

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

**Caracterización molecular y epidemiológica de aislamientos clínicos de
Pseudomonas aeruginosa multirresistente**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ester Viedma Moreno

Director

Fernando Chaves

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**Caracterización Molecular y Epidemiológica de
Aislamientos Clínicos de
Pseudomonas aeruginosa Multirresistente**

ESTER VIEDMA MORENO

2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I

**Caracterización Molecular y Epidemiológica de
Aislamientos Clínicos de
Pseudomonas aeruginosa Multirresistente**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ester Viedma Moreno

Bajo la dirección del Doctor

Fernando Chaves

2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I

**Caracterización Molecular y Epidemiológica de
Aislamientos Clínicos de
Pseudomonas aeruginosa Multirresistente**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ester Viedma Moreno

Bajo la dirección del Doctor

Fernando Chaves

2014

A mis padres y hermanos

A Huascar

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que desde el momento que inicié esta aventura profesional me han ayudado y apoyado de una manera u otra para continuar en el camino y no desistir en este proyecto que hoy acaba.

De esta forma quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la elaboración de este trabajo:

En primer lugar quiero mostrar mi agradecimiento al Dr. Fernando Chaves, director de esta tesis doctoral, sin cuya ayuda este trabajo no hubiese sido posible. Muchas gracias por haberme dado la oportunidad de poder trabajar y aprender contigo y con tu equipo (Mar Aguilera, Antonia Martín y Mercedes Murcia). Por haber confiado en mí, por tu constancia y sobre todo por todo el apoyo y la motivación para seguir adelante a lo largo de todos estos años.

Al Dr. Antonio Oliver y al Dr. Carlos Juan, junto a todo su equipo del Servicio de Microbiología e Instituto de Investigación del Hospital Son Dureta en Palma de Mallorca. Gracias por haber hecho posible vivir una enriquecedora experiencia profesional y personal durante mis meses de estancia con vosotros. Vuestra colaboración fue imprescindible para la realización de este trabajo.

A todo el Servicio de Microbiología del Hospital 12 de Octubre donde llevé a cabo mi formación como especialista y de donde me llevo tantos buenos recuerdos y vicencias que sin duda han marcado mi camino. Aquí comenzó todo.

Al Dr. Joaquín Otero, jefe de servicio del Microbiología del Hospital 12 de Octubre. Por ser la primera persona que me incitó a embarcarme en este proyecto, por haber confiado en mí y por sus sabios consejos, que me los llevo conmigo.

A las residentes y compañeras del servicio de Microbiología del Hospital 12 de Octubre, en especial a Carmen, Lula, Almu, Adela, Joshi, Laura, Jenn, Paty, Sara, Johanna y Olalla. Gracias chicas, por haber estado siempre ahí tanto en los

buenos momentos como en los menos buenos. Gracias por haberme hecho sentir tan querida.

A mis compañeras y amigas, Jennifer Villa, por haberme transmitido siempre tu entusiasmo y dedicación en cada una de las cosas que haces, y Olalla Sierra, por tu optimismo, tan necesario en algunos momentos pasados. Sois para mí un ejemplo de superación y de firmeza ante la vida.

Por último y no por ello menos importante, a mi familia por su apoyo incondicional y sin cuyo esfuerzo y sacrificio no hubiese sido posible llegar hasta donde me encuentro hoy. Y a tí, Huascar, mi luz, mi compañero, mi amigo. Gracias por estar SIEMPRE conmigo, por haberme motivado siempre hasta el infinito, por haberme ayudado a levantarme cuando he caído, gracias. Sin ti todo esto no habría sido posible.

Esta tesis ha sido en parte financiada por el Plan Nacional de I+D+i y el Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD12/0015/0009, RD06/0008) - cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa" FEDER.

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN

1. <i>Pseudomonas spp</i>	1
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
3. Significado e Impacto clínico de <i>P. aeruginosa</i>	3
4. Mecanismos de resistencia	
4.1 Resistencias mutacionales en <i>P. aeruginosa</i>	7
4.1.1 Reducción en la afinidad (Topoisomerasas).....	8
4.1.2 Hiperproducción de <i>ampC</i>	8
4.1.3 Hiperexpresión de bombas de expulsión.....	10
4.1.4 Represión o inactivación de la porina <i>oprD</i>	10
4.1.5 Otros.....	11
4.2 Resistencias adquiridas en <i>P. aeruginosa</i>	12
4.2.1 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	
- BLEE tipo PSE.....	15
- BLEE tipo PER.....	16
- BLEE tipo OXA.....	16
- BLEE tipo GES.....	17
4.2.2 Carbapenemasas.....	18
- Carbapenemasas clase A.....	18
- Carbapenemasas clase B o Metallo- β -lactamasas.....	21
- Carbapenemasas clase D.....	26
- Carbapenemasas en España.....	29

4.2.3 Enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA).....	30
- AAC.....	31
- APH.....	32
- ANT.....	33
- EMA y elementos genéticos móviles.....	33
5. Elementos móviles en <i>Pseudomonas spp</i>	34
5.1 Plásmidos.....	34
5.2 Transposones.....	39
5.3 Integrones.....	45
- Implicación clínica de la asociación integrón- <i>cassette</i> génico de resistencia.....	55
6. Expansión y diseminación de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente. Clones de alto riesgo.....	57

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

- Justificación del estudio y objetivos.....	65
--	----

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO.-

1.1 Diseño del estudio.....	71
1.2 Muestras incluidas.....	72

1.3 Definición de multirresistencia.	72
1.4 Características clínicas de los pacientes.....	74
2. SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS Y SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	75
3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.-	
3.1 Extracción de ADN genómico.....	83
3.2 Extracción de ADN plasmídico.....	84
3.3 Extracción ARN.....	85
4. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	86
5. AMPLIFICACIÓN DEL ADN.....	86
6. SEPARACIÓN Y VISUALIZACIÓN DEL ADN.	
6.1 Electroforesis de corriente continua.....	88
6.2 Tinción y visualización.....	89
7. PURIFICACIÓN DE ADN Y SECUENCIACIÓN.-	
7.1 Purificación de ADN.....	90
7.2 Reacción de Secuenciación.....	90
7.3 Análisis Bioinformático.....	92

8. TIPIFICACIÓN MOLECULAR.-	
8.1 PFGE.....	92
8.2 MLST.....	96
9. CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA MUTACIONALES.-	
9.1 Expresión de bombas de expulsión (RT-PCR) y de β -lactamasa cromosómica (AmpC).....	98
9.2 Determinates de resistencia a quinolonas.....	100
9.3 <i>oprD</i>	100
10. CARACTERIZACIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).-	
10.1 Detección fenotípica.....	101
10.2 Amplificación (PCR) genes <i>bla</i> -VIM, -IMP, -PER, -CTX-M, -SHV, -TEM, -OXA, -PSE.....	102
10.3 Detección Bioquímica.....	103
10.4 Experimentos de Clonación/Transformación.....	105
11. CARACTERIZACIÓN DE CARBAPENEMASAS (Metallo- β -Lactamasas, MBL)	
11.1 Test fenotípico.....	106
11.2 Amplificación y Secuenciación.....	106

12. CARACTERIZACIÓN DE LOS ENTORNOS GENÉTICOS DE CARBAPENEMASAS. PRESENCIA O AUSENCIA DE INTEGRONES.....	107
13. LOCALIZACIÓN DE CARBAPENEMASAS.-	
13.1 Ensayos de Transformación.....	108
13.2 Ensayos de Hibridación y Transferencia.....	109
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	112

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ESTUDIO	
1.1 Incidencia y prevalencia de aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> durante un periodo de 4 años en el Hospital Universitario 12 de Octubre.....	127
1.2 Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por <i>P. aeruginosa</i>	128
1.3 Resistencia antimicrobiana de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente.....	132
1.4 Análisis genotípico de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente.....	133

1.5 Estudio de la epidemiología molecular de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente durante 2007-2010 en el Hospital Universitario 12 de Octubre.....	136
--	-----

- Prevalencia de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente durante 2007-2010 en el Hospital Universitario 12 de Octubre.....	137
--	-----

2. FASE I: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE UN BROTE DE <i>P. aeruginosa</i> MULTIRRESISTENTE DETECTADO DURANTE 2007-2008.-	
2.1 Descripción general.....	139
2.2 Genotipado de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> durante 2007 y 2008.....	140
2.3 Características clínicas de pacientes colonizados y/o infectados con el clon multirresistente A.....	144
2.4 Patrón de resistencia de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente perteneciente al clon A durante los años 2007 y 2008.....	146
2.5 Caracterización molecular del mecanismo de resistencia del clon epidémico A.....	147

3.3 FASE II: DISEMINACIÓN DE UN CLON EPIDÉMICO,
CARBAPENEMASAS Y SUS ENTORNOS GENÉTICOS.-

3.1 Caracterización genotípica del clon mayoritario.

3.1.1 Genotipado de aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente.....	156
3.1.2 Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por el clon B.....	160
3.1.3 Resistencia Antimicrobiana de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> pertenecientes al clon B.....	164
3.1.4. Detección y tipado de Metallo- β -lactamasas en aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente.....	165

3.2 Estudio de los entornos genéticos de MBLs en cepas de *P. aeruginosa* y *P. putida* multirresistente durante el periodo de 2007 a 2010.....

3.2.1. Descripción general: características clínicas, análisis genotípico y perfil de resistencia de las cepas de <i>Pseudomonas spp.</i> portadoras de MBL.....	169
3.2.2. Estudio de los entornos genéticos de las cepas portadoras de MBL.	173
- Estructura de los integrones portadores de MBLs.....	176
3.2.3. Localización de las MBL tipo VIM-2.....	182

3.2.4. Caracterización genética del entorno del integrón.....	184
---	-----

V. DISCUSIÓN

1. <i>P. aeruginosa</i> MULTIRRESISTENTE Y EL PAPEL DE LAS CARBAPENEMASAS.....	189
2. BROTE DE <i>P. aeruginosa</i> MULTIRRESISTENTE ST235.....	193
3. DISEMINACIÓN DE UN DE <i>P. aeruginosa</i> MULTIRRESISTENTE PRODUCTOR DE VIM-2 DE GRAN EXPANSIÓN.....	196
4. EMERGENCIA POLICLONAL DE CEPAS DE <i>Pseudomonas spp.</i> MULTIRRESISTENTES PRODUCTORAS DE MBL.....	199
5. PAPEL DE LOS INTEGRONES EN LA ADQUISICIÓN DE DETERMINANTES DE RESISTENCIA.....	200
6. DISEMINACIÓN DE CLONES DE ALTO RIESGO.....	203

VI. CONCLUSIONES.....	211
------------------------------	------------

VII. BIBLIOGRAFIA.....	217
-------------------------------	------------

VIII. ANEXOS

Resumen.....	240
Publicaciones asociadas a la tesis doctoral.....	252

Relación de Tablas

I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.- Principales mecanismos de resistencia mutacional en *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla 2.- Clasificación y características de β -lactamasas y carbapenemasas

Tabla 3.- Carbapenemasas. Clasificación y perfil de hidrólisis

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1.3.- Definición de los términos multirresistencia, extrarresistencia y panrresistencia

Tabla 2.1- Aislamientos clínicos de *Pseudomonas spp.* recogidos durante el estudio

Tabla 1.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR empleados en el estudio del MLST

Tabla 1.- *Primers* y condiciones de secuenciación por PCR empleados en el estudio del MLST (Continuación)

Tabla 2.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR empleados en la caracterización de los mecanismos de resistencia por mutaciones en el cromosoma

Tabla 2.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR empleados en la caracterización de los mecanismos de resistencia por mutaciones en el cromosoma (Continuación)

Tabla 3.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de BLEE

Tabla 4.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de MBL

Tabla 5.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de los entornos genéticos de las MBL.

Tabla 5.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de los entornos genéticos de las MBL.

Caracterización de los Integrones de clase 1 (Continuación)

Tabla 6.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de los entornos genéticos de los integrones de clase 1. Caracterización del módulo *tni*

Tabla 7.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR para la elaboración de sondas específicas utilizadas en la técnica de *Southern Blot*

III. RESULTADOS

Tabla 1.- Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa*

Tabla 2.- Esquema de MLST de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente representativos del clon A

Tabla 3: Características clínicas de pacientes colonizados/infectados por *P. aeruginosa* multirresistente durante 2007 y 2008. Comparación entre Clon A y Clon no A

Tabla 4.- Perfil de resistencia antibiótica de los aislamientos de *P. aeruginosa* durante la primera fase de estudio.

Tabla 5: CMIs y mecanismos de resistencia de los aislamientos seleccionados de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon epidémico A

Tabla 6.- Tipado molecular por MLST de cepas de *P. aeruginosa* multirresistente representativas del clon B

Tabla 7.- Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes y no pertenecientes al clon B

Tabla 8.- Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes al clon B frente a los pertenecientes al clon A

Tabla 9.- Número de aislamientos de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon B resistentes a los diferentes antibióticos ensayados

Tabla 10.- Características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de *P. aeruginosa* y *P. putida* multirresistente aislados en el periodo de 2007-2010.-

Tabla 11.- Características clínicas de cepas de *Pseudomonas spp.* portadoras de MBL durante el periodo 2007-2010

Tabla 12.- Perfiles alélicos obtenidos por MLST de las cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes portadoras de MBL durante el período de 2007 a 2010

Tabla 13.- CMIs de las cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes portadoras de MBL durante los años 2007 a 2010

Tabla 14.- Estructura de los integrones portadores de MBL en cepas de *P. aeruginosa* y *P. putida* durante los años 2007-2010

Relación de Figuras

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1: Diversidad genética de las variantes alélicas de MBL tipo IMP y localización de los primeros hallazgos documentados (Adaptación de *Cornaglia y cols.*, 2011)

Figura 2: Diversidad genética de las variantes alélicas de MBL tipo VIM y localización de los primeros hallazgos documentados (Adaptación de *Cornaglia y cols.*, 2011)

Figura 3: Esquema general de la estructura de una secuencia de inserción

Figura 4: Esquema general de un transposón compuesto

Figura 5: Esquema de la estructura de un integrón complejo

Figura 6: Esquema general de la estructura de un integrón

Figura 7: Estructura de un integrón de clase 1

Figura 8: Estructura esquematizada de un gen *cassette*

III. RESULTADOS

Figura 1: Incidencia anual de infecciones y /o colonizaciones por *P. aeruginosa* MDR

Figura 2: Prevalencia de aislamientos de *P. aeruginosa* MDR en el Hospital Universitario 12 de Octubre

Figura 3: Distribución de aislamientos de *P. aeruginosa* en función de la muestra clínica

Figura 4: Infecciones producidas por cepas de *P. aeruginosa* multirresistente durante el periodo de estudio

Figura 5.- Dendograma de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente (incluidos también los aislamientos de *P. putida*) entre los años 2007-2010

Figura 6: Distribución de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente (incluidos también los aislamientos de *P. putida*) entre los años 2007-2010

Figura 7: Distribución temporal de los clones mayoritarios de *P. aeruginosa* durante los cuatro años de estudio (2007-2010)

Figura 8: Prevalencia de carbapenemasas en aislamientos multirresistentes de *P. aeruginosa*

Figura 9: Prevalencia y distribución temporal de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente productora de GES1/5 durante el periodo de estudio

Figura 10: Prevalencia y distribución temporal de los aislamientos de *P. aeruginosa* (incluidos los aislamientos de *P. putida*) multirresistente productores de GES1/5 durante el periodo de estudio

Figura 11: PFGE de aislamientos pertenecientes al clon A y un aislamiento no A

Figura 12: Dendograma de *P. aeruginosa* multirresistente durante 2007-2008

Figura 13: Distribución temporal del clon A frente al total de aislamientos de *P. aeruginosa* (incluidos los clones de *P. putida*) a lo largo de los cuatro años de estudio.

