps aer	993	A	A	A	A	A
57	318 Ps aer	879	A	A	A	P	P
58	319 Ps aer	924	P	P	A	P	P
59	322 Ps aer	62	A	A	A	A	A
60	323 Ps aer	77	A	A	A	A	A
61	324 Ps aer	993	A	A	A	A	P
62	325 Ps aer	87	A	A	A	A	A
63	326 Ps aer	256	A	A	A	A	P
64	327 Ps aer	287	A	A	A	A	A
65	328 Ps aer	241	A	A	P	A	P
66	329 Ps aer	369	A	A	A	A	A
67	330 Ps aer	528	P	P	A	P	A
68	332 Ps aer	742	A	A	A	P	A
69	333 Ps aer	768	P	P	A	P	P
70	334 Ps aer	744	A	A	A	A	P
71	335 Ps aer	800	A	A	P	A	P
72	345 Ps aer	963	A	A	A	A	A
73	346 Ps aer	975	A	A	A	P	P
74	348 Ps aer	1	A	A	A	A	A
75	349 Ps aer	99	A	A	P	A	P
76	350 Ps aer	525	A	A	A	A	A
77	351 Ps aer	1015	A	A	A	P	P

**Tabla 3. Presencia-ausencia de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código de congelación	Código Hospital	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones <i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Integrón Clase 1	Región Variable
78	353 Ps aer	1088	A	A	A	A	A
79	355 Ps aer	183	A	A	A	A	A
80	356 Ps aer	247	A	A	A	P	P
81	362 Ps aer	595	A	A	A	A	A
82	365 Ps aer	466	P	P	A	P	P
83	366 Ps aer	697	A	A	A	P	P
84	367 Ps aer	830	A	A	A	A	P
85	368 Ps aer	902	A	A	A	A	P
86	369 Ps aer	138	A	A	A	A	P
87	373 Ps aer	134	A	A	A	P	P
88	377 Ps aer	332	P	A	A	A	P
89	379 Ps aer	296	A	A	A	P	P
90	380 Ps aer	341	P	P	A	P	P
91	381 Ps aer	334	A	A	A	A	A
92	385 Ps aer	468	A	A	A	A	A
93	386 Ps aer	512	P	P	P	P	P
94	387 Ps aer	531	P	P	A	P	P
95	388 Ps aer	599	P	P	P	P	P
96	391 Ps aer	873	A	A	A	A	A
97	392 Ps aer	1005	P	P	A	P	P
98	393 Ps aer	792	A	A	A	A	A
99	402 Ps aer	466	A	A	A	A	A
100	403 Ps aer	792	P	A	A	A	A

**Tabla 3. Presencia-ausencia de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código de congelación	Código Hospital	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones <i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Integrón Clase 1	Región Variable
101	405 Ps aer	892	A	A	A	A	A
102	406 Ps aer	920	P	A	A	P	P
103	407 Ps aer	856	A	A	A	A	P
104	408 Ps aer	798	A	A	A	A	A
105	409 Ps aer	741	P	A	A	P	P
106	410 Ps aer	874	A	A	A	P	A
107	411 Ps aer	944	A	A	A	P	A
108	413 Ps aer	153	A	A	A	A	A
109	414 Ps aer	138	A	A	A	P	P
110	415 Ps aer	102	A	A	A	A	A
111	416 Ps aer	484	A	A	A	A	A
112	417 Ps aer	580	A	A	A	P	P
113	418 Ps aer	687	A	A	A	A	A
114	420 Ps aer	218	A	A	A	P	A
115	421 Ps aer	98	A	A	A	A	P
116	422 Ps aer	226	P	P	P	P	P
117	423 Ps aer	357	A	A	A	P	P
118	424 Ps aer	316	A	A	A	A	P
119	429 Ps aer	818	A	A	A	P	A
120	430 Ps aer	300	A	A	A	A	P
121	431 Ps aer	300	A	A	A	A	A
122	432 Ps aer	299	A	A	A	A	P
124	434 Ps aer	302	A	A	A	A	P

**Tabla 3. Presencia-ausencia de genes codificantes para tipo Serin- $\beta$ -lactamasas e Integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código de congelación	Código Hospital	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones <i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Integrón Clase 1	Región Variable
125	435 Ps aer	302	A	A	A	A	A
126	436 Ps aer	508	A	A	A	A	P
127	437 Ps aer	508	A	A	A	A	P
128	438 Ps aer	170	A	A	A	P	P
129	443 Ps aer	3560	P	P	A	A	P

