

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

**DETECCIÓN DE GENES PRODUCTORES DE ENZIMAS
MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS (EMAs) EN
AISLADOS HOSPITALARIOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

**Disertación previa a lo obtención del título de Licenciado en
Ciencias Biológicas**

PEDRO MIGUEL BARBA ESTRELLA

Quito, 2010

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Yo, Dra. Iliana Alcocer Negrete, Directora de Disertación, certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Pedro Miguel Barba Estrella, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer Negrete

Quito, 19 de noviembre de 2010

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En la realización del presente trabajo agradezco profundamente a mis padres Pedro Barba y Teresa Estrella, quienes me han enseñado grandes valores morales y de sencillez, y a demás por toda la entrega, sacrificio y apoyo brindado en todo momento; sin ellos, no habría alcanzado esta meta; y a mi hermana Ana Raquel por todas las alegrías, la amistad y los gratos momentos que hemos compartimos.

A la Dra. Iliana Alcocer por toda la confianza depositada en mí y en este trabajo, a más de las enseñanzas y buenos momentos en todos estos años de trabajo. A la Lcda. Mercedes Rodríguez por todo el apoyo y preocupación en todo momento. A la Dra. Laura Arcos Terán por su importante apoyo al laboratorio. A la Dra. Jeannete Zurita por la apertura brindada a todo nuestro equipo de trabajo y especialmente por transmitirnos todo su conocimiento y experiencia.

A David Ortega por toda la ayuda, apoyo y amistad. A Marco, Mario, Juan Pablo, David V. y a todos los amigos y compañeros que han hecho que mi paso por la facultad represente de los mejores años de mi vida.

A Fer, Iry, Sofy, Diana, Anita, por hacer más amenos y entretenidos los largos días de trabajo en el laboratorio.

Y finalmente, a mis grandes amigos Renato, Sebastián, Carlos, Andrés, Jorge, Daniel, por hacerme sentir todo su apoyo y amistad durante tantos años.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
μl	Microlitro
μM	Micromol
2'Ntl	2'-N-etilnetilmicina
5-epi	5-episisomicina
6'Ntl	6'-N-etilnetilmicina
A/A	Ácido sobre ácido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Amk	Amikacina
Apr	Apramicina
ARN	Ácido ribonucleico
Astm	Astromicina
BHI	Infusión cerebro corazón
But	Butirosina
Dbk	Dibekacina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMAs	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
ERIC	Secuencias consenso repetitivas intragénicas de Enterobacterias
F	Femenino
Gm	Gentamicina
GmB	Gentamicina B

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
I	Intermedio
Isp	Isepamicina
K/A	Alcalino sobre ácido
K/K	Alcalino sobre alcalino
KCl	Cloruro de potasio
Km	Kanamicina
Lvdm	Lividomicina
M	Masculino
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MILI	Motilidad Indol Lisina
MIO	Motilidad Indol Ornitina
mM	Milimol
NA	No aplica
NaOH	Hidróxido de Sodio
ND	No determinado
NP	No presenta
Neo	Neomicina
Ntl	Netilmicina
O-F	Óxido Fermentación
PCR	Reacción de cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsado
Prm	Paromomicina

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Ps aer	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
R	Resistente
Rsm	Ribostamicina
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensible
Siso	Sisomicina
Sm	Streptomicina
Spcm	Espectinomicina
TBE	Tris-Boro-EDTA
Tob	Tobramicina
TSB	Caldo tripticasa de soya
TSI	Triple azúcar y hierro
UPGMA	Unweighted Pair Method with Arithmetic Mean

TABLA DE CONTENIDOS

1	RESUMEN.....	1
2	ABSTRACT.....	2
3	INTRODUCCIÓN.....	3
	OBJETIVO GENERAL.....	8
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4	METODOLOGÍA.....	10
	4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	10
	4.2 TRANSPORTE Y CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
	4.3 EXTRACCIÓN DE ADN.....	16
	4.3.1 ELECTROFORESIS.....	17
	4.3.2 ANÁLISIS DE LA ELECTROFORESIS.....	18
	4.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
	4.5 IMPLEMENTACIÓN DE UNA BACTERIOTECA.....	19
	4.6 DETECCIÓN DE GENES PRODUCTORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS (EMAs).....	20
	4.7 TIPIFICACIÓN DE AISLADOS POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS CONSENSO REPETITIVAS INTRAGÉNICAS DE ENTEROBACTERIAS, ERIC.....	21
	4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
5	RESULTADOS.....	24
	5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	24

TABLA DE CONTENIDOS

5.2	TRANSPORTE Y CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
5.3	EXTRACCIÓN DE ADN.....	27
5.4	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
5.5	DETECCIÓN DE GENES PRODUCTORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS (EMAs).....	28
5.6	TIPIFICACIÓN DE AISLADOS POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS CONSENSO REPETITIVAS INTRAGÉNICAS DE ENTEROBACTERIAS, ERIC.....	29
6	DISCUSIÓN.....	33
7	CONCLUSIONES.....	40
8	LITERATURA CITADA.....	43
9	FIGURAS.....	51
10	TABLAS.....	77
11	ANEXOS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto de colonias típicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en medio Agar Nutriente.....	52
Figura 2	Prueba de oxidasa positiva.....	52
Figura 3	Pruebas bioquímicas estándares para identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Figura 4	Porcentaje total de resistencia y sensibilidad a aminoglucósidos en la población total de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Figura 5	Porcentaje de sensibilidad y resistencia a amikacina, gentamicina y tobramicina en la población total de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
Figura 6	Porcentaje de sensibilidad y resistencia a aminoglucósidos dentro de la población de estudio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
Figura 7	Porcentaje de los diferentes Perfiles de resistencia a aminoglucósidos encontrados en los aislados hospitalarios de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Figura 8	Origen de los aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a aminoglucósidos.....	58
Figura 9	Gel representativo de ADN extraído con DNAzol a partir de aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a aminoglucósidos.....	59
Figura 10	Gel representativo del producto de amplificación del gen de proteína de membrana externa <i>oprL</i> (504 pb).....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 11	Gel representativo del producto de amplificación del gen EMAs <i>aac(6')-Ib</i> (395 pb).....	61
Figura 12	Gel representativo del producto de amplificación de genes EMAs.	62
Figura 13	Porcentaje de prevalencia de cada uno de los genes EMAs encontrados en los aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a aminoglucósidos.....	63
Figura 14	Porcentaje de los diferentes perfiles genotípicos encontrados para genes EMAs en los aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a aminoglucósidos.....	64
Figura 15	Gel representativo de la tipificación mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal A.....	65
Figura 16	Análisis de clonalidad de aislados del grupo de análisis clonal A.....	66
Figura 17	Gel representativo de la tipificación mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal B.....	67
Figura 18	Análisis de clonalidad de aislados del grupo de análisis clonal B.....	68
Figura 19	Gel representativo de la tipificación mediante ERIC-PCR de los grupos de análisis clonal C y E.....	69
Figura 20	Análisis de clonalidad de aislados del grupo de análisis clonal C.....	70
Figura 21	Análisis de clonalidad de aislados del grupo de análisis clonal E.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 22	Gel representativo de la tipificación mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal D.....	71
Figura 23	Análisis de clonalidad de aislados del grupo de análisis clonal D.....	72
Figura 24	Gel representativo de la tipificación mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal F.....	72
Figura 25	Análisis de clonalidad de aislados del grupo de análisis clonal F.....	73
Figura 26	Gel representativo de la tipificación mediante ERIC-PCR de los grupos de análisis clonal G y H.....	73
Figura 27	Análisis de clonalidad de aislados del grupo de análisis clonal G.....	74
Figura 28	Gel representativo de la tipificación mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal I.....	74
Figura 29	Análisis de clonalidad de aislados del grupo de análisis clonal G.....	75
Figura 30	Análisis de clonalidad de todos aislados que presentaron genes EMAs.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Datos de origen de los aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> analizados en este estudio	78
Tabla 2	Iniciadores para confirmación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , genes productores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y tipificación.....	81
Tabla 3	Perfil genotípico y subgrupo para genes EMAs observados en aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a aminoglucósidos.....	82

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Susceptibilidad a antimicrobianos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y grupo de análisis clonal.....	86
Anexo 2	Resumen de genes EMAs y su perfil de resistencia a aminoglucósidos.....	92

1 RESUMEN

La resistencia bacteriana a antibióticos representa un problema de salud pública de rápido crecimiento, ocasionado, entre otras causas, por el inadecuado uso de antimicrobianos y la rápida dispersión de genes de resistencia. *Pseudomonas aeruginosa* tiene gran relevancia debido a su alta incidencia en infecciones nosocomiales y al surgimiento de cepas multiresistentes. Los aminoglucósidos representan un grupo de antimicrobianos fundamental en la terapia de infecciones cuyo agente etiológico es *Pseudomonas aeruginosa*. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia / ausencia de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) en aislados hospitalarios de *Pseudomonas aeruginosa*. Para el estudio se analizaron 78 aislados resistentes a aminoglucósidos provenientes de diversas casas de salud. La detección de genes EMAs se realizó mediante PCR usando iniciadores para genes reportados con mayor frecuencia en *Pseudomonas aeruginosa*: *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-VIa*. La tipificación de los aislados se realizó mediante ERIC-PCR. Se encontró una alta prevalencia de genes EMAs dentro de la población de estudio (64,10%). Los genes con mayor prevalencia fueron *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* y *ant(2'')-Ia*. Se observó varios perfiles genotípicos para genes EMAs, prevaleciendo: *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* / *ant(2'')-Ia*, concordando con los perfiles de resistencia encontrados. Los aislados mostraron gran heterogeneidad genómica al analizarlos mediante ERIC-PCR, descartando la posibilidad de que formen parte de un brote epidemiológico. El uso específico y apropiado de aminoglucósidos y prácticas efectivas en el control de infecciones, podrían evitar el desarrollo y diseminación de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a estos antibióticos.

Palabras clave: aminoglucósidos, enzimas modificadoras de aminoglucósidos, *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia, tipificación.

2 ABSTRACT

The bacterial resistance to antibiotics represents a fast-growing health public problem, caused by the inadequate use of antimicrobials and the quick dispersion of the resistance genes. *Pseudomonas aeruginosa* has great relevance due to its high incidence into nosocomial infection and the emergence of multiresistant strains. Aminoglycosides represent an antimicrobial group fundamental in the therapy of pseudomonad infections. The objective of this study was to detect the presence / absence of aminoglycosides modifying enzymes genes (AMEs) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diverse hospitals. For the study, 78 aminoglycosides resistant strains were analyzed; these ones came from several convalescent centers. Detection of AMEs genes was carried out by PCR technique, using primers for the more frequent genes in *Pseudomonas aeruginosa*: *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-VIa*. Typification was carried out by means of ERIC-PCR. A high prevalence of the AMEs genes (64,10%) was found within the studied population. The genes more prevalent were *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* y *ant(2'')-Ia*. Several genotypic profiles were noticed for AMEs genes, prevailing: *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* / *ant(2'')-Ia*, this fact agrees with the opposing profiles. The analysis made by ERIC-PCR showed that the isolated strains had a great genomic heterogeneity, discarding the possibility that they may be a part of an epidemiological outbreak. The specific and suitable use of aminoglycosides, and some effective practices in the control of infections, may avoid the development and dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to these antibiotics.

Key words: aminoglycosides, aminoglycosides modifying enzymes (AMEs), *Pseudomonas aeruginosa*, resistance, typification.

3 INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos de uso clínico representa un problema de salud pública de rápido crecimiento, en gran medida, causado por el uso inadecuado de los agentes antimicrobianos y la rápida dispersión de determinantes genéticos de resistencia; así como, la ausencia de nuevas alternativas terapéuticas (Lepape y Monnet, 2009).

El apareamiento y dispersión de resistencia bacteriana reduce dramáticamente la posibilidad de un tratamiento efectivo, lo cual incrementa de manera significativa el riesgo de complicaciones y la mortalidad de pacientes con infecciones bacterianas graves (Martínez *et al.*, 2007). Adicionalmente, conduce a un aumento en la estancia hospitalaria y costo del tratamiento (Ramón y Fernández-Cruz, 2008), reduciendo de esta manera, la calidad de la atención sanitaria (Isturiz y Carbon, 2000).

A partir de la primera descripción formal de una sustancia con aplicabilidad clínica como antibacteriano realizada por Alexander Fleming en 1927 y su posterior empleo médico, fue evidente un cambio drástico en los porcentajes de mortalidad y efectos secundarios causados por infecciones bacterianas. Sin embargo, la resistencia antibiótica, debida al uso excesivo o abuso de estos fármacos, ha limitado la efectividad de determinados compuestos para el tratamiento de procesos infecciosos (Centers for Disease Control and Prevention, 2009). Dentro de este contexto, juegan un papel crucial su uso sin supervisión médica, por la ausencia de leyes restrictivas para su expendio; el uso indiscriminado, la inadecuada dosificación y el escaso control de calidad en compuestos farmacéuticos; además de varios factores ambientales. Todo esto, aumenta la presión

selectiva responsable del apareamiento y selección de mecanismos de resistencia (Mitra y Rodríguez-Fernández, 2010).

Alrededor de 20 familias de antibióticos han sido desarrolladas y aplicadas en la terapia clínica. Desafortunadamente, para cada uno de estos compuestos, al menos un mecanismo de resistencia ha sido descrito (Sefton, 2002; Levy y Marshall, 2004; Burke y Cunha, 2010). La respuesta adaptativa a la presión selectiva ejercida en el microambiente por el empleo de antibióticos, frecuentemente deriva en el desarrollo de resistencia bacteriana a estos compuestos (Sefton, 2002). Bacterias naturalmente sensibles adquieren resistencia a agentes antibacterianos, mediante mutación genética o por la adquisición de genes de resistencia provenientes de otras bacterias (Sefton, 2002; Sosa *et al.*, 2009).

Los genes de resistencia se encuentran normalmente en elementos de ADN especializados, conocidos como transposones, los cuales permiten su movilidad de un plásmido a otro (Sefton, 2002). Además, genes de resistencia bacteriana, pueden localizarse en integrones (plataformas genéticas de reclutamiento y expresión de genes en cassette). Los cuales poseen la capacidad de integrar en su estructura diversos genes de resistencia a antibióticos (Levy y Marshall, 2004; Ramírez *et al.*, 2010).

Una vez que los cambios mutacionales han tenido lugar, su movilidad entre diferentes bacterias se realiza a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes, tales como: conjugación, transformación y transducción (Dale y Park, 2004). Finalmente, el resultado inevitable de la dinámica de los genes de resistencia bacterianos a los antibióticos, es la dispersión y expansión de cepas multiresistentes, con capacidad de

producir infecciones extremadamente difíciles de tratar y muchas veces asociados a una alta tasa de morbilidad y mortalidad (Sefton, 2002; Levy y Marshall, 2004)

En la Unión Europea se ha estimado 25.000 muertes por año, atribuibles a bacterias multiresistentes, con un costo estimado de 1,5 billones de euros anuales, por concepto de valores extra en el cuidado de la salud y pérdidas de productividad (ECDC/EMEA/ReAct, 2009). Por otro lado, en Latinoamérica se ha estimado que un 15% de los pacientes hospitalizados, adquieren una infección intrahospitalaria, con una mortalidad de entre 5% a 10% (Ramón y Fernández, 2008).

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas y su tratamiento, tienen un costo razonablemente elevado en países Latinoamericanos, donde los fondos para la asistencia sanitaria se encuentran limitados. Este es el caso de Ecuador, donde el 5,1% del Presupuesto General del Estado, ejercicio 2009, fue destinado al sectorial salud, y de este apenas el 1,38% se destinó a programas diseñados para prevenir y tratar enfermedades como rabia, influenza, tuberculosis, dengue, fiebre amarilla, chagas, entre otros (Ministerio de Economía y Finanzas, 2010). Razón por la cual, el tema de la resistencia bacteriana a los antibióticos, debería ser considerado de mayor importancia dentro de las políticas de Estado (Kelley, 2008).

En concordancia con los datos actuales, el problema de la resistencia a antimicrobianos no se resolverá únicamente con la creación de nuevos antibacterianos. Es necesario un esfuerzo cooperativo entre la industria, investigación y el gobierno; incluyendo la implementación simultánea de varias estrategias; como capacitación del personal médico y de enfermería; vigilancia permanente de perfiles de resistencia a los

antimicrobianos; uso normatizado y restringido de antimicrobianos para el tratamiento de infecciones prevalentes; difusión de información sobre eficacia, costo, potencial de inducir resistencia y toxicidad de los antimicrobianos; además de la creación de comités encargados del control de infecciones intrahospitalarias (Organización Panamericana de Salud, 2004; Alanis, 2005; Sosa, 2009).

Cuando el tratamiento de las enfermedades infecciosas se realiza sin tomar razonablemente en cuenta información específica, oportuna y con base en la evidencia, difícilmente puede considerarse una adecuada atención al paciente (Kelley, 2008). Para proporcionar esta información, el estudio de la prevalencia de los distintos agentes patógenos humanos causantes de procesos infecciosos y su resistencia a antimicrobianos, facilita su vigilancia. Estos datos brindan información clave para orientar la elección del tratamiento adecuado y diseñar estrategias locales (Corso *et al.*, 2008).

Entre los principales agentes bacterianos causantes de infecciones nosocomiales graves, *Pseudomonas aeruginosa* es de especial relevancia (Schroeter, 1872), debido a su alta incidencia en infección, particularmente en pacientes que presentan cuadros de fibrosis quística, inmunidad deprimida, quemaduras, alteraciones metabólicas (diabetes), neoplasias malignas y aquellos sometidos a procesos invasivos como el cateterismo (Shahid y Malik, 2005; Romero, 2007). Adicionalmente, *P. aeruginosa* presenta resistencia intrínseca a varias familias de antibióticos de uso clínico como β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. Esto se debe a características relacionadas con baja permeabilidad en la membrana, producción de β -lactamasas cromosómicas de tipo AmpC, reducción de porinas y sobreexpresión de bombas de expulsión activa (Martínez,

2007). Lo cual sumado a su capacidad para adquirir genes de resistencia a otros fármacos, conlleva a altas tasas de fracaso terapéutico (Andrade *et al.*, 2003).

Los aminoglucósidos representan un componente fundamental en la terapia de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, debido a su actividad contra bacterias Gram negativas y por exhibir sinergia con otros antibacterianos, principalmente β -lactámicos (Poole, 2005). Sin embargo, su efectividad en la terapia se ha visto disminuida por la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs); los cuales actúan principalmente sobre kanamicina, neomicina, gentamicina, amikacina y tobramicina (Torres *et al.*, 2000).

Las EMAs catalizan la modificación covalente de grupos amino e hidroxilo en aminoglucósidos; dichas funciones son las encargadas de proporcionar especificidad al antimicrobiano, facilitando la unión al sitio blanco 16S rRNA. La modificación enzimática de los aminoglucósidos se produce mediante tres mecanismos. El primer mecanismo, la acetilación, que es mediada por la acción de las enzimas *N*-acetiltransferasas (AAC), las cuales, utilizan como cofactor la acetil coenzima A, para acetilar grupos amino. El segundo mecanismo, la adenilación, es mediada por la acción de enzimas *O*-adeniltransferasas (ANT), las cuales utilizan como cofactor el ATP, para adenilar grupos hidroxilo. El tercer mecanismo, la forforilación, es mediada por la acción de enzimas *O*-fosfotransferasas (APH), las cuales utilizan como cofactor el ATP, para fosforilar grupo hidroxilo (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Walsh, 2003; Zurita, 2005).

El porcentaje de aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes a aminoglucósidos, varía en función de la localidad; debido principalmente a los patrones de

prescripción, la calidad en el control de la infección y la selectividad de las enzimas sobre estos compuestos (Poole, 2005).

El conocimiento detallado de la prevalencia de estos determinantes de resistencia en nuestro medio, nos permitirá el adecuado uso de dichos agentes en la terapia contra infecciones cuyo agente etiológico es *Pseudomonas aeruginosa*, elevando, de esta manera, la capacidad de los centros hospitalarios para restablecer la salud de los pacientes.

En base a esto, los objetivos del presente estudio fueron:

OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia o ausencia de genes productores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) en aislados hospitalarios de *Pseudomonas aeruginosa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar la identificación fenotípica de la especie *Pseudomonas aeruginosa* de los aislados hospitalarios, de mediante pruebas bioquímicas convencionales.
2. Confirmar la identificación bioquímica de *Pseudomonas aeruginosa* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a través de la amplificación del gen de proteína de membrana externa *oprL*.
3. Implementar una bacterioteca con aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Establecer el perfil genotípico en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* mediante presencia o ausencia de genes de resistencia a enzimas modificadoras de aminoglucósidos por PCR.

5. Tipificar a nivel molecular los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la amplificación por PCR de secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC) para identificar posibles clones.

4 METODOLOGÍA

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio incluyó 78 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* donados por el Departamento de Microbiología de los Zurita&Zurita Laboratorios (Quito - Ecuador). Los 78 aislados fueron pre-seleccionados de una población total de 129 muestras hospitalarias identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*. Estos aislados provienen de varios centros hospitalarios de la ciudad de Quito y se muestrearon en pacientes que presentaron casos documentados de infección microbiana durante enero de 2005 y octubre de 2008. El origen de los aislados, códigos hospitalarios y de congelación; así como las fechas de aislamiento y sexo del paciente se encuentran detallados en el Tabla 1. Tanto la identificación específica, como el perfil de resistencia a antimicrobianos, fue realizado mediante MicroScan® (Dade Behring), en los Zurita&Zurita Laboratorios, siguiendo los criterios de sensibilidad delineados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI, por sus siglas en inglés (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009) y se encuentran detallados en el Anexo 1.

4.2 TRANSPORTE Y CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Para el transporte, los aislados fueron inoculados en placas Petri con agar MacConkey (Difco) en los Zurita&Zurita Laboratorios, y trasladados al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en donde fueron incubados a 35 °C por 18 horas.

Para la confirmación fenotípica de los aislados como *Pseudomonas aeruginosa*, se reaislaron colonias mediante inoculación en placas Petri con agar nutriente (Difco) a partir del agar McConkey (Difco), para luego realizar la respectiva identificación bioquímica en base al perfil de degradación de sustratos, descrito por Callicó *et al.* (2004). El ensayo preliminar de confirmación fenotípica fue el de oxidasa.

Para la prueba de oxidasa se seleccionó una colonia de cada aislado, con la morfología, coloración y olor característico de *P. aeruginosa*, a partir del crecimiento en agar nutriente (Koneman *et al.*, 2006; Martínez, 2007) (Figura 1). Esta prueba se realizó transfiriendo, con un palillo aplicador de madera estéril, una pequeña parte de la colonia seleccionada, a discos de papel absorbente de alta calidad BBL Taxo N Discs para identificación de *Neisseria* y *Pseudomonas* (BD Diagnostic System). *P. aeruginosa* posee un sistema intracelular de oxidasa citocrómica que activa la oxidación del citocromo reducido por oxígeno molecular; el citocromo sirve como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. Los discos poseen el reactivo de oxidasa, monoclóhidrato de *p*-aminodimetilanilina al 6%, el cual es oxidado en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo C, formando así, un compuesto de coloración púrpura, el indofenol. El cambio de coloración revela un ensayo positivo propio de *P. aeruginosa* (Becton, Dickinson and Company, 2003) (Figura 2).