Figura 14: E-Test MBL positivo

Figura 15: Fragmento de la secuencia de la porina oprD

Figura 16: Fragmento de la secuencia de aa de la proteína gyrA

Figura 17: Fragmento de la secuencia de aa de la proteína parC

Figura 18: Representación de la estructura del integrón de clase 1 detectado en las cepas de *P. aeruginosa* multirresistente representativas del clon A

Figura 19: PFGE de aislamientos de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon mayoritario B y tres aislamientos con pulsotipos únicos recogidos durante los años 2009 y 2010

Figura 20: Dendograma de *P. aeruginosa* multirresistentes durante 2009-2010

Figura 21: Dendograma de las cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes seleccionadas para el estudio del entorno de genético de las MBL

Figura 22: PCR *up-stream* de VIM-2

Figura 23: PCR *down-stream* de VIM-2

Figura 24: Secuencia de aminoácidos de la enzima *aac49* detectada en los integrones de tipo 1

Figura 25: Digestión con *ICeuI* de cepas de *P. aeruginosa* productoras de VIM-2

Figura 26: Digestión con *ICeuI* de cepas de *P. putida* productoras de VIM-2

Figura 27A: Estructura de integrones con módulo 3'CS completo junto con los elementos *tniBΔ1* y *tniA*

Figura 27B: Estructura de integrones con módulo 3'CS completo junto con los elementos *tniBΔ3* y *tniA*

ABREVIATURAS

aa= aminoácido

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

Bla-: beta-lactamasa

c.s.p: cantidad suficiente para

CC: Complejo Clonal

CMI: Concentración Mínima

Inhibitoria

Cols.: colaboradores

dNTP: Deoxinucleótido Trifosfato

EDTA: Ácido

Etilendiaminotetraacético

Kb: kilobases

KCl: cloruro potásico

LB: Luria Bertain

M: concentración molar

M: molar

mA: miliamperios

MgCl₂: cloruro de magnesio

Min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

NaOH: Hidróxido sódico

nt: nucleótido

°C: grados centígrados

p.b: pares de bases

A/C: amoxicilina/ácido clavulánico

PCR: *Polymerase Chain Reaction*;

Reacción en Cadena de la Polimerasa

rpm: revoluciones por minuto

rRNA: Ácido Desoxirribonucleico

ribosómico

Seg: segundos

spp.: especies

ST: *Sequence Type*; Secuencia Tipo

T^a: temperatura

TBE: tris-borato-EDTA

Tn: transposón

Tnp: transposasa

TRIS: trishidroxiaminometilmetano

U: unidades de enzima

UFC: unidades Formadoras de Colonia
por mililitro

UV: ultravioleta

V/cm: voltio/centímetro

w/v: peso/volumen

µg: microgramo

µM: micromolar

INTRODUCCIÓN

1. *Pseudomonas spp.*-

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonaceae*. Esta familia incluye el género *Xanthomonas*, que junto con *Pseudomonas*, forman el grupo de las pseudomonadales. Este grupo es tradicionalmente conocido como patógeno de plantas más que de animales.

Pseudomonas spp. es un género verdaderamente ubicuo, lo cual parece ser consecuencia de los simples requerimientos nutritivos que posee, del rango de compuestos de carbón que utiliza, y de su gran adaptabilidad genética y metabólica. De esta forma, cualquier hábitat con una Tª de entre 4°C a 42°C, un pH de entre 4 y 8 y con compuestos orgánicos simples o complejos, es un hábitat potencial para *Pseudomonas spp.* Así pues, las especies de *Pseudomonas* se encuentran en suelos y aguas que presentan unas condiciones aeróbicas, mesófilas y de pH neutro. Debido a que la mayoría de las especies de este género son aeróbicas estrictas, el oxígeno parece ser casi el único requerimiento obligado para la colonización de un ambiente por *Pseudomonas spp.*

2. *Pseudomonas aeruginosa.*-

Dentro del género *Pseudomonas*, la más importante clínicamente es *Pseudomonas aeruginosa*, debido principalmente a su capacidad de producir infecciones en humanos. *P. aeruginosa* fue aislada por primera vez de muestras ambientales por *Schroeter* en 1872. La denominación de la especie deriva de término “aeruginoso” (*aeruginous*) que significa “el color del cobre oxidado”,

reflejando el característico color azul-verdoso que presentan las colonias debido a la producción de pigmentos.

Como todos los miembros de esta familia, se trata de un bacilo gram negativo aerobio, muy versátil metabólicamente, pudiendo utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. La morfología colonial, pigmentación y propiedades de movilidad de esta especie pueden ser bastante heterogéneas. Un fenotipo comúnmente observado cuando estas cepas crecen en medio sólido es el fenotipo mucoso, consecuencia de la sobreproducción de alginato. Este fenotipo es muy común en los aislamientos procedentes de muestras de vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística (FQ), y se relaciona con infecciones crónicas en estos pacientes. Los papeles potenciales de este polisacárido, incluyen el aumento de la resistencia a los antibióticos y la adherencia a las células epiteliales (*May y cols., 1991*).

Debido a su ubicuidad y a la gran capacidad para colonizar ambientes húmedos, *P. aeruginosa* se encuentra frecuentemente en reservorios tanto extra- como intrahospitalarios, donde esta especie ha sido aislada en gran variedad de soluciones acuosas como desinfectantes, jabones, fluidos de irrigación y de diálisis, así como en los propios equipamientos. No es frecuente encontrar este microorganismo como parte de la flora bacteriana de individuos sanos, pero en caso de ser encontrada, el tracto gastrointestinal es el lugar más frecuente de colonización. Otros lugares húmedos del cuerpo también pueden ser colonizados, incluyendo la faringe, la mucosa nasal y zonas como axilas o el perineo, de donde ha sido aislada en 2-10% de individuos sanos. Las tasas de colonización son elevadas en individuos inmunosuprimidos u hospitalizados, particularmente en

aquellos que pasan largos periodos de hospitalización o que han recibido terapia antimicrobiana de amplio espectro o quimioterapia. En estos pacientes, además de los lugares de colonización típicos de los individuos sanos, hay que añadir el tracto respiratorio inferior, sobre todo en pacientes intubados (*Pollack Y cols., 2000; Myhall y cols., 1997*).

3. SIGNIFICADO E IMPACTO CLÍNICO DE *P. aeruginosa*.-

Dentro del género *Pseudomonas spp.*, *P. aeruginosa* es el patógeno humano más importante, tanto por el número y por el tipo de infecciones causadas, así como por la morbilidad y mortalidad asociadas (*Mesnaros y cols., 2007; Aloush y cols., 2006*).

Su implicación en las enfermedades en humanos fue reconocida por primera vez en 1882 cuando *Gessard* aisló *P. aeruginosa* de vendajes teñidos de color azul-verdoso, debido a la producción de piocianina. Actualmente, *P. aeruginosa* es reconocida como una fuente común en las infecciones nosocomiales y en las infecciones adquiridas en la comunidad, aunque cada vez es más frecuente el aislamiento en muestras clínicas de otras especies como *P. stutzeri* o *P. putida*.

La patogénesis de este microorganismo se describe a menudo como multifactorial, ya que la virulencia no se puede atribuir a un único determinante. La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* que participan en infecciones son tanto invasivas como toxigénicas, resultado de la producción de factores de virulencia de superficie, lo que permite la unión bacteriana, la colonización y la invasión, y de los factores de virulencia secretados que dañan tejidos o desencadenan la

producción de citoquinas. A pesar de la gran colección de factores de virulencia, *P. aeruginosa* rara vez infecta personas inmunocompetentes o tejidos que no están dañados. Esto refleja la poca capacidad de esta bacteria de colonizar o dañar epitelios intactos, y explica por qué la pérdida de la integridad epitelial, especialmente con un declive de la función inmunológica, es normalmente un prerrequisito para las infecciones por este patógeno oportunista. La formación de *biofilm* también juega un papel muy importante en la patogénesis de *P. aeruginosa* ya que se piensa que contribuye a la infección crónica de las vías respiratorias de pacientes de fibrosis quística. Los microorganismos que crecen formando parte de *biofilms* presentan elevada resistencia a los antibióticos, a los mecanismos de eliminación mediados por el complemento, a la fagocitosis y a los biocidas. Las cepas causantes de infección respiratoria crónica están a menudo asociadas con elevadas tasas de mutación y, por lo tanto, con el desarrollo de resistencias (Macia y cols., 2005; Oliver y cols., 2000), y con la formación de biopelículas en el pulmón, lo que limita drásticamente la actividad de los antibióticos (Pedersen, 1992).

Las infecciones por *P. aeruginosa* se pueden clasificar en agudas o crónicas. Las agudas, como las neumonías asociadas a ventilación mecánica, son invasivas, citotóxicas y frecuentemente resultan en una infección sistémica, shock séptico y elevada mortalidad (Lynch, 2001; Vincent, 2003). En cambio las infecciones respiratorias crónicas asociadas a fibrosis quística, a pesar de que presentan una elevada colonización bacteriana en los esputos, son muy poco invasivas, no citotóxicas y raramente progresan a infección sistémica (Høiby y

cols., 2002). Debido a que estas infecciones pueden persistir durante décadas, acaban resultando en un grave deterioro del epitelio pulmonar y muerte.

El espectro de infecciones que puede causar *P. aeruginosa* es muy amplio, va desde una foliculitis, hasta la bacteriemia. Las infecciones más comunes implican al tejido cutáneo, corneal, tracto urinario y respiratorio, aunque en realidad las infecciones por este patógeno pueden ocurrir en todas las localizaciones anatómicas, y todas ellas pueden derivar en bacteriemia (*Vincent, 2003*). Las infecciones por *P. aeruginosa* deben ser consideradas como graves, incluso mortales en situaciones específicas, con las mayores tasas de mortalidad registradas en los casos de bacteriemia en pacientes neutropénicos (30-50 %) (*Mesanaros y cols.*, 2007). *P. aeruginosa* es la causa principal de neumonías asociadas a ventilación mecánica y en pacientes con fibrosis quística con tasas de mortalidad del 45-70 % asociadas a neumonía nosocomial en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos También causa colonización crónica de las vías respiratorias de los pacientes que sufren de bronquiectasias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En pacientes neutropénicos con cáncer que reciben quimioterapia, la bacteriemia por *P. aeruginosa* es una complicación común. La bacteriemia y septicemia por *P. aeruginosa* puede también ocurrir en pacientes con inmunodeficiencia relacionada con SIDA, diabetes mellitus o quemaduras graves. La mayoría de estas infecciones se adquieren en hospitales y geriátricos. *P. aeruginosa* es también la tercera causa (12 %) de las infecciones del tracto urinario adquiridas en el hospital, causando elevadas tasas de mortalidad (hasta del 50%) (*Pollack y cols.*, 2000; *Vincent, 2003*). *P. aeruginosa* es el principal agente causal de la “otitis del nadador” (una

forma de otitis externa) y de la otitis externa maligna en pacientes diabéticos. Aunque es menos frecuente que otros organismos, *P. aeruginosa* puede también ser la causa de infecciones oftálmicas graves (queratitis bacteriana en individuos con lentes de contacto y oftalmía neonatal), meningitis y abscesos cerebrales y endocarditis en usuarios de drogas por vía parenteral. Las infecciones de piel y hueso son raras, pero pueden ocurrir después de heridas punzantes. *P. aeruginosa* rara vez provoca verdaderas infecciones del tracto digestivo, pero su colonización favorece el desarrollo de infecciones invasivas en pacientes de riesgo.

En definitiva, los individuos más susceptibles a las infecciones por este microorganismo son aquellos que presentan una inmunodeficiencia o un epitelio pulmonar comprometido, así como los que han sufrido quemaduras, ulceraciones o abrasiones mecánicas. Estas infecciones oportunistas causadas por *P. aeruginosa* pueden ser resultado de la inmunosupresión, ya que ésta permite por un lado, que las cepas con baja patogenicidad tengan la capacidad de invadir tejidos y, por otro lado, realza la capacidad de virulencia de estas cepas con baja patogenicidad. La inmunodeficiencia del huésped, combinada con la elevada incidencia de cepas resistentes a antibióticos, hace que el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno se convierta en un serio reto médico

4. MECANISMOS DE RESISTENCIA.-

Una de las características más preocupantes de *P. aeruginosa* es su elevado nivel de resistencia intrínseca a los antibióticos (algunos β -lactámicos, amoxicilina-clavulánico, cloranfenicol, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas o trimetoprim), así como su gran capacidad de desarrollo de nuevas resistencias a través de mutaciones en su cromosoma. En este sentido, cabe destacar la hiperproducción de la β -lactamasa cromosómica tipo AmpC, confiriendo resistencia a todas las penicilinas y cefalosporinas. Es característica también de *P. aeruginosa* la resistencia mediada por la hiperexpresión de alguna de las múltiples bombas de expulsión codificadas en su genoma: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM, etc, y que dependiendo de la bomba implicada, pueden afectar a prácticamente todos los β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Por último, cabe destacar también la represión o inactivación de la porina OprD, que confiere resistencia a los carbapenems. Por otro lado, *P. aeruginosa* es capaz de adquirir nuevos determinantes de resistencia por transferencia horizontal. Esta gran capacidad de desarrollar resistencia reduce enormemente el abanico de opciones antibióticas disponible.

4.1 RESISTENCIAS MUTACIONALES EN *P. aeruginosa*.

4.1.1 Reducción de la afinidad (Topoisomerasas).-

En *P. aeruginosa*, la resistencia a las fluoroquinolonas se produce por varios mecanismos, entre otros por la disminución de la permeabilidad de la pared celular y por sistemas de expulsión de antibióticos, y por modificaciones en las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. Estas enzimas entran a formar parte de lo que se conoce como *región de determinantes de resistencia a quinolonas* (*QRDR* del inglés *quinolone region drug resistant*).

ADN girasa está compuesta por dos subunidades A y B, las cuales están codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. La topoisomerasa IV es homóloga a la ADN girasa y también está compuesta por dos subunidades: ParC, codificada por el gen *parC*; y la subunidad ParE, codificada por el gen *parE*. Mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* conferirán resistencia a fluoroquinolonas por disminución de la afinidad de las enzimas a las fluoroquinolonas (*Akasaka y cols., 2001; Oh y cols., 2003*).

4.1.2 Hiperproducción de AMPc.-

La hiperproducción de la cefalosporinasa cromosómica de clase C (*ampC*), va a reducir la sensibilidad a todas las penicilinas (incluyendo las combinaciones con inhibidores de β -lactamasas, como la piperacilina-tazobactam), cefalosporinas (ceftazidima y cefepime) y monobactámicos (aztreonam), aunque el nivel de resistencia va a variar en función del grado de desrepresión de la *ampC*. *AmpC* es una β -lactamasa de clase C (*Bush y cols., 1995, Livermore 1995*) presente en la

mayoría de las *Enterobacteriaceae*, así como en *P. aeruginosa* y otros bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF). Esta β -lactamasa (excepto en *Escherichia coli* y *Shigella spp.*) es producida a bajos niveles basales, pero su expresión puede ser inducida por ciertos β -lactámicos, especialmente cefoxitina e imipenem. Se conocen varios genes reguladores involucrados en la inducción de *ampC*, un proceso que está íntimamente relacionado con la renovación del peptidoglicano de la pared celular (Normark, 1995). Entre los genes involucrados en la hiperproducción de *ampC* se encuentran *ampR*, *ampD*, *ampG* y *ampE*. De los genes que más frecuentemente se han visto involucrados en la hiperproducción de *AmpC* destacan *ampR*, que codifica un regulador transcripcionales de la familia de *LysR* que es requerida para a inducción de β -lactámicos (Honore y cols., 1986; Lindquist y cols., 1989) y *ampD*, que codifica la N-acetil-anhidromurámico-L-alanina amidasa del citosol que hidroliza el 1,6-anhidromurámico péptido el cual actúa como represor de la expresión de *ampC* (Høltje y cols., 1994; Lindberg y cols., 1987; Juan y cols., 2005). Por otro lado, se ha visto que las proteínas de unión a la penicilina (PBP, del inglés *proteína binding penicillin*) también pueden desempeñar un papel importante en la resistencia a β -lactámicos en bacilos gram negativos (BGN). Se produce como consecuencia de la inactivación de una PBP4 no esencial codificada por *dac-B*, que se comporta como objetivo trampa para los β -lactámicos. La inactivación de esta PBP se presenta como una respuesta de resistencia a β -lactámicos altamente eficiente y compleja, que provoca una hiperproducción de *ampC* y una activación específica de un regulador de dos componentes, *CreBC* (*BlrAB*), que a su vez juega un papel importante en la resistencia (Moya y cols., 2009).

4.1.3 Hiperexpresión de bombas de expulsión.-

La resistencia mediada por la hiperexpresión por bombas de expulsión va a afectar a fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas y también a meropenem, aunque a este último en un menor grado. La secuenciación del genoma sugiere la presencia de gran variedad de bombas de expulsión (Poole, 2004; Masuda y cols., 2000, Livermoore, 2002). Entre las más conocidas se encuentran:

- MexAB-OprM: su hiperexpresión se debe a mutaciones en los genes represores *nalB* y *mexR* o *nalC* y otros. Esta bomba va a conferir resistencia frente a fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas y meropenem (no a imipenem). Además es la encargada de expulsar otros antibióticos como los aminoglucósidos
- MexCD-OprJ: su hiperexpresión se debe a mutaciones en los genes *nfxB*. Va a conferir resistencia a fluoroquinolonas y a algunos β -lactámicos.
- Mex-OprN: su hiperexpresión se debe a mutaciones en los genes *nfxC*-*mexT*. Puede llegar a afectar a todos los β -lactámicos (incluidos los carbapenems) y a fluoroquinolonas.
- MexXY-OprM. Al igual que ocurre con la bomba *MexAB-OprM*, se ve afectada la sensibilidad hacia meropenem pero no a imipenem. Además esta bomba podría favorecer la resistencia a aminoglucósidos.