Ps aer, *Pseudomonas aeruginosa*; A, ausente; P, presente

## **11 ANEXOS**

**Anexo 1. Perfil fenotípico y genotípico de sensibilidad a carbapenemes y aminoglucósidos en aislados clínicos de  
*Pseudomonas aeruginosa***

#	Código Congelación	Código Hospital	Fecha de aislamiento	Susceptibilidad a antimicrobianos														Genes codificantes para Metallo-β-lactamasas			Genes codificantes para EMAs				Genes codificantes Serin-β-lactamasas					
				Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Hodsuda	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (6')-Ia	<i>ant</i> (2'')-Ia	<i>aph</i> (3')-Via	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones <i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	
1	13 Ps aer	10	01/07/2005	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S	R	R	R	A	P	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A
2	16 Ps aer	4	01/07/2005	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	P	P	A	P	P	A	A	A	P	P	A	
3	17 Ps aer	7	08/07/2005	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S	R	R	R	A	P	A	P	P	A	A	A	P	A	A	
4	21 Ps aer	459	15/08/2005	S	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	
5	23 Ps aer	274	09/08/2005	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	A	P	A	P	A	P	A	A	A	A	A	
6	28 Ps aer	60	09/09/2005	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	P	A	P	A	P	A	A	A	A	A	
7	29 Ps aer	237	22/09/2005	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
8	31 Ps aer	385	22/09/2005	R	I	I	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	A	P	P	A	
9	38 Ps aer	202	10/09/2005	R	I	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	ND	ND	ND	ND	A	A	P	A	P	P	A	
10	40 Ps aer	189	01/10/2005	S	S	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	A	P	A	A	ND	ND	ND	ND	P	P	A	
11	44 Ps aer	848	27/09/2005	R	S	I	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	A	P	A	A	A	P	P	A	P	P	A	
12	45 Ps aer	773	10/01/2005	R	S	S	I	S	I	R	R	R	R	I	S	S	S	R	A	A	A	P	ND	ND	ND	ND	P	A	A	
13	48 Ps aer	835	24/10/2005	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	A	A	A	P	P	A	A	A	P	P	A	
14	55 Ps aer	925	19/06/2007	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	P	A	
15	57 Ps aer	430	13/12/2005	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A	
16	95 Ps aer	714	22/03/2006	R	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	P	A	P	P	P	A	A	P	P	A	
17	97 Ps aer	483	15/03/2006	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	P	A	P	P	P	A	A	A	A	A	

**Anexo 1. Perfil fenotípico y genotípico de sensibilidad a carbapenemes y aminoglucósidos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código Congelación	Código Hospital	Fecha de aislamiento	Susceptibilidad a antimicrobianos														Genes codificantes para Metallo-β-lactamasas			Genes codificantes para EMAs				Genes codificantes Serin-β-lactamasas					
				Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Hodsuda	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (6)-Ia	<i>ant</i> (2)-Ia	<i>aph</i> (3)-Via	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>
18	98 Ps aer	1442	03/04/2006	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	NP	R	I	R	R	ND	ND	ND	ND	A	P	A	A	A	A	A	A
19	103 Ps aer	164	05/04/2006	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	A	P	A	A	ND	ND	ND	ND	P	P	A	A
20	104 Ps aer	1042	31/03/2006	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	P	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A
21	117 Ps aer	1812	25/04/2006	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	I	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	A
22	120 Ps aer	1791	01/04/2006	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	A
23	124 Ps aer	752	26/06/2006	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	NP	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	A	A	A
24	130 Ps aer	597	19/05/2006	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	P	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A
25	139 Ps aer	2581	20/06/2006	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	NP	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A
26	140 Ps aer	638	22/06/2006	S	R	R	R	S	R	S	S	I	I	R	S	S	R	S	A	A	A	P	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A
27	142 Ps aer	632	22/06/2006	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
28	144 Ps aer	2678	26/06/2006	I	I	R	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	P	A	A	A
29	145 Ps aer	639	21/07/2006	S	S	S	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	P	A	A	A
30	150 Ps aer	899	30/06/2006	S	R	S	R	I	I	S	S	R	S	R	S	S	S	S	A	P	A	A	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A
31	152 Ps aer	880	29/06/2006	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	P	A	A	P	A	A	A
32	161 Ps aer	3131	15/08/2006	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	NP	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A
33	167 Ps aer	3532	22/08/2006	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A
34	175 Ps aer	67	01/09/2006	R	S	I	I	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	A	P	A	A	A