Basándose en lo descrito por Callicó *et al.* (2004), la confirmación fenotípica se la realizó mediante bioquímicas específicas para el género y luego para la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Sólo con las colonias que resultaron positivas para la prueba de oxidasa descrita anteriormente, se procedió a realizar pruebas bioquímicas confirmatorias, las cuales fueron: Triple azúcar hierro (“Triple Sugar Iron”, TSI, Bio-Rad), Motilidad

Indol Ornitina (MIO, Himedia), Motilidad Indol Lisina (MILI, Himedia) y Óxido-Fermentación (O-F, Difco) específicos para el género *Pseudomonas*. La especie *Pseudomonas aeruginosa* se confirmó mediante la incubación y crecimiento en caldo Brain-Heart Infusion (BHI, Difco) a una temperatura de 43 °C durante 18 (Gales *et al.*, 2003) (Figura 3).

La prueba de TSI mide la capacidad de los microorganismos para metabolizar azúcares, puntualmente la sacarosa, dextrosa y lactosa, así como la producción de dióxido de carbono (CO₂) y sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Figura 3A).

La prueba de TSI se realizó inoculando una colonia, con una aguja bacteriológica, mediante picada profunda en la base y estría superficial en el ápice que se encuentra inclinado. De acuerdo a la capacidad enzimática de la bacteria, ésta puede fermentar los azúcares acidificando el medio, y produciendo un cambio de coloración de rojo a amarillo gracias al revelador rojo fenol. En otro caso puede ser que la bacteria sea incapaz de fermentar azúcares, produciendo la alcalinización de las peptonas incluidas en el medio, revelando así un color rojo (Difco, 2009). La reducción del tiosulfato sódico, presente en el medio, a H₂S, se da en ambiente ácido, y este puede ser visible debido a la coloración negra que se observa, gracias a que reacciona con el revelador sulfato ferroso, presente en el medio (Difco, 2009).

El metabolismo de azúcares presentes en el medio TSI puede ocurrir aerobiamente en la superficie o anaerobiamente en la profundidad, o simultáneamente, dependiendo del potencial enzimático del microorganismo en estudio. Se puede observar tres modelos de fermentación: apenas la fermentación de la glucosa (K/A), fermentación de la glucosa,

sacarosa y lactosa (A/A) y la no fermentación de azúcares (K/K) (Alcocer, 2010), ésta última observada en microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*.

La prueba MIO se la usa para evidenciar la motilidad de un microorganismo y la capacidad de producir indol y ornitina descarboxilasa (Figura 3B). Esta prueba se realiza inoculando con una aguja bacteriológica, mediante picada profunda, el medio de agar semisólido MIO (Himedia).

La motilidad se puede evidenciar por turbidez en el medio de cultivo o por una zona difusa de crecimiento alrededor de la línea de inoculación dejada por la aguja bacteriológica (Callicó *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* presenta motilidad gracias a que posee uno o varios flagelos polares (Martínez, 2007).

La producción de indol se evidencia luego de 24 horas de incubación, debido a un anillo de color rojo en la superficie del medio al adicionar 5 gotas del reactivo de Ehrlich sobre el medio de cultivo. Esta reacción evidencia la degradación del triptófano presente en el medio, llevando a la formación de indol, escatol y ácido indol-acético, gracias a la acción del conjunto enzimático triptofanasas. Los productos intermedios formados en mayor cantidad en la degradación del triptófano son el ácido indol pirúvico, que produce indol por desaminación-deaminación, y el escatol formado por la descarboxilación del ácido acético. El reactivo de Ehrlich revela la presencia de indol debido a que lo une a su p-dimetil-amino-benzaldeído, produciendo un compuesto quinoidal de coloración roja (Alcocer, 2010). *P. aeruginosa* no produce un anillo de color rojo al adicionar el reactivo de Ehrlich, revelando un resultado negativo para esta prueba.

La producción de ornitina descarboxilasa se la observa con un color púrpura en todo el medio de cultivo. Al bajar el pH del medio, el indicador púrpura de bromo cresol cambia la coloración del medio a un tono amarillo, el pH ácido brinda las condiciones óptimas de funcionamiento para que la enzima ornitina descarboxilasa degrade la ornitina presente en el medio; esto genera un aumento del pH, lo que promueve un cambio de coloración nuevamente a púrpura por parte del indicador (Difco, 2009). La coloración púrpura en el medio de cultivo, revela un resultado positivo en esta prueba propia de *P. aeruginosa*.

La prueba MILI se la utiliza, con la misma finalidad que la prueba MIO, es decir observar la motilidad de un microorganismo y la producción de indol; pero, adicionalmente, evidencia la producción de descarboxilasa de lisina (Figura 3C). Se la realiza de la manera descrita anteriormente para la prueba MIO, empleando agar semisólido MILI (Himedia).

La producción de descarboxilasa de lisina es evidenciada por una coloración púrpura en todo el medio de cultivo. El crecimiento bacteriano provoca una baja en el pH del medio, debido al uso de la glucosa por el microorganismo, lo cual gatilla el cambio de coloración del medio a un tono amarillo, gracias al indicador púrpura de bromo cresol. El pH ácido brinda las condiciones óptimas para el funcionamiento de esta enzima. Al descarboxilarse la lisina, ésta se transforma en la diamina cadaverina, esto genera un aumento del pH, lo que promueve un cambio de coloración nuevamente a púrpura por parte del indicador de pH. Los cultivos negativos a la descarboxilasa de lisina producen una coloración amarillenta en el medio de cultivo, que puede ser púrpura o roja en la parte superior por el uso de las peptonas a las 24 horas, o más, de incubación (Difco, 2009). *P.*

aeruginosa presenta resultado positivo en esta prueba, al originar una coloración púrpura en el medio de cultivo.

La prueba O-F se la aplica especialmente en bacilos no fermentadores. Las pruebas de fermentación convencionales diseñadas para bacterias como las entéricas, no son adecuadas para aplicarlas en bacterias tales como *P. aeruginosa*, ya que, generalmente, son especies que producen ácidos relativamente débiles gracias a su metabolismo oxidativo; estos ácidos son neutralizados debido al ambiente alcalino presente en el medio de cultivo, resultado del metabolismo de peptonas, generalmente incluidos en este tipo de medios (Hugh y Leifson, 1953; Callicó *et al.*, 2004)

La prueba de óxido fermentación se realizó inoculando la colonia de análisis en el medio de cultivo semisólido basal (O/F) (óxido y fermentación) (Difco), preparado en un tubo de ensayo, realizando picada profunda con la ayuda de una aguja bacteriológica. Para cada aislado se inocularon dos tubos; uno expuesto al oxígeno ambiental, y el otro, cubierto por una delgada capa de glicerol para generar anaerobiosis (Figura 3D y 3E).

En la prueba O-F los organismos fermentadores acidifican todo el medio de cultivo, en ambos tubos, debido a la fermentación de la glucosa. Por su parte, los organismos oxidativos, como *P. aeruginosa*, producen una reacción ácida sólo en el tubo sin sellar, mientras que en el tubo en anaerobiosis, se observa algo o nada de crecimiento bacteriano, sin cambio alguno en la coloración del medio. La acidificación del medio de cultivo produce una coloración amarillenta, debido a la presencia del revelador de pH azul de bromotimol, para pruebas positivas. En organismos que no presentan ni el modelo

oxidativo, ni el modelo fermentativo, los medios contenidos en los dos tubos permanecen sin cambio (Hugh y Leifson, 1953).

Una vez confirmado bioquímicamente el género *Pseudomonas*, se realizó la última prueba, la incubación en caldo de cultivo a 43 °C. Esta es una de las pruebas de mayor validez para la confirmación fenotípica de especie como *P. aeruginosa*, pues a esta temperatura son incapaces de crecer otras especies del género (Callicó *et al.*, 2004). La prueba se realizó inoculando, la colonia en investigación, en caldo de enriquecimiento BHI (Difco). Se incubó a 43 °C por un tiempo de 18 a 24 horas. La turbidez en el caldo de cultivo, evidenció crecimiento bacteriano, representando un resultado positivo para *Pseudomonas aeruginosa* en la prueba (Callicó *et al.*, 2004), como se ve en la Figura 3F.

4.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción del ADN total, usado como templado para todas las pruebas moleculares, se utilizó el reactivo de aislamiento para ADN genómico DNAzol® Reagent (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante, con modificaciones.

Cada uno de los aislados, fue sembrado en placas Petri, con agar nutriente (Difco), mediante estrías discontinuas, a partir del cultivo utilizado para la identificación de especie, con la finalidad de aislar colonias. De cuatro a cinco colonias fueron transferidas a tubos conteniendo 4 ml de caldo de enriquecimiento digerido de soja y caseína Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) e incubadas a 35 °C durante 24 horas.

Una fracción del cultivo (1,5 ml), fue transferido a un tubo eppendorf estéril y centrifugado a máxima velocidad (14.000 rpm) durante 3 minutos (centrífuga Spectrafuge 16M Labnet); se descartó el sobrenadante para conservar el precipitado bacteriano. Se adicionó un mililitro de DNAzol® por cada mililitro de cultivo utilizado, homogeneizando la muestra. Se centrifugó a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf estéril, minimizando, así, la contaminación con fragmentos de tejido insolubles, ARN, exceso de polisacáridos, entre otros, que pudieran afectar la posterior calidad del ADN. Se precipitó el lisado añadiendo 500 µl de etanol absoluto frío, por cada mililitro de DNAzol® utilizado. Se centrifugó la muestra durante 4 minutos a 4.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se lavó dos veces el ADN precipitado con etanol al 75%, luego se resuspendió el precipitado con 200 µl de NaOH 8 mM y se almacenó a -20 °C.

En todas las sesiones de extracción, se empleó 1,5 ml de medio de cultivo TSB estéril como control negativo de extracción, para asegurar un correcto procedimiento.

4.3.1 ELECTROFORESIS

La calidad del ADN fue analizada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (Invitrogen) al 1% diluida en tampón hidroximetil-aminometano 88,9 mM, ácido bórico 88,9 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM (TBE 1 X). A las muestras se les adicionó 5 X Green GoTaq® Flexi Buffer en una proporción de 3 partes de buffer y una 1 parte de muestra. La electroforesis se llevó a cabo aplicando 8,33 V/cm durante 50 minutos en una cámara Gel XL Ultra V-2 (Labnet), conteniendo tampón TBE 0,5 X.

4.3.2 ANÁLISIS DE LA ELECTROFORESIS

La tinción del gel se realizó empleando 5 ml de solución 1 X Sybr Gold 10.000 X en DMSO (Invitrogen), para luego ser visualizado en un transiluminador Safe Imager (Invitrogen) y fotodocumentado en el sistema de captura de imágenes MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems) con la ayuda del programa informático GelCapture 4.5.3.

4.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa*

La identificación genotípica de *Pseudomonas aeruginosa*, se realizó a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante amplificación del gen de proteína de membrana externa *oprL*, único para esta especie. Los iniciadores usados en este procedimiento fueron probados por Xu *et al.* (2004), y se encuentran detallados en la Tabla 2.

Para la PCR se usó como templado el ADN total obtenido en la sección 4.3. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Xu *et al.* (2004), con modificaciones. La reacción de PCR fue estandarizada en un volumen de 25 μ l, conteniendo: 1 μ l de ADN, 800 μ M de deoxinucleótidos fosfato (dNTPmix) (Promega), 0,1 μ M de cada iniciador (Integrated DNA Technologies), 1,25 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂ (Promega); y aforado con agua grado molecular hasta completar el volumen final de reacción. Se empleó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como control positivo de amplificación, y como control negativo se utilizó agua grado molecular.

El programa de amplificación se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PerkinElmer). El programa consistió en una denaturación inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos, los cuales consistieron en un paso de denaturación a 96 °C por 1 minuto, seguido de un paso de hibridación a 57 °C por 40 segundos y un paso de extensión a 72 °C por 1 minuto; finalmente, una extensión a 72 °C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis electroforético.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa como se describe en la sección 4.3.1. Como marcador de peso molecular se utilizó 2 µl de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). La separación de los fragmentos de ADN a través del gel, fue inducida mediante la aplicación de 8,33 V/cm de corriente continua durante 50 minutos en una cámara de electroforesis Gel XL Ultra V-2 (Labnet), conteniendo tampón TBE 0,5 X.

La visualización y fotodocumentación se realizó como se detalla en la sección 4.3.2. El peso molecular de las bandas visualizadas se calculó mediante el programa informático GelAnalyzer versión 2010a freeware.

4.5 IMPLEMENTACIÓN DE UNA BACTERIOTECA

Los aislados confirmados fenotípicamente y genotípicamente como *Pseudomonas aeruginosa* se conservan en congelación. Para esto, cada uno de los aislados fue incubado en 5 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) a 35 °C por 18 horas. Al finalizar el período de incubación, se adicionó 30% de glicerol estéril al medio de cultivo con crecimiento bacteriano. De esta solución, se realizaron alícuotas de 1 ml en tubos

Eppendorf estériles de 1,5 ml, obteniendo así, 6 copias de cada aislado. Tres copias se almacenaron a -20 °C y las restantes tres copias se almacenaron a -85 °C. Adicionalmente, los aislados fueron incubados a 35 °C durante 18 horas en tubos de ensayo 10 x 120 mm con tapa hermética de caucho. Se colocó una etiqueta a cada tubo con sus respectivos datos como especie, número de congelamiento, procedencia y fecha de almacenamiento, y se los mantiene a temperatura ambiente. De esta manera se implementó la bacterioteca con copias a temperatura ambiente, a -20 °C y -85 °C.

4.6 DETECCIÓN DE GENES PRODUCTORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS (EMAs)

La detección de genes EMAs se realizó mediante PCR, amplificando genes específicos, los cuales han sido identificados como productores de enzimas que modifican antibióticos, pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos, detallados en la Anexo 2 (Shaw *et al.*, 1993). Los iniciadores utilizados en esta sección, así como los genes amplificados, fueron analizados por Díaz *et al.* (2004) y Vila *et al.* (1999), y se encuentran detallados en la Tabla 2.

Para la PCR se utilizó como templado el ADN total extraído en la sección 4.3. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Díaz *et al.* (2004), con modificaciones. La reacción de PCR se la estandarizó en un volumen de 25 µl incluyendo: 1 µl de ADN; GoTaq® Green Master Mix (Promega), el cual contiene 1,5 mM de MgCl₂, 800 µM de dNTPs, 1 U de GoTaq® DNA Polymerase y 1 X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5); 25 pM de cada iniciador (Integrated DNA Technologies); se adicionó MgCl₂ para llegar a la concentración final de 3 mM; y agua grado molecular hasta alcanzar

el volumen final de reacción. Como controles positivos se utilizaron las cepa 57 KPN-BLEE para el gen *aac(3)-IIa*, la cepa 68 KPN-BLEE para el gen *aac(6')-Ia*, la cepa 58 KPN-BLEE para el gen *ant(2'')-Ia* (Ortega, 2010) y la cepa 333 Ps aer, para el gen *aph(3')-VIa*. Como control negativo se utilizó agua de grado molecular en lugar de ADN.

El proceso de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PerkinElmer). El programa consistió en una denaturación inicial a 96 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos con denaturación a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 3 minutos; seguido de una extensión final a 72 °C durante 8 minutos. Los productos de la PCR fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis.

Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Invitrogen), como se describe en la sección 4.3.1. La visualización y fotodocumentación se realizó como se describe en la sección 4.3.2. El peso molecular de las bandas visualizadas se calculó mediante el programa informático GelAnalyzer versión 2010a freeware.

4.7 TIPIFICACIÓN DE AISLADOS POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS CONSENSO REPETITIVAS INTRAGÉNICAS DE ENTEROBACTERIAS, ERIC

Análisis genéticos detallados, de individuos dentro de una misma especie, nos ayudan a visualizar la variabilidad genética de una población; en este caso, entre aislados bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa*. La tipificación molecular bacteriana es una

herramienta útil en estudios epidemiológicos, y ayuda a conocer y comprender el comportamiento de diferentes poblaciones bacterianas, relacionadas con procesos específicos de infecciones intrahospitalarias (Bhattacharya *et al.*, 2003; Espinal *et al.*, 2004).

Para la tipificación molecular de aislados de *P. aeruginosa*, se utilizó la técnica de amplificación por PCR de elementos repetitivos conocidos como secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias, ERIC, por sus siglas en inglés “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (Versalovic *et al.*, 1991). A pesar de ser secuencias descritas en enterobacterias, la aplicabilidad de esta técnica ha sido ampliamente demostrada para ensayos de tipificación para diversas especies bacterianas, entre ellas *P. aeruginosa*.

En la tipificación ERIC-PCR se utilizó los iniciadores descritos por Versalovic *et al.* (1991), y confirmados por Appuhamy *et al.* (1997) y Mishra *et al.* (2001), los cuales se encuentran detallados en la Tabla 2.

Para la PCR se utilizó como templado el ADN total extraído en la sección 4.3. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Bhattacharya *et al.* (2003), con modificaciones. La reacción de PCR se estandarizó en un volumen de 26 μ l, conteniendo: 1,3 μ l de ADN; GoTaq® Green Master Mix (Promega), el cual contiene 1,5 mM de $MgCl_2$, 800 μ M de dNTPs, 1 U de GoTaq® DNA Polymerase y 1 X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5); 2 μ M de cada iniciador (Promega); se adicionó $MgCl_2$ (Promega) para llegar a una concentración final de 3,3 mM y GoTaq® Flexi DNA

Polymerase (Promega) hasta alcanzar una concentración final de 2 U. Se utilizó como control negativo de amplificación agua grado molecular en lugar de ADN.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PerkinElmer). El programa consistió de una denaturación inicial a 98 °C durante 5 minutos; seguido de 35 ciclos que corresponden a denaturación a 92 °C durante 30 segundos, hibridación a 47 °C durante 1 minuto y extensión a 70 °C durante 3 minutos; y una extensión final a 70 °C durante 8 minutos. Los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Invitrogen), como se describe en la sección 4.3.1. La visualización y foto documentación se realizó siguiendo lo descrito en la sección 4.3.2.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis porcentual de los resultados se realizó empleando el programa informático Microsoft Office Excel 2007 (©2008 Microsoft Corporation). Para el análisis de clonalidad, resultado de la tipificación mediante ERIC-PCR, los aislados fueron separados en subgrupos, basándose en el perfil genotípico que presentaron, para genes EMAs (Tabla 3). Los productos de PCR fueron analizados mediante el programa informático BioNumerics (versión 6.1), utilizando el coeficiente de Dice, empleando el método UPGMA (Unweighted Pair Method with Arithmetic Mean). La relación clonal fue analizada comparando el patrón de bandas que presentaron los aislados dentro de cada subgrupo.

5 RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los 78 aislados analizados en el presente estudio (Tabla 1), fueron pre-seleccionados en base a la resistencia a aminoglucósidos que presentaron. Estos aislados representan el 60,46% de resistencia a esta familia de antimicrobianos, registrado durante el período de muestreo, enero de 2005 y octubre de 2008. El 39,53% (51 aislados) fue sensible (Figura 4). Los aminoglucósidos probados en la técnica de MicroScan fueron amikacina, gentamicina y tobramicina; evidenciando 42 aislados (32,56%) resistentes a amikacina, 77 aislados (59,69%) resistentes a gentamicina y 56 aislados (43,41%) resistentes a tobramicina (Figura 5).

Dentro de la población de estudio, el número de aislados registrados como resistentes a amikacina fueron 42 aislados (53,85%), 77 aislados fueron resistentes a gentamicina (98,72%) y 56 aislados fueron resistentes a tobramicina (71,79%) como se representa en la Figura 6. De los 78 aislados resistentes a aminoglucósidos 16 aislados (20,51%) presentaron resistencia únicamente a gentamicina, 1 aislado (1,28%) presentó resistencia sólo a amikacina y no se encontró aislados resistentes únicamente a tobramicina (0%). Por otra parte 20 aislados (25,64%) mostraron resistencia conjunta a gentamicina y tobramicina, 5 aislados (6,41%) mostraron resistencia a amikacina y gentamicina, y no se encontraron aislados con el perfil de resistencia amikacina y tobramicina (0%), y 36 aislados (46,15%) mostraron resistencia a los tres antibióticos (Figura 7).

El origen de los aislados que comprende la población de estudio, se describe en la Figura 8 (Tabla 1). De los 78 aislados, 17 (21,79%) provienen de aspirado traqueal, 14 (17,95%) fueron aislados de esputo, 11 (14,10%) se originaron de herida quirúrgica, 7 (8,97%) son de herida, 5 (6,41%) provienen de hemocultivo y en igual cantidad de abscesos y urocultivo respectivamente, 3 (3,85%) fueron aislados de líquido peritoneal, 2 (2,56%) de biopsia, y 1 (1,28%) aislado proviene de catéter, lavado bronquial, líquido biliar, líquido pericárdico, líquido pleural, pie diabético, prótesis, secreción de úlcera y secreción faríngea respectivamente. Por otro lado, 44 (56,41%) aislados provienen de pacientes del sexo masculino, 31 aislados (39,74%) son de pacientes del sexo femenino y 3 aislados (3,85%) no registraron datos del sexo del paciente.

5.2 TRANSPORTE Y CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Se seleccionaron colonias típicas de *P. aeruginosa*, las cuales presentaron morfología alargada y plana, con centro elevado, coloración verde amarillenta en la mayoría de los casos y un distintivo olor frutal (Figura 1). Los 78 aislados presentaron un resultado positivo al realizar la prueba de oxidasa, revelando, al cabo de 20 minutos, el esperado cambio de coloración a púrpura, en los discos BBL Taxo N Discs (Figura 2).

En la prueba TSI, se observó un modelo de fermentación K/K (alcalino/alcalino). Este resultado es el esperado para microorganismos que no poseen la capacidad de fermentar carbohidratos, como la glucosa, sacarosa y lactosa, incluidos en el medio; este es el caso de *P. aeruginosa*. Además, no se observó producción de gas (CO₂) ni reducción del

tiosulfato sódico a H_2S , evidenciado por la ausencia de precipitado de coloración negra en el medio de cultivo (Figura 3A).

En la prueba MIO, todos los aislados presentaron una zona difusa alrededor de la línea de inoculación, evidenciando la motilidad de la bacteria. No se registró producción de indol, ya que, al agregar el reactivo de Ehrlich, éste no produjo un anillo de coloración roja, propia de pruebas positivas; lo cual demostró la ausencia de triptofanasas. Finalmente, se evidenció la producción de ornitina descarboxilasa por la coloración púrpura presente en todo el medio de cultivo, revelado por el indicador de pH, bromo cresol (Figura 3B).

En la prueba MILI, aparte de confirmar la motilidad y la incapacidad de producir indol, se evidenció la presencia de descarboxilasa de lisina, gracias a la coloración púrpura, presente en todo el medio, generado por el indicador de pH, bromo cresol, dando un resultado positivo (Figura 3C).

La prueba O-F, fue positiva para organismo oxidativo, debido a la coloración amarillenta que mostró el medio de cultivo expuesto al oxígeno ambiental, evidenciando la oxidación de la glucosa presente en el medio, acidificándolo (Figura 3E). El tubo sometido a anaerobiosis no presentó crecimiento bacteriano, y la coloración del medio de cultivo se mantuvo sin cambios, evidenciando la incapacidad de la bacteria para fermentar azúcares (Figura 3D).

La especie *P. aeruginosa* se pudo confirmar gracias al desarrollo bacteriano que presentó la prueba de crecimiento en caldo de cultivo, incubado a 43 °C; esto se evidenció por el aspecto turbio del medio de cultivo, al cabo de 18 horas de incubación (Figura 3F).