4.1.4 Represión o inactivación de la porina *OprD*.-

La porina OprD forma un canal transmembrana por el que pueden acceder los carbapenems y no otros β -lactámicos (Studemeister y cols., 1988). Mutaciones en el gen *oprD* pueden generar un codón stop prematuro y una terminación

temprana de la traducción, que también puede estar producida por un cambio en la pauta de lectura que genera un nuevo codón *stop*. La represión o pérdida de la porina *OprD* está asociada con resistencia a imipenem y sensibilidad reducida a meropenem. Este mecanismo de resistencia es el más comúnmente asociado a la resistencia a imipenem en *P. aeruginosa* (Queenan y cols., 2007). Por otro lado, en ausencia de mutaciones, la expresión del gen *OprD* puede estar reprimida en los mutantes de tipo *nfxC*. La porina *OprD* es corregulada junto con MexEF-OprN, a través del gen *nfxC* que codifica para la proteína *mexT*, así mutantes del gen *nfxC* (*mexT*) pueden ser seleccionados ocasionalmente por fluoroquinolonas con lo que puede producir una sobreexpresión en la bomba MexEF-OprN y una represión de *OprD*, dando lugar a resistencia a fluoroquinolonas e imipenem y sensibilidad reducida a meropenem (Livermore, 2002; Quale y cols., 2006).

4.1.5 Otros.-

- Resistencia a aminoglucósidos por reducción en el transporte de aminoglucósidos y por aumento en la permeabilidad de la membrana.
- Resistencia a las polimixinas por alteración en la estructura de la membrana (Livermore, 2002).

Tabla 1: Principales mecanismos de resistencia mutacional en *P. aeruginosa*.

(Adaptación de Livermore, 2002)

Mecanismo de resistencia	Gen mutado	β-lactámicos	Imipenem	Meropenem	Amg	Fq	Pm
Reducción de la afinidad a							
Topoisomerasa II	<i>gyrA</i>	NA	NA	NA	NA	r/R	NA
Topoisomerasa IV	<i>parC</i>	NA	NA	NA	NA	r/R	NA
Desrepresión de AmpC							
Parcial	<i>AmpD</i>	R	NA	NA	NA	NA	NA
Total	<i>AmpD</i> +otros	R	NA	NA	NA	NA	NA
Sobreexpresión de							
MexAB-OprM	<i>nalB</i> y <i>mexR</i> ; <i>nalC</i> y otros	R	NA	r	NA	R	NA
MexCD-OprJ	<i>nfxB</i>	R	NA	r	NA	r/R	NA
MexEF-OprN	<i>nfxC</i> y <i>mexT</i>	R	r	r	NA	r/R	NA
MexXY-OprM		R	NA	r	r/R	r/R	NA
Reducción en el transporte de Aminoglucósidos							
Inactivación de OprD	<i>OprD</i> ; <i>nfxC</i> y <i>mexT</i>	NA	R	r	NA	NA	NA
Alteraciones en la membrana							
		NA	NA	NA	NA	NA	R

NA: no aplicable; r: resistencia de bajo nivel; R: resistencia de alto nivel. Amg: aminoglucósidos ;
Fq: fluoroquinolonas ; Pm: polimixinas

4.2 RESISTENCIAS ADQUIRIDAS EN *P. aeruginosa*.

Además de la capacidad de *P. aeruginosa* para adquirir resistencia por mutaciones en su cromosoma, este microorganismo también es capaz de adquirir nuevos determinantes de resistencia por transferencia horizontal, como son las β-

lactamasas (β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas) y las enzimas modificantes de los aminoglucósidos (EMA) (Mesanaros y cols., 2007).

Las β -lactamasas se han clasificado utilizando diferentes criterios:

- i) Clasificación molecular de Ambler (Ambler, 1991). Se basa en la estructura molecular. Divide a las β -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D) basándose en la estructura de la proteína. Las enzimas de los grupos A, C y D son serin- β -lactamasas, que contienen una serina en su centro activo, y las del grupo B son metalo- β -lactamasas, dependientes de Zn^{+2} .
- ii) Clasificación funcional propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 y actualizada en 2009 (Bush y cols., 1995, 2010) establece diferentes grupos según su sustrato y el perfil de inhibición por inhibidores de β -lactamasas. Las β -lactamasas se dividen en cuatro grandes grupos:

Grupo 1: incluye enzimas de la clase C de Ambler que hidrolizan cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam.

Grupo 2: incluye enzimas de las clases A y D de Ambler que se inhiben por el ácido clavulánico y está compuesto por 12 subgrupos.

Grupo 3: incluye enzimas de la clase B de Ambler. Son metalo- β -lactamasas (MBL) que requieren para actuar de la unión de Zn^{+2} a su centro activo y que se van a inhibir por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pero no se inhibirán por el ácido clavulánico o por tazobactam.

Grupo 4: incluido en la clasificación inicial, sin embargo, no aparece en la actualización del año 2010. La mayoría enzimas incluidas inicialmente en

este grupo no están completamente caracterizadas y podrían ser clasificadas en los grupos anteriores.

Tabla 2: Clasificación y característica de β -lactamasas y carbapenemasas (Adaptación de Bush y cols., 1995; Bush y cols., 2010).

Ambler (1980)	Bush-Jacoby (2010)	Sustrato	Inhibición A/C	Inhibición EDTA	Características	β -lactamasas representativas	Microorganismos
C	1	Cefalosporinas	-	-	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas.	AmpC, P99, AACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	<i>Enterobacterias, Pseudomonas aeruginosa</i>
C	1e*	Cefalosporinas	-	-	Hidrólisis elevada de cefamicinas cefazidima y de otros oximiino-beta-lactámicos	GC1, CMY-37	<i>Enterobacterias, P. aeruginosa</i>
A	2 ^a	Penicilinas	+	-	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que de cefalosporinas	PC1	<i>Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter amalonaticus</i>
A	2b	Penicilinas, cefalosporinas 1 ^a generación	+	-	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y de cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1	<i>Enterobacterias, Haemophilus influenzae, P. aeruginosa</i>
A	2be	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a generación, monobactam	+	-	Hidrólisis elevada de oximiino-beta-lactámicos	TEM-3, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB-1	<i>Enterobacterias, P. aeruginosa</i>
A	2br	Penicilinas Cefalosporinas 1-4 ^a	-	-	Resistentes a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10	<i>Escherichia coli</i>
A	2ber	generación, monobactam	-	-	Hidrólisis elevada de oximiino-beta-lactámicos y resistencia a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50	<i>Enterobacterias</i>
A	2c	Carbencilina	+	-	Hidrólisis elevada a carbencilina	PSE-1, CARB-3	<i>Moraxella catharralis, Proteus mirabilis, P. aeruginosa</i>
A	2ce	Carbencilina, cefepime	+	-	Hidrólisis elevada a carbencilina, cefepime y ceftiproma	RTG-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>
D	2d	Cloxacilina	+/-	-	Hidrólisis elevada a cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10	<i>Enterobacterias, P. aeruginosa</i>
D	2de*	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a generación	+/-	-	Hidrólisis elevada a cloxacilina, oxacilina y oximiino-beta-lactámicos	OXA-11, OXA15	<i>Enterobacterias, P. aeruginosa</i>
D	2df*	Carbapenems	+/-	-	Hidrólisis elevada a cloxacilina, oxacilina y carbapenems	OXA-23, OXA-48	<i>Enterobacterias, A. baumannii</i>
A	2e	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a generación	-	-	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibición por ácido clavulánico pero no por aztreonam	CepA	<i>Bacteroides spp., E. coli, k. pneumoniae, Proteus vulgaris</i>
A	2f	Carbapenems	+/-	-	Hidrólisis elevada a carbapenems, oximiino-beta-lactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME1	<i>Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, K. pneumoniae</i>
B (Subgrupo B1 y B3)	3 ^a	Carbapenems	-	+	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenems pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1	<i>Enterobacterias, P. aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia</i>
B (Subgrupo B2)	3b	Carbapenems	-	+	Hidrólisis de carbapenems	CphA, Sfh-1	<i>Aeromonas spp.</i>

+/: Positiva; -: negativa; +/-: variable

4.2.1 BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.

Las β -lactamasas de espectro extendido se han definido tradicionalmente como enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas incluyendo las de amplio espectro y monobactámicos, pero no cefamicinas ni carbapenems. Estas enzimas pueden ser inactivadas por compuestos como el ácido clavulánico o el sulbactam (*Philippon y cols., 1989*).

Las BLEE incluyen enzimas pertenecientes a la clase A de Ambler y funcionalmente al grupo 2be y a la clase D de Ambler y grupo funcional 2de (Tabla 2).

Aunque existen diferencias en la prevalencia de los distintas familias, las mayoritarias son las de tipo TEM, SHV y CTX-M, seguidas de OXA, PER y VEB. Otras BLEE detectadas menos frecuentemente son SFO, TLA, GES, IBC y BEL. Estas enzimas derivan de genes de β -lactamasas cromosómicas por mutaciones y movilización e integración de los mismos en diferentes estructuras genéticas, siendo la mayoría de ellas de codificación plasmídica (*Barlow y cols., 2008; Cantón, 2008*). Son muchas las BLEE adquiridas que han sido descritas en *P. aeruginosa*. Algunas de ellas están ampliamente distribuidas por el sur de Europa, Turquía y Sureste asiático (*Livermore, 2002*).

BLEE tipo PSE

Las β -lactamasas más frecuentemente adquiridas son PSE-1 y PSE-4. Al igual que las clásicas enzimas TEM y OXA, las cuales se han encontrado, aunque muy esporádicamente, en *P. aeruginosa* (*Bradford y cols., 2001; Naas y cols., 1999a; Poirel y cols., 2001a*), estas enzimas no van a tener actividad frente a los

carbapenems, oxiiimino-aminotiazolil, cefalosporinas (por ejemplo, ceftazidima, cefepime, cefpiroma) o con monobactámicos (*Queenan y cols., 2007*).

BLEE tipo PER

La blee tipo PER-1 confiere alto nivel de resistencia a la ceftazidima, pero puede ser inhibida por ácido clavulánico y aunque tiene cierta actividad *in vitro* para la piperacilina, los carbapenems permanecen estables. Confiere resistencia a penicilinas, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Su actividad se inhibe por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. PER-1 se ha observado con frecuencia en aislamientos de *P. aeruginosa* en Turquía, aunque también se ha documentado en Europa. La enzima PER-1 se describió por primera vez en Francia en 1991 de un aislamiento procedente de un paciente originario de Turquía. Se encuentra muy diseminada en *Acinetobacter spp.* y en *P. aeruginosa*. PER-2, que presenta un 86% de homología en aminoácidos con PER-1, fue descrita por primera vez en cepas de *S. enterica serovar Thyphimurium* (*Bauernfeind y cols., 1996*) y posteriormente en otras especies de bacterias Gram-negativas. Es reseñable que mientras PER-1 se ha descrito principalmente en Turquía y Corea, PER-2 sólo se ha encontrado en América del Sur (*Naas y cols., 2008; Vahaboglu H, y cols., 1997*).

BLEE tipo OXA

Las β -lactamasas de tipo OXA se caracterizan por su gran actividad hidrolítica frente a oxacilina, ampicilina y cefalotina y por no ser apenas inhibidas por el ácido clavulánico. Destaca sobre todo las variantes de OXA-10 (OXA-11, -

14, -16, -17, -19 y -28) y variante de OXA-2 (OXA-10). Estas β -lactamasas al igual que las BLEE TEM y SHV, que también se han descrito en *Pseudomonas spp.*, van a conferir resistencia a oxiiimino- β -lactámicos, cefalosporinas, monobactámicos y penicilinas, pero no a carbapenems (Naas y cols., 1999a; Poirel y cols., 2000a). La primera OXA tipo BLEE (OXA-11) deriva de OXA-10 y fue descrita en un aislamiento de *P. aeruginosa* obtenido de un hemocultivo de un paciente de Turquía (Hall y cols., 1993). En la actualidad hay descritas al menos 11 variantes de OXA con perfil de BLEE (www.lahey.org/studies). Se han identificado mayoritariamente en *P. aeruginosa*, y también en *Acinetobacter baumannii* y en diferentes especies de *Enterobacteriaceae* (Naas y cols., 2008).

BLEE tipo GES

Las BLEE de tipo GES (también denominadas IBC) presentan un perfil hidrolítico similar a otras BLEE de clase A de Ambler, son activas frente a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro, pero no frente a cefamicinas o carbapenems y son inhibidas por el ácido clavulánico, tazobactam e imipenem. La primera BLEE de este grupo, denominada GES-1, se describió por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* en Francia (Poirel y cols., 2000a). Se han descrito diferentes variantes (www.lahey.org/studies) en países de distintos continentes como Argentina, Brasil, China, Corea, Japón, Francia, Grecia, Portugal y Sudáfrica (Mendonça y cols., 2009; Naas y cols., 2008; Piersigilli y cols., 2009). Esta β -lactamasa se ha diseminado de manera creciente en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

4.2.2 CARBAPENEMASAS.

Las carbapenemasas transferibles son uno de los problemas emergentes debido a su imparable diseminación, tanto en *Enterobacteriaceae* como en BGNNF.

Las carbapenemasas agrupan a todas las β -lactamasas que tienen un amplio espectro hidrolítico incluyendo a los carbapenems. Éstas pertenecen a tres de los 4 grupos estructurales definidos por Ambler.

Tabla 3: Carbapenemasas. Clasificación y perfil de hidrólisis.

Clase Molecular (Ambler)	Grupo Funcional (Bush y cols.)	Tipo Carbapenemasa	Perfil de Hidrólisis					Perfil de Inhibición	
			Penicilinas	Cefalosporinas 1 ^a -2 ^a Generación	Cefalosporinas 3 ^a -4 ^a Generación	Carbapenems	Aztreonam	A/C	EDTA
A	2f	NMC	+	+	+/-	+	+	+	-
		IMI	+	+	+	+	+	+	-
		SME	+	+	+/-	+	+	+	-
		KPC	+	+	+	+	+	+	-
		GES	+	+	+	+/-	-	+	-
B	3	IMP	+	+	+	+	-	-	+
		VIM	+	+	+	+	-	-	+
		GIM	+	+	+	+	-	-	+
		SPM	+	+	+	+	-	-	+
		AIMD	+	+	+	+	-	-	+
		DIM	+	+	+	+	-	-	+
D	2d	OXA	+	+	+/	+/-	-	+/-	-

+: positiva; -: negativa; +/-: variable

Carbapenemasas de clase A

Las carbapenemasas de la clase A pertenecen al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush y cols., (*Bush y cols., 1995*), y comprenden cinco tipos: SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBC. Todas tienen en común tres motivos

altamente conservados, esenciales para su actividad: a) Ser70-X-XLys; b) Ser130-Asp-Asn, y c) Glu166.

Los grupos **SME**, **IMI** y **NMC** son, principalmente, de codificación cromosómica, y nunca se han detectado en *Pseudomonas spp.* Las enzimas pertenecientes al grupo SME (1 a 3) se han hallado tan sólo en *Serratia marcescens*, y las IMI (1 y 2) y NMC-A, en *Enterobacter spp.* (Queenan y cols., 2007; Walther-Rasmussen y cols., 2007). En general, hidrolizan todos los β -lactámicos, aunque la eficacia catalítica o de hidrólisis sobre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación es bastante modesta (Queenan y cols., 2007; Walther-Rasmussen y cols., 2007).

Las carbapenemasas tipo KPC se describieron por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* (Yigit y cols., 2001), y se han ido detectando periódicamente y en diferentes variantes. Hasta ahora, hay descritas de la KPC-2 a la KPC-11, principalmente en *Enterobacteriaceae* (Queenan y cols., 2007; www.lahey.org/studies). Se han detectado prácticamente en todo el mundo, con mayor frecuencia en Norteamérica (Queenan y cols., 2007; Walther-Rasmussen y cols., 2007). En *P. aeruginosa* han sido detectadas en sólo dos variantes: KPC-2 en una cepa clínica en Colombia, y KPC-5, en Puerto Rico, que de hecho se ha descrito únicamente en *P. aeruginosa* (Villegas y cols., 2007; Wolter y cols., 2009). Las carbapenemasas KPC son plasmídicas en todos los casos estudiados. Aunque sus genes no están en forma de *cassettes* en integrones, sí están asociados a elementos móviles como secuencias de inserción o transposasas, y dada su presencia predominante en *K. pneumoniae*, un microorganismo cuya capacidad como vector de diseminación de determinantes de resistencia es bien conocida,

han llegado a ser las más extendidas dentro del grupo funcional 2f (*Queenan y cols., 2007; Walther-Rasmussen y cols., 2007*). Su espectro de hidrólisis incluye todos los β -lactámicos, si bien la eficacia de hidrólisis sobre los carbapenems y los monobactámicos es hasta 10 veces menor que sobre las penicilinas y las cefalosporinas.