## Anexo 1. Perfil fenotípico y genotípico de sensibilidad a carbapenemes ya aminoglucósidos en aislados clínicos de

### *Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)

#	Código Congelación	Código Hospital	Fecha de aislamiento	Susceptibilidad a antimicrobianos														Genes codificantes para Metallo-β-lactamasas			Genes codificantes para EMAs				Genes codificantes Serin-β-lactamasas					
				Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Hodsuda	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (6)-Ia	<i>ant</i> (2'')-Ia	<i>aph</i> (3')-Via	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>
35	177 Ps aer	276	08/09/2006	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	A	
36	178 Ps aer	259	09/09/2006	S	S	S	I	S	R	S	I	S	S	NP	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	
37	180 Ps aer	352	11/09/2006	S	S	S	I	S	R	S	R	S	S	NP	S	R	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	
38	181 Ps aer	3869	13/09/2006	I	I	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	
39	191 Ps aer	4149	03/10/2006	S	I	S	R	S	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S	A	A	A	P	ND	ND	ND	ND	P	P	A	
40	192 Ps aer	3940	16/10/2006	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A	
41	194 Ps aer	4272	12/10/2006	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
42	227 Ps aer	30	02/12/2006	R	S	I	R	S	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	P	A	A	A	
43	228 Ps aer	26	01/12/2006	S	S	S	R	S	R	S	S	R	I	I	S	S	S	S	A	P	A	P	ND	ND	ND	ND	P	P	A	
44	234 Ps aer	5091	29/12/2006	I	S	S	R	S	I	S	I	S	S	S	S	R	S	S	ND	ND	ND	ND	A	P	P	A	A	A	A	
45	235 Ps aer	565	20/06/2007	R	R	R	R	R	R	I	R	I	I	S	R	R	R	R	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	
46	236 Ps aer	945	28/12/2006	S	R	R	R	R	R	I	I	R	I	I	S	R	R	S	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	
47	237 Ps aer	942	28/12/2006	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	A	P	A	A	P	A	A	P	P	A	A	
48	238 Ps aer	33	02/01/2007	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	P	A	
49	243 Ps aer	429	11/01/2007	R	S	I	I	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	A	P	P	A	
50	262 Ps aer	561	09/02/2007	S	S	I	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
51	263 Ps aer	561	20/06/2007	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	P	A	A	A	

**Anexo 1. Perfil fenotípico y genotípico de sensibilidad a carbapenemes y aminoglucósidos en aislados clínicos de  
*Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código Congelación	Código Hospital	Fecha de aislamiento	Susceptibilidad a antimicrobianos														Genes codificantes para Metallo-β-lactamasas			Genes codificantes para EMAs				Genes codificantes Serin-β-lactamasas					
				Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Hodsuda	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (6)-Ia	<i>ant</i> (2)-Ia	<i>aph</i> (3)-Via	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>
52	293 Ps aer	2203	07/06/2007	S	I	I	R	R	R	S	S	S	S	NP	S	R	R	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
53	297 Ps aer	1011	30/07/2007	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
54	310 Ps aer	4831	15/11/2007	S	I	I	R	S	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	A	A	A	P	A	A	P	A	A	A	A	
55	316 Ps aer	832	26/11/2007	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	P	
56	317 Ps aer	993	30/11/2007	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
57	318 Ps aer	879	27/11/2007	R	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	P	A	A	A	A	
58	319 Ps aer	924	28/11/2007	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	P	A	A	A	A	P	P	P	P	A	
59	322 Ps aer	62	03/12/2007	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	NP	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
60	323 Ps aer	77	03/12/2007	S	I	I	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	ND	ND	ND	ND	A	P	A	A	A	A	A	
61	324 Ps aer	993	30/11/2007	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
62	325 Ps aer	87	03/12/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
63	326 Ps aer	256	08/12/2007	S	I	I	R	I	R	R	R	S	R	I	S	S	S	R	A	P	A	P	A	P	P	A	A	A	A	
64	327 Ps aer	287	09/12/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
65	328 Ps aer	241	08/12/2007	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	P	
66	329 Ps aer	369	11/12/2007	S	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
67	330 Ps aer	528	16/12/2007	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	A	P	A	P	A	P	A	A	P	P	A	
68	332 Ps aer	742	22/12/2007	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	A	P	A	P	A	P	A	A	A	A	A	A