5.3 EXTRACCIÓN DE ADN

El protocolo de extracción utilizado en el presente estudio, evidenció ser el óptimo para *Pseudomonas aeruginosa*. La electroforesis horizontal en gel de agarosa, permitió visualizar una buena calidad del ADN extraído, el cual, es necesario para pruebas moleculares, como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicada en este estudio. El control negativo de extracción empleado (caldo TSB estéril) no evidenció rastro alguno de ADN, al ser visualizado en geles de agarosa, lo que nos revela un correcto proceso de extracción y la obtención de muestras libres de contaminantes, los cuales, pudieran modificar posteriores resultados (Figura 9).

5.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa*

Los 78 aislados analizados (100%) fueron confirmados como *Pseudomonas aeruginosa*, a nivel molecular. Al visualizar los productos de PCR, sometidos a electroforesis horizontal en gel de agarosa, se logró evidenciar una banda a la altura de 500 pb, en relación al marcador de peso molecular (Figura 10).

El resultado del análisis mediante el programa informático GelAnalyzer, evidenció el peso molecular de la banda, en 500 ± 5 pb, el cual es el esperado para el amplicón

generado por los iniciadores utilizados. Esto confirmó la presencia del gen *oprL* propio de *P. aeruginosa*; confirmando así, la especie bacteriana.

5.5 DETECCIÓN DE GENES PRODUCTORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS (EMAs)

Al visualizar los productos de PCR, sometidos a electroforesis horizontal en gel de agarosa, se observó 4 bandas claramente diferenciadas. Estas bandas migraron distancias específicas, gracias al heterogéneo peso molecular que poseen.

Comparadas con el marcador de peso molecular, las bandas corresponden a los genes *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* y *aph(3')-VIa*, con pesos moleculares de 196, 395, 304 y 234 pb respectivamente, producto de los iniciadores utilizados, como se ve en las Figuras 11 y 12.

El resultado del análisis mediante el programa informático GelAnalyzer, arrojó pesos moleculares de 196 ± 5 pb para el gen *aac(3)-IIa*, 390 ± 5 pb para el gen *aac(6')-Ib*, 300 ± 5 pb para el gen *ant(2'')-Ia* y 230 ± 5 pb para el gen *aph(3')-VIa*; confirmando la presencia de los genes estudiados (Figura 12).

De los 78 aislados analizados, 50 (64,10%) presentaron al menos uno de los cuatro genes EMAs referentes en este estudio, mientras que los 28 aislados restantes (35,90%) no evidenciaron la presencia de genes.

De los 50 aislados que poseen genes EMAs, 27 aislados (34,62%) presentaron el gen *aac(3)-IIa*, 21 (26,92%) presentaron el gen *aac(6')-Ib*, 13 (16,67%) presentaron el gen *ant(2'')-Ia* y 6 aislados (7,69%) presentaron el gen *aph(3')-VIa* (Figura 13).

El perfil genotípico para genes EMAs observados en los aislados resistentes a aminoglucósidos, se detalla en la Tabla 3. De los 50 aislados que evidenciaron presencia de genes EMAs, 19 (24,36%) presentaron únicamente el gen *aac(3)-IIa*, 11 (14,10%) aislados presentaron sólo el gen *aac(6')-Ib*, 4 (5,13%) presentaron sólo el gen *ant(2'')-Ia* y ningún aislado fue identificado únicamente con el gen *aph(3')-VIa*. En los aislados restantes, se logró identificar diferentes perfiles de presencia para genes EMAs; así, el perfil *aac(6')-Ib / ant(2'')-Ia* se identificó en 6 aislados (7,69%), el perfil *aac(3)-IIa / aph(3')-VIa* se identificó en 4 aislados (5,13%), el perfil *aac(3)-IIa / aac(6')-Ib* se identificó en 3 aislados (3,85%), el perfil *ant(2'')-Ia / aph(3')-VIa* se identificó en 2 aislados (2,56%) y el perfil *aac(3)-IIa / aac(6')-Ib / ant(2'')-Ia* se identificó sólo en un aislado (1,28%); ningún aislado presentó los cuatro genes. A esto se incluye 28 aislados (35,90%) que no evidenciaron la presencia de ninguno de los genes estudiados (Figura 14 y Tabla 3).

5.6 TIPIFICACIÓN DE AISLADOS POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS CONSENSO REPETITIVAS INTRAGÉNICAS DE ENTEROBACTERIAS, ERIC

En la población de estudio, se encontró 9 perfiles genotípicos diferentes, lo cual, fue la base para el estudio clonal mediante tipificación por ERIC-PCR. La población se dividió así, en 9 sub-grupos de análisis clonal, detallados en la Tabla 3.

Al visualizar los productos de PCR, sometidos a electroforesis horizontal en geles de agarosa, se evidenció la amplificación de diversos fragmentos de ADN; los cuales, variaron en cantidades de 8 a 30 fragmentos de diferente intensidad, evidenciando la existencia de distintos patrones de bandas. Al ser comparados con el marcador de peso molecular (100 pb), arrojaron pesos moleculares en un rango aproximado entre 50 pb a 3600 pb.

En el grupo A, el número de fragmentos de ADN amplificado va desde 9 hasta 19 fragmentos. Al compararlos con el marcador de peso molecular, se pudo constatar que tienen un rango de peso entre 57 pb hasta 3445 pb (Figura 15). El análisis de clonalidad presentó dos grupos con relación clonal elevado; el primer grupo comprendido por los aislados 104 Ps aer, 351 Ps aer y 362 Ps aer; y el segundo grupo integrado por los aislados 57 Ps aer, 175 Ps aer y 243 Ps aer (dos de los cuales con un índice de similaridad de 100), mostrados en la Figura 16.

En el grupo B, el número de fragmentos amplificados fue de 12 a 19. Comparando estos fragmentos con el marcador de peso molecular, se observó un rango de peso entre 72 pb hasta 3301 pb (Figura 17). Todos los 11 aislados analizados en este grupo mostraron tener heterogeneidad genética, sin presentar aislados con el mismo patrón de bandas, o grupos clonales. Los aislados más relacionados entre sí fueron: 98 Ps aer y 23 Ps aer; 28 Ps aer y 413 Ps aer; 373 Ps aer y 379 Ps aer (Figura 18).

En el grupo C, el número de fragmentos amplificados encontrados fue de 18 a 21. Comparados con el marcador molecular, poseían un rango de peso de 69 pb hasta 3532 pb (Figura 19). Los 4 aislados analizados en este grupo, no evidenciaron formación de grupos

clonales, siendo los más relacionados el aislado 38 Ps aer y el aislado 318 Ps aer (Figura 20).

En el grupo D, el número de fragmentos amplificados observados fue de 21 hasta 23, y al compararlos con el marcador de peso molecular mostraron un rango de peso molecular de 88 pb hasta 2295 pb (Figura 22). Los aislados 95 Ps aer y 97 Ps aer presentaron un índice de similaridad mayor a 97; el aislado 152 Ps aer demostró una mayor divergencia genotípica (Figura 23).

En el grupo E se encontraron de 15 a 22 fragmentos amplificados, los cuales tenían un rango peso de 105 pb a 3503 pb (Figura 19). Entre los tres aislados analizados aquí, no se encontraron grupos clonales. Los aislados más relacionados genotípicamente, aunque distantes entre sí, fueron el 227 Ps aer y 237 Ps aer (Figura 21).

En el grupo F se encontraron un rango de entre 15 a 30 fragmentos amplificados, los cuales, al ser comparados con el marcador de peso molecular, mostraron un rango de peso entre 65 pb hasta 3385 pb (Figura 24). Se encontraron dos grupos relacionados entre sí; el primer grupo comprendido por los aislados 44 Ps aer, 385 Ps aer y 391 Ps aer; y el segundo grupo formado por los aislados 45 Ps aer, 234 Ps aer y 326 Ps aer (Figura 25).

En el grupo G, el cual comprende únicamente los aislados 319 Ps aer y 333 Ps aer, se visualizó 20 y 21 fragmentos amplificados, respectivamente, con un rango de peso de 69 pb hasta 3419 pb (Figura 26). No mostraron relación genotípicamente representativa (Figura 27).

En el grupo H, al cual únicamente pertenece el aislado 437 Ps aer, se observó 14 fragmentos amplificados, el menor de un peso molecular de 136 pb, y el mayor de un peso molecular de 1904 pb (Figura 26).

En el grupo I, al cual pertenecen los aislados que no presentaron genes EMAs, se observaron entre 8 y 23 fragmentos amplificados, con un rango de peso molecular de 98 pb hasta 3384 pb (Figura 28). En el análisis clonal se logró observar que los aislados 235 Ps aer y 346 Ps aer presentaron un índice de similaridad de 100; por otro lado, los aislados 117 Ps aer, 381 Ps aer y 181 Ps aer su relación clonal fue elevada; al igual que los aislados 13 Ps aer y 177 Ps aer; 419 Ps aer y 421 Ps aer (Figura 29).

En la Figura 30 se observa el análisis de clonalidad entre todos los aislados con presencia de genes EMAs. Los mayores niveles de similaridad se observó entre aislados del mismo grupo de análisis clonal, con excepción de los aislados 319 Ps aer y 323 Ps aer, pertenecientes a los grupos G y B respectivamente, los cuales mostraron un índice de similaridad de 88.

6 DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana a aminoglucósidos en infecciones ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa* ha sido reportada en varios países alrededor del mundo, con especial énfasis, en Latinoamérica y Europa (Poole, 2005; Andrade *et al.*, 2003; Vakulenko y Mobashery, 2003; Gales *et al.*, 2001). Los altos porcentajes de resistencia a los antimicrobianos de la familia de aminoglucósidos analizados en este estudio, concuerdan con otros estudios como el de la Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana - Ecuador, REDNARBEC (2008) y de igual manera, con porcentajes reportados por varios autores (Shahid y Malik, 2005; Vakulenko y Mobashery, 2003).

Diversos estudios han registrado porcentajes altos de resistencia a gentamicina en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* de origen nosocomial (Stratchounski *et al.*, 1998; Shahid y Malik, 2005). En el presente estudio se registró un alto porcentaje de aislados resistentes (60,46%); fenómeno posiblemente relacionado a los patrones de prescripción regionales, su generalizado uso empírico y su temprana adición al arsenal terapéutico (Mella *et al.*, 2004; García e Yturralde, 2005).

A pesar de que gentamicina poseer una toxicidad importante, estudios de dosificación han ayudado a disminuir los efectos secundarios de su administración, obteniendo buenos resultados con la implementación de monodosis diarias (Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999; Mella *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha registrado una prevalencia alta de genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos, que confieren resistencia a esta droga, al compararla con otros determinantes genéticos EMAs, que producen resistencia a otros antibióticos de la misma familia. (Shaw *et al.*,

1993). En concordancia, en este trabajo se observaron patrones similares de prevalencia, en donde, los genes EMAs relacionados con la resistencia a gentamicina, alcanzaron niveles aproximados al 50%.

Antibióticos tales como tobramicina, amikacina (analizados aquí), neomicina y netilmicina; se encuentran sujetos a los iguales fenómenos en el surgimiento de resistencia y diseminación de la misma (Guerrero *et al.*, 2003). Sin embargo, restricciones en su uso, como dosificación y uso tópico, han limitado la presión selectiva, la cual ayuda a mantener niveles altos de susceptibilidad (Schmitz *et al.*, 1999; Poole, 2005). No obstante el presente estudio registró resistencia a estos antibióticos en tasas relativamente altas, al igual que los determinantes genéticos involucrados e incluidos en el estudio (Shaw *et al.*, 1993).

A pesar de la presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos en el medio hospitalario, estos compuestos mantienen su vigencia en la terapia de infecciones ocasionadas por el agente etiológico *Pseudomonas aeruginosa* (Mella *et al.*, 2004; Poole, 2005; Vakulenko y Mobashery, 2003), debido, especialmente, a su frecuente uso en sinergia con antibióticos de otras familias (en su mayoría β -lactámicos con actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*), principalmente en casos de neumonía bacteriana ocasionada por éste patógeno (Vallés y Mariscal, 2005; Poole, 2005; Raja y Singh, 2007). Dicha característica es de gran utilidad en el tratamiento de infecciones graves causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, la cual puede reducir el uso de agentes antibacterianos de última generación, como carbapenemes (Vallés y Mariscal, 2005), aportando tanto a la vigencia de estos compuestos, como a conservar líneas de defensa para casos de infección con cepas resistentes a aminoglucósidos (Poole, 2005); además de reducir el costo del tratamiento (Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999).

La tasa de resistencia bacteriana a los aminoglucósidos, al igual que a otros antimicrobianos, experimenta importantes variaciones geográficas, probablemente ocasionadas por diferencias en los patrones de prescripción y dosificación de los antibióticos, observado entre países y regiones. Adicionalmente, la calidad en las prácticas y programas de control y vigilancia de infecciones nosocomiales aportan al surgimiento de perfiles localizados de resistencia (Vakulenko y Mobashery, 2003; Poole, 2005).

La mayor resistencia observada a gentamicina en este estudio, puede ser el resultado de dichas diferencias regionales en las políticas del uso de antimicrobianos. La prescripción preferencial de dicho antibiótico, en la terapia de infecciones cuyo agente etiológico es *Pseudomonas aeruginosa*, sugiere una correlación con la resistencia presentada por los aislados estudiados (Aliño *et al.*, 2007; Organización Panamericana de la Salud, 2004). De igual forma, propone una sincronía con la prevalencia del gen *aac(3)-IIa* observada en mayor porcentaje en el análisis molecular. Éste gen confiere resistencia a gentamicina tobramicina, dibekacina y sisomicina, más no a amikacina; siendo el principal componente genético de resistencia a aminoglucósidos; por otro lado, los productos de genes pertenecientes al grupo *aac(3)-II*, han demostrado ser el principal mecanismo de resistencia a aminoglucósidos en *Pseudomonas aeruginosa* (Zurita, 2005).

En consecuencia, la alta resistencia hacia tobramicina, puede deberse a la relación genética que comparte con gentamicina (Vakulenko y Mobashery, 2003; Shaw *et al.*, 1993). Caso similar es descrito en Estados Unidos, en donde la predominancia encontrada del gen *ant(2'')-I*, responsable de la resistencia a gentamicina, es ocasionada por la propensión hacia el uso de este antimicrobiano en la terapia de infecciones ocasionadas por

P. aeruginosa (Vakulenko y Mobashery, 2003). El gen *ant(2'')-Ia* arrojó un porcentaje moderadamente alto en este estudio.

Por otro lado, el alto porcentaje de resistencia observado a gentamicina, puede ser explicado en este sentido, el alto porcentaje en el que se registraron los perfiles de resistencia hacia gentamicina y a gentamicina / tobramicina, dentro de este trabajo, puede ser el resultado de la prevalencia de los perfiles genotípicos *aac(3)-IIa* y *aac(6')-Ib* / *ant(2'')-Ia*; este último perfil genético confiere, además, resistencia a amikacina. El nivel alto de resistencia a amikacina se ve reflejado, de igual manera, por el alto índice de ocurrencia del gen *aac(6')-Ib* (Shaw *et al.*, 1993; Poole, 2005).

La capacidad de los aislados para producir enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) se estableció determinando la presencia o ausencia de los elementos genéticos que los codifican. Los genes analizados fueron aquellos reportados con mayor frecuencia en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Shaw *et al.* (1993) realizó un estudio que incluyó 728 aislados de *P. aeruginosa*, en el cual, los genes con mayor incidencia encontrados fueron *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* y *aph(3')-VIa*. Similares resultados, fueron los arrojados por Vakulenko y Mobashery (2003) y Díaz *et al.* (2004).

La inactivación mediada por enzimas modificadoras de aminoglucósidos es el principal mecanismo de resistencia bacteriana a esta familia de antimicrobianos (Mella *et al.*, 2004; Poole, 2005; Shaw *et al.*, 1993). Sin embargo, la existencia de mecanismos alternos de resistencia descritos para aminoglucósidos, tales como: impermeabilidad de la membrana externa, ocasionada por mutaciones en porinas; eflujo del antimicrobiano,

mediado por sobreexpresión de sistemas de expulsión activa; y mutaciones en el sitio blanco 16s rRNA (Poole, 2005; Mella *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 1993), juegan un papel importante en los porcentajes de resistencia a estos antimicrobianos, aumentando la complejidad de su epidemiología (Vakulenko y Mobashery, 2003).

En el presente trabajo, el 33,90% de aislados de la población de estudio no presentó genes EMAs. Consecuentemente, en los aislados que no presentaron genes EMAs, la resistencia observada a aminoglucósidos podría ser esperada por la existencia de uno o varios de los mecanismos de resistencia mencionados. La impermeabilidad de membrana externa, el eflujo del antimicrobiano y mutaciones en el sitio blanco, no fueron incluidos en este estudio.

Al igual que otros mecanismos de resistencia, los genes productores de EMAs se encuentran localizados frecuentemente en plataformas genéticas móviles, tales como plásmidos y transposones (Vakulenko y Mobashery, 2003; Mella *et al.*, 2004; Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999). Sin embargo, varios estudios han localizado ciertos genes EMAs, (*ant(2'')*-I y *aac(6')*-I, por ejemplo), dentro de integrones, con mayor frecuencia que otros determinantes genéticos de resistencia, lo cual puede explicar, en parte, la ubicuidad de dichos genes y el apareamiento de cepas multiresistentes (Xu *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2003).

Una amplia variedad de métodos se encuentran disponibles para la caracterización y comparación de aislados bacterianos, dentro de los cuales, los métodos genotípicos alcanzan el mayor poder discriminatorio (Belkum, 1994; Syrmis *et al.*, 2004; Olive y Bean, 1999). La elección del método o combinación de métodos más adecuado para el tipaje de

un grupo de aislados, se encuentra relacionado principalmente con su nivel de discriminación (Singh *et al.*, 2006). La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es la técnica estándar de referencia para tipificación de microorganismos, gracias a su elevado poder de discriminación y su excelente reproducibilidad; no obstante, su uso es limitado por factores tales como, costo, complejidad, uso de enzimas de restricción y tiempo de realización (Fernández-Cuenca, 2004; Atkinson *et al.*, 2006).

En el presente estudio se empleó como método de tipificación la técnica de ERIC-PCR, la cual se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 horas) y su relativo bajo costo; siendo de mucha utilidad en el análisis de grandes poblaciones. (Fernández-Cuenca, 2004; Iglesias *et al.*, 2008).

Los genes EMAs están asociados generalmente a plásmidos y transposones (Poole, 2005; Walsh, 2003); por otro lado, las secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias se encuentran únicamente en el cromosoma (Versalovic *et al.*, 1991; Wilson y Sharp, 2006). En consecuencia, la ocurrencia de patrones similares de bandas en aislados que poseen diferente perfil genotípico, al ser analizarlos con ERIC-PCR, puede ser el resultado de la ubicación plasmidial de los elementos de resistencia en dichos aislados (Wilson y Sharp, 2006) En tal motivo, la inclusión de información adicional de las muestras analizadas, tal como presencia de genes de resistencia, puede ayudar a corregir este sesgo (Cejas *et al.*, 2008).

En base a esta información, la tipificación se realizó dentro de subgrupos designados de acuerdo al conocimiento de sus determinantes genéticos de resistencia a

aminoglucósidos, obtenidos previamente en este estudio. Este diseño permitió elevar la discriminación del tipaje, sin elevar los costos, ni la dificultad del método empleado (Wilson y Sharp, 2006; Cejas *et al.*, 2008; Espinal *et al.*, 2004).

El análisis de los patrones electroforéticos obtenidos para los aislados pertenecientes a los distintos subgrupos, evidenció una elevada heterogeneidad genética. La reducida clonalidad en una muestra perteneciente a un ambiente con presión selectiva constante, es clara evidencia de varios eventos separados de adquisición de estos genes de resistencia, ó a una rápida evolución de sus genomas bacterianos (Walsh, 2003). La divergencia genética encontrada, elimina, de esta manera, la posibilidad de que formen parte de un brote epidemiológico (Martínez, 2007).

7 CONCLUSIONES

1. Se detectó a presencia de genes productores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, EMAs, en más de un tercio (38,76%) de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. La identificación molecular de especie mediante PCR para *Pseudomonas aeruginosa* fue positiva para todos los aislados estudiados (78), confirmando los resultados obtenidos mediante la técnica fenotípica de identificación específica para esta especie; demostrando la eficiencia y concordancia de ambas técnicas.
3. El mayor porcentaje de resistencia observado en los aislados clínicos estudiados fue para el antimicrobiano gentamicina (59,69%), seguido del porcentaje de resistencia observado para tobramicina (43,41%). Amikacina presentó un porcentaje de resistencia inferior a gentamicina y tobramicina (32,56%).
4. El perfil fenotípico de resistencia predominante fue Amikacina/Gentamicina/Tobramicina (46,15%), seguido de el perfil fenotípico de resistencia Gentamicina/Tobramicina (25,64%) y, en menor porcentaje, se observó el perfil de resistencia Gentamicina (20,51%).
5. Se encontró un alto porcentaje (64,10% de los aislados estudiados) de genes productores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, dentro de la población de *Pseudomonas aeruginosa* que presentó resistencia a este antimicrobiano.

6. La mayor prevalencia de genes productores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos registrado en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* estudiados fue para *aac(3)-IIa* (34,62%), seguido de los genes *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* y *aph(3')-VIa* (26,92%, 16,66% y 7,69%, respectivamente), con predominancia de los perfiles genotípicos *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib/ ant(2'')-Ia*.
7. La heterogeneidad de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos analizados, refleja la diversidad genómica y fenotípica existente dentro de la población, lo cual manifiesta diferentes eventos de adquisición y dispersión de determinantes genéticos de resistencia y su divergencia evolutiva.
8. Los resultados obtenidos evidencian que la combinación de un método de tipificación con el conocimiento de la prevalencia de determinados genes de fácil dispersión, como es el caso de genes productores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos EMAs, podría alcanzar una mayor discriminación que permita identificar reservorios y rutas de transmisión de estos patógenos.
9. Los resultados encontrados en el presente estudio representan el primer reporte de la dinámica de resistencia a aminoglucósidos, mediada por la acción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs), en *Pseudomonas aeruginosa* en Ecuador.
10. El uso específico y apropiado de los aminoglucósidos, y el montaje de prácticas efectivas en el control de infecciones, pueden evitar el desarrollo y diseminación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a esta familia antibacteriana.

11. El uso de aminoglucósidos permanece vigente y, en ocasiones, es indispensable dentro del arsenal antimicrobiano empleado contra diversos tipos de infección. Esto, a pesar del potencial nefrotóxico y ototóxico que presentan, y al surgimiento de cepas resistentes a esta familia de antibióticos; pues en situaciones específicas pueden ser las únicas drogas efectivos para el tratamiento de infecciones nosocomiales graves.