Las carbapenemasas tipo GES/IBC se describieron por primera vez, casi en paralelo, en dos variantes: GES-1 (siglas procedentes de *Guiana extended spectrum*, por su país de origen) en una cepa de *K. pneumoniae* (*Poirel y cols., 2000a*), e IBC-1 (del inglés *integron borne cephalosporinase*) en un aislamiento de *Enterobacter cloacae* en Grecia (*Giakkoupiy cols., 2000*), ambas en el año 2000. Difieren en sólo un aminoácido, y fueron definidas como BLEE, con unas tasas de hidrólisis de carbapenemas prácticamente nulas. La nomenclatura de la familia GES/IBC fue revisada, y se llegó a un consenso para el cambio de las IBC por GES. En general, las GES poseen hasta un 36% de identidad en aminoácidos con respecto a KPC-2, y un 35% con respecto a SME-1 (*Lee y cols., 2005; Jacoby, 2006*). A lo largo del tiempo se han ido describiendo nuevas variantes (desde GES-1 a GES-9 y GES11 y GES-13; www.lahey.org/studies), pero sólo cuatro con actividad carbapenemasa: GES-2, -4, -5 y -6. Se ha propuesto que la presencia de asparragina o serina en la posición 170 es clave en la actividad carbapenemasa de tales variantes (*Lee y cols., 2005*). El hallazgo de las GES no es tan frecuente como el de otras carbapenemasas, aunque se han aislado prácticamente en todo el mundo, desde América hasta el sudeste asiático, pasando por Europa e incluso Sudáfrica (*Queenan y cols., 2007; Walther-Rasmussen y cols., 2007*). En *P. aeruginosa* se han detectado, de entre las que tienen actividad carbapenemasa, tan

sólo las variantes GES-2 y GES-5, siempre de codificación plasmídica en el seno de integrones (Poirel y cols., 2001b; Wang y cols., 2006; Labuschagne y cols., 2008). Las GES con actividad carbapenemasa parecen tener una actividad modesta sobre los monobactámicos, si bien se ha descrito la variante GES-9 en una cepa de *P. aeruginosa*, con importante actividad sobre el aztreonam, aunque sin hidrólisis detectable sobre los carbapenems (Poirel y cols., 2005).

Carbapenemasas de clase B o Metallo- β -lactamasas

Las metalo- β -lactamasas (MBL) pertenecen a la clase B de la estructura clasificación de β -lactamasas y con tres grandes subclases estructurales. Los miembros de las subclases difieren no sólo en cuanto a su alto grado de diversidad de secuencias, sino también en la estructura de sus sitios activos. En enzimas de subclases B1 y B3, el sitio activo contiene dos átomos de zinc y en las enzimas de la subclase B2, el centro activo contiene sólo uno. Las metalo- β -lactamasas están codificadas tanto por genes que forman parte de la estructura cromosómica de algunas especies bacterianas (*Bacillus spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas spp.*, *Bacteroides fragilis*, varias especies de *Flavobacterium*, *Pseudomonas otitidis* (Walsh y cols., 2005; Queenan y cols., 2007), como por genes heterólogos adquiridos por transferencia horizontal (metaló- β -lactamasas adquiridas).

Las carbapenemasas de clase B (en concreto, las de la subclase B1), más conocidas como metalo β -lactamasas, son quizá el grupo más relevante de carbapenemasas, tanto por diversificación en diferentes variantes aminoacídicas como por su diseminación prácticamente mundial, y en diferentes

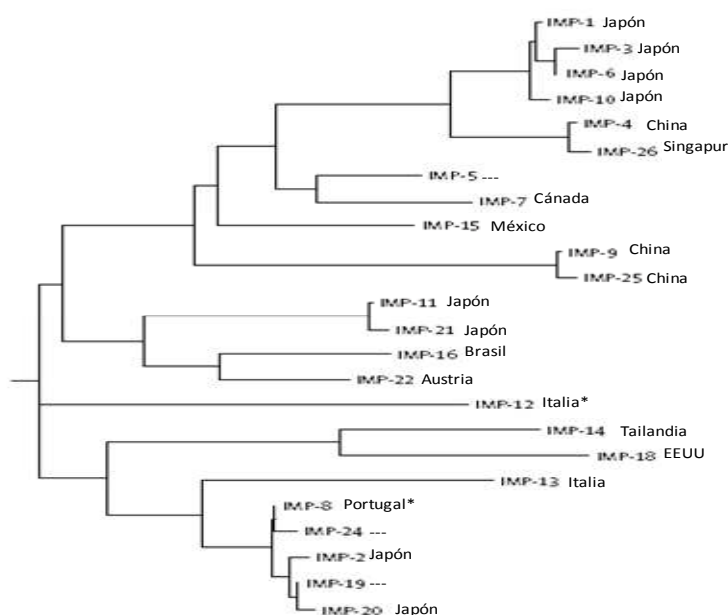
microorganismos. Como elemento definitorio, las MBL de la subclase B1 poseen un motivo de unión de zinc del tipo His-X-His-X-Asp, al que se unen dos átomos de zinc, necesarios para la actividad de la enzima (Walsh y cols., 2005; Queenan y cols., 2007). Así pues, todas las MBL tienen también en común su inhibición por quelantes metálicos como el EDTA. Dentro de ellas, se distinguen nueve grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM, KHM y NDM.

Las metalo- β -lactamasas AIM-1 y DIM-1 se han detectado recientemente en *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, en Australia y Holanda, respectivamente, pero la información disponible acerca de ellas es aún muy escasa (Poirel y cols., 2010; Yong y cols 2012).

La metalo- β -lactamasa KHM-1 se ha detectado sólo en *Citrobacter freundii*, y presenta una moderada actividad sobre las carbapenemas, viéndose claramente superada por la actividad sobre las cefalosporinas (Sekiguchi y cols., 2008). Del resto de grupos de MBL destacan las IMP y las VIM como los tipos más extendidos y habitualmente detectados, relacionándose con brotes causados por cepas de *Pseudomonas spp.* portadoras.

Las metalo- β -lactamasas tipo IMP (IMP- 1) se detectaron por vez primera en 1991 en Japón, en *S. marcescens* (Osano y cols., 1994). Hasta el momento de esta revisión se han descrito variantes aminoacídicas hasta la IMP-26 (www.lahey.org/Studies; Cornaglia y cols., 2011), en distintos microorganismos, y prácticamente en todo el mundo, aunque con un mayor predominio en la región del sudeste asiático-Pacífico (Queenan y cols., 2007). A excepción de IMP-3, -5, -17, -23 y -24, el resto se han detectado en *Pseudomonas spp.* Destaca, por su rareza, el hallazgo de IMP-8 sólo en *P. mendocina*, así como la presencia de IMP-

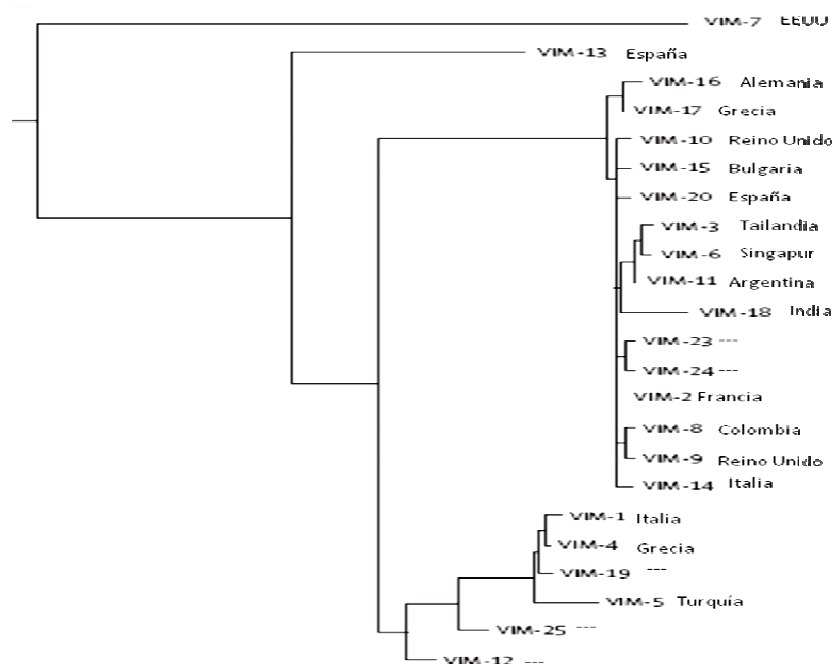
1 en *P. putida* y *P. fluorescens* (además de en *P. aeruginosa*), IMP-12 sólo en *P. putida* (Docquier y cols., 2003), IMP-19 en *P. putida* (además de en *P. aeruginosa*) e IMP-22 en *P. fluorescens* (Pellegrini y cols., 2009) (además de en *P. aeruginosa*). El resto se han detectado sólo en la especie *P. aeruginosa*. Las IMP más próximas entre sí se engloban en el *cluster* de IMP-1, que incluye a las IMP-3, -4, -6 y -10. A partir de aquí, sin la formación de *clusters* claros, las IMP se van distanciando de este primer grupo, hasta llegar a IMP-12, la variante más distante de IMP-1 (Figura 1). Los genes de las IMP se hallan en forma de *cassettes* en integrones plasmídicos, principalmente de clase 1, aunque también se han detectado en integrones de clase 3 (Walsh y cols., 2005; Queenan y cols., 2007; Senda y cols., 1996; Shibata y cols., 2003).



--- (no encontrada en *Pseudomonas spp.*); * (Detectada en especies de *Pseudomonas spp.* no *P.aeruginosa*)

Figura 1: Diversidad genética de las variantes alélicas de MBL tipo IMP y localización de los primeros hallazgos documentados. (Adaptación de Cornaglia y cols., 2011)

Las metalo- β -lactamasas tipo VIM (VIM-1), por su parte, se detectaron por vez primera en *P. aeruginosa* en Verona, en 1997 (Laurettil y cols., 1999) de ahí sus siglas: *Veronese IMipenemase*. Las enzimas tipo VIM son las detectadas de forma más habitual en Europa, en donde la VIM-2 se ha convertido en predominante. De hecho, puede decirse que VIM-2 es la carbapenemasa más común en todo el mundo (Walsh y cols., 2005). De todas las variantes recogidas en www.lahey.org/Studies, las VIM-1, -2, -4 y -6 se han detectado en *P. aeruginosa* y *P. putida*. VIM-2 fue detectada en otra especie ambiental, *P. pseudoalcaligenes* (Quinteira y cols., 2005). Del resto de VIM, todas han sido detectadas en *P. aeruginosa*, además de ciertas variantes en otras especies no pseudomonadales, con las excepciones de VIM-12, un híbrido entre VIM-1 y VIM-2, y que sólo se ha detectado en *Enterobacteriaceae* (Pournaras y cols., 2005); VIM-19, sólo hallada en *K. pneumoniae*, y VIM-23, sólo en *E. cloacae*. En cuanto a la organización dentro del grupo de las VIM, el árbol filogenético parece tener tres *clusters* bien diferenciados (Figura 2). El de VIM-7 (única representante) está claramente separado de los dos otros: VIM-1 (que contiene a VIM-4, y VIM-13, entre otras) y VIM-2 (que contiene a la mayoría de variantes del grupo). Si bien se han hallado casos de codificación cromosómica de los genes de VIM, lo más habitual es la presencia de estos genes en forma de *cassettes* en integrones de clase 1 (Queenan y cols., 2007). Respecto al espectro de hidrólisis, VIM-1 parece hidrolizar mejor a prácticamente todos los β -lactámicos (sobre todo, a ciertas cefalosporinas) que VIM-2, lo cual parece explicarse por cambios de aminoácidos cercanos o en el propio centro activo de la enzima (Docquier y cols., 2003). Las IMP, en general, parecen tener una menor eficiencia en la hidrólisis que las VIM.



--- (no encontrada en *Pseudomonas spp.*); * (Detectada en especies de *Pseudomonas spp.* no *P.aeruginosa*)

Figura 2: Diversidad genética de las variantes alélicas de MBL tipoVIM y localización de los primeros hallazgos documentados. (Adaptación de Cornaglia y cols., 2011)

La metalo-β-lactamasa NDM-1 (*New Delhi metallo- β-lactamase*) es una de las últimas incorporaciones al grupo de metalo-β-lactamasas adquiridas, y su facilidad de dispersión intercontinental ha originado una gran preocupación (Rolain y cols., 2010). NDM-1 se detectó por primera vez en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en 2008 en un paciente que regresaba a Suecia desde India, donde NDM-1 se ha diseminado en *Enterobacteriaceae* (Kumarasamy y cols., 2010). Aunque esta MBL se ha detectado principalmente en *Enterobacteriaceae* ya se han reportado casos de *P. aeruginosa* productora de NDM (Jovicic y cols., 2011).

Los grupos **SPM**, **GIM** y **SIM**, con un solo representante cada uno, parecen tener una distribución geográfica mucho más restringida, y sólo en el caso de **SPM-1** se han detectado brotes por cepas portadoras (Zavascki y cols., 2005). La identificación de SPM-1 (*Sao Paulo metallo- β -lactamase*) se realizó en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* en 2001. Esta MBL presentó localización plasmídica, aunque no relacionada con integrones, y un porcentaje de identidad en aminoácidos del 35% con IMP-1. Hoy en día, esta MBL está ampliamente diseminada en Brasil (Martins y cols., 2007), y hace muy poco tiempo se ha detectado el primer caso en Europa (El Salabi y cols., 2010). **GIM-1** se detectó en Alemania (*German IMipenemase*), en diferentes aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, presentando una identidad aminoacídica próxima al 40% con respecto a las MBL tipo IMP. Se demostró su presencia en un integrón de clase 1 situado en un plásmido no transferible de 22 Kb. En cuanto a sus características de hidrólisis de β -lactámicos, GIM-1 mostró una menor actividad, en general, que el resto de MBL clínicamente relevantes (Castanheira y cols., 2004). Finalmente, **SIM-1** (*Seoul IMipenemase*) se ha detectado únicamente en *A. baumannii* en Corea, y presenta un 69% de identidad en aminoácidos con respecto a las IMP (Lee y cols., 2005).

Carbapenemasas de clase D.

Las β -lactamasas tipo OXA se detectan, sobre todo, en *A. baumannii*, habitualmente como *cassettes* en integrones situados en plásmidos o transposones, aunque también, en ciertos casos, asociadas a secuencias de inserción (Walther-Rasmussen y cols., 2006). Sin embargo, también se han hallado más raramente en

P. aeruginosa y otras especies próximas, como *Ralstonia* o *Aeromonas* (Walther-Rasmussen y cols., 2006; Paterson y cols., 2005). Como característica definitoria, las OXA, al pertenecer a la clase D, poseen cuatro motivos conservados: a) Ser70-XX- Lys, b) Ser118-X-Val/Ile, que es equivalente al motivo Ser-Asp-Así en las β -lactamasas de clase A, c) Lys216-Thr/Ser-Gly, común a la gran mayoría de serín- β -lactamasas, y d) Trp232-X-X-Gly67. Las primeras OXA, descritas en la década de 1980, inicialmente se caracterizaron por sus elevados cocientes *kcat/Km* sobre cloxacilina y oxacilina (de ahí su nombre), pero sin afectar significativamente a los carbapenems ni a las cefalosporinas de espectro extendido (Naas y cols., 1999a). Hasta la fecha se han descrito más de 100 variantes aminoacídicas de OXA (www.lahey.org/Studies). No obstante, sólo determinadas variantes de OXA 2 y OXA-10 (también denominada PSE-2) se engloban por su comportamiento hidrolítico dentro de las BLEE, pues afectan a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y también a los monobactámicos. Estas OXA de espectro extendido se detectaron por primera vez en Turquía (Paterson y cols., 2005). Sin embargo, ninguna de ellas afecta significativamente a los carbapenems, al contrario de lo que ocurre con un grupo de aproximadamente 50 enzimas OXA, sólo remotamente relacionadas con las OXA sin actividad carbapenemasa. La primera OXA con actividad carbapenemasa, inicialmente denominada ARI-1 y, posteriormente, renombrada como OXA-23, fue descrita en 1993 por Paton y cols (Paton y cols., 1993) en una cepa de *A. baumannii*. A partir de entonces, la diversificación ha sido enorme, y las nuevas variantes se han clasificado en nueve subfamilias. Los miembros de cada subfamilia tienen una identidad en aminoácidos de aproximadamente un 92%, mientras que la identidad entre

miembros de distintas subfamilias varía entre un 40 y un 70%. Las subfamilias son: *a)* OXA-23 (incluyendo las -23, -27 y -49); *b)* OXA-24 (incluyendo -24, -25, 26-, -40 y -72); *c)* OXA-51 (incluyendo -51, de -64 a -71, de -75 a -78, -83, -84, -86 a -89, -91, -92, -94, y -95); *d)* OXA-58; *e)* OXA-55 (incluyendo -55 y -SHE [de *Shewanella algae*]); *f)* OXA-48 (incluyendo -48, -54 y -SAR2); *g)* OXA-50 (incluyendo de -50a a -50d, conocidas como enzimas PoxB); *h)* OXA-60 (incluyendo de -60a a -60d), e *i)* OXA-62. No obstante, en *P. aeruginosa*, la única carbapenemasa transferible de clase D detectada es la OXA-40, en dos aislamientos clínicos en nuestro país (*Sevillano y cols., 2009*). Las β -lactamasas PoxB (OXA-50a a -50d) (*Girlich y cols., 2004; Kong y cols., 2005*) fueron caracterizadas como oxacilinasas cromosómicas presentes de forma natural en el cromosoma de *P. aeruginosa*, pero que en condiciones normales, no parecen expresarse. Varios estudios han demostrado que en ausencia de expresión de *ampC*, la expresión de *poxB* se ve aumentada (*Girlich y cols., 2004; Kong y cols., 2005*), y aunque la hidrólisis sobre el imipenem es detectable, el papel de esta subfamilia de OXA en la resistencia a carbapenems parece, al menos, cuestionable. En general, la acción de las carbapenemasas tipo OXA sobre los carbapenems es bastante modesta (mayor eficacia hidrolítica sobre el imipenem que sobre el meropenem), aunque siempre superior al efecto que tiene sobre las cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos, que es prácticamente nulo. El nivel de inhibición que provocan los clásicos inhibidores de β -lactamasas (clavulánico, tazobactam) sobre las blee tipo OXA es variable, aunque en general bastante débil, al contrario de lo que ocurre con el CINa, que se muestra como un fuerte inhibidor de su actividad (*Queenan y cols., 2007*).