**Anexo 1. Perfil fenotípico y genotípico de sensibilidad a carbapenemes y aminoglucósidos en aislados clínicos de  
*Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código Congelación	Código Hospital	Fecha de aislamiento	Susceptibilidad a antimicrobianos														Genes codificantes para Metallo-β-lactamasas			Genes codificantes para EMAs				Genes codificantes Serin-β-lactamasas				
				Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Hodsuda	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (6)-Ia	<i>ant</i> (2)-Ia	<i>aph</i> (3)-Via	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones	<i>bla</i> <sub>GES</sub>
69	333 Ps aer	768	23/12/2007	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	P	A	A	A	A	P	P	P	P	A	
70	334 Ps aer	744	22/12/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
71	335 Ps aer	800	24/12/2007	S	S	S	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	A	P	A	P	ND	ND	ND	ND	A	A	P	
72	345 Ps aer	963	29/12/2007	S	S	S	I	S	I	S	S	R	S	I	S	S	S	A	A	A	P	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
73	346 Ps aer	975	30/12/2007	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	A	P	A	P	A	A	A	A	A	A	
74	348 Ps aer	1	01/02/2008	S	S	S	I	S	S	S	S	S	NP	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
75	349 Ps aer	99	03/02/2008	R	S	I	I	S	I	R	R	S	R	NP	R	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	A	A	P	
76	350 Ps aer	525	15/01/2008	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
77	351 Ps aer	1015	29/01/2008	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	NP	R	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	A	A	A	
78	353 Ps aer	1088	31/01/2008	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	NP	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
79	355 Ps aer	183	07/02/2008	S	S	S	R	S	R	R	I	S	I	NP	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
80	356 Ps aer	247	09/02/2008	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
81	362 Ps aer	595	26/09/2008	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NP	R	R	R	R	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A
82	365 Ps aer	466	26/09/2008	S	S	S	I	S	R	S	R	R	S	NP	S	S	S	S	A	P	A	P	A	A	A	A	P	P	A
83	366 Ps aer	697	26/09/2008	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
84	367 Ps aer	830	26/09/2008	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
85	368 Ps aer	902	26/09/2008	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	

**Anexo 1. Perfil fenotípico y genotípico de sensibilidad a carbapenemes y aminoglucósidos en aislados clínicos de  
*Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código Congelación	Código Hospital	Fecha de aislamiento	Susceptibilidad a antimicrobianos													Genes codificantes para Metallo-β-lactamasas			Genes codificantes para EMAs				Genes codificantes Serin-β-lactamasas					
				Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Hodsuda	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (6')-IIa	<i>ant</i> (2'')-Ia	<i>aph</i> (3')-Via	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones <i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>
86	369 Ps aer	138	26/09/2008	S	I	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	A	A	A	A	
87	373 Ps aer	134	26/09/2008	S	S	S	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	ND	ND	ND	ND	A	P	A	A	A	A	A	
88	377 Ps aer	332	26/09/2008	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	A	A	P	P	A	A	A	P	A	A	
89	379 Ps aer	296	26/09/2008	S	S	S	I	S	I	S	R	S	S	S	S	S	R	ND	ND	ND	ND	A	P	A	A	A	A	A	
90	380 Ps aer	341	26/09/2008	S	S	S	R	S	R	I	R	S	S	NP	S	R	S	S	ND	ND	ND	ND	A	P	A	A	P	P	A
91	381 Ps aer	334	30/09/2008	S	S	S	I	S	I	S	R	R	S	S	S	S	S	P	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	
92	385 Ps aer	468	30/09/2008	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	ND	ND	ND	ND	A	P	P	A	A	A	A
93	386 Ps aer	512	30/09/2008	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	P	P	
94	387 Ps aer	531	30/09/2008	R	S	S	R	S	I	S	R	R	S	S	S	R	R	R	P	A	A	P	P	A	A	A	P	P	A
95	388 Ps aer	599	30/09/2008	R	S	I	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	A	P	P	P
96	391 Ps aer	873	30/09/2008	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	ND	ND	ND	ND	A	P	P	A	A	A	A
97	392 Ps aer	1005	28/03/2008	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	P	A
98	393 Ps aer	792	30/09/2008	S	R	S	I	S	I	R	I	S	R	NP	S	R	S	R	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A
99	402 Ps aer	466	30/09/2008	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
100	403 Ps aer	792	22/04/2008	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	P	P	A	A	ND	ND	ND	ND	P	A	A
101	405 Ps aer	892	30/09/2008	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A	
102	406 Ps aer	920	30/09/2008	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	A	A	