8 LITERATURA CITADA

- Alanis, A.J. 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* 36: 697–705.
- Alcocer, I. 2010. Manual de laboratorio de Microbiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador 28-67 pp.
- Aliño, M., Esquirol, J., Navarro, R. Duperval, P. 2007. Aminoglucósidos: mirada actual desde su historia. *Revista Cubana de Pediatría* 79(2).
- Andrade, S.S., Jones, R.N. Gales, A.C., Sader, H.S. 2003. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 140–141.
- Appuhamy, S., Parton, R., Coote, J.G., Gibbs, H.A. 1997. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 288–291.
- Atkinson, R.M., LiPuma, J.J., Rosenbluth, D.B., Dunne Jr, W.M. 2006. Chronic colonization with *Pandoraea apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 44(3): 833-836.
- Becton, Dickinson and Company. 2003. Taxo discs for identification of *Neisseria* and *Pseudomonas*. BBL 1-3 pp.
- Belkum, A.V. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clinical Microbiology Reviews* 7(2): 174-184.
- Bhattacharya, D., Sarma, P., Krishnan, S., Mishra, S., Lal, B. 2003. Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3): 1435–1441.

- Burke, A., Cunha, M.D. 2010. Physicians' Press, Antibiotic Essentials. Ninth edition. Jones and Bartlett Publishers. USA.
- Callicó, A., Cedré, B., Sifontes, S., Torres, V., Pino, Y., Callís, A., Esnard, S. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. VacciMonitor 3: 1-9.
- Cejas, D., Almuzara, M., Santella, G., Tuduri, A., Palombarani, S., Figueroa, S., Gutkind, G., Radice, M. 2008. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. Revista Argentina de Microbiología 40: 238-245.
- Centers for Disease Control and Prevention [en línea] acceso el 17 de noviembre de 2010. Disponible en <http://www.cdc.gov/getsmart/antibiotic-use/antibiotic-resistance-faqs.html#c>
- Clinical and laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement Sixteenth International Supplement. CLSI document. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Corso, A., Ceriana, P., Guerriero, L., Carriero, R., Prieto, M., Tuduri, E., Lopardo, H., Vay, C., Smayevsky, J., Tokumoto, M., Domínguez, H., Guerreiro, B., Adé, M.P., Galas, M., y participantes del programa de control de calidad en bacteriología y resistencia a los antimicrobianos. 2008. Quality assurance in bacteriology and antimicrobial: seven years of experience in Latin America. Revista Panamericana de Infectología 10 (4): 26-37.
- Dale J.W., Park S.F. 2004. Molecular genetics of bacteria. Fourth edition. John Wiley & Sons, Ltd. Gran Bretaña.
- Díaz P., Bello H., Domínguez M., Trabal, N., Mella, S., Zemelman, R., González, G. 2004. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de

Klebsiella pneumoniae subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. Revista Médica de Chile 132: 1173-1178.

Difco. Manual Difco. 2009. Diagnostic Systems. Technical Center. Dehydrated culture media. Section IV 432-445; 875-880; 535-536 pp.

ECDC/EMEA/ReAct. 2009. The bacterial challenge: time to react. Technical Report. European Centre for Disease Prevention and Control.

Espinal, P., Mantilla, J., Saavedra, C., Leal, A., Alpuche, C., Valenzuela, E. 2004. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. Biomédica 24: 252-61.

Fernández-Cuenca, F. 2004. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 22(6): 355-60.

Gales, A.C., Jones, R.N., Turnidge, J., Rennie, R., Rampha, R. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: Occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the Global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. Clinical Infectious Diseases 32: 146–55.

Gales, A., Menezes, L., Silbert, S., Sader, S. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenemes-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. Journal Antimicrobial Chemotherapy 52: 699-702.

García, T.P., Yturralde, A.S. 2005. Evaluación de la prescripción de gentamicina en gestantes ingresadas con infección del tracto urinario. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología.

Guerrero, C., Cesteros R., Miranda, A., Menasalvas, A., Blázquez, R., Segobia, M. 2003. Sensibilidad a antimicrobianos de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Revista Española de Quimioterapia 16(4): 444-449.

- Hugh, R., Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *The Journal of Bacteriology* 66(1): 24–26.
- Iglesias, N.G., Marengo, J.M., Rentería, F., Gatti, B., Segal, E., Semorile, L. 2008. Tipificación molecular de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 3-8.
- Isturiz, R.E., Carbon, C. 2000. Antibiotic use in developing countries. *Infection Control Hospital Epidemiology* 21: 394-403.
- Kelley, P.W. 2008. Containing antimicrobial resistance: A cornerstone of quality of care. *Revista Panamericana de Infectología* 10(4): 10-12.
- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. 2006. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Sexta edición. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore.
- Lepape, A., Monnet, D. L., on behalf of participating members of the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). 2009. Experience of European intensive care physicians with infections due to antibiotic-resistant bacteria. *Euro Surveill* 14 (45): 19393.
- Levy, S.B., Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10: 122–129
- Martínez, L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antibióticos. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona, España.
- Martínez, J., Baquero F., Andersson, D. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 5(12): 958-965.

- Mella, S., Sepúlveda, M.A., González, G.R., Bellot, H., Domínguez, M.Y., Zemelman, R.Z., Ramírez, C.G. 2004. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología* 21 (4): 330-338.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Tulkens, P.M. 1999. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(5): 1003–1012.
- Ministerio de Economía y Finanzas – Ecuador [en línea] acceso el 17 de noviembre de 2010.
Disponibile en <http://www.mef.gov.ec>.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., Lal, B. 2001. Evaluation of inoculums addition to stimulate in situ bioremediation of oily sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1675–1681.
- Mitra, A.K., Rodriguez-Fernandez, G. 2010. Latin America and the Caribbean: Assessment of the advances in public health for the achievement of the millennium development goals. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 2238-2255.
- Olive, D.M., Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37(6): 1661–1669.
- Organización Panamericana de Salud. 2004. Guia para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Washington D.C. (OPS/DPC/CD/296/2004).
- Ortega, D. 2010. Genotipaje de la resistencia a antibióticos en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de β -Lactamasas de espectro extendido (BLEE). Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Poole, K., 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(2): 479–487.

- Raja, S., Singh, N. 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *Journal of Microbiology Immunology and Infection* 40: 45-49.
- Ramírez, M.S., Piñeiro, S., Argentinian Integron Study Group, Centrón, D. 2010. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(2): 699–706.
- Ramón, P., Fernández-Cruz, A. 2008. Magnitude and trend of antibiotic resistance in gram negative nosocomial infection in Latin América. *Revista Panamericana de Infectología* 10(4): 38-46.
- Red Nacional de Resistencia Bacteriana - Ecuador [en línea] acceso el 17 de noviembre de 2010. Disponible en <http://www.Rednarbec.org>.
- Reyes, A., Bello, H., Domínguez, M., Mella, S., Zelman, 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.
- Romero, R. 2007. *Microbiología y parasitología humana*. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V. México, D.F.
- Schmitz, F.-J., Verhoef, J., Fluit, A.C., and the SENTRY Participants Group. 1999. Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European University Hospitals Participating in the European SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 18: 414–42.
- Schroeter, J. 1872. Uber einige durch bacterien gebildete pigmente. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen* 109-126.
- Sefton, A.M. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance. *Drugs* 62: 557–566.

- Shahid, M., Malik, A. 2005. Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns patients. *Indian Journal of Medical Research*. 122: 324-329.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., Miller, G. H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews* 57(1): 138-163.
- Singh, A., Goering, R.V., Simjee, S., Foley, S.L., Zervos, M.J. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews* 19(3): 512–530.
- Sosa, A., Byarugaba, D., Amávile-Cuevas, C., Hsuen, P.R., Kariuki, S., Okeke, I. 2009. Antimicrobial resistance in developing countries. Springer Science. London, UK.
- Stratchounskil, L.S., and the Russian NPRS Study Group, Kozlov, R.S., Rechedko, G.K., Stetsiouk, O.U., Chavrikova, E.P. 1998. Antimicrobial resistance patterns among aerobic Gram-negative bacilli isolated from patients in intensive care units: results of a multicenter study in Russia. *Clinical Microbiology and Infection* 4: 497-507.
- Torres, C., Perlin, M.H., Baquero, F., Lerner, D.L., Lerner, S. A. 2000. High-level amikacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* associated with a 3-phosphotransferase with high affinity for amikacin. *International Journal Antimicrobial Agents* 15(4): 257–263.
- Vakulenko, S.B., Mobashery, S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews* 16(3); 430–450.
- Vallés, J., Mariscal, D. 2005. Neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 23(3): 30-6.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19(24): 6823 -6831.

- Vila, J., Ruiz, J., Navia, M., Becerril, B., Garcia, I., Perea, S., López, I., Alamo, I., Ballester, F., Planes, A., Martínez, J., Jiménez, T. 1999. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *Journal of Clinical Microbiology* 37(3): 758–761.
- Walsh, C. 2003. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. Copyright © 2003. American Society of Microbiology Press. Washington, D.C.
- Wilson, L.A., Sharp, P.M. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution* 23(6): 1156–1168.
- Xu, Z., Li, L., Shirliff, M.E., Alam, M.J., Yamasak, S., Shi, L. 2009. Occurrence and Characteristics of Class 1 and 2 Integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Southern China. *Journal of Clinical Microbiology* 47(1): 230–234.
- Xu, J., Moore, J., Murphy, P., Millar, C., Elborn, J. 2004. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 3:21.
- Zurita, J., 2005. Antibióticos aminoglucósidos. En: *Fundamentos de Farmacología Médica* sexta edición (E. Samaniego) pp. 1109-1119. Casa de la Cultura Ecuatoriana “Benjamin Carrión”, Quito, Ecuador.

9 FIGURAS



Figura 1 Aspecto de colonias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* en medio Agar Nutriente. Colonias alargadas, planas y con centro elevado. Coloración, depende del tipo de pigmento que posee; pioverdina (amarillo-verdoso), piocianina (azul-verdoso) o piorubina (rojo). En crecimiento confluyente a menudo presenta un olor a fruta.



Figura 2 Prueba de oxidasa positiva. La mancha de coloración púrpura en el disco evidencia la oxidación del citocromo C, revelando una prueba positiva para oxidasa.

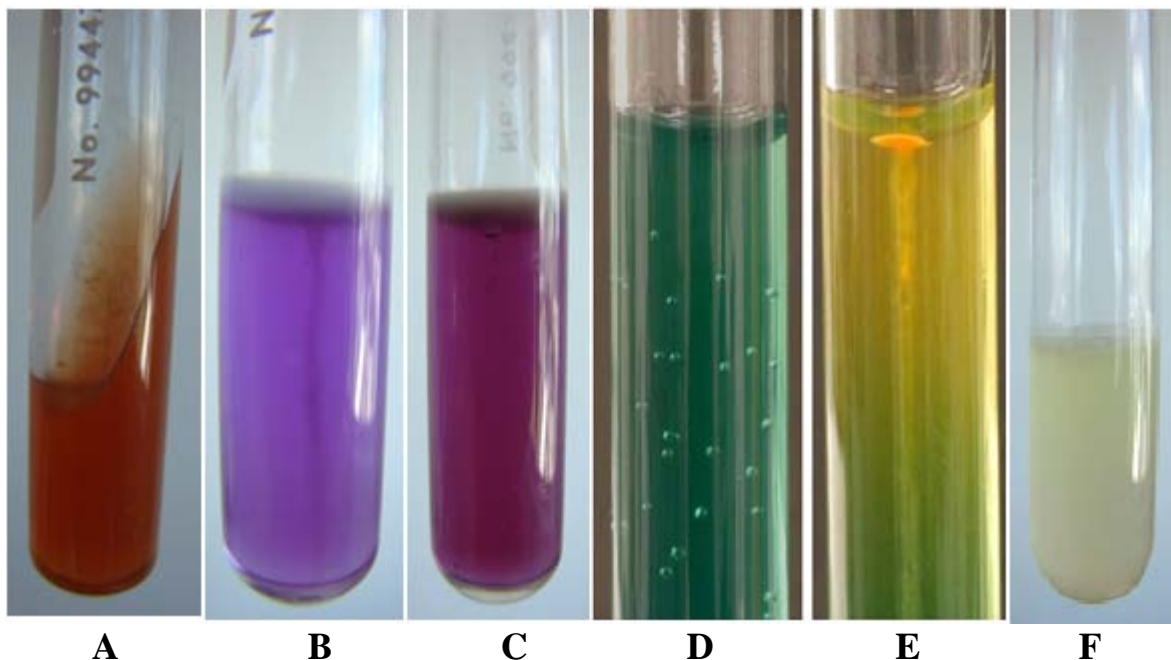


Figura 3 Pruebas bioquímicas para identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

A, prueba TSI (triple azúcar y hierro), no fermentación de azúcares (K/K), H₂S y CO₂ negativos; B, prueba MIO (motilidad, indol y ornitina) motilidad y ornitina descarboxilasa positivos, indol negativo; C, prueba MILI (motilidad, indol y lisina) motilidad y descarboxilasa de lisina positivos, indol negativo; D y E, prueba O – F (óxido – fermentación), D, fermentación negativa, E, oxidación positiva; F, crecimiento a 43 °C en BHI (infusión de cerebro – corazón), crecimiento positivo.

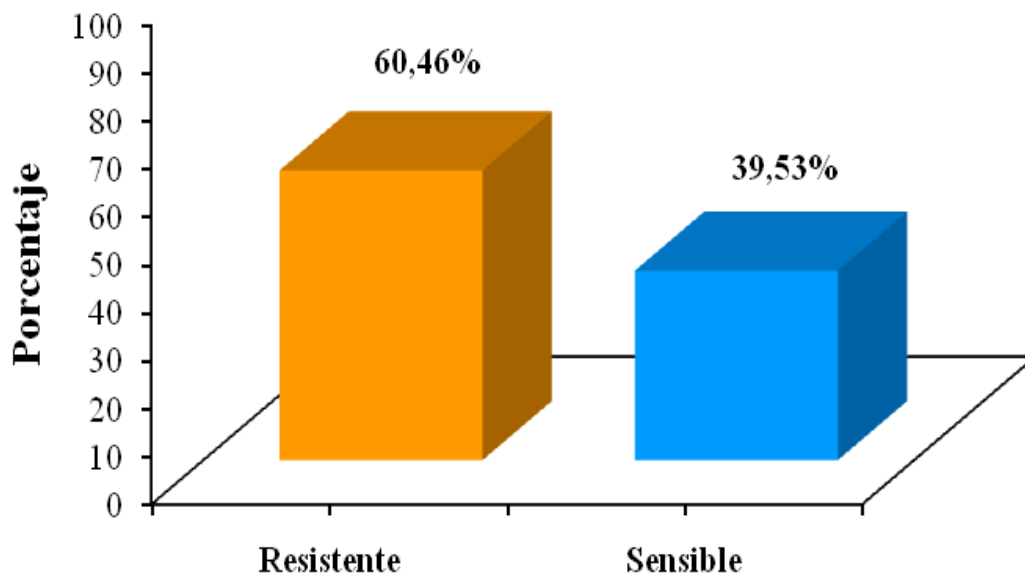


Figura 4 Porcentaje total de resistencia y sensibilidad a aminoglucósidos en la población total de *Pseudomonas aeruginosa*.

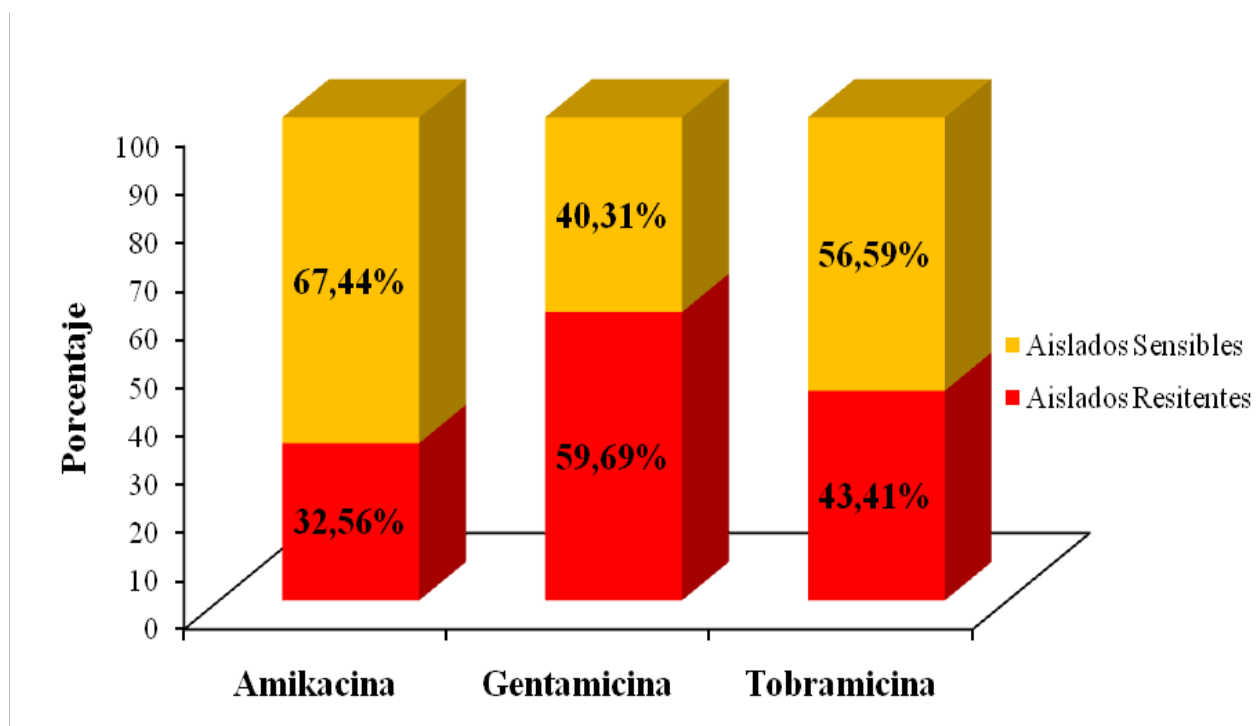


Figura 5 Porcentaje de sensibilidad y resistencia a amikacina, gentamicina y tobramicina en la población total de *Pseudomonas aeruginosa*. El total de la población fue de 129 aislados.

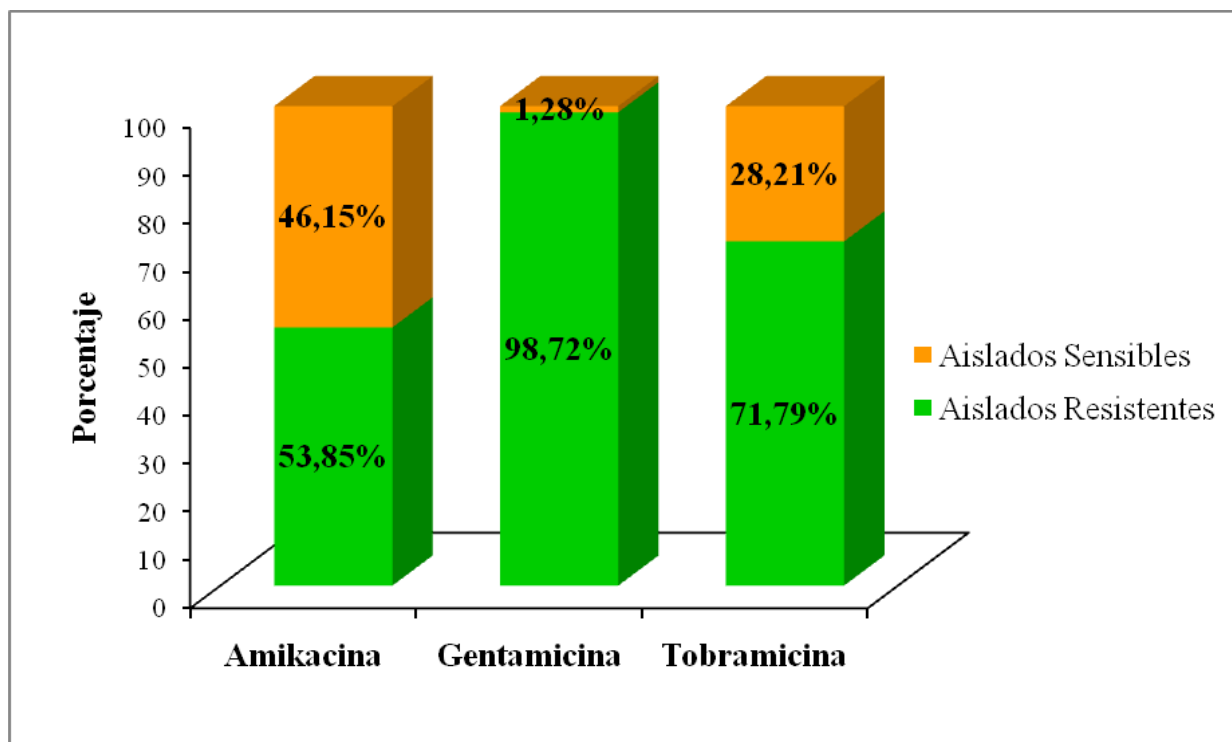


Figura 6 Porcentaje de sensibilidad y resistencia a amikacina, gentamicina y tobramicina dentro de la población de estudio de *Pseudomonas aeruginosa*. El total de la población resistente a aminoglucósidos fue de 78 aislados.

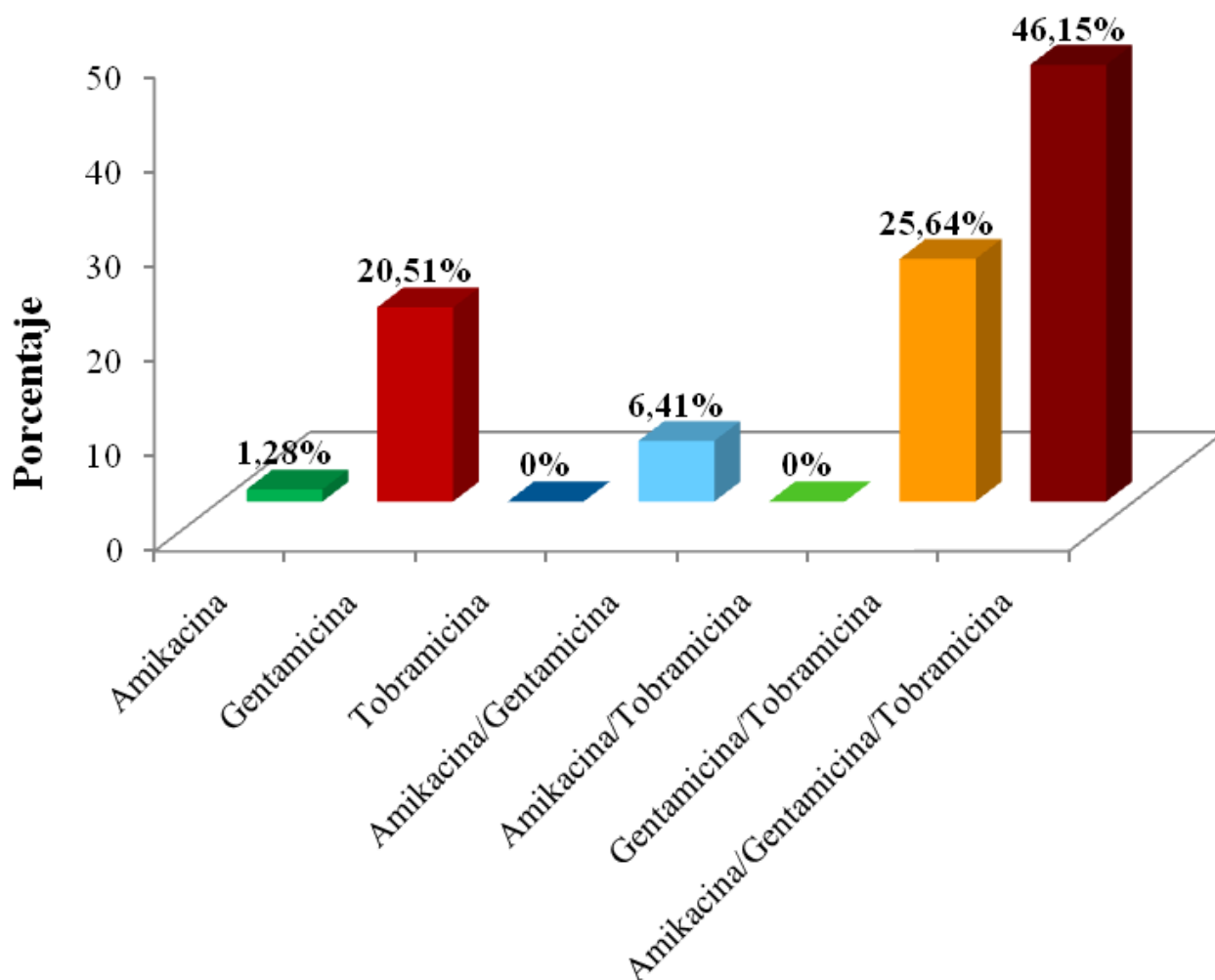


Figura 7 Porcentaje de los diferentes Perfiles de resistencia a aminoglucósidos encontrados en los aislados hospitalarios de *Pseudomonas aeruginosa*. El total de la población resistente a aminoglucósidos fue de 78 aislados.