➤ **Carbapenemasas en España.**

Si bien la prevalencia de cepas de *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas en España es todavía relativamente baja comparada con la de otros países, su detección ha dejado ya de ser un hecho infrecuente. La primera detección de una carbapenemasa adquirida por *Pseudomonas spp.* en nuestro país (en concreto, VIM-2) se documentó en un hospital de Barcelona en cepas de *P. aeruginosa* durante el período 1996-2001 (Prats y cols., 2002). En 2007 se describió el primer brote epidémico también por una cepa productora de VIM-2 en el Hospital de Bellvitge (Barcelona) (Peña y cols., 2007). Aunque la MBL mayormente detectada en España es VIM-2, en 2008 se identificó una nueva variante (VIM-13) en Palma de Mallorca (Juan y cols., 2009; Juan y cols., 2008). También en Palma de Mallorca se ha detectado recientemente una alta frecuencia (14%) de aislados de *P. putida* productores de MBL (VIM-1 y VIM-2). Resulta interesante que el integrón portador de VIM-2 se localizara en el mismo transposón detectado en las cepas de *P. aeruginosa* productoras de VIM-2 (Juan y cols., 2009). A pesar de que otras especies del género *Pseudomonas spp.*, como *P. stutzeri*, *P. fluorescens* o *P. putida* poseen una menor resistencia intrínseca que *P. aeruginosa* y tienen menor relevancia clínica, también pueden causar brotes en ciertas situaciones (Souza-Dias y cols., 2008; Aumeran y cols., 2007), y más aún, por ser un reservorio ambiental ideal de determinantes de resistencia, en forma de *cassettes* presentes en integrones los cuales pueden ser transmitidos a otras especies de mayor relevancia, como ciertas *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii*, o bien la propia *P. aeruginosa* (Juan y cols., 2009).

Por último, se ha descrito también la presencia de la carbapenemasa de clase D, OXA-40, en dos aislamientos de *P. aeruginosa*, presente en el mismo plásmido descrito en *A. baumannii*, también en España (Hospital de Santa Marina, Bilbao) (Sevillano y cols., 2009; Juan y cols., 2005).

4.2.3 ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCOSIDOS (EMA).

La inactivación de los aminoglucósidos (AMG), como estreptomina, kanamicina, neomicina o gentamicina por aislamientos resistentes de *P. aeruginosa* se dieron a conocer durante los años 1960 y 1970 (Poole, 2005). Tradicionalmente, la inactivación del aminoglucósido en cepas resistentes implica su modificación por las enzimas que fosforilan (aminoglucósidos fosforiltransferasa [APH]), acetilan (aminoglucósidos acetiltransferasa [AAC]), o adenilan (aminoglucósidos nucleotidiltransferasa [ANT]; también conocida como aminoglucósido adeniltransferasa), y tales enzimas son determinantes comunes de resistencia a aminoglucósidos en *P. aeruginosa*. Cada vez más, se documentan aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a AMG que albergan múltiples (es decir, de dos a cinco enzimas) enzimas modificadoras dando como resultado un amplio espectro de resistencia a aminoglucósidos (Poole, 2005; Kettner y cols., 1995; Miller y cols., 1997; Miller y cols., 1995b).

AACs:

El mecanismo de resistencia de *P. aeruginosa* a los aminoglucósidos debido a la N-acetilación enzimática se conoce ya desde hace algún tiempo (Brzezinska y cols., 1972). La acetilación de los aminoglucósidos puede ocurrir en los grupos amino en posición 1, 3, 6, y 2 e implica resistencia a prácticamente todos los compuestos médicamente útiles (por ejemplo, gentamicina, tobramicina, netilmicina y amicacina). Las enzimas que modifican la posición 3' (3-N-aminoglucósido acetiltransferases [AAC (3)]) y la posición 6' (6-N-aminoglucósido acetiltransferasa [AAC (6')]) junto con ANT (2'), son las enzimas más comunes que proporcionan resistencia a aminoglucósidos en *P. aeruginosa* (Miller y cols., 1994; Miller y cols., 1995a; Miller y cols., 1995b). **La familia AAC(3)-I**, principalmente tres de sus variantes (Ia, Ib, y Ic) se han descrito en *P. aeruginosa*, y es un determinante común de resistencia a la gentamicina en este microorganismo (Álvarez y cols., 1993; Schwucho y cols., 1995; Severino y cols., 2002; Shimizu y cols., 1985). **AAC (3)-II** (Dubois y cols., 2002b; Kettner y cols., 1995; Mugnier y cols., 1996; Rodríguez y cols., 2000) y **AAC (3)-III** (Vliegenthart y cols., 1991) son las enzimas que se han descrito menos comúnmente. Éstas determinan la resistencia a gentamicina, tobramicina y netilmicina [AAC (3) -II] o resistencia a tobramicina y kanamicina [AAC (3)-III] en *P. aeruginosa*.

La familia de enzimas (AAC 6') proporcionar resistencia a la tobramicina, netilmicina, kanamicina y amicacina (subfamilia I), o bien gentamicina (subfamilia II). **AAC (6')-II** no es sólo la AAC(6'), más común sino también la AAC más común en *P. aeruginosa* (Dornbusch y cols., 1990, ESGAR,

1987 ; Miller y cols., 1994; Miller y cols., 1995a; Miller y cols., 1995b; Shaw y cols., 1989) y por lo tanto es un determinante de resistencia significativo a gentamicina y a tobramicina en este microorganismo. Mientras AAC (6')-I [también conocida como AAC (6')-Ia] es menos común, aunque es importante para la resistencia a amicacina en *P. aeruginosa* (Falkiner y cols., 1982; Kettner y cols., 1995; Mugnier y cols., 1996). Existe una variante de esta enzima, la AAC (6')-Ib, que no confiere resistencia a amicacina, pero se han documentado en aislamientos clínicos resistentes a tobramicina (Galimand y cols., 1993).

APHs:

Cepas resistentes de *P. aeruginosa* a aminoglucósidos tales como kanamicina, neomicina, y estreptomina (Poole, 2005) como resultado de la fosforilación de estos aminoglucósidos se han documentado durante 30 años. La inactivación se lleva a cabo por fosfotransferasas [APH (3')] que modifican el grupo -OH en posición 3 de estos antimicrobianos. Varias enzimas APH (3') se han descrito en *P. aeruginosa*, con APH (3')-I y -II como grupos predominantes en aislamientos clínicos resistentes a kanamicina (y neomicina) (Miller y cols., 1994; Reynolds y cols., 1976; Saavedra y cols., 1986). Enzimas APH (3') que proporcionan resistencia a otros aminoglucósidos también se han descrito en *P. aeruginosa* e incluye las variantes APH (3')-VI (resistencia a amicacina e isepamicina) y variante APH (2') (resistencia a gentamicina y tobramicina) (Kettner y cols.; Lambert y cols., 1994; Miller y cols., 1994).

ANTs:

El adenilación de aminoglicósidos tales como estreptomina (*Kono y cols., 1976*) y gentamicina (*Dornbusch y cols., 1980*) por ANT en cepas resistentes de *P. aeruginosa* han sido documentadas durante 20 años. La nucleotidiltransferasa más prevalente es la ANT (2')-I, que junto, con AAC (6') y, en cierta medida, AAC (3), representa el determinante más común de resistencia a aminoglucósidos dependiente de enzima en *P. aeruginosa* (*Dornbusch y cols., 1990; ESGAR, 1987; Miller y cols., 1994; Miller y cols., 1995a; Miller y cols., 1995b; Shimizu y cols., 1985*). La enzima ANT (2') que inactiva la gentamicina y tobramicina, pero no netilmicina o amicacina, se ha documentado en aislamientos clínicos resistentes a gentamicina (*Philips y cols., 1986; Reynolds y cols., 1976*) y a tobramicina (*MacLeod y cols., 2000*). Otras adeniltransferasas asociadas con resistencia a aminoglucósidos en *P. aeruginosa* incluyen ANT (3') (resistencia a la estreptomina) y ANT (4')-II (resistencia a tobramicina, amicacina e isepamicina). Dos variantes de ANT (4')-II, ANT (4')-IIa y ANT (4')-IIb (*Sabtcheva y cols., 2003*), se han descrito en aislamientos clínicos resistentes a amicacina y están codificadas por los genes presentes en el cromosoma y / o en plásmidos de aislamientos clínicos resistentes a amicacina.

➤ **EMAs y elementos genéticos móviles.**

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos son a menudo integradas en elementos móviles que albergan determinantes de resistencia adicionales. Los genes AAC se asocian a menudo con transposones (*Dubois y cols., 2002a*) y / o integrones (*Schwocho y cols., 1995; Severino y cols., 2002; Wohlleben y cols.,*

1989) en *P. aeruginosa*, incluyendo integrones que albergan BLEE (Dubois y cols., 2002a; Poirel y cols., 2002) o metalo- β -lactamasas (Poirel y cols., 2001c; Riccio y cols., 2003; Walsh y cols., 2003), así como otras enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Poirel y cols., 2001c). Al igual que con otras EMAs, los genes para las enzimas ANT pueden estar asociadas integrones, particularmente la enzima ANT(3') codificada por *aadA*, inactiva la estreptomicina y espectinomicina y es común en integrones clase 1 (Naas y cols., 1999b). Aunque también pueden ser codificados por *aadB*, es decir, ANT (2')-I (Bunny y cols., 1995) y, posiblemente, ANT (4')-IIb (Sabtcheva y cols., 2003), los cuales se pueden presentar con otros genes de resistencia, incluyendo los que codifican β -lactamasas (Bunny y cols., 1995).

5. ELEMENTOS MOVILES EN *Pseudomonas spp.*

Los determinantes de resistencia adquiridos horizontalmente en *Pseudomonas spp.*, normalmente se encuentran en forma de *cassettes* situados en integrones, a su vez localizados en transposones o plásmidos que permiten su movilidad intra- e interespecie.

5.1 Plásmidos

Un plásmido es una unidad de ADN extracromosómico de tamaño variable (1->100kb) que se replica de forma autónoma y autorregulada, y que puede ser movilizadado entre diferentes células bacterianas a través de un proceso denominado

conjugación. A pesar de que los plásmidos codifican los genes necesarios para la iniciación de su replicación, lo cierto es que dependen de factores codificados por la célula hospedadora (ligasas, ADN polimerasas, helicasas...) para llevar a cabo el proceso completo.

Se han hallado tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, así como en levaduras y algún otro tipo de hongo. Pueden alcanzar hasta el 10% del material genético celular total. La mayoría de los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena sin extremos libres, es decir, cada nucleótido de cada hebra está unido de forma covalente al siguiente. A este tipo de plásmidos se les ha llamado ADN CCC (del inglés: *Covalently Closed Circular*), aunque también existen plásmidos lineales en diferentes especies bacterianas y fúngicas.

Los plásmidos no son imprescindibles para la supervivencia celular, ya que, a diferencia del cromosoma, no codifican los genes esenciales para las funciones celulares. Sin embargo, a menudo codifican genes que permiten a la bacteria portadora adaptarse mejor a condiciones externas adversas o competir en superioridad con otros microorganismos para ocupar un nicho ecológico. La participación de los plásmidos en el soporte y movilización de genes de resistencia antibiótica y otros componentes tóxicos, en la mayoría de especies bacterianas de interés médico está ampliamente descrita. Este hecho, sumado a la capacidad de los mismos de transferirse entre diferentes especies bacterianas es de primordial importancia para el entendimiento de la evolución de las poblaciones bacterianas. La secuenciación completa de plásmidos ha llevado al conocimiento de otras piezas fundamentales en la movilización genética, como son los transposones e integrones presentes en los mismos, y de cómo éstos participan

también en la transmisión de la resistencia a agentes antimicrobianos (*Cantón y cols., 2003; Dobrindt y cols., 2001*).

Existen diferentes tipos de plásmidos y cada uno de ellos se caracteriza al menos por dos propiedades constantes: el número de copias existentes en el interior celular, que puede variar desde una a miles de ellas, y la incompatibilidad entre plásmidos para poder ser heredados en la misma línea celular, lo que ha permitido clasificar a los plásmidos en grupos de incompatibilidad.

Para poder existir independientemente del cromosoma, los plásmidos han de poder replicarse de forma autónoma. A los plásmidos con esta capacidad, que son la mayoría, se les ha denominado *replicones*, esto es, estructuras de ácidos nucleicos con capacidad de autorreplicación, al igual que lo son los cromosomas y el ADN de los fagos. Los plásmidos que no poseen esta capacidad y que se integran de forma reversible en el cromosoma bacteriano para replicarse bajo su control, se les denominan *episomas*.

Existen diferentes tipos de mecanismos básicos de replicación para los plásmidos circulares (*del Solar, 1998*). El que un plásmido se replique por un mecanismo u otro viene determinado junto a otras propiedades, por los genes localizados en una región específica y esencial para el plásmido que se encarga del proceso de replicación y su control. Dentro de esta región esencial se agrupan genes y secuencias fundamentales, como son:

- 1 - **el origen de replicación**, *ori*, característico de cada replicón. Un plásmido puede poseer más de un *ori* (“plásmidos compuestos multi-replicón”) y funcionar cada origen de manera simultánea e independiente.

2 - los genes implicados en el necesario **control de la replicación**. Una función relacionada se suma a ésta: el **control del número de copias** de un plásmido por célula.

- **proteína Rep**, presente en la mayoría de los plásmidos. Estas proteínas Rep son específicas del origen de replicación y esto se refleja en la existencia de sitios específicos de unión para ellas en *ori*. (*Actis y cols., 1999; del Solar y cols., 1998*).

La forma de evitar la pérdida del plásmido en la herencia vertical es responsabilidad de **los sistemas de partición** (*parS, parA, parA*). Estos sistemas de partición se aseguran de que al menos una copia vaya en cada célula hija por cada ciclo celular. Si no existiesen mecanismos que lo controlasen habría una alta probabilidad de que células de la progenie se generasen sin esos plásmidos. (*Gerdes y cols., 2000; Boue y cols., 2007*).

La **incompatibilidad plasmídica** se define como el fracaso de dos plásmidos co-residentes para ser heredados de forma estable en ausencia de presión selectiva externa. De manera que si la introducción de un segundo plásmido desestabiliza la herencia del primero estos dos son incompatibles. Este fenómeno es consecuencia de compartir elementos de herencia plasmídica, como son los **mecanismos de replicación o partición** (*Novick y cols., 1987; Actis y cols., 1999*), y no a la existencia de genes específicos de incompatibilidad. En relación a estos elementos, los plásmidos han sido agrupados en diferentes grupos de incompatibilidad y ya a finales de los años '80 se creó un sistema para poder tipificarlos y clasificarlos (*Couturier y cols., 1988*). Sólo plásmidos de diferente grupo de incompatibilidad plasmídica pueden coexistir en la misma célula.