**Anexo 1. Perfil fenotípico y genotípico de sensibilidad a carbapenemes y aminoglucósidos en aislados clínicos de  
*Pseudomonas aeruginosa* (Continuación...)**

#	Código Congelación	Código Hospital	Fecha de aislamiento	Susceptibilidad a antimicrobianos														Genes codificantes para Metallo-β-lactamasas			Genes codificantes para EMAs				Genes codificantes Serin-β-lactamasas		
				Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Hodsuda	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (6')-IIa	<i>ant</i> (2'')-Ia	<i>aph</i> (3')-Via	<i>bla</i> <sub>GES</sub>
103	407 Ps aer	856	30/09/2008	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
104	408 Ps aer	798	30/09/2008	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
105	409 Ps aer	741	30/09/2008	R	I	I	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	ND	ND	ND	ND	P	A	A	P	P	A	A
106	410 Ps aer	874	30/09/2008	I	I	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A
107	411 Ps aer	944	30/09/2008	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	P	A	P	P	A	A	A	A	A	A
108	413 Ps aer	153	30/09/2008	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	P	A	A	P	A	P	A	A	A	A	A
109	414 Ps aer	138	30/09/2008	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
110	415 Ps aer	102	30/09/2008	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A
111	416 Ps aer	484	30/09/2008	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
112	417 Ps aer	580	30/09/2008	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
113	418 Ps aer	687	30/09/2008	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
114	420 Ps aer	218	30/09/2008	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
115	421 Ps aer	98	01/10/2008	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A
116	422 Ps aer	226	01/10/2008	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	P	P
117	423 Ps aer	357	01/10/2008	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
118	424 Ps aer	316	01/10/2008	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	I	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A
119	429 Ps aer	818	01/10/2008	R	S	I	I	S	R	R	R	I	R	I	S	R	P	P	A	P	P	A	A	A	A	A	A

**Anexo 1. Perfil fenotípico y genotípico de sensibilidad a carbapenemes y aminoglucósidos en aislados clínicos de  
*Pseudomonas aeruginosa* (Continuación)**

#	Código Congelación	Código Hospital	Fecha de aislamiento	Susceptibilidad a antimicrobianos														Genes codificantes para Metallo-β-lactamasas			Genes codificantes para EMAs				Genes codificantes Serin-β-lactamasas					
				Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Hodsuda	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (6')-IIa	<i>ant</i> (2'')-Ia	<i>aph</i> (3')-Via	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Integrones	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>
120	430 Ps aer	300	01/10/2008	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A
121	431 Ps aer	300	01/10/2008	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	ND	ND	ND	ND	A	P	A	A	A	A	A	A	
122	432 Ps aer	299	01/10/2008	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A		
123	433 Ps aer	302	01/10/2008	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A		
124	434 Ps aer	302	01/10/2008	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A	A		
125	435 Ps aer	302	01/10/2008	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	A	A	A		
126	436 Ps aer	508	01/10/2008	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	I	ND	ND	ND	ND	A	A	A	A	A	A		
127	437 Ps aer	508	01/10/2008	S	I	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	P	A	A	P	P	P	P	A	A	A		
128	438 Ps aer	170	01/10/2008	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P	P	A	P	A	A	P	A	A	A	A		
129	443 Ps aer	3560	01/10/2008	S	S	R	R	R	R	I	S	R	S	S	R	I	S	P	A	A	P	ND	ND	ND	ND	P	P	A		

Ps aer, *Pseudomonas aeruginosa*; NP, no presenta; R, resistente; S, sensible; I, intermedio; ND, no determinado; A, ausente;

P, presente.