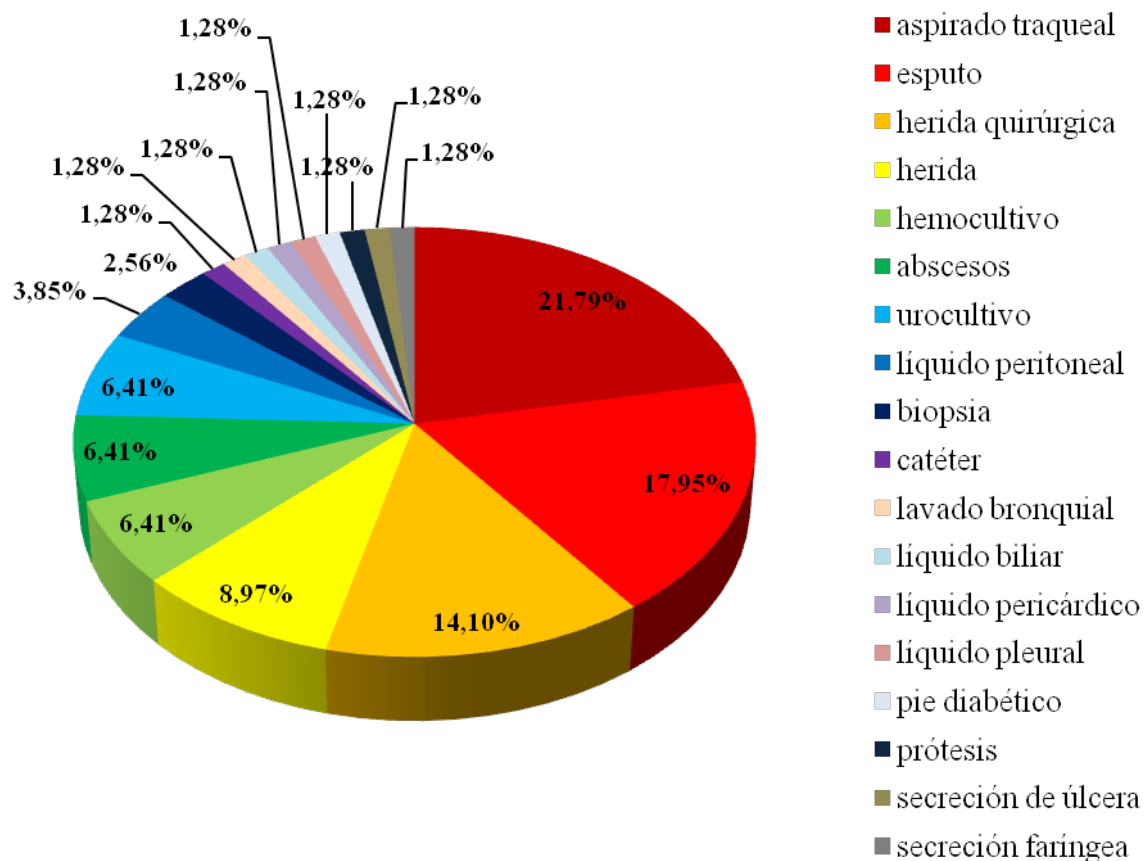


Figura 8 Origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos. El total de la población resistente a aminoglucósidos fue de 78 aislados.

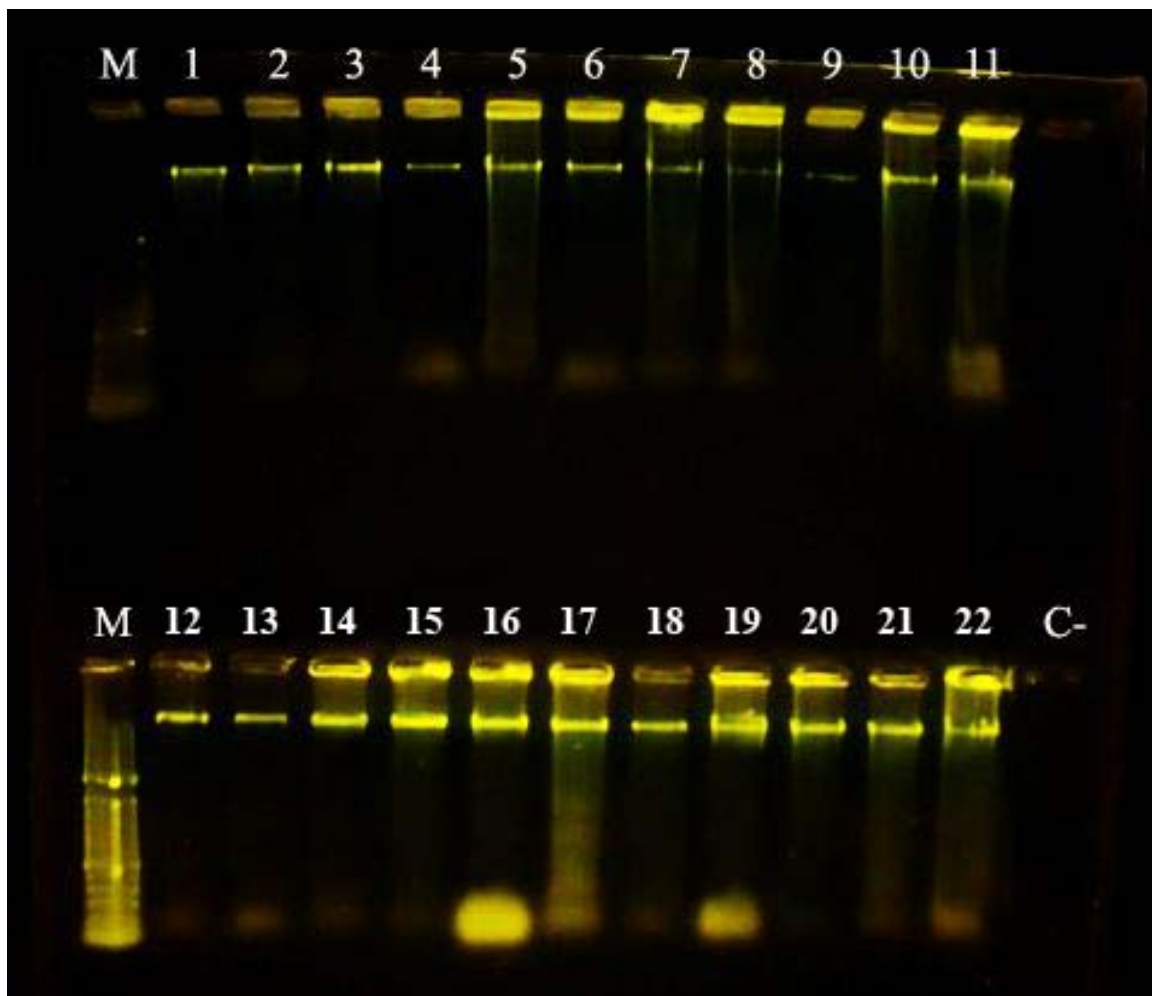


Figura 9 Gel representativo de ADN extraído con DNazol a partir de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a aminoglucósidos. M, marcador de peso molecular (100 pb). Las canelates 1 a 22 presentan bandas pertenecientes al ADN total extraído correctamente con el método descrito. 1, 13 Ps aer; 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, 44 Ps aer; 11, 45 Ps aer; 12, 57 Ps aer; 13, 95 Ps aer; 14, 97 Ps aer; 15, 98 Ps aer; 16, 104 Ps aer; 17, 117 Ps aer; 18, 120 Ps aer; 19, 130 Ps aer; 20, 142 Ps aer; 21, 144 Ps aer; 22, 145 Ps aer; C-, representa al control negativo de extracción.

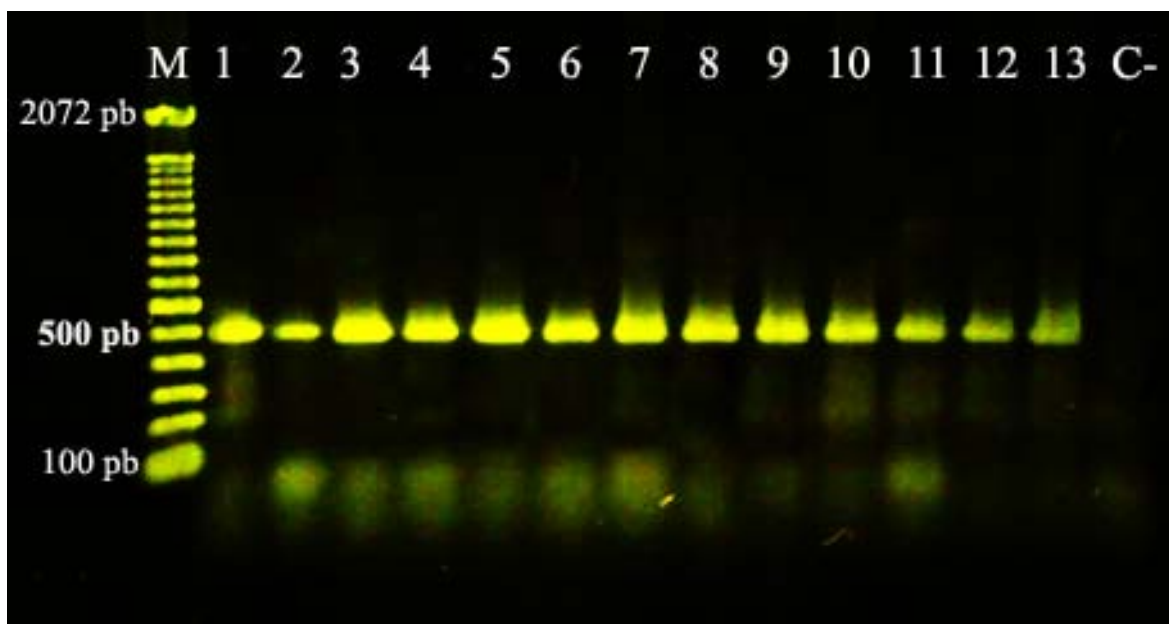


Figura 10 Gel representativo del producto de amplificación del gen de proteína de membrana externa *oprL* (504 pb). M, marcador de peso molecular (100 pb). Las canaletas 1 a la 12 presentan bandas con un peso molecular aproximado de 500 pb correspondientes al gen *oprL*, único de *P. aeruginosa*; comprobando así, la especie de estudio. 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, 44 *Ps aer*; 11, 45 *Ps aer*; 12, 48 *Ps aer*; La canaleta 13 presenta la banda del amplicón de PCR de la cepa ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* utilizada como control positivo; C-, control negativo.

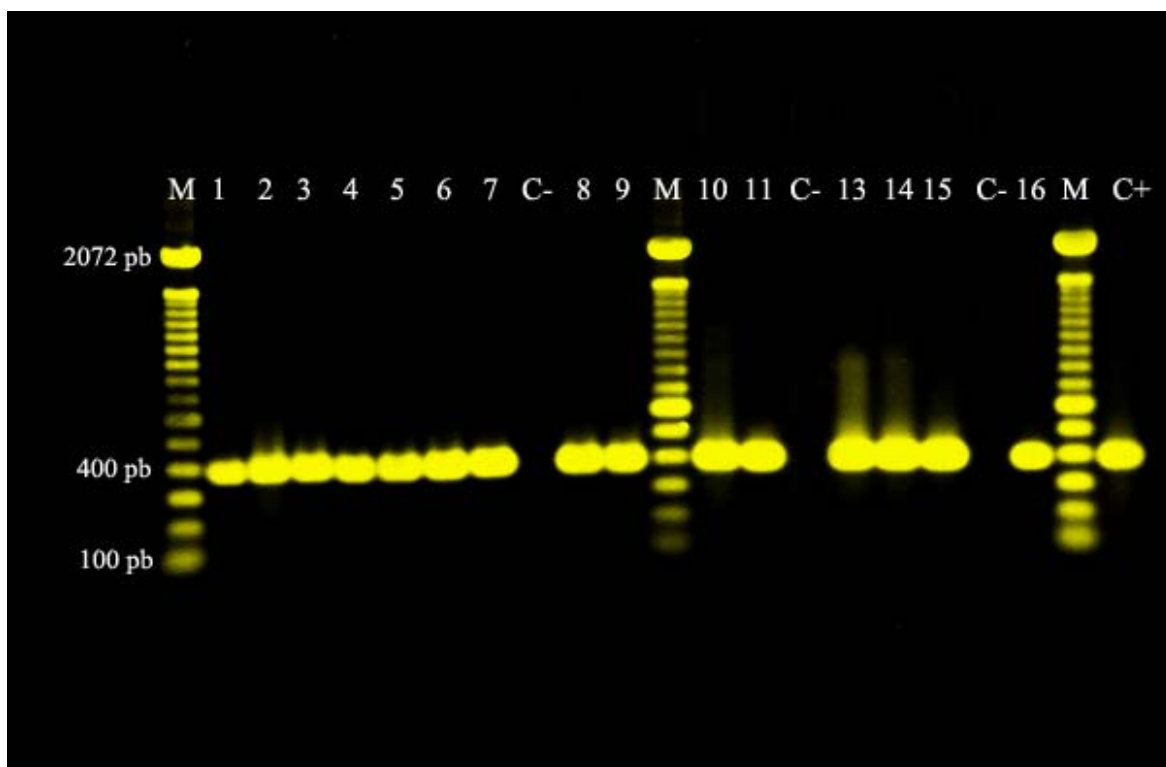


Figura 11 Gel representativo del producto de amplificación de gen EMAs *aac(6')-Ib* (395 pb). M, marcador de peso molecular (100pb). Las canaletas 1 a la 16 presentan bandas de aproximadamente 400 pb, correspondientes al gen *aac(6')-Ib*, confirmando la presencia del elemento genético de resistencia. 1, 23 Ps aer; 2, 28 Ps aer; 3, 44, Ps aer; 4, 45 Ps aer; 5, 95 Ps aer; 6, 97 Ps aer; 7, 98 Ps aer; 7, 152 Ps aer; 8, 234 Ps aer; 9, 323 Ps aer; 10, 326 Ps aer; 11, 330 Ps aer; 12, 332 Ps aer; 13, 373 Ps aer; 12, 379 Ps aer; 13, 380 Ps aer; 14, 385 Ps aer; 15, 391 Ps aer; C-, control negativo. C+, presenta la banda del amplicón de PCR de la cepa 68 KPN-BLEE, empleada como control positivo.

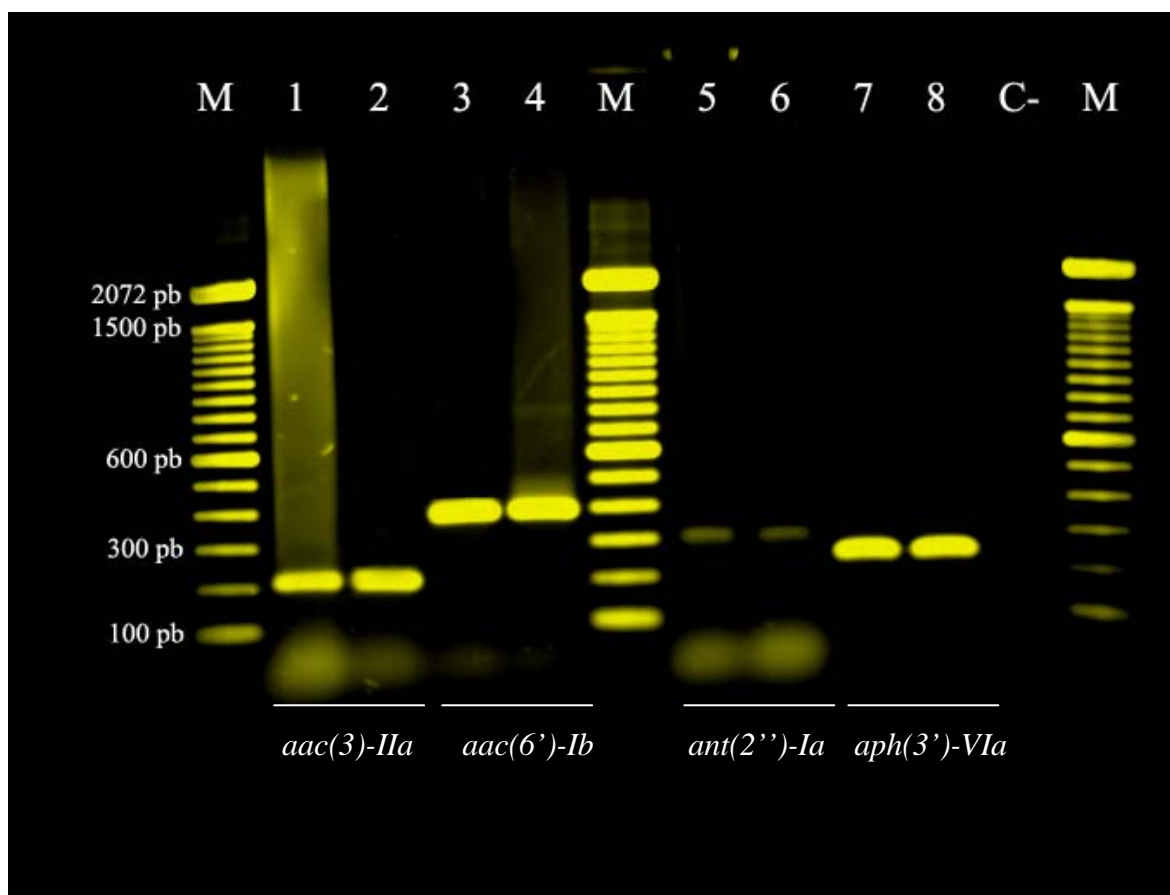


Figura 12 Gel representativo de los productos de amplificación de genes EMAs. M, marcador de peso molecular (100pb). Las canaletas 1 y 2 presentan bandas de un peso molecular aproximado de 200 pb correspondiente al gen *aac(3)-IIa*; 1, 377 Ps aer; 2, cepa 57 KPN-BLEE utilizado como control positivo. Las canaletas 3 y 4 presentan bandas de un peso molecular aproximado de 400 pb correspondiente al gen *aac(6')-Ib*; 3, 373 Ps aer; 4, cepa 68 KPN-BLEE utilizada control positivo. Las canaletas 5 y 6 presentan bandas con un peso molecular aproximado de 300 pb correspondiente al gen *ant(2'')-Ia*; 5, 318 Ps aer; 6, cepa 58 KPN-BLEE utilizada como control positivo. Las canaletas 7 y 8 presentan bandas con un peso aproximado de 250 pb pertenecientes al gen *aph(3')-VIa*; 7, 263 Ps aer; 8, aislado 333 Ps aer utilizado como control positivo; C-, control negativo.

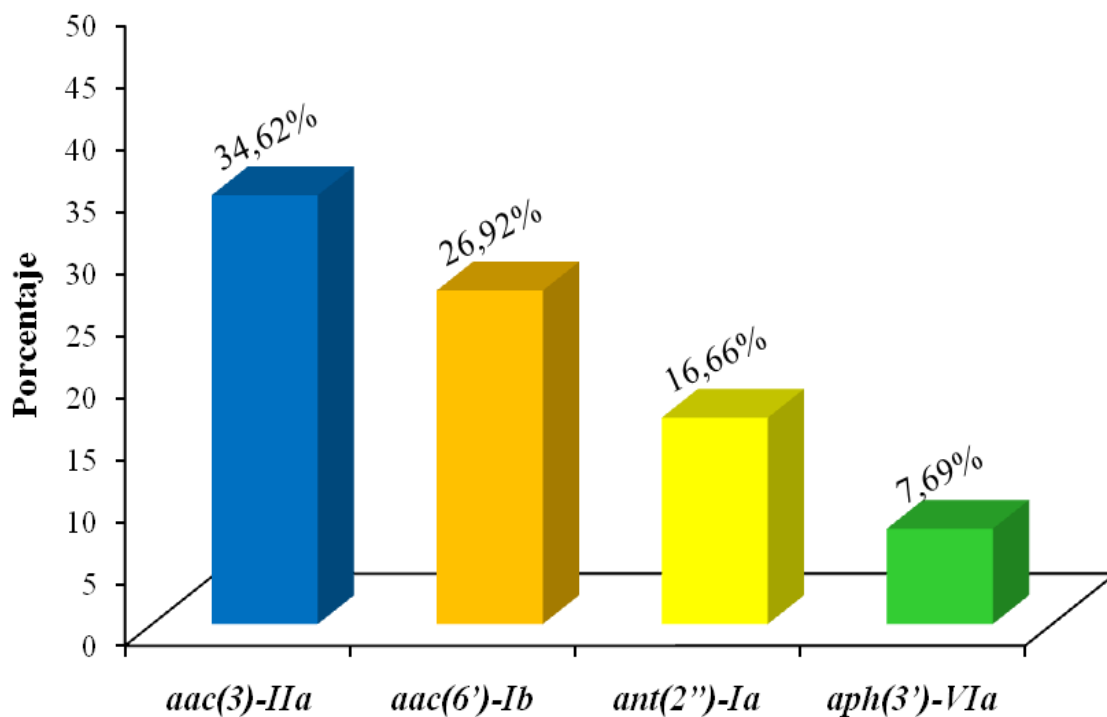


Figura 13 Porcentaje de prevalencia de cada uno de los genes EMs encontrados en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos. El total de la población resistente a aminoglucósidos fue de 78 aislados.