La **conjugación** permite la transferencia de ADN entre diferentes células, a diferencia de la transformación que es una captación exógena de ADN del entorno. La conjugación implica el transporte de ADN monocatenario a través de una o más membranas. La mayoría de las bacterias y algunas de las especies arqueanas codifican sistemas de conjugación, y existen varias clases de elementos genéticos móviles que utilizan esta vía de propagación, incluyendo los **plásmidos conjugativos**, los **plásmidos movilizables** (Bennet y cols., 2008), y una serie de elementos conjugativos recientemente agrupados en una denominación común: **ICEs**, del inglés *Integrative Conjugative Elements* (Burrus y cols., 2002), entre los que se encuentran los **transposones conjugativos**. Todas las células portadoras de un plásmido auto-transferible (plásmido conjugativo, genes *tra*) son células donadoras potenciales. Para poder conjugarse con otras, producen una estructura proteica, llamada *pilus* sexual que facilita el proceso. En función de la característica a la que se atiende, **los plásmidos pueden clasificarse** de diversos modos:

- Según el sistema de replicación y segregación de copias, se pueden clasificar por **grupos de incompatibilidad**.
- Según el fenotipo que codifiquen, hablamos de **plásmidos de resistencia** si portan genes de resistencia a antibióticos y metales pesados (Plásmidos R), **plásmidos bacteriocinogénicos** (ColE1), **plásmidos de virulencia**, como por ejemplo los portadores de la toxina tetánica en *Clostridium tetani* o de la toxina del carbunco en *Bacillus anthracis* y otros muchos más.

-Según sean autotransferibles o no, se pueden clasificar como ya hemos apuntado, en **conjugativos**, **movilizables** por un plásmido conjugativo y **no movilizables**.

Los **plásmidos conjugativos** son aquellos que promueven la transferencia horizontal de genes de resistencia entre diferentes células por si mismos, a través de un proceso de conjugación. Poseen todos los genes necesarios en este proceso (sistema *Tra* completo).

Los **plásmidos movilizables** son transmisibles sólo en presencia de funciones conjugativas adicionales, esto es, en presencia de un plásmido conjugativo co-residente. Los plásmidos movilizables carecen de los genes que se requieren para el emparejamiento celular, pero sí de los necesarios para generar las proteínas específicas de movilización y de un sitio *oriT* donde actuarán los productos del sistema *tra* del plásmido conjugativo. A esto se le denomina **sistema *mob***.

5.2 Transposones

Los transposones son elementos genéticos móviles que tienen habilidad de moverse tanto intra- como inter-molecularmente entre diferentes tipos de secuencias de ADN, (*Bennet y cols., 2008*). Al movimiento de un transposón se le denomina transposición, y a la enzima que codifican y promueve dicho proceso, *transposasa*. Pueden existir en plásmidos, en el cromosoma de un hospedador o integrados en otros transposones, valiéndose siempre de sus regiones terminales

para promover su recombinación desde una región a otra de ADN (*Alekshu y cols., 2007*).

Se conoce de la existencia de transposones en todos los organismos terrestres, incluidos en humanos, aunque son en las bacterias donde alcanzan mayor sentido, ya que su presencia juega un papel fundamental en la supervivencia bacteriana. Los transposones ofrecen un método eficaz para introducir genes en el cromosoma o en plásmidos de una bacteria, a pesar de tener muy poca homología entre ambas secuencias de ADN. Para introducirse en bacterias de géneros poco relacionados aprovechan los procesos de conjugación de plásmidos promiscuos, o los fagos bacterianos (*Snyder y cols., 2007*).

Un **transposón** se define como un segmento de ADN que no codifica sus propias funciones de replicación, pero sí aquellas relacionadas con la capacidad de moverse entre los elementos de ADN replicativos (plásmidos y cromosomas) sin la ayuda de la maquinaria recombinatoria del hospedador. Es un elemento móvil no replicativo (*Rice, 2000*). Una característica común en los transposones (excepto en los transposones Rolling-Circle), es que contienen secuencias repetidas en sus extremos denominadas secuencias **repetidas invertidas (IR)**. Son dos secuencias que, siendo una idéntica o prácticamente idéntica a la otra, se encuentran dispuestas en orientación inversa, una en cada hebra, generando un eje de simetría entre ellas:

5'-GGTACC-3'

3'-CCATGG-5'

En el caso de los transposones, estas secuencias generadas a cada lado del eje de simetría, no se hallan contiguas, pero aún así siguen formando una repetición

invertida. Las IR de los transposones suelen tener varios pb (entre 10 y 30) y no siempre son una copia perfecta entre ellas, basta con que presenten alta homología.

5'-GGTNNNNNNNNNNNNNACC-3'

3'-CCANNNNNNNNNNNNNTGG-3'

Otra característica común (exceptuando a los transposones RC), es la presencia adicional de **secuencias cortas repetidas directas (DR) en el ADN diana** una vez ha ocurrido el proceso de transposición (sitio diana en azul). Su presencia es consecuencia de la inserción del transposón.

5'-NNNNGCATNNNN-3' 5'-NNNNGCAT NNNN----

3'-NNNNCGTANNNN-5' ----NNNN CGTANNNN-3'

En todos los diferentes procesos de transposición, una **transposasa** corta la secuencia donadora en los extremos del transposón reconociendo determinadas secuencias IR, y después inserta dicho fragmento en el ADN diana (receptor). Este proceso natural de rellenado de “huecos” que deriva en la formación de estas DR al duplicarse en la misma cadena:

5'-NNNNGCATGGTNNNNNNNNNNNNNACCGCATNNNN-----

3'-NNNNCGTACCANNNNNNNNNNNNNNNTGGCGTANNNN

Los transposones de resistencia son aquellos que llevan incluidos en el elemento genético al menos un gen de resistencia a antimicrobianos. En función

de la estructura genética, los transposones se van a clasificar en: secuencias de inserción, transposones compuestos y transposones complejos.

- **Secuencias de inserción (IS):**

Las secuencias de inserción son los transposones bacterianos más pequeños. Son elementos genéticos de menos de 2,5 kb pero con la misma capacidad de transposición que los grandes transposones. Fueron descubiertas y estudiadas, no porque transportasen ningún tipo de gen relevante, sino porque las mutaciones insercionales que provocaban implicaban la inactivación del gen en el cual se transponían.

Actualmente se conocen múltiples familias de IS. Se denominan con las siglas IS y un número. Las familias son: IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/IS605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 e ISL3. Su estructura es sencilla, ya que codifican poco más que la transposasa que les permite promover su propia transposición e integrarse en multitud de sitios específicos. Esta enzima está codificada por uno o dos marcos de lectura abierta que consumen la práctica totalidad de la longitud del elemento. Como ya se ha apuntado en el apartado anterior, las IS van flanqueadas por unas secuencias repetidas invertidas, IRR e IRL (*Inverted Repeat Right/Left* respectivamente). Sólo algunas excepciones notables carecen de ellas, son las familias IS91, IS110 e IS200/605 (Mahillon y cols., 1998).

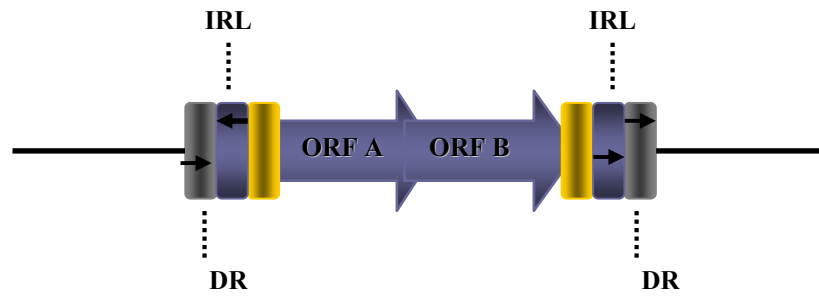


Figura 3: Esquema general de la estructura de una secuencia de inserción: ORF (Marcos de lectura abierta, Open Reading fragment); IRL (Secuencias Inverted repeat Right/Left); DR (Secuencias Direct Repeat). Las zonas en color amarillo representan las regiones de ADN no codificante.

- **Transposones compuestos o de Clase I:**

Son elementos genéticos móviles formados por una serie central de genes, que por si solos no podrían transponerse. Estos genes se encuentran flanqueados por una pareja de IS del mismo tipo formando así un transposón compuesto. Una de las diferencias con una IS, es que aporta al menos una alteración del fenotipo celular por la expresión de dichos genes centrales. Entre los transposones compuestos más conocidos encontramos Tn5, Tn9, Tn10, Tn903, Tn1525 y Tn2350, en Gram negativos, y Tn4001y Tn4003 en Gram positivos.

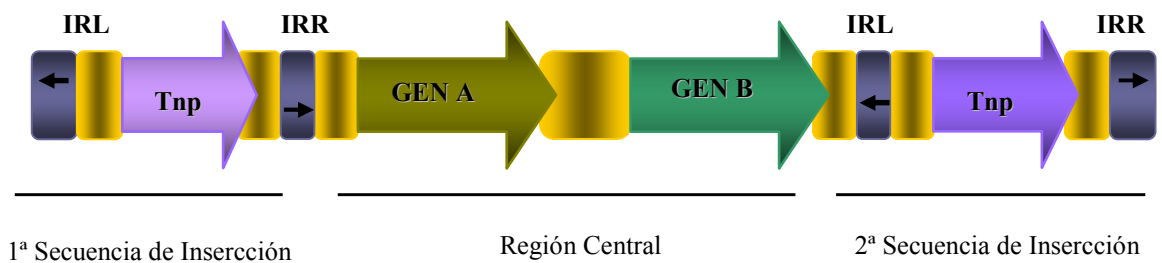


Figura 4: Esquema general de un transposón compuesto.

En amarillo se representan las zonas no codificantes del ADN.

- **Transposones complejos o de Clase II**

Los transposones complejos pueden moverse entre el cromosoma bacteriano y los plásmidos presentes en la bacteria. La estructura genética consta de una transposasa junto a una resolvasa, más los determinantes de resistencia que transporte, todo ello flanqueado por una copia de una IR en cada extremo. La presencia de estas dos enzimas les permite su recombinación e integración en el cromosoma bacteriano o en plásmidos (*García-Rodríguez y cols., 2006*). Los transposones complejos más estudiados son Tn5, Tn3, Tn21, Tn501, Tn1721 y Tn3926 en Gram negativos y, Tn551 y Tn917 en Gram positivos.



Figura 5: Esquema de la estructura de un integrón complejo.

En amarillo se representan las zonas de ADN no codificante. Transposasa A (TnpA) aparece en morado y en verde se representa un gen de resistencia (gen R) cualquiera.

La transposasa **TnpA**, codificada por el gen *tnpA*, es la enzima que promueve la transposición: y genera los cortes tanto en el ADN diana como en el transposón y liga determinados extremos de estos cortes para generar un “cointegrado”. Las **IR** terminales son los sitios donde la TnpA actuará para promover la transposición. Cualquier mutación en estos elementos impide que desarrolle el proceso. La resolvasa **TnpR**, codificada por el gen *tnpR*, es una proteína con doble funcionalidad: por un lado actúa como represor de la transcripción de la transposasa (una mutación en este gen que inactivase la proteína implicaría unas

tasas superiores de transposición al permitirse una síntesis mayor de la transposasa), y por otro lado, escinde los cointegrados generados a través de un proceso de recombinación específica de sitio.

5.3 Integrones

El término integrón o elemento de integración fue propuesto por *Stokes y Hall* en 1989 (*Stokes y cols., 1989*), aunque la actual definición fue introducida en 1995 por *Hall y Collins*. Los integrones son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos. Las secuencias de ADN que delimitan las regiones con genes de resistencia representan zonas conservadas, con un extremo 5' conservado (5'CS) de ~1,36 kb, y un extremo 3' conservado (3'CS) de ~2 kb. La zona con los determinantes de resistencia presenta longitud variable y es dependiente del número de genes insertos en dicho sitio.

Los integrones han sido detectados principalmente en BGN de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* (*Jones y cols., 1997; Mazel y cols 1998; Schmidt y cols., 2001*), y en algunos no fermentadores, como *P. aeruginosa* (*Bissonnette y cols., 1992*), y *Acinetobacter baumannii* (*González y cols., 1998*). Además, se ha descrito un integrón funcional en bacterias Gram positivas, en una cepa de *Corynebacterium glutamicum*.

La región 5'-CS codifica el gen de la integrasa (*intI*) que forma parte de una familia de enzimas cuyo prototipo es la integrasa del bacteriófago λ (*Azaro cols., 2002*), actualmente denominadas tirosina-recombinasas (*Van Duyne y cols.,*

2002). Adyacente a *intI* se encuentra el sitio de recombinación específica de sitio, *attI* (*attachment site*), en el que se integra el *cassette* genético de resistencia (Partridge y cols., 2000). Entre *intI* y *attI* se encuentran varios promotores divergentes, *P*, que permite la expresión de la integrasa; *P1*, (también llamado *P ant*) que permite la expresión de los *cassettes* génicos insertados, que normalmente, carecen de promotor y, *P2*, que frecuentemente es inactivo ya que solo presenta 14 nt entre las cajas -35 y -10, en vez de los 17 nt óptimos. Han sido descritos al menos cinco promotores *P1* diferentes y dos *P2*, que pueden estar en diversas combinaciones.

El *attII* requiere presentar como mínimo 40pb y como máximo 70pb para ser totalmente activo. Posee una región conservada de siete pares de bases en el lugar de la recombinación, la cual tiene la secuencia GTTRRRY, donde R puede ser cualquier purina e Y cualquier pirimidina, aunque las bases que se encuentran con más elevada frecuencia son GTTAGGC. Esta secuencia la comparte con una región llamada *core* situada en el *attC* de los *cassettes* génicos.

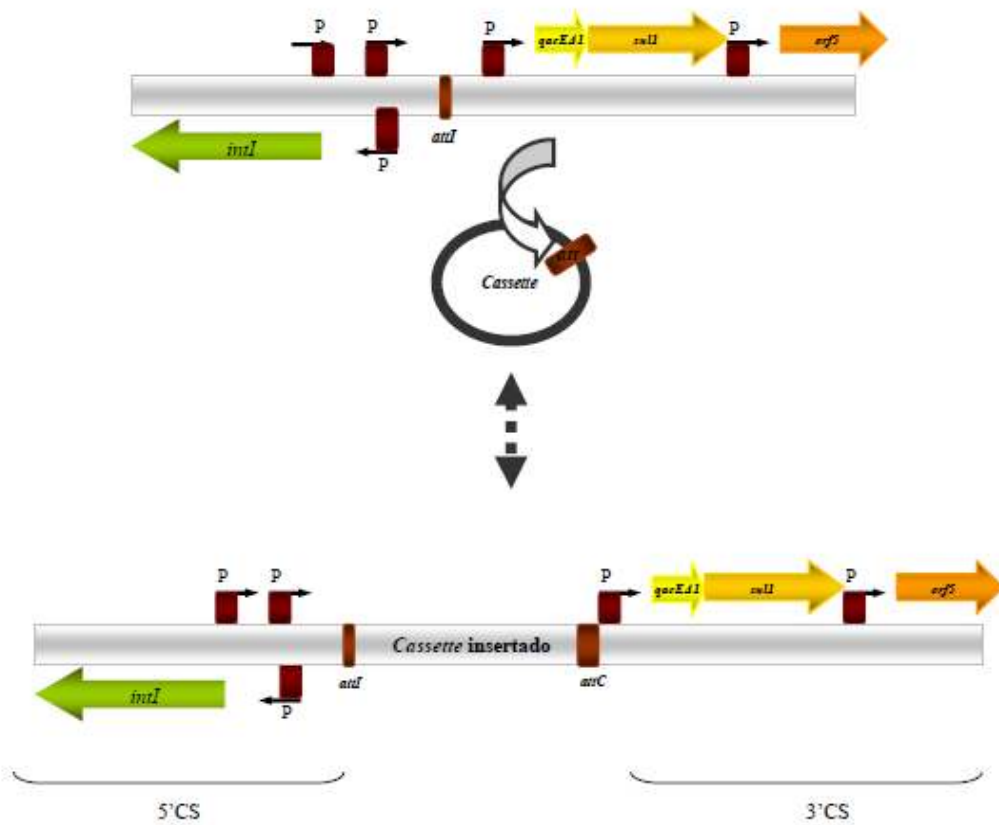


Figura 6: Esquema general de la estructura de un integrón y proceso de integración

En esta figura se describe el proceso de integración de un *cassette* por actuación de la integrasa.

Hasta la fecha se han descrito varias familias de integrones de acuerdo a la secuencia nucleotídica del gen *int I*, y al menos tres de ellas están relacionadas con la expresión de genes de resistencia. Sus integrasas presentan entre 45% y 58% de homología, sugiriendo una divergencia evolutiva por un período superior a 50 años, lo que corresponde, aproximadamente, a la era antibiótica (Bennett, 1999).