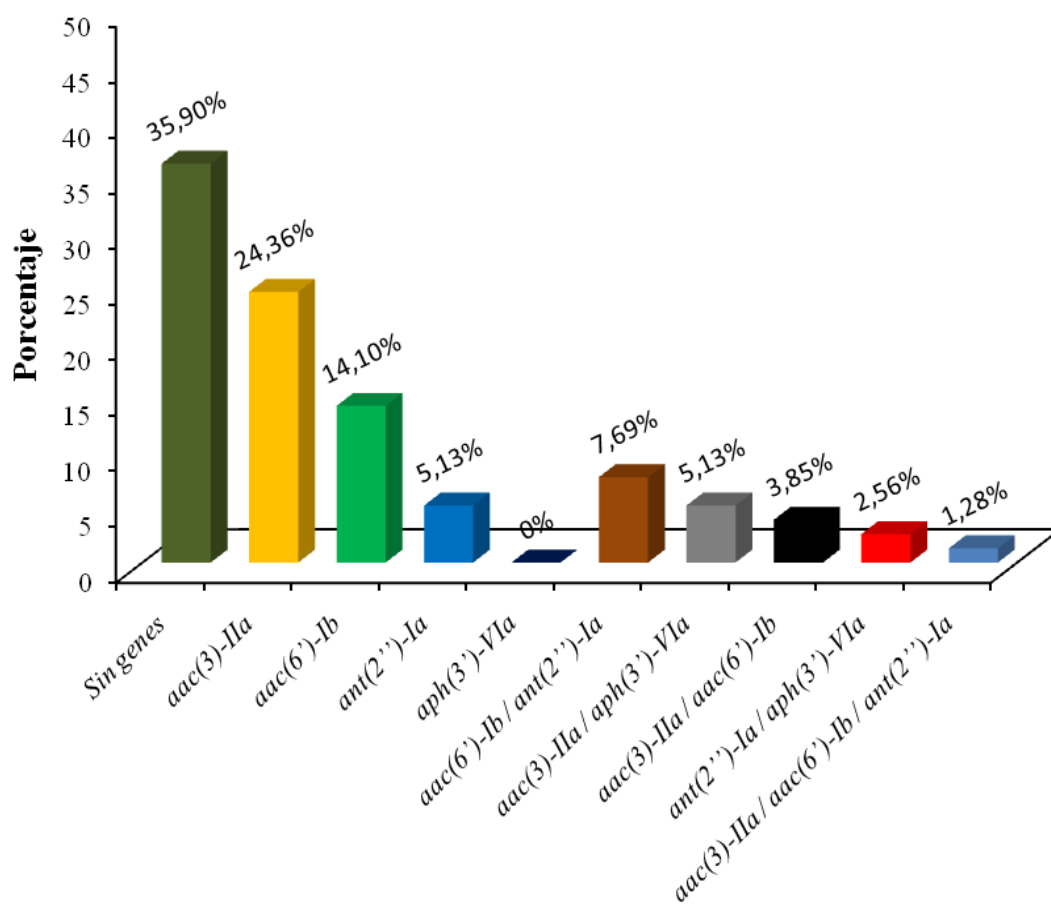


Figura 14 Porcentaje de los diferentes perfiles genotípicos encontrados para genes EMAs en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos. El total de la población resistente a aminoglucósidos fue de 78 aislados.

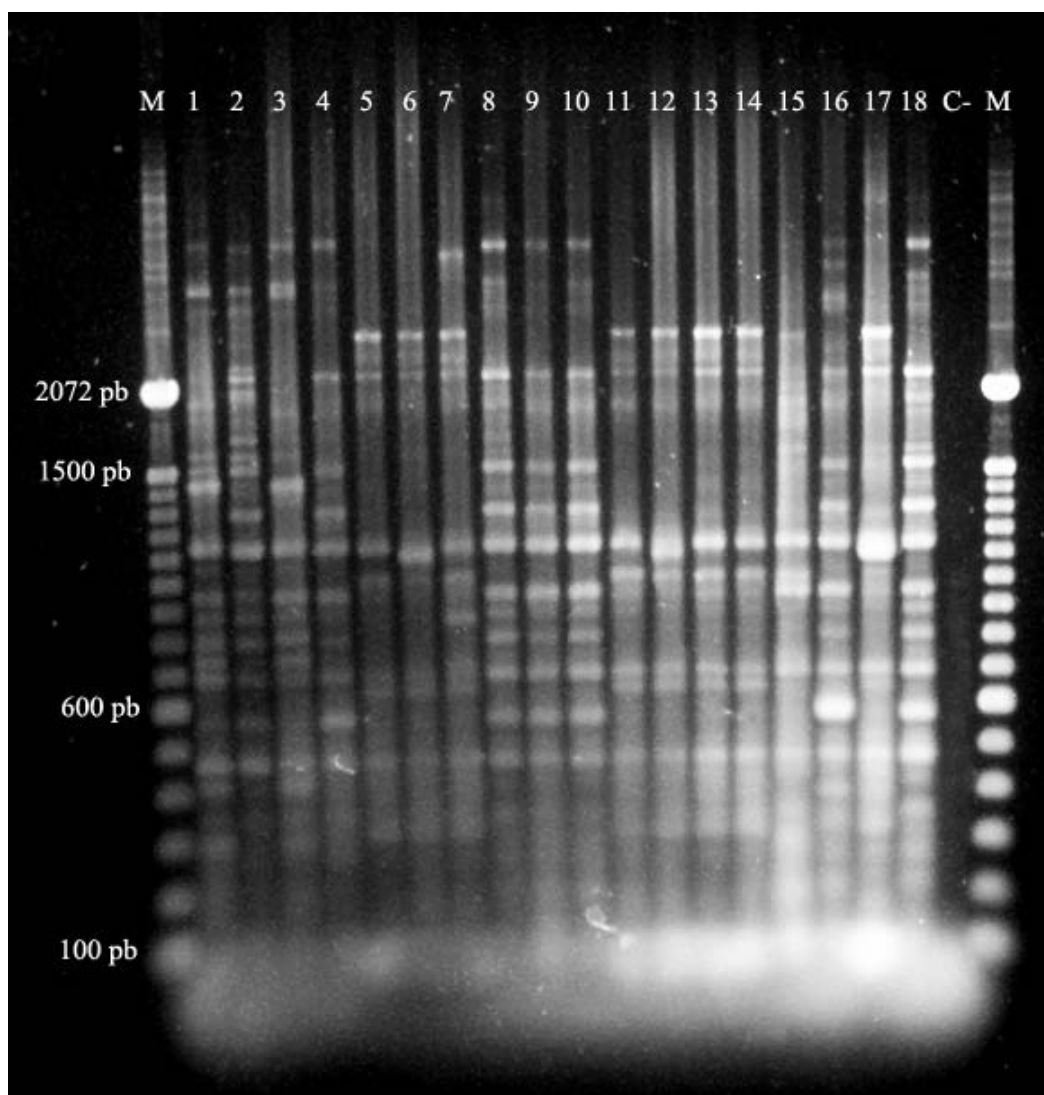


Figura 15 Gel representativo de la tipificación de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal A. M, marcador de peso molecular (100 pb). Las canaletas 1 a la 18 presentan los diferentes patrones de bandas amplificadas con esta técnica, cada uno exhibiendo fragmentos amplificadas de diferente peso molecular. 1, 16 Ps aer; 2, 31 Ps aer; 3, 48 Ps aer; 4, 57 Ps aer; 5, 104 Ps aer; 6, 130 Ps aer; 7, 167 Ps aer; 8, 175 Ps aer; 9, 243 Ps aer; 10, 349 Ps aer; 11, 351 Ps aer; 12, 362 Ps aer; 13, 369 Ps aer; 14, 377 Ps aer; 15, 387 Ps aer; 16, 388 Ps aer; 17, 411 Ps aer; 18, 429 Ps aer; C-, control negativo.

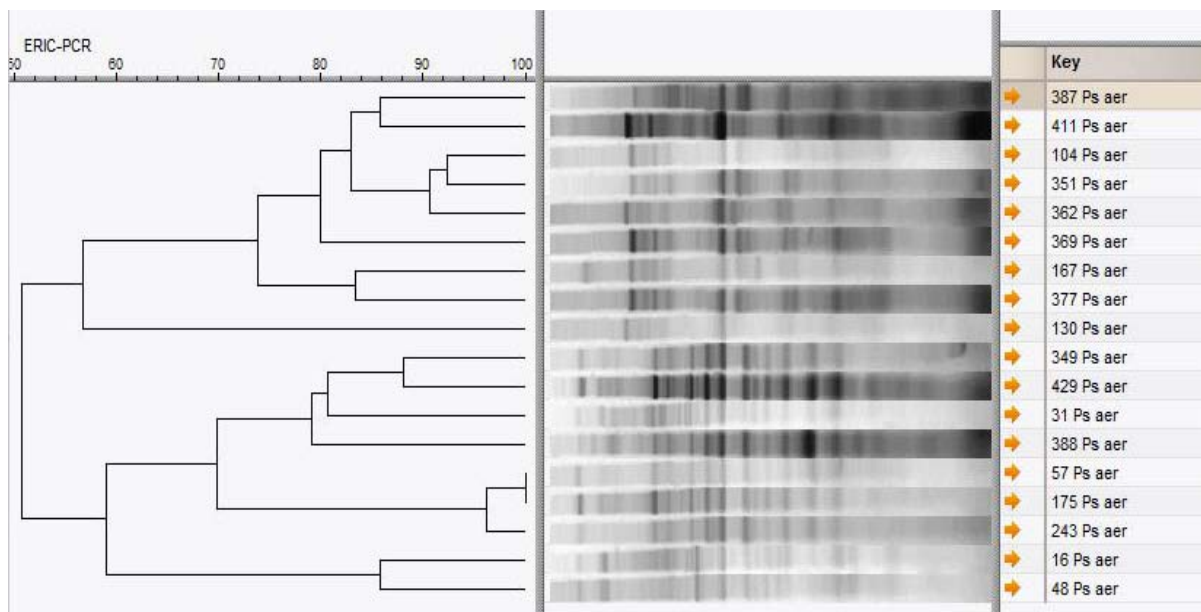


Figura 16 **Análisis de clonalidad de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del grupo de análisis clonal A.** Se compara los diferentes patrones de bandas obtenidos a partir de la técnica ERIC-PCR. En el dendrograma muestra cepas relacionadas entre sí, identificando 2 grupos clonales (104 Ps aer - 351 Ps aer - 382 Ps aer, y 57 Ps aer - 175 Ps aer - 234 Ps aer). Los aislados 57 Ps aer y 175 Ps aer presentaron un índice de similaridad de 100, visualizada en la escala superior izquierda, que indica el índice de similaridad del coeficiente de Dice.

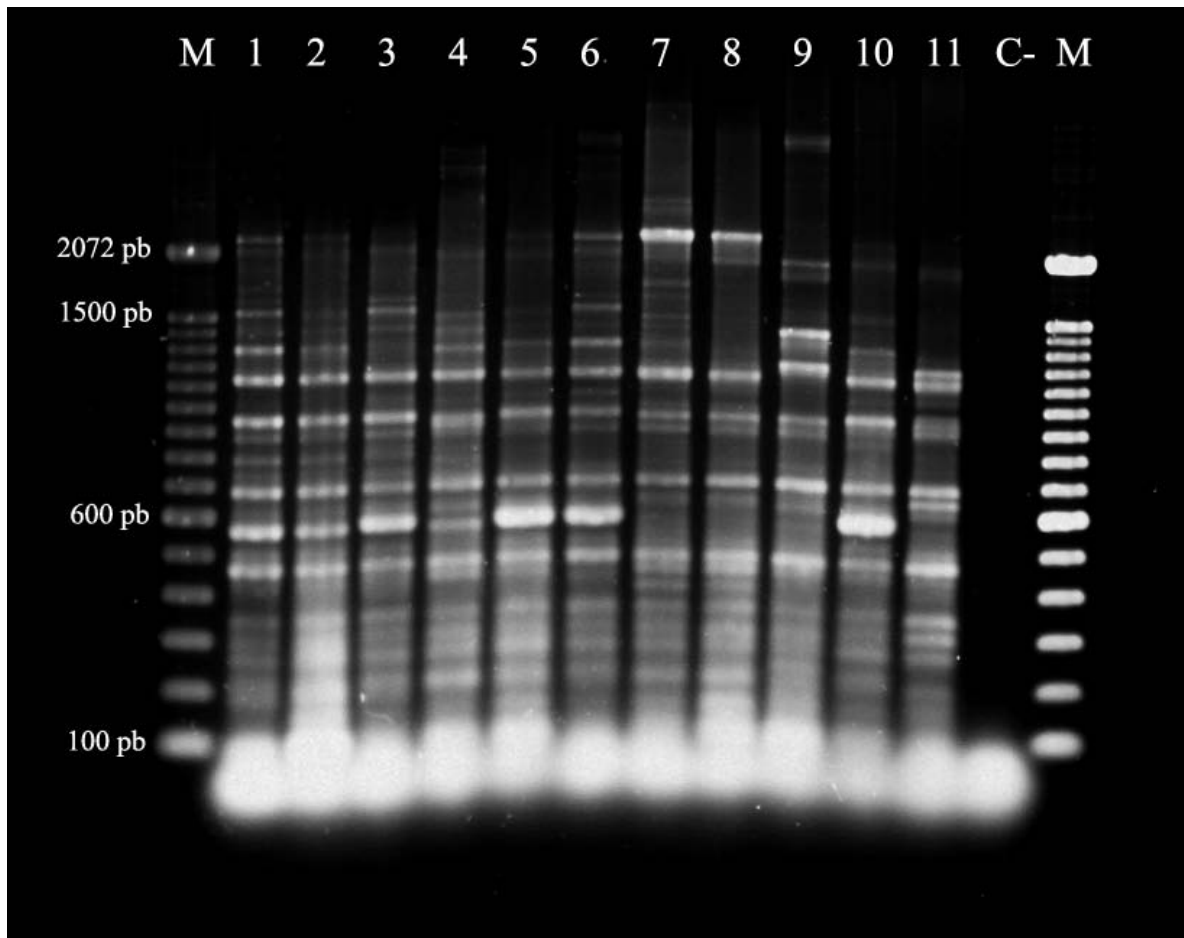


Figura 17 Gel representativo de la tipificación de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal B. M, marcador de peso molecular (100 pb). Las canaletas 1 a la 11 presentan fragmentos amplificados de diferente peso molecular, demostrando diferentes patrones de bandeo para los aislados pertenecientes a este grupo. C-, control negativo.

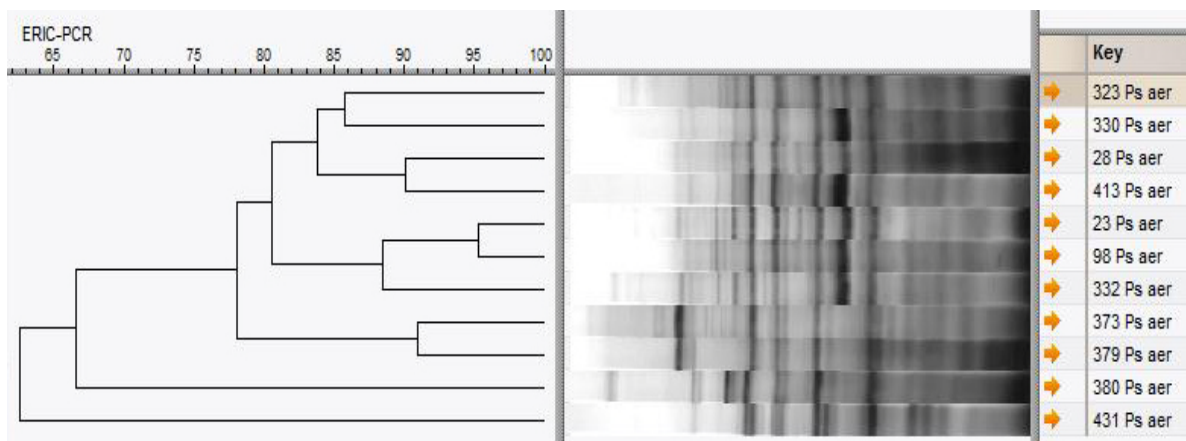


Figura 18 **Análisis de clonalidad de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del grupo de análisis clonal B.** Se compara los diferentes patrones de bandas obtenidos en este grupo, observado, la heterogeneidad genética existente entre los aislados de este grupo. Los aislados más relacionados entre sí son: 23 Ps aer - 98 Ps aer, 373 - 379 Ps aer y 28 Ps aer 413 Ps aer; presentando índices de similaridad de 95, 91 y 90 respectivamente.

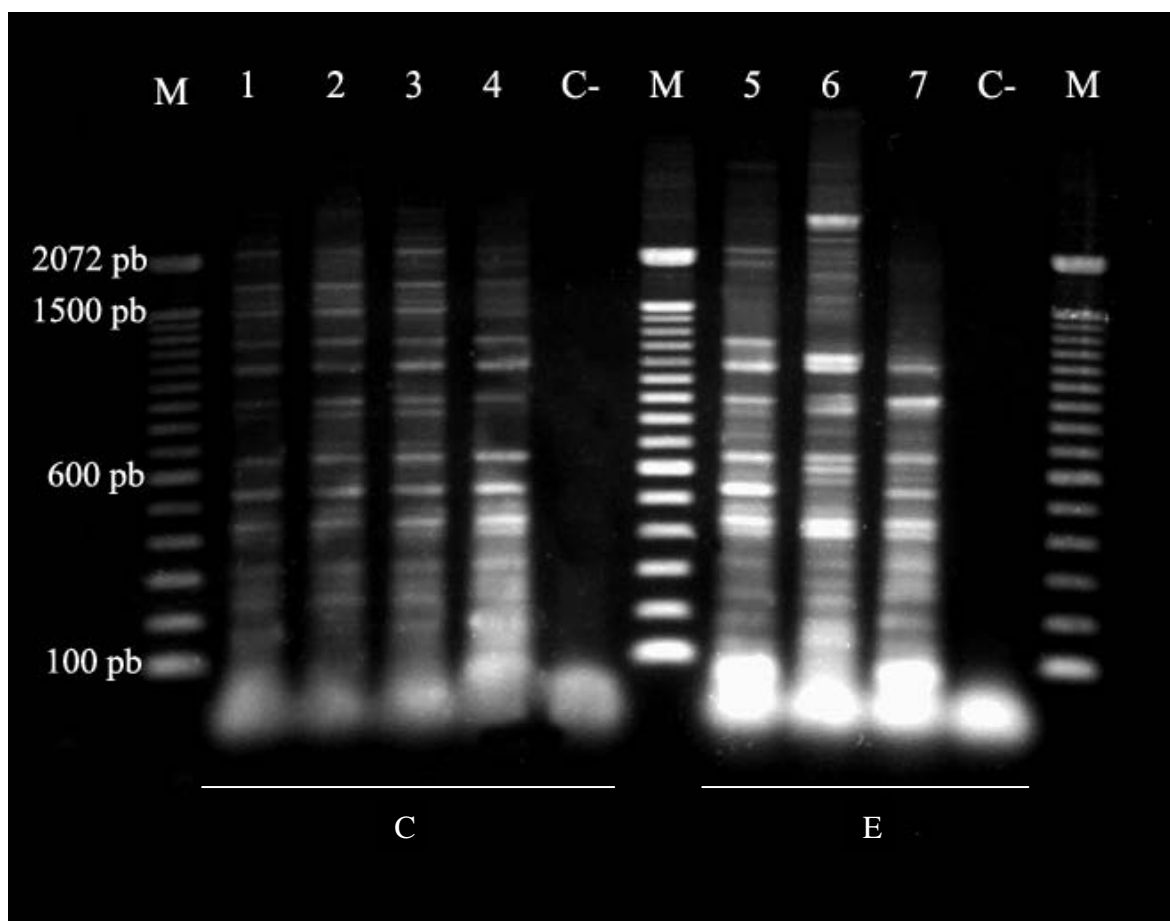


Figura 19 Gel representativo de la tipificación de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal C y E. M, marcador de peso molecular (100 pb). Las canaletas 1 a la 4 muestran los aislados pertenecientes al grupo C, y presentan fragmentos amplificados de diferente peso molecular; 1, 38 Ps aer; 2, 310 Ps aer; 3, 318 Ps aer. Las canaletas 5 a la 7 muestran los fragmentos amplificados pertenecientes a los aislados del grupo E; 4, 438 Ps aer; 5, 227 Ps aer; 6, 237 Ps aer; 7, 263 Ps aer. C-, control negativo.

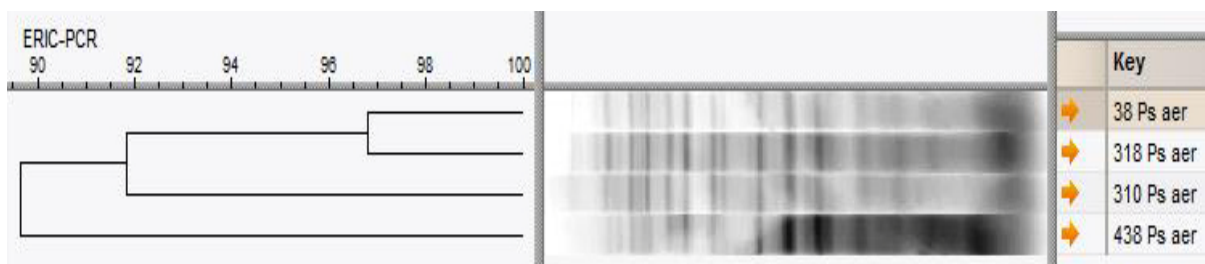


Figura 20 **Análisis de clonalidad de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del grupo de análisis clonal C.** Se observa la relación clonal de los aislados pertenecientes a este grupo, evidenciando la alta relación genómica existente entre dichos aislados; y destacando el alto índice de similaridad entre los aislados 38 Ps aer - 318 Ps aer.

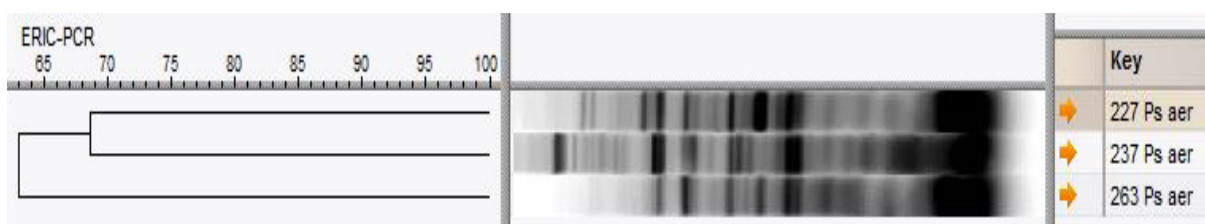


Figura 21 **Análisis de clonalidad de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del grupo de análisis clonal E.** En la figura se observa una importante divergencia genómica entre los aislados pertenecientes a este grupo, siendo los más relacionados el aislado 227 Ps aer y el aislado 237 Ps aer.

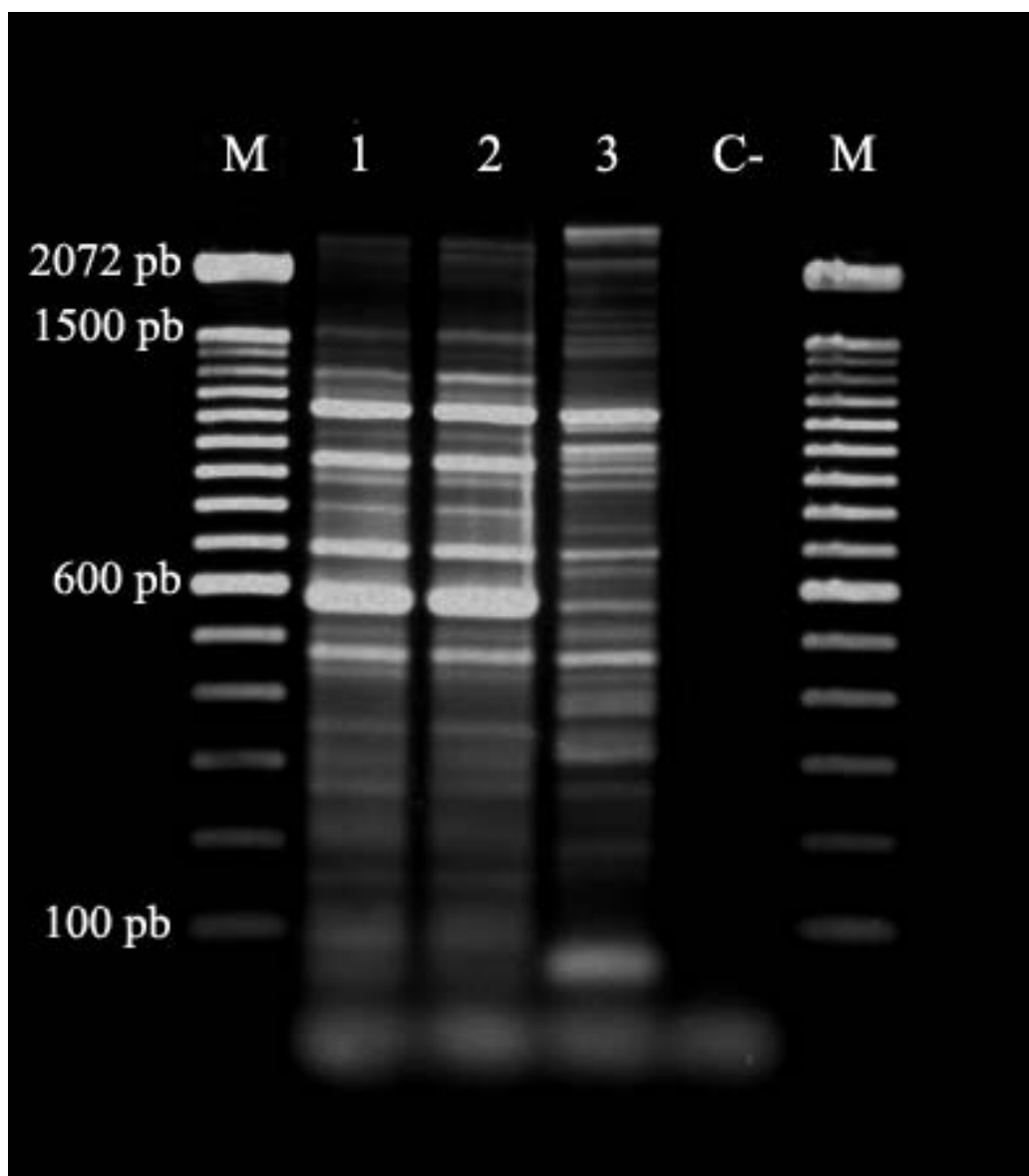


Figura 22 Gel representativo de la tipificación de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal D. M, marcador de peso molecular (100 pb). Las canaletas 1 a la 3 representan la amplificación de fragmentos, producto de la técnica de ERIC-PCR, los cuales tienen diferentes pesos moleculares. 1, 95 Ps aer; 2, 97 Ps aer; 3, 152 Ps aer; C-, control negativo.



Figura 23 Análisis de clonalidad de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del grupo de análisis clonal D. Se observa claramente la presencia de un grupo clonal muy relacionado entre sí, con un índice de similaridad mayor a 97; al cual pertenecen los aislados 95 Pa aer y 97 Ps aer.

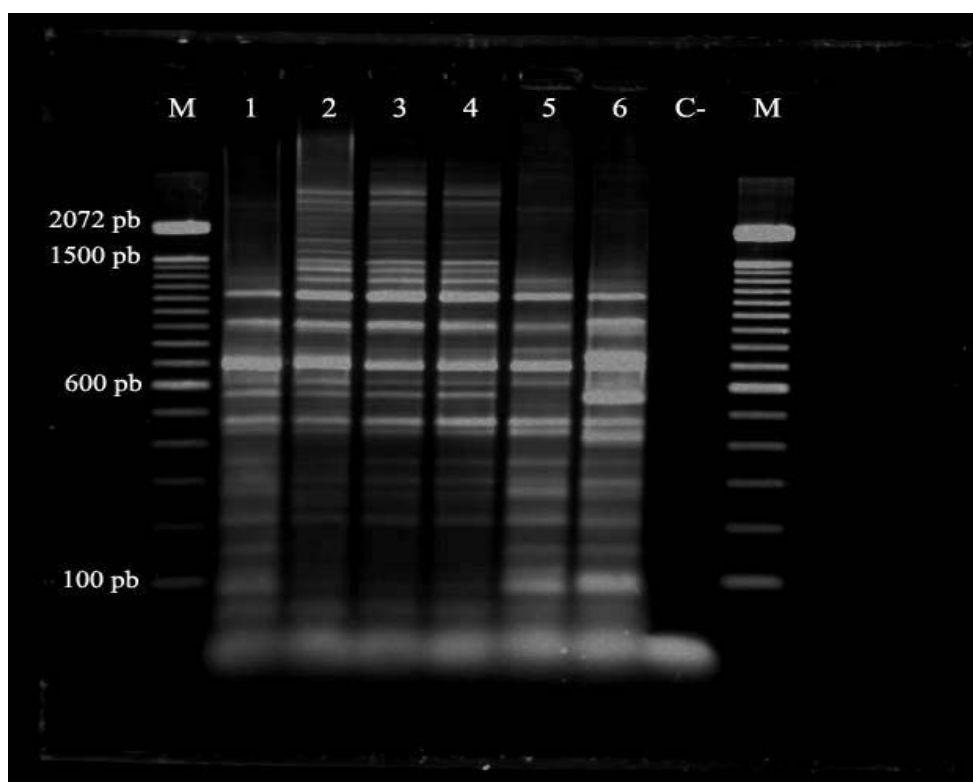


Figura 24 Gel representativo de la tipificación de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal F. M, marcador de peso molecular (100 pb). Las canaletas 1 a la 6 presentan presentan varios fragmentos amplificados de diferentes pesos moleculares, pertenecientes a los aislados que integran este grupo; 44 Ps aer; 2, 45 Ps aer, 3, 234 Ps aer; 4, 326 Ps aer; 5, 385 Ps aer; 6, 391 Ps aer; C-, control negativo.

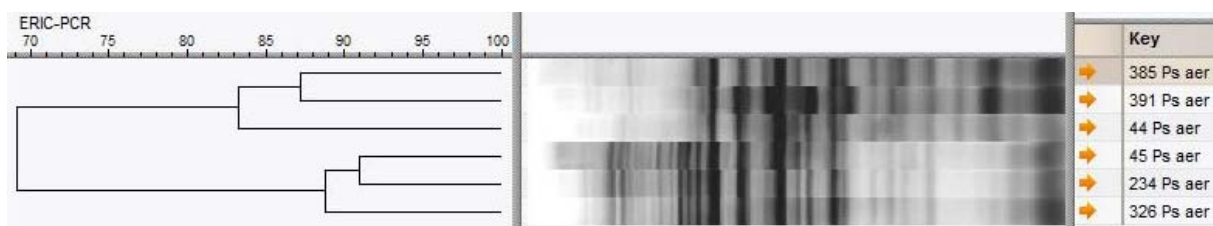


Figura 25 Análisis de clonalidad de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del grupo de análisis clonal F. Se observan dos grupos de aislados relacionados entre si, el primero formado por 385 Ps aer - 391 Ps aer - 44 Ps aer; y el segundo por 45 Ps aer - 234 Ps aer - 326 Ps aer.

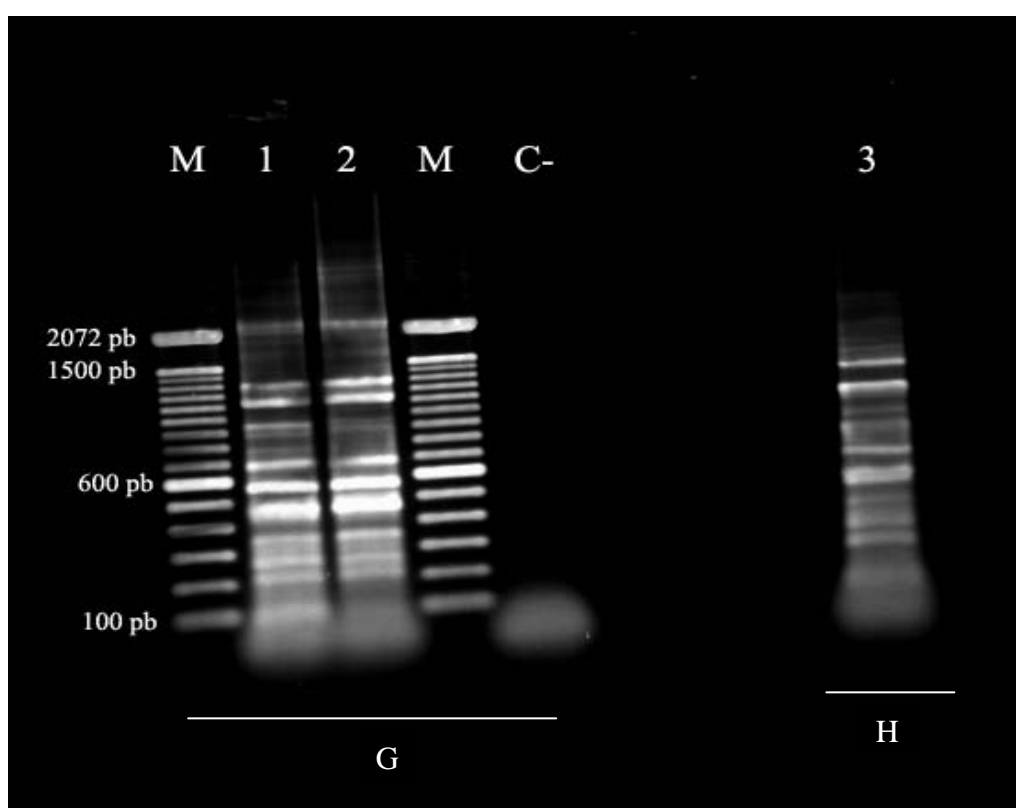


Figura 26 Gel representativo de la tipificación de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal G y H. M, marcador de peso molecular (100 pb); Las canaletas 1 y 2 representan los fragmentos amplificados de los aislados pertenecientes al grupo G; 1, 319 Ps aer; 2, 333 Ps aer. La canaleta 3 representa los fragmentos amplificados del aislado perteneciente al grupo H 3, 437 Ps aer. C-, control negativo.



Figura 27 Análisis de clonalidad de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del grupo de análisis clonal G. Se observa una alta heterogeneidad genómica entre los aislados pertenecientes a este grupo.

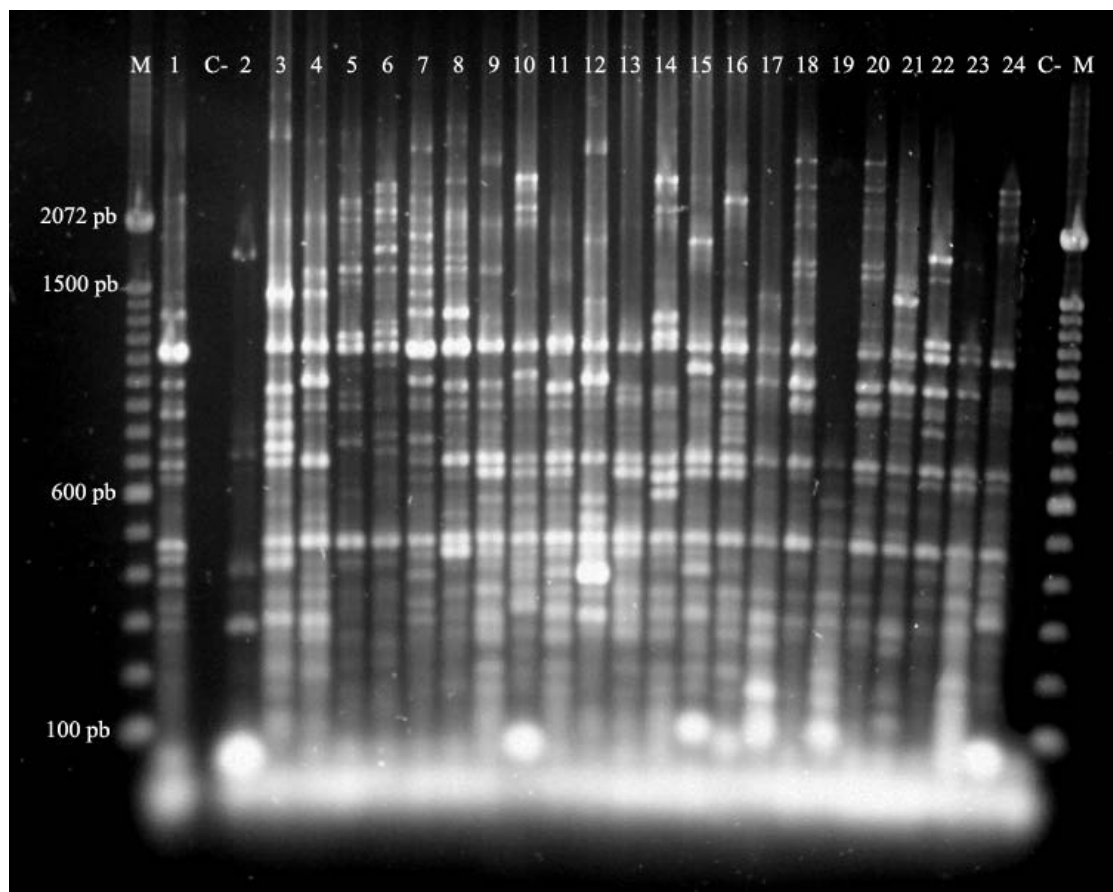


Figura 28 Gel representativo de la tipificación de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* mediante ERIC-PCR del grupo de análisis clonal I. M, marcador de peso molecular (100 pb); 1, 13 Ps aer; 2, 29 Ps aer; 3, 117 Ps aer; 4, 120 Ps aer; 5, 144 Ps aer; 6, 145 Ps aer; 7, 177 Ps aer; 8, 180 Ps aer; 9, 181 Ps aer; 10, 192 Ps aer; 11, 235 Ps aer; 12, 236 Ps aer; 13, 346 Ps aer; 14, 355 Ps aer; 15, 365 Ps aer; 16, 381 Ps aer; 17, 393 Ps aer; 18, 410 Ps aer; 19, 415 Ps aer; 20, 419 Ps aer; 21, 421 Ps aer; 22, 424 Ps aer; 23, 433 Ps aer; 24, 436, Ps aer; C-, control negativo.

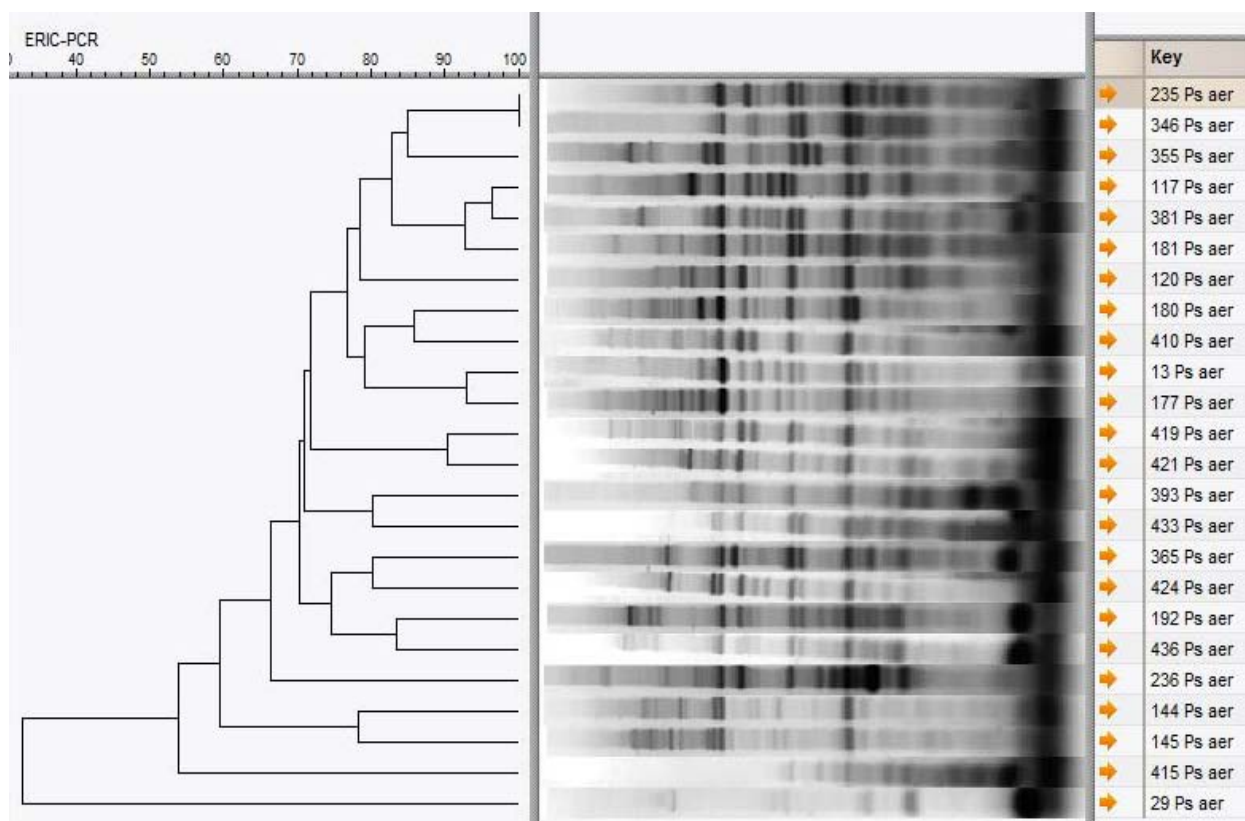


Figura 29 **Análisis de clonalidad de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del grupo de análisis clonal I.** Se observa un índice de similitud de 100 entre los aislados 235 Ps aer - 346 Ps aer; al igual que varios grupos clonales, principalmente, el comprendido por los aislados 117 Ps aer - 381 Ps aer - 181 Ps aer, con un índice de similaridad mayor a 90.

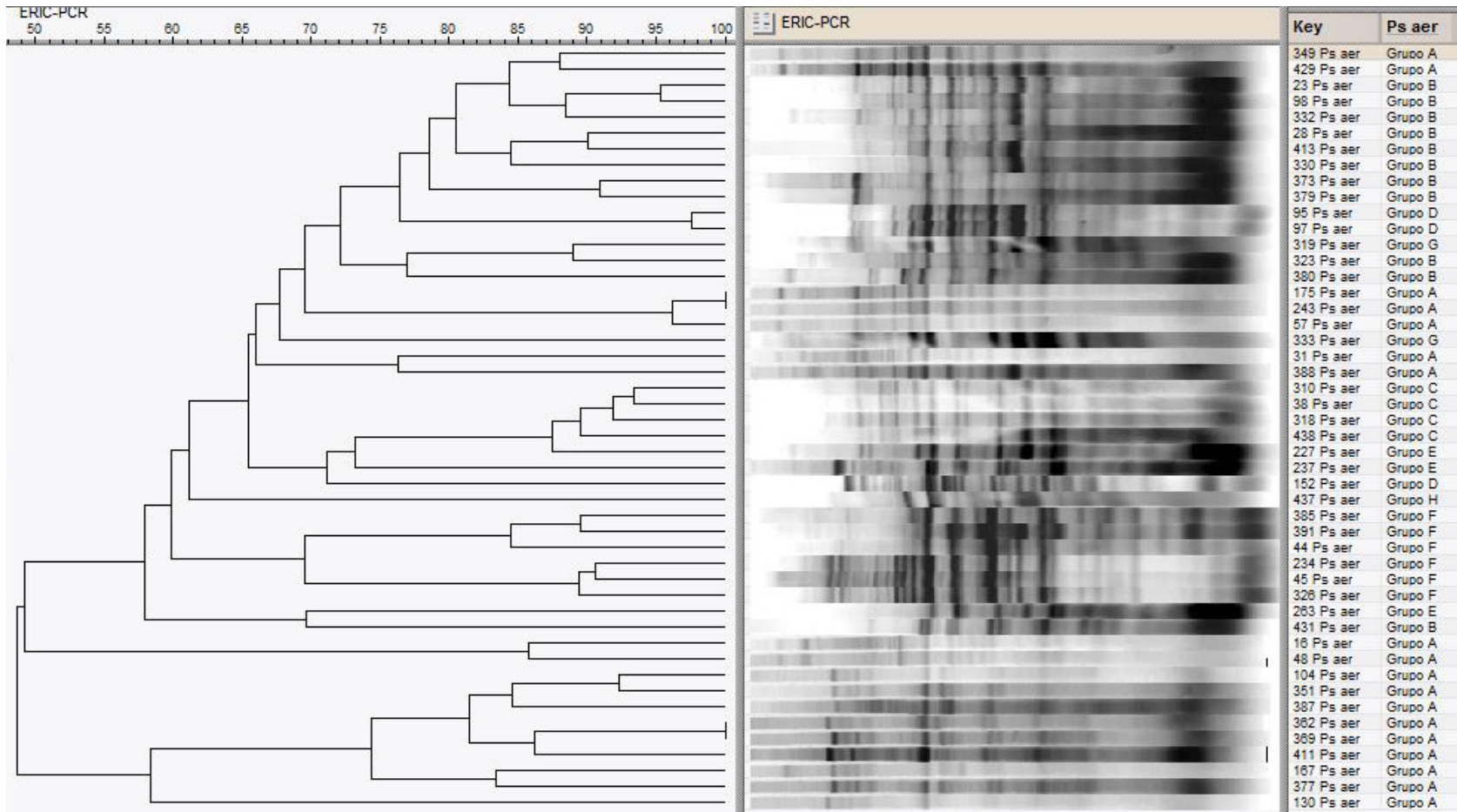


Figura 30 Análisis de clonalidad de todos los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* que presentaron genes EMAs. En esta figura se muestra la relación clonal existente entre todos los aislados con elementos genómicos de resistencia a aminoglucósidos analizados en este estudio.