- **Integrones de clase 1** (integrasa IntI1). Estos agrupan a la mayoría de integrones conocidos. Son un claro ejemplo de elemento genético común en *proteobacterias*. La integrasa de tipo 1 (IntI1) es una proteína de 337 aa que reconoce tres tipos de lugares de recombinación: *attII*, *attC* (situada en los *cassettes* génicos) y otros lugares secundarios. El extremo 3'-CS, en los integrones de clase 1, presenta tres pautas de lectura abierta. La primera, *qacEdelta1*, es un derivado truncado del gen *qacE* que confiere resistencia a amonios cuaternarios. La segunda pauta de lectura se corresponde con el gen *sulI* que confiere resistencia a las sulfonamidas. La tercera pauta, *orf5*, no codifica ninguna función conocida hasta el momento (Bennett, 1999; Recchia y cols., 1997; Collis y cols., 1993; Carattoli y cols., 2001). Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de *cassettes* génicos de resistencia. Las otras clases de integrones relacionadas con resistencia a antibióticos no poseen extremos 3' altamente conservados, ya que sus secuencias pueden variar por inserción o delección de algunos genes o secuencias de inserción.

Muchos de los integrones de clase 1 hallados en aislamientos clínicos están vinculados a un módulo de transposición, siendo el mejor ejemplo el transposón Tn402, denominado actualmente Tn5090. Esta familia de transposones contiene un grupo de 4 genes de transposición, conocidos como “módulo *tni*”, un sitio *res*, y una pareja de IR cerrando la estructura. Los miembros de esta familia son muy comunes entre aislamientos ambientales, ya que habitualmente poseen un *operon mer* asociado que les confiere resistencia a compuestos de mercurio (Labbate y cols., 2008). Este

operon suele en realidad formar parte a su vez de un transposon mayor como el Tn21, también conocido por ser el representante clásico de resistencia a mercuriales.

Recientemente se ha propuesto un modelo de evolución y origen de los integrones de clase 1 (Gillings y cols., 2008). En un primer estadio la estructura del integrón corresponde al cromosoma de un progenitor, pero no posee ninguno de los genes de resistencia antibiótica que actualmente transportan los aislamientos clínicos que conocemos. Uno de estos integrones es movilizado e insertado en un elemento Tn402-like. En un momento indeterminado adquiere un gen que le confiere una ventaja selectiva frente a otros, probablemente el primero fue *qacE* (gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario). Sucesivos eventos de inserción de otros genes van configurando la estructura tal y como la conocemos hoy en día. Estos mismos hechos acaban truncando Tn402 convirtiéndolo en una estructura incompetente. Pero transposiciones en *trans* permiten reintegrar esta estructura en plásmidos y/o en transposones funcionales como Tn21, permitiendo al integrón sobrevivir penetrando en multitud de organismos y evolucionar adquiriendo nuevos genes de resistencia.

Los **integrones complejos de clase 1**, son estructuralmente idénticos a los integrones de clase 1, solo que a continuación de la primera secuencia 3'-CS existe una región de 2154 pb, que se denominó región común o CR, compuesta por un *orf513* (llamado así por codificar una transposasa de 513 aminoácidos) y un sitio de recombinación de 33 pb localizado en su extremo

derecho, seguido de genes que no son genes *cassettes* aunque sí pueden ser genes de resistencia, rematando el integrón otra copia de 3'-CS (Rodríguez-Martínez y cols., 2006).

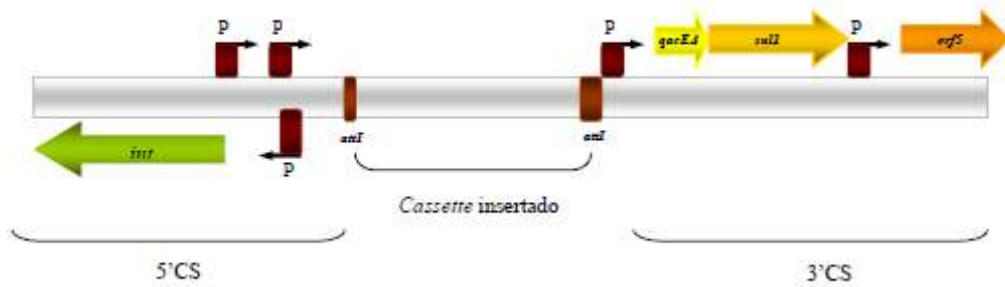


Figura 7: Estructura de un integrón de clase 1.

- Integrones de clase 2** La integrasa de tipo 2 (*IntI2*) presenta una secuencia de aa con una homología menor del 50% con la de *IntI*: suele ser no funcional, debido a la presencia de un *codón stop* interno (TAA), de manera que la integración y la escisión de *cassettes* es dependiente, en este tipo de integrones, de otro tipo de integrasa. Muchas veces, debido a que los integrones de clase 2 se encuentran en organismos que también poseen un integrón de clase 1, es la integrasa de éstos quién realiza la función (Hasson y cols., 2002). El extremo 3'-CS de los integrones de clase 2 no presenta una estructura tan conservada como el extremo 5'-CS. Los integrones de clase 2 se encuentran vinculados a la familia Tn7, que al igual que ocurría con los integrones de clase 1, contribuye a su diseminación entre la población bacteriana.

- **Integrones de clase 3.** Se encontró por primera vez en una cepa de *Serratia marcescens* (cepa AK9373) y posteriormente en bacterias Gram negativas resistentes a imipenem de aislamientos clínicos (Japón) transportando todos ellos la metalo- β -lactamasa *bla_{IMP}* como gen *cassettes* (Arakawa y cols., 1995; Senda y cols., 1996). Las propiedades de la integrasa *IntI3* son similares a las de *IntI1*, y además su secuencia presenta una homología del 61% con *IntI1*. *IntI3* es capaz de reconocer diferentes *attC* e integrar los *cassettes*, así como realizar su escisión. También puede realizar la recombinación entre *attC* y lugares de recombinación secundarios, aunque a una menor frecuencia que *IntI1*. El extremo 3'-CS de los integrones de clase 3, al igual que ocurría con los de clase 2 no presenta una estructura tan conservada como el extremo 5'-CS.
- **Integrones de clase 4 o “superintegrones”.** Se han identificado principalmente en el cromosoma de *Vibrio cholerae* (Mazel y cols., 1998).

En la actualidad, es bien conocido el papel de plásmidos y transposones en la multirresistencia de las bacterias a los antibióticos y en la diseminación natural de los determinantes de resistencia (Amabile-Cuevas y cols., 1992). Sin embargo, sólo en los últimos años se está estudiando la participación de los *cassettes* genéticos de resistencia y de los integrones en el proceso evolutivo de los plásmidos de resistencia (plásmidos R). Se conocen al menos 60 genes de resistencia en formato gen *cassettes*, cubriendo la práctica totalidad del arsenal

terapéutico que se emplea en la práctica clínica. Los *cassettes* genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen sólo un marco de lectura abierta completo (*orf*), o región codificante (gen) (Hall y cols., 1995; Recchia y cols., 1997). Además, formando parte de su estructura, a continuación del *orf*, existe un sitio de recombinación específica denominado elemento de 59 pb, o sitio *attC*, localizado en el extremo 3' del gen (Partridge y cols., 2000; Collis y cols., 1993). Los elementos *attC* son repeticiones invertidas imperfectas, no son secuencias altamente conservadas, y varían de 57 a 141 pb de longitud (Stokes y cols., 1997). Dos secuencias de 7 pb denominadas core y core inverso se encuentran en los extremos de cada *attC*. El core se localiza en el extremo 3' del *attC*, y presentan los extremos de cada *attC*. El core se localiza en el extremo 3' del *attC*, y presenta una secuencia consenso GTTRRRY (que con mayor frecuencia es GTTAGGC); mientras que el core inverso está localizado en el extremo 5' y su secuencia consenso es RYYAAC (frecuentemente GCCTAAC). Además a la izquierda del *cassette* insertado, también se encuentra la secuencia consenso GTTRRRY del *attI*, de manera que el *cassette* queda flanqueado por dos secuencias iguales (Figura 8).



Figura 8: En esta figura se representa la estructura esquematizada de un gen *cassete*.

El *attC* está formado por el *core* y por el *core inverso*, separados por una región variable. Los extremos del *cassete* están definidos por dos *cores*, el del *attI* a la izquierda, y el del *attC* a su derecha. La recombinación tiene lugar entre la G del *core* de la izquierda y la T del de la derecha

La integración y escisión de los *cassettes* está mediada por la integrasa. La integración se produce por un mecanismo de recombinación lugar-especifica, en el que la integrasa reconoce el *attI* del integrón y el *attC* del *cassete* y realiza la recombinación entre la G del *attI* y la T del *core*. La recombinación puede tener lugar entre *attI* y *attC*, o bien entre dos *attC*, si ya existen *cassettes* integrados en la estructura, y además puede implicar a un lugar no específico denominado lugar secundario (que generalmente presenta la secuencia GWTMW (W:T/A; M:A/C). Esta recombinación mediante un lugar secundario ocurre con muy baja frecuencia, pero permitiría la integración de *cassettes* fuera del integrón aunque esta integración no sería reversible, es decir, al no reconstruirse de nuevo las secuencias *attC*, la escisión de los *cassettes* no volvería a ser posible.

Los *cassettes* no suelen incluir promotores, por lo que normalmente se expresan por acción de un promotor común localizado en la región 5'CS del integrón, el P1. Dentro de un mismo integrón pueden coexistir varios *cassettes* (denominados *cassete array*), y aunque suelen insertarse en la misma dirección, lo que permite su expresión, ésta no es uniforme. Esto significa que los *cassettes* distales

presentan una expresión reducida por la presencia de los *cassettes* más proximales, ya que las repeticiones invertidas de los *attC* previos formarían *loops* que pueden silenciar completamente la expresión de los *cassettes* más distales, funcionando también así, como terminadores de la transcripción. Esto afectaría al nivel de resistencia alcanzado por un microorganismo a los antibióticos, cuyos genes de resistencia están codificados por el *cassette array* (Hall y cols., 1995), en el cual pequeñas variaciones afectan la fuerza de transcripción del promotor, llegando incluso a niveles tan bajos de expresión que la bacteria aparece fenotípicamente sensible, aunque sea potencialmente resistente por poseer el gen que codifica la resistencia. El nivel de resistencia a un determinado antibiótico, codificado por un gen *cassette* de resistencia, depende de su posición en el integrón, más cercana o lejana del promotor común.

La estabilidad en el orden de los *cassettes*, también es objeto de debate, ya que los análisis de los tipos de integrones predominantes en múltiples hospitales europeos parecen mostrar que son estructuras estables, pues se han encontrado combinaciones conservadas de *cassettes* génicos tanto entre aislamientos procedentes de orígenes diversos, como de bacterias sometidas a presión antibiótica durante largos periodos de tiempo (Martínez-Freijo y cols., 1999). En cambio, los estudios *in vitro* demuestran que pueden existir cambios de orden de los *cassettes* dentro del integrón, aunque aparentemente, esta reorganización se daría únicamente en condiciones ambientales específicas. Además de reorganizaciones, también pueden darse deleciones y duplicaciones de los *cassettes* (Collis y cols., 1992). La escisión de los genes *cassette* está también mediada por la integrasa. Una vez el gen *cassette* ha quedado libre, cada uno de

ellos forma un intermediario circular, cuya integración en el *attI* del mismo integrón (lugar de recombinación por el que la integrasa tiene mayor afinidad) o en lugares secundarios del mismo, dando lugar a nuevas reorganizaciones de los genes *cassette* dentro de los integrones.

➤ **Implicación clínica de la asociación integrón-*cassette* génico de resistencia.**

White y col (*White y cols., 2001*) describieron como la diseminación de genes de resistencia aumenta considerablemente cuando estos determinantes de resistencia forman parte de *cassettes* génicos móviles, lo cual los habilita para su transferencia horizontal por varios mecanismos. Algunos incluyen la movilización de *cassettes* entre integrones, mediada por la integrasa. En el caso de integrones que forman parte de un transposón, pueden transponerse desde el cromosoma hacia plásmidos y viceversa. Por su parte, los plásmidos conjugativos pueden transferirse de una bacteria a otra de la misma o de diferente especie, fenómeno genético particularmente importante por la presión selectiva existente a nivel nosocomial (*Levy, 1992*). Los *cassettes* génicos codifican resistencia a una amplia gama de compuestos antibacterianos, que incluyen antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y a quinolonas (*Recchia y cols., 2002; White y cols., 2001; Tran y cols., 2002*). Los mecanismos de resistencia relacionados con genes de integrones son variados e incluyen la síntesis de enzimas como las EMA (*Jones y cols., 1997*), cloranfenicol acetil transferasas (CAT) (*Collis y cols., 1995; White y cols., 2001*), modificantes de rifampicina (*Tribuddharat C y cols., 1999*), β -lactamasas,

incluyendo carbapenemasas (Poirel y cols., 2000a; Poirel y cols., 2000b), dihidrofolato reductasas (Jones y cols., 1997). Además, se han descrito proteínas protectoras de la *ADN girasa* y bombas de flujo (Tran y cols., 2002; Bissonnette y cols., 1991).

Estudios realizados en diversos hospitales europeos, han demostrado que los aislamientos integrón-positivos son más frecuentemente resistentes a los aminoglicósidos, las quinolonas y los β -lactámicos que los aislamientos integrón-negativos incluso si estos determinantes de resistencia no están presentes en los integrones (Martínez-Freijo y cols., 1999).

De igual manera que en las poblaciones ambientales, los clones bien establecidos en las poblaciones clínicas aumentan su genotipo de resistencia mediante adquisición de nuevos genes, y uno de los mecanismos por lo que esto es posible, es mediante la adquisición de integrones. Éstos son portadores de genes que facilitan el proceso de selección de microorganismos, en el cual no solo los clones resistentes o mejor adaptados serían seleccionados, sino que también lo serían sus estructuras genéticas que portan los genes de resistencia. Estas resistencias pueden posteriormente ser transmitidas a otros microorganismos que comparten de manera permanente o transitoria el mismo nicho ecológico. De este modo los integrones participarían en la emergencia y persistencia de resistencia en las poblaciones clínicas, pues la presencia de genes de resistencia en clones específicos les proporciona una ventaja selectiva, que les permite competir con éxito en ambientes con elevada presión, permitiendo así su persistencia y diseminación en las poblaciones (Cantón y cols., 2003).

6. EXPANSIÓN Y DISEMINACIÓN DE *P. aeruginosa*
MULTIRRESISTENTE: CLONES DE ALTO RIESGO.-

Las bacterias multirresistentes se comportan como verdaderos anfitriones para los múltiples elementos genéticos (genes, integrones, transposones y plásmidos) que le van a conferir sus característicos fenotipos de resistencia. Una cepa bacteriana de 'éxito' es un vehículo muy eficaz para la difusión de estos elementos debido en primer lugar, a que todos los elementos de resistencia alojados van a ser transmitidos verticalmente en virtud de la propagación de la cepa y su creciente prevalencia, y en segundo lugar, a que una cepa de éxito tiene múltiples oportunidades de actuar como donante y transferir sus elementos de resistencia horizontal a otras cepas, especies o géneros.

La multirresistencia adquiere mayor importancia, sobre todo cuando se asocia a brotes hospitalarios o en un mismo entorno comunitario, lo que va a llevar, generalmente, a un análisis epidemiológico molecular de las bacterias causantes de éste y de los genes de resistencia implicados.

Siguiendo las recomendaciones de las guías recientemente publicadas (*van Belkum y cols., 2007*), el término 'clon' se utiliza para describir los aislamientos que, a pesar haber sido cultivados independientemente desde diferentes fuentes, en diferentes lugares y tal vez, en diferentes momentos, siguen teniendo tantas semejanzas fenotípicas y genotípicas idénticas, que la explicación más probable sea la de un origen común. En conjunto, la existencia de clones epidémicos multirresistentes adaptados al entrono hospitalario sigue siendo una

cuestión abierta con posibles implicaciones prácticas para el control y prevención de las infecciones hospitalarias.