10 TABLAS

Tabla 1 Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en este estudio

Código de Congelación	Código Hospitalario	Fecha de Aislamiento	Origen de la Muestra	Sexo del Paciente
13 Ps aer	10	01/07/2005	Herida	M
16 Ps aer	4	01/07/2005	Biopsia	M
17 Ps aer	7	08/07/2005	Herida	F
21 Ps aer	459	15/08/2005	Líquido biliar	ND
23 Ps aer	274	09/08/2005	Herida	F
28 Ps aer	60	09/09/2005	Herida	M
29 Ps aer	237	22/09/2005	Espuito	F
31 Ps aer	385	22/09/2005	Herida quirúrgica	M
38 Ps aer	202	10/09/2005	Herida quirúrgica	M
44 Ps aer	848	27/09/2005	Lavado bronquial	F
45 Ps aer	773	10/01/2005	Absceso	ND
48 Ps aer	835	24/10/2005	Biopsia	M
57 Ps aer	430	13/12/2005	Herida quirúrgica	M
95 Ps aer	714	22/03/2006	Herida	F
97 Ps aer	483	15/03/2006	Hemocultivo	M
98 Ps aer	1442	03/04/2006	Urocultivo	M
104 Ps aer	1042	31/03/2006	Secreción traqueal	F
117 Ps aer	1812	25/04/2006	Secreción traqueal	F
120 Ps aer	1791	01/04/2006	Espuito	M
130 Ps aer	597	19/05/2006	Secreción traqueal	F
142 Ps aer	632	22/06/2006	Líquido peritoneal	M
144 Ps aer	2678	26/06/2006	Espuito	F
145 Ps aer	639	21/07/2006	Espuito	M
152 Ps aer	880	29/06/2006	Herida	M
167 Ps aer	3532	22/08/2006	Herida quirúrgica	F
175 Ps aer	67	01/09/2006	Herida quirúrgica	ND
177 Ps aer	276	08/09/2006	Secreción traqueal	M
178 Ps aer	259	09/09/2006	Urocultivo	F

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

Código de congelación	Código Hospitalario	Fecha de Aislamiento	Origen de la Muestra	Sexo del Paciente
180 Ps aer	352	11/09/2006	Urocultivo	F
181 Ps aer	3869	13/09/2006	Espujo	M
192 Ps aer	3940	16/10/2006	Absceso	F
227 Ps aer	30	02/12/2006	Absceso	M
234 Ps aer	5091	29/12/2006	Espujo	M
235 Ps aer	565	20/06/2007	Hemocultivo	F
236 Ps aer	945	28/12/2006	Secreción traqueal	M
237 Ps aer	942	28/12/2006	Secreción traqueal	M
243 Ps aer	429	11/01/2007	Hemocultivo	M
263 Ps aer	561	20/06/2007	Líquido pericárdico	F
310 Ps aer	4831	15/11/2007	Espujo	M
318 Ps aer	879	27/11/2007	Espujo	M
319 Ps aer	924	28/11/2007	Secreción traqueal	M
323 Ps aer	77	03/12/2007	Secreción traqueal	M
326 Ps aer	256	08/12/2007	Secreción traqueal	F
330 Ps aer	528	16/12/2007	Secreción traqueal	M
332 Ps aer	742	22/12/2007	Líquido pleural	M
333 Ps aer	768	23/12/2007	Secreción traqueal	F
346 Ps aer	975	30/12/2007	Espujo	M
349 Ps aer	99	03/02/2008	Líquido peritoneal	M
351 Ps aer	1015	29/01/2008	Pie diabético	F
355 Ps aer	183	07/02/2008	Secreción traqueal	F
362 Ps aer	595	26/09/2008	Secreción traqueal	F
365 Ps aer	466	26/09/2008	Espujo	F
369 Ps aer	138	26/09/2008	Hemocultivo	M
373 Ps aer	134	26/09/2008	Prótesis	F
377 Ps aer	332	26/09/2008	Secreción traqueal	M
379 Ps aer	296	26/09/2008	Absceso	F

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

Código de congelación	Código Hospitalario	Fecha de Aislamiento	Origen de la Muestra	Sexo del Paciente
380 Ps aer	341	26/09/2008	Urocultivo	F
381 Ps aer	334	30/09/2008	Herido	F
385 Ps aer	468	30/09/2008	Catéter	M
387 Ps aer	531	30/09/2008	Herida quirúrgica	M
388 Ps aer	599	30/09/2008	Absceso	F
391 Ps aer	873	30/09/2008	Secreción de úlcera	M
393 Ps aer	996	30/09/2008	Urocultivo	F
409 Ps aer	741	30/09/2008	Herida quirúrgica	M
410 Ps aer	874	30/09/2008	Secreción traqueal	M
411 Ps aer	944	30/09/2008	Herida quirúrgica	F
413 Ps aer	153	30/09/2008	Hemocultivo	M
415 Ps aer	102	30/09/2008	Líquido peritoneal	F
419 Ps aer	156	30/09/2008	Espujo	M
421 Ps aer	98	01/10/2008	Secreción faríngea	M
424 Ps aer	316	01/10/2008	Secreción traqueal	M
429 Ps aer	818	01/10/2008	Herida quirúrgica	F
431 Ps aer	300	01/10/2008	Espujo	F
433 Ps aer	302	01/10/2008	Espujo	M
434 Ps aer	302	01/10/2008	Espujo	M
436 Ps aer	508	01/10/2008	Herida quirúrgica	M
437 Ps aer	508	01/10/2008	Herida quirúrgica	M
438 Ps aer	170	01/10/2008	Secreción traqueal	M

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

Tabla 2 Iniciadores para confirmación de *Pseudomonas aeruginosa*, genes productores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y tipificación

Iniciador	Secuencia 5' → 3'	Gen/Blanco	Amplicón (pb)	Referencia
oprLF	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC	<i>oprL</i>	504	Xu <i>et al.</i> (2004)
oprLR	CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	<i>oprL</i>		Xu <i>et al.</i> (2004)
aac(3)-IIaF	CGCTAAACTCCGTTACC	<i>aac(3)-IIa</i>	196	Díaz <i>et al.</i> (2004)
aac(3)-IIaR	TAGCACTGAGCAAAGCC	<i>aac(3)-IIa</i>		Díaz <i>et al.</i> (2004)
aac(6')-IbF	TATGAGTGGCTAAATCGAT	<i>aac(6')-Ib</i>	395	Díaz <i>et al.</i> (2004)
aac(6')-IbR	CCCGCTTTCTCGTAGCA	<i>aac(6')-Ib</i>		Díaz <i>et al.</i> (2004)
ant(2'')-IaF	CGTCATGGAGGAGTTGGACT	<i>ant(2'')-Ia</i>	304	Díaz <i>et al.</i> (2004)
ant(2'')-IaR	CGCAAGACCTCAACCTTTTC	<i>ant(2'')-Ia</i>		Díaz <i>et al.</i> (2004)
aph(3')-VIaF	ATACAGAGACCACCATACAGT	<i>aph(3')-VIa</i>	234	Vila <i>et al.</i> (1999)
aph(3')-VIaR	GGACAATCAATAATAGCAAT	<i>aph(3')-VIa</i>		Vila <i>et al.</i> (1999)
ERIC-1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	ERIC	NA	Bhattacharya <i>et al.</i> (2003)
ERIC-2	AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	ERIC	NA	Bhattacharya <i>et al.</i> (2003)

A, adenina; G, guanina; T, timina; C, citosina; pb, pares de bases; NA, no aplica.

Tabla 3 Perfil genotípico y subgrupo para genes EMAs observados en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos

Código de Congelación	Origen	Subgrupo de análisis clonal	Perfil Genotípico para genes EMAs
16 Ps aer	Biopsia	A	<i>aac(3)-IIa</i>
17 Ps aer	Herida	A	<i>aac(3)-IIa</i>
31 Ps aer	Herida quirúrgica	A	<i>aac(3)-IIa</i>
48 Ps aer	Biopsia	A	<i>aac(3)-IIa</i>
57 Ps aer	Herida quirúrgica	A	<i>aac(3)-IIa</i>
104 Ps aer	Secreción traqueal	A	<i>aac(3)-IIa</i>
130 Ps aer	Secreción traqueal	A	<i>aac(3)-IIa</i>
167 Ps aer	Herida quirúrgica	A	<i>aac(3)-IIa</i>
175 Ps aer	Herida quirúrgica	A	<i>aac(3)-IIa</i>
243 Ps aer	Hemocultivo	A	<i>aac(3)-IIa</i>
349 Ps aer	Líquido peritoneal	A	<i>aac(3)-IIa</i>
351 Ps aer	Pie diabético	A	<i>aac(3)-IIa</i>
362 Ps aer	Secreción traqueal	A	<i>aac(3)-IIa</i>
369 Ps aer	Hemocultivo	A	<i>aac(3)-IIa</i>
377 Ps aer	Secreción traqueal	A	<i>aac(3)-IIa</i>
387 Ps aer	Herida quirúrgica	A	<i>aac(3)-IIa</i>
388 Ps aer	Absceso	A	<i>aac(3)-IIa</i>
411 Ps aer	Herida quirúrgica	A	<i>aac(3)-IIa</i>
429 Ps aer	Herida quirúrgica	A	<i>aac(3)-IIa</i>
23 Ps aer	Herida	B	<i>aac(6')-Ib</i>
28 Ps aer	Herida	B	<i>aac(6')-Ib</i>
98 Ps aer	Urocultivo	B	<i>aac(6')-Ib</i>
323 Ps aer	Secreción traqueal	B	<i>aac(6')-Ib</i>
330 Ps aer	Secreción traqueal	B	<i>aac(6')-Ib</i>
332 Ps aer	Líquido pleural	B	<i>aac(6')-Ib</i>
373 Ps aer	Prótesis	B	<i>aac(6')-Ib</i>
379 Ps aer	Absceso	B	<i>aac(6')-Ib</i>
380 Ps aer	Urocultivo	B	<i>aac(6')-Ib</i>
413 Ps aer	Hemocultivo	B	<i>aac(6')-Ib</i>
431 Ps aer	Espuito	B	<i>aac(6')-Ib</i>
38 Ps aer	Herida quirúrgica	C	<i>ant(2'')-Ia</i>

Tabla 3 Perfil genotípico y subgrupo para genes EMAs observados en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos (Continuación...)

Código de Congelación	Origen	Subgrupo de análisis clonal	Perfil Genotípico para genes EMAs
310 Ps aer	Espuito	C	<i>ant(2'')-Ia</i>
318 Ps aer	Espuito	C	<i>ant(2'')-Ia</i>
438 Ps aer	Secreción traqueal	C	<i>ant(2'')-Ia</i>
95 Ps aer	Herida	D	<i>aac(3)-IIa/ aac(6')-Ib</i>
97 Ps aer	Hemocultivo	D	<i>aac(3)-IIa/ aac(6')-Ib</i>
152 Ps aer	Herida	D	<i>aac(3)-IIa/ aac(6')-Ib</i>
227 Ps aer	Absceso	E	<i>aac(3)-IIa/aph(3')-VIa</i>
237 Ps aer	Secreción traqueal	E	<i>aac(3)-IIa/aph(3')-VIa</i>
263 Ps aer	Líquido pericárdico	E	<i>aac(3)-IIa/aph(3')-VIa</i>
409 Ps aer	Secreción de úlcera	E	<i>aac(3)-IIa/aph(3')-VIa</i>
44 Ps aer	Lavado bronquial	F	<i>aac(6')-Ib/ ant(2'')-Ia</i>
45 Ps aer	Absceso	F	<i>aac(6')-Ib/ ant(2'')-Ia</i>
234 Ps aer	Espuito	F	<i>aac(6')-Ib/ ant(2'')-Ia</i>
326 Ps aer	Secreción traqueal	F	<i>aac(6')-Ib/ ant(2'')-Ia</i>
385 Ps aer	Catéter	F	<i>aac(6')-Ib/ ant(2'')-Ia</i>
391 Ps aer	Secreción de úlcera	F	<i>aac(6')-Ib/ ant(2'')-Ia</i>
319 Ps aer	Secreción traqueal	G	<i>ant(2'')-Ia/aph(3')-VIa</i>
333 Ps aer	Secreción traqueal	G	<i>ant(2'')-Ia /aph(3')-VIa aac(3)-IIa/ aac(6')-Ib/ ant(2'')-Ia</i>
437 Ps aer	Herida quirúrgica	H	<i>ant(2'')-Ia</i>
13 Ps aer	Herida	I	Sin gen
21 Ps aer	Líquido biliar	I	Sin gen
29 Ps aer	Espuito	I	Sin gen
117 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen
120 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen
142 Ps aer	Líquido peritoneal	I	Sin gen
144 Ps aer	Espuito	I	Sin gen
145 Ps aer	Espuito	I	Sin gen
177 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen
178 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen
180 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen

Tabla 3 Perfil genotípico y subgrupo para genes EMAs observados en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos (Continuación)

Código de Congelación	Origen	Subgrupo de análisis clonal	Perfil Genotípico para genes EMAs
181 Ps aer	Espuito	I	Sin gen
192 Ps aer	Absceso	I	Sin gen
235 Ps aer	Hemocultivo	I	Sin gen
236 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen
346 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen
355 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen
365 Ps aer	Espuito	I	Sin gen
381 Ps aer	Herida	I	Sin gen
393 Ps aer	Urocultivo	I	Sin gen
410 Ps aer	Secreción traqueal	I	Sin gen
415 Ps aer	Líquido peritoneal	I	Sin gen
419 Ps aer	Espuito	I	Sin gen
421Ps aer	Secreción faríngea	I	Sin gen
424Ps aer	Secreción faríngea	I	Sin gen
433 Ps aer	Espuito	I	Sin gen
434 Ps aer	Espuito	I	Sin gen
436 Ps aer	Espuito	I	Sin gen

Ps aer, *Pseudomonas aeruginosa*; A, aislados con perfil *aac(3)-IIa*; B, aislados con perfil *aac(3)-IIa*; C, aislados con perfil *ant(2'')-Ia*; D, aislados con perfil *aac(3)-IIa/aac(6')-Ib*; E, aislados con perfil *aac(3)-IIa/aph(3')-VIa*; F, aislados con perfil *aac(6')-Ib/ant(2'')-Ia*; G, aislados con perfil *ant(2'')-Ia/aph(3')-VIa*; H, *aac(3)-IIa/aac(6')-Ib/ant(2'')-Ia*.

11 ANEXOS

Anexo 1 Susceptibilidad a antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* y grupo de análisis clonal (Continuación...)

Código de Congelación	Fecha de Aislamiento	Sexo	Origen de la Muestra	Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	Subgrupo de análisis clonal
98 Ps aer	03/04/2006	M	Urocultivo	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	NP	R	I	R	R	B
104 Ps aer	31/03/2006	F	Secreción traqueal	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
117 Ps aer	25/04/2006	F	Secreción traqueal	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	I	I
120 Ps aer	01/04/2006	H	Espujo	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	I
130 Ps aer	19/05/2006	F	Secreción traqueal	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
142 Ps aer	22/06/2006	M	Líquido peritoneal	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	I
144 Ps aer	26/06/2006	F	Espujo	I	I	R	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	I
145 Ps aer	21/07/2006	M	Espujo	S	S	S	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I
152 Ps aer	29/06/2006	M	Herida	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	D
167 Ps aer	22/08/2006	F	Herida quirúrgica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
175 Ps aer	01/09/2006	ND	Herida quirúrgica	R	S	I	I	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	A
177 Ps aer	08/09/2006	M	Secreción traqueal	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	I
178 Ps aer	09/09/2006	F	Urocultivo	S	S	S	I	S	R	S	I	S	S	NP	S	S	S	S	I
180 Ps aer	11/09/2006	F	Urocultivo	S	S	S	I	S	R	S	R	S	S	NP	S	R	S	S	I
181 Ps aer	13/09/2006	M	Espujo	I	I	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I

Anexo 1 Susceptibilidad a antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* y grupo de análisis clonal (Continuación...)

Código de Congelación	Fecha de Aislamiento	Sexo	Origen de la Muestra	Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clay	Tobramicina	Subgrupo de análisis clonal
192 Ps aer	16/10/2006	F	Absceso	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	I
227 Ps aer	02/12/2006	M	Absceso	R	S	I	R	S	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	E
234 Ps aer	29/12/2006	M	Espudo	I	S	S	R	S	I	S	I	S	S	S	S	R	S	S	F
235 Ps aer	20/06/2007	F	Hemocultivo	R	R	R	R	R	R	I	R	I	I	S	R	R	R	R	I
236 Ps aer	28/12/2006	M	Secreción traqueal	S	R	R	R	R	R	I	I	R	I	I	S	R	R	S	I
237 Ps aer	28/12/2006	M	Secreción traqueal	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	E
243 Ps aer	11/01/2007	M	Hemocultivo	R	S	I	I	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	A
263 Ps aer	20/06/2007	F	Líquido pericárdico	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	E
310 Ps aer	15/11/2007	M	Espudo	S	I	I	R	S	R	S	I	R	S	R	S	S	S	S	C
318 Ps aer	27/11/2007	M	Espudo	R	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C
319 Ps aer	28/11/2007	M	Secreción traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	G
323 Ps aer	03/12/2007	M	Secreción traqueal	S	I	I	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	B
326 Ps aer	08/12/2007	F	Secreción traqueal	S	I	I	R	I	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	F
330 Ps aer	16/12/2007	M	Secreción traqueal	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	B
332 Ps aer	22/12/2007	M	Líquido pleural	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	B

Anexo 1 Susceptibilidad a antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* y grupo de análisis clonal (Continuación...)

Código de Congelación	Fecha de Aislamiento	Sexo	Origen de la Muestra	Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	Subgrupo de análisis clonal
				R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
333 Ps aer	23/12/2007	F	Secreción traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	G
346 Ps aer	30/12/2007	M	Espudo	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	I
349 Ps aer	03/02/2008	M	Líquido peritoneal	R	S	I	I	S	I	R	R	S	R	NP	R	R	R	R	A
351 Ps aer	29/01/2008	F	Pie diabético	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	NP	R	R	R	R	A
355 Ps aer	07/02/2008	F	Secreción traqueal	S	S	S	R	S	R	R	I	R	I	NP	S	S	S	S	I
362 Ps aer	26/09/2008	F	Secreción traqueal	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NP	R	R	R	R	A
365 Ps aer	26/09/2008	F	Espudo	S	S	S	I	S	R	S	R	R	S	NP	S	S	S	S	I
369 Ps aer	26/09/2008	M	Hemocultivo	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	A
373 Ps aer	26/09/2008	F	Prótesis	S	S	S	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	B
377 Ps aer	26/09/2008	M	Secreción traqueal	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
379 Ps aer	26/09/2008	F	Absceso	S	S	S	I	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	R	B
380 Ps aer	26/09/2008	F	Urocultivo	S	S	S	R	S	R	I	R	S	S	NP	S	R	S	S	B
381 Ps aer	30/09/2008	F	Herida	S	S	S	I	S	I	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I
385 Ps aer	30/09/2008	M	Secreción traqueal	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	F
387 Ps aer	30/09/2008	M	Herida quirúrgica	R	S	S	R	S	I	S	R	R	S	S	S	R	R	R	A

Anexo 1 Susceptibilidad a antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* y grupo de análisis clonal (Continuación)

Código de Congelación	Fecha de Aislamiento	Sexo	Origen de la Muestra	Amicacina	Aztreonam	Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem	Pip/Tazo	Piperacilina	Ticar/A Clav	Tobramicina	Subgrupo de análisis clonal
436 Ps aer	01/10/2008	M	Herida quirúrgica	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	I
437 Ps aer	01/10/2008	M	Herida quirúrgica	S	I	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	H
438 Ps aer	01/10/2008	M	Secreción traqueal	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C

Ps aer, *Pseudomonas aeruginosa*; M, masculino; F, femenino; NP, no presenta; R, resistente; S, sensible; I, intermedio.

Anexo 2 Resumen de genes EMAs y su perfil de resistencia a aminoglucósidos

Tipo de modificación enzimática	Gen	N° de accesión GenBank	Perfil de resistencia a aminoglucósidos
Acetilación			
AAC(3)-I	<i>aac(3)-Ia</i>	X15852	Gm, Astm, Siso
	<i>aac(3)-Ib</i>	L06157	
AAC(3)-II	<i>aac(3)-IIa</i>	X13543	Gm, Tob, Dbk, Ntl, 6'Ntl, 2'Ntl, Siso
	<i>aac(3)-IIb</i>	M97172	
	<i>aac(3)-IIc</i>	X54723	
AAC(3)-III	<i>aac(3)-IIIa</i>	X55652	Gm, Tob, Dbk, 5-epi, Siso, Km, Neo, Prm, Lvdm
	<i>aac(3)-IIIb</i>	L06160	
	<i>aac(3)-IIIc</i>	L06161	
AAC(3)-IV	<i>aac(3)-IVa</i>	X01385	Gm, Tob, Dbk, Ntl, 6'Ntl, 2'Ntl, Apr, Siso
AAC(3)-VI	<i>aac(3)-VIa</i>	M88012	Gm, 6'Ntl, Siso, (Tob), (Ntl), (5-epi), (Km)
AAC(6')-I	<i>aac(6')-Ia</i>	M18967	Tob, Dbk, Ntl, Amk, 2'Ntl, 5-epi, Siso, (Isp)
	<i>aac(6')-Ib</i>	M21682	
	<i>aac(6')-Ic</i>	M94066	
	<i>aac(6')-Id</i>	X12618	
	<i>aac(6')-Ie</i>	M18086	
	<i>aac(6')-If</i>	M55353	
AAC(6')-II	<i>aac(6')-IIa</i>	M29695	Gm, Tob, Dbk, Ntl, 2'Ntl, 5-epi, Siso
	<i>aac(6')-IIb</i>	L06163	
AAC(6')-APH(2'')	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	M18086, M13771	Gm, Tob, Dbk, Ntl, Amk, 2'Ntl, 6'Ntl, 5-epi, Astm
AAC(2')-I	<i>aac(2')-Ia</i>	L06156	Gm, Tob, Dbk, Ntl, 6'Ntl

Anexo 2 Resumen de genes EMAs y su perfil de resistencia a aminoglucósidos
(Continuación)

Tipo de Modificación enzimática	Gen	N° de accesión GenBank	Perfil de resistencia a aminoglucósidos
Adenilación			
ANT(2'')-I	<i>ant(2'')-Ia</i>	X04555	Gm, Tob, Dbk, Siso, Km
	<i>ant(2'')-Ib</i>	L06161	
ANT(3')-I	<i>ant(3')-Ia</i>	X02340, M10241	Sm, Spcm
ANT(4')-I	<i>ant(4')-Ia</i>	V01282	Tob, Amk, Isp, Dbk
ANT(4')-II	<i>ant(4')-IIa</i>	M98270	Tob, Amk, Isp
ANT(9)-I	<i>ant(9)-Ia</i>	X13290	Spcm
Fosforilación			
APH(3')-I	<i>aph(3')-Ia</i>	J01839	Km, Neo, Prm, Rsm, Lvdm, GmB
	<i>aph(3')-Ib</i>	M20305	
	<i>aph(3')-Ic</i>	M37910	
APH(3')-II	<i>aph(3')-IIa</i>	V00618	Km, Neo, Prm, Rsm, But, GmB (Amk)
APH(3')-III	<i>aph(3')-IIIa</i>	V01547	Km, Neo, Prm, Rsm, Lvdm, But, GmB, Amk, Isp
APH(3')-IV	<i>aph(3')-IVa</i>	X01986	Km, Neo, Prm, Rsm, But
APH(3')-V	<i>aph(3')-Va</i>	K00432	Neo, Prm, Rsm
	<i>aph(3')-Vb</i>	M22126	
	<i>aph(3')-Vc</i>		
APH(3')-VI	<i>aph(3')-VIa</i>	X07753	Km, Neo, Prm, Rsm, But, GmB, Amk, Isp
	<i>aph(3')-VIb</i>		
APH(3')-VII	<i>aph(3')-VIIa</i>	M29953	Km, Neo (Amk)

Amk, amikacina; Apr, apramicina; Astm, astromicina; But, butirosina; Dbk, dibekacina; 5-epi, 5-episisomicina; Gm, gentamicina; GmB, gentamicina B; Isp, isepamicina; Km, kanamicin; Lvdm, lividomicina; Neo, neomicina; Ntl, netilmicina; 2'Ntl, 2'-N-etilnetilmicina; 6'Ntl, 6'-N-etilnetilmicina; Sm, estreptomycin; Prm, paromomicina; Rsm, ribostamicina; Siso, sisomicina; Spcm, espectinomycin; Tob, tobramicina; (), actividad enzimática detectada *in vitro*.