En 2004 fue publicado un esquema de MLST para la tipificación molecular de *P. aeruginosa* (Curran y cols., 2004) y en la actualidad existen al menos 972 ST definidos (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Aunque la especie, clásicamente se ha caracterizado por una estructura poblacional epidémica y no-clonal, algunas cuestiones importantes siguen siendo controvertidas llevando a considerarla como una especie con estructura poblacional epidémica, es decir, una estructura superficial clonal con recombinaciones frecuentes, en las que pueden surgir clones epidémicos exitosos (Curran y cols., 2004; Pirnay y cols., 2002, 2009). Existe una enorme diversidad de serotipos y, por lo general, una enorme coincidencia entre aislados de fuentes clínicas y ambientales (Wiehlmann y cols., 2007). Los serotipos más frecuentes de *P. aeruginosa* son O11, O12, O6 y O1, siendo los O11 (CC 11) y O12 (CC 4) especialmente comunes entre los aislamientos multirresistentes (Pirnay y cols., 2009). Un CC comprende aquellos STs que tienen al menos cinco alelos en común. En el esquema de MLST de 2004, (Curran y cols., 2004) incluyeron muchos aislamientos procedentes de esputo, sin embargo no fueron representados en el análisis, aislamientos específicos de fibrosis quística. La mayor aplicación subsiguiente de MLST específicamente a cepas de FQ fue realizado por Waine y cols., quienes encontraron que la mayoría de los pacientes fueron colonizados por aislamientos que pertenecen a uno (50%) o dos (37,5%) CC, pero hasta cuatro serotipos están presentes en algunos pacientes. Por otra parte, estos autores encontraron que los pacientes podrían ser colonizados simultáneamente por STs únicas o por STs

epidémicas como por ejemplo el ST146 (cepa Liverpool, extendida en el Reino Unido) y el ST148 (cepa Midlands) (*Waine y cols., 2009*). *Pirnay y cols* concluyeron que los aislamientos multirresistentes procedentes de FQ de diferentes partes del mundo eran genotípicamente diversos y era poco probable que estuvieran directamente relacionados, pero sí agrupados en un linaje “núcleo”, en lugar de un verdadero clon. Los autores no encontraron evidencia de "transmisión generalizada o global de éxito de las cepas *P. aeruginosa* de FQ llegando a la conclusión de que las cepas que pertenecen al linaje núcleo están omnipresentes en el medio ambiente. La frecuencia con la que estas cepas sean aisladas de pacientes con FQ reflejará la prevalencia en el ambiente a nivel local (*Pirnay y cols., 2009*)

- **CC-4.-**

Una clara excepción a esta generalización es, el internacional, y con frecuencia multirresistente, linaje O12 (*Pitt y cols., 1989, 1990*). Este clon incluye sólo los aislamientos clínicos, y la evidencia indica que surgió durante la década de 1980, tal vez seleccionada por la presión antibiótica (*Pirnay y cols., 2009*). El linaje O12 en *P. aeruginosa* se corresponde con **CC-4**. En este linaje destaca el **ST229**, el cual se ha asociado a la producción de carbapenemasas, y ha sido detectado en diferentes países europeos (*Giske y cols., 2006*).

Otro clon, ubicado dentro de este complejo clonal, que puede ser considerado de alto riesgo por su capacidad para diseminarse es el **ST175** (serotipo 04). La propagación del clon ST175 se podría considerar una pandemia emergente. Fue identificado por primera vez en 2005 en Reino

Unido y Canadá (<http://pubmlst.org/> paeruginosa) y se han documentado casos en Hungría, Polonia, República Checa, España, Alemania, Francia, Estados Unidos, Alemania y China. (*Woodford y col., 2011; Nemeč y cols., 2010; Elias y cols., 2009, Cholley y cols., 2011*). ST175 se ha asociado a aislamientos multirresistentes y a la adquisición de diferentes β -lactamasas, en su mayoría situadas en elementos móviles, tales como integrones. El clon ST 175 también ha representado a cepas productoras de VIM en Hungría (*Libisch et al., 2008b*)

Más recientemente, (*Samuelsen y col, 2010*) se ha encontrado que cepas del complejo internacional **CC111** (en concreto, la **STs 111 y 229**) se asociaban a la producción de MBL tipo VIM en Noruega y Suecia entre 1999 y 2007. En este estudio se incluían importaciones desde Grecia, Chipre, Dinamarca, que dieron lugar a la diseminación de CC111 en Suecia.

- **CC-11.-**

El complejo clonal 11 se han documentado en Italia (**ST277**), Grecia, Hungría y Suecia (**ST230**) asociados a diferentes variantes de MBLs tipo VIM (*Giske y cols., 2006; Samuelsen y cols., 2010*). Otro clon a tener muy en cuenta dentro de este complejo clonal es el **ST235**. ST235 ha sido recientemente considerado un clon muy exitoso desde el punto de vista de su diseminación y ha sido encontrado en gran número de países, incluyendo Austria, Bélgica, Francia, Grecia, Hungría, Italia, Polonia, España, Rusia, Serbia, Singapur, Suecia y Turquía, en asociación no sólo con las enzimas VIM sino también con β -lactamasas como BEL-, IMP-, OXA-, PER-, PSE- y SPM metalo- β -lactamasas (*Empel y cols., 2007.; Edelstein y cols., 2013;*

Edalucci y cols., 2008; Lepsanovic y cols., 2008; Libisch y cols., 2008a; Libisch et al., 2008b; Duljasz y cols., 2009.; Juan y cols., 2010, Cholley y cols., 2011). La capacidad de las cepas en ST235 para adquirir varios determinantes de resistencia se ilustra por la gran diversidad de estructuras de integrones de clase 1 asociados a este complejo (*Giske y cols., 2006; Kouda y cols., 2009; Lepsanovic y cols., 2008; Libisch y cols., 2008b; Samuelsen y cols., 2010).*

**JUSTIFICACIÓN
Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Miembros del género bacteriano *Pseudomonas*, especialmente *P. aeruginosa*, se encuentran entre los mayores patógenos nosocomiales debido a su naturaleza ubicua y su capacidad para colonizar y sobrevivir en reservorios hospitalarios, así como por su papel en las infecciones de pacientes inmunodeprimidos y enfermos críticos (Aloush y cols., 2006). El incremento en la prevalencia de las infecciones nosocomiales causadas por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los antimicrobianos, compromete severamente la selección de un tratamiento apropiado y se asocia a un incremento en la morbilidad y mortalidad (Aloush, y cols., 2006; Leibovici y cols., 1998). La amenaza creciente de la resistencia antibiótica en *P. aeruginosa* es debida a la extraordinaria capacidad de este microorganismo para desarrollar resistencia a casi cualquier antimicrobiano disponible, a través de la selección de mutaciones en su cromosoma y también a la emergencia y diseminación de determinantes de resistencia transferibles (Livermore y cols., 2002; Mesanaros y cols., 2007). La adquisición de estos determinantes de resistencia por parte de *P. aeruginosa* contribuye enormemente a la aparición de cepas multirresistentes (MDR, del inglés *multi-drug resistance*). La resistencia natural de *P. aeruginosa* a diversos antibióticos (algunos β -lactámicos, amoxicilina-clavulánico, cloranfenicol, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas o trimetoprim), y su notable habilidad para adquirir mecanismos de resistencia contra diferentes agentes antipseudomónicos y demás antibióticos comunes en el uso clínico, han convertido a los carbapenems en el tratamiento de elección para infecciones producidas por *P. aeruginosa* (Kevin y

cols., 2005). En este punto adquieren especial importancia, las carbapenemasas, cuya asociación a elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones) y a perfiles de multirresistencia antibiótica hacen más preocupante la diseminación de cepas de *P.aeruginosa* multirresistentes en hospitales de todo el mundo. La cada vez mayor frecuencia, diversidad y transcendencia clínica de las cepas portadoras de carbapenemasas apremia la necesidad de poner a punto procedimientos para su óptima detección en el laboratorio, adoptar medidas para reducir tanto la expansión de las cepas como de los elementos genéticos portadores de MDR, y desarrollar nuevas opciones terapéuticas para su tratamiento.

Dada la importancia de este microorganismo como patógeno nosocomial sumado a la emergencia en esta última década de metalo- β -lactamasa como mecanismo responsable de resistencia a β -lactámicos, los objetivos de esta tesis fueron:

1. OBJETIVO PRINCIPAL:

- Determinar la prevalencia de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente durante un periodo de 4 años (2007-2010) en el Hospital Universitario 12 de Octubre, así como la epidemiología molecular de estos aislamientos y el posible papel de las carbapenemasas como responsable de esta multirresistencia.

2. OBJETIVOS DE LA PRIMERA FASE DEL ESTUDIO (2007-2008)

Los objetivos de esta fase del estudio se enmarcan en el contexto de un brote de *P. aeruginosa* producido en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

- Estudiar la epidemiología molecular de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente durante 2007 y 2008.
- Determinar las características clínicas de los pacientes colonizados/infectados con el clon de *P. aeruginosa* multirresistente responsable de un brote intrahospitalario.
- Caracterizar molecularmente los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos del microorganismo causante del brote.

3. OBJETIVOS DE LA SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO (2009-2010)

En el marco de la diseminación de *P. aeruginosa* multirresistente en múltiples servicios clínicos del hospital se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterización genotípica y molecular del clon mayoritario.
- Determinar las características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por el clon mayoritario.
- Caracterizar las Metallo- β -lactamasas como mecanismo de resistencia en el clon mayoritario.
- Caracterizar los entornos genéticos de MBLs en las cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes portadoras.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO.-

1.1 Diseño del estudio.-

Llevamos a cabo un estudio retrospectivo observacional en el Hospital Universitario 12 de Octubre en Madrid, hospital de tercer nivel con 1.300 camas que atiende a una población de 600.000 habitantes (~ 42.000 admisiones por año). Este hospital cuenta con dos áreas separadas en dos edificios (Residencia General y Materno- Infantil).

Este estudio se dividió en dos periodos en el contexto de dos investigaciones realizadas sobre la emergencia de cepas de *P. aeruginosa* multirresistente en nuestra institución.

- Primer periodo (Enero 2007-Diciembre 2008): Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de los pacientes adultos ingresados (no fibrosis quística) infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa* que fueran resistentes a todos los β -lactámicos incluyendo carbapenems, penicilinas y cefalosporinas.
- Segundo periodo (Enero 2009-Diciembre 2010): Se recogieron de forma prospectiva aquellos aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* multirresistente de los pacientes adultos ingresados (no fibrosis quística) infectados y/o colonizados.

Durante ambos periodos también fueron recogidas aislamientos multirresistentes pertenecientes a otras especies de *Pseudomonas*.

1.2. Muestras incluidas.-

Se recogieron aquellas muestras clínicas con aislamiento de *Pseudomonas spp.* multirresistentes desde Enero de 2007 a Diciembre de 2010. Se incluyó únicamente un aislamiento clínico por paciente (el primero).

1.3. Definición de Multirresistencia.-

Clasificamos los patrones de resistencia de acuerdo con las definiciones propuestas recientemente por Magiorakos (*Magiorakos y cols., 2012*). Un aislamiento fue definido como multirresistente (MDR, del inglés *multi drug resistant*) cuando era resistente a uno o más antibióticos de tres o más categorías de antimicrobianos, y extremadamente resistente (XDR, del inglés *extra drug resistant*) si era resistente a uno o más antibióticos en todas las categorías excepto dos o menos. Las familias de antimicrobianos en los que se basa esta clasificación son: cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima [TAZ], cefepime [CEF]), carbapenems (imipenem [IMP], meropenem [MER]), piperacilina/tazobactam (PIP/TZ), aztreonam (ATM), fluoroquinolonas (ciprofloxacino [CIP]), aminoglicósidos (gentamicina [GEN], tobramicina [TOB] y ampicacina [AMK]) y Colistina [CO].

Tabla 1.3.- Definición de los términos multirresistencia, extrarresistencia y panrresistencia (adaptación de *Magiorakos y cols., 2012*).

MDR	Resistente a ≥ 1 agente antimicrobiano de ≥ 3 categorías antimicrobianas	
XDR	Resistente a ≥ 1 agente antimicrobiano de todas las categorías antimicrobianas excepto en ≤ 2	
PDR	Resistente a todas las categorías antimicrobianas	
	Categoría de antimicrobianos	
	Agentes antimicrobianos	
<i>P. aeruginosa</i>	Aminoglucósidos	Gentamicina, Tobramicina, Amicacina, Netilmicina
	Carbapenems <i>anti-pseudomonas</i>	Imipinem, Meropem
	Cefalosporinas <i>anti-pseudomonas</i>	Ceftazidima, Cefepime
	Penicilinas <i>anti-pseudomonas</i> + Inhibidor de β -lactamasa	Piperacilina/Tazobactam
	Fluorquinolonas <i>anti-pseudomonas</i>	Ciprofloxacino, Levofloxacino
	Monobactámicos	Aztreonam
	Ácidos fosfónicos	Fosfomicina
	Polimixinas	Colistina

401.4. Características clínicas de los pacientes.

Los datos demográficos, clínicos y microbiológicos fueron recogidos tras revisión de la historia clínica de todos los pacientes ingresados colonizados y/o infectados por *P. aeruginosa* multirresistente (incluidas también los aislamientos de *Pseudomonas* no aeruginosa). Algunas de las variables clínicas incluidas en el estudio fueron:

- Sexo: Hombre/Mujer
- Edad: 15-99 años
- Infección: Aparición de síntomas en el momento de la petición de muestra.
- Colonización: Aislamiento de *Pseudomonas spp.* en una o más muestras clínicas en ausencia de síntomas indicativos de infección.
- Adquisición nosocomial: Infección o colonización por *Pseudomonas spp.* presentada al menos a las 48 horas después del ingreso, así como infección o colonización en aquel paciente donde se documentara evidencia de hospitalización en los 12 meses anteriores al primer aislamiento.
- Servicio de Diagnóstico.
- Bacteriemia: al menos una botella de hemocultivo positiva para *Pseudomonas spp.*
- Infección respiratoria: De acuerdo a historia clínica.
- Infección urinaria: De acuerdo a historia clínica.
- Infección abdominal: De acuerdo a historia clínica.
- Patología cardiovascular: De acuerdo a historia clínica.
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC): De acuerdo a historia clínica.

- Patología gastrointestinal quirúrgica: De acuerdo a historia clínica.
- Hepatopatía/pancreatitis: De acuerdo a historia clínica.
- Antecedente de neoplasia, sólida o hematológica: De acuerdo a historia clínica.
- Antecedente de diabetes mellitus: De acuerdo a historia clínica.
- Procedimientos invasivos: uso de catéter venoso central, ventilación mecánica, procedimientos quirúrgicos al ingreso o 30 días antes del primer aislamiento.
- Ingreso para trasplante: De acuerdo a historia clínica.
- Uso previo de antibióticos: Al menos 72 horas antes de la petición de la toma de muestra.
- Mortalidad durante el ingreso.

2. SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS Y SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Se incluyeron 177 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y 6 aislamientos de *P. putida*, recogidas de pacientes ingresados en el Hospital Universitario 12 de Octubre durante Enero de 2007 y Diciembre de 2010.

La tabla 2.1 muestra los aislamientos incluidos en el estudio junto con la fecha de aislamiento y origen clínico de las mismas.

Tabla 2.1.- Aislamientos clínicos de *Pseudomonas spp.* recogidos durante el estudio.

ESTUDIO	CEPA	FECHA DE AISLAMIENTO	MUESTRA CLINICA Y COLONIZACIÓN
1^{er} PERIODO	P1	16/02/2007	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P2	07/03/2007	BILIS
	P3	09/03/2007	LÍQUIDO ABDOMINAL
	PA4	24/04/2007	SANGRE
	P5	27/06/2007	ORINA
	PP6_SD1	02/07/2007	ORINA
	7P	26/07/2007	ORINA
	8P	13/08/2007	ORINA
	P9	24/10/2007	ESPUTO
	P10	31/10/2007	ESPUTO
	P11	15/11/2007	EXUDADO CUTANEO
	P12	30/11/2007	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P13	31/12/2007	EXUDADO CUTANEO
	PA14	29/01/2008	ESPUTO
	P15	30/01/2008	SANGRE
	P16	01/02/2008	SECRECIÓN TRAQUEAL
	PA17_SD2	04/02/2008	ESPUTO
	P18	19/02/2008	ORINA
	P19	11/04/2008	EXUDADO CUTANEO
	P20	11/04/2008	SANGRE
	P21	15/04/2008	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P22	21/04/2008	SANGRE
	P23	07/05/2008	ESPUTO
	P24	07/05/2008	ESPUTO
	P25	23/05/2008	SANGRE
	PA26_SD3	26/05/2008	ORINA
	P27	30/05/2008	ESPUTO
	PA28	25/06/2008	SANGRE
	P29	05/07/2008	ASPIRADO BRONQUIAL
	P30	28/07/2008	EXUDADO CUTÁNEO
	PA31_SD4	07/08/2008	ESPUTO
	P32	21/08/2008	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P33	27/09/2008	ORINA

ESTUDIO	CEPA	FECHA DE AISLAMIENTO	MUESTRA CLINICA Y COLONIZACIÓN	
1^{er} PERIODO	PA34_SD5	16/10/2008	ORINA	
	P35	29/10/2008	BILIS	
	PP36_SD11	13/11/2008	EXUDADO INGUINAL	
	PA37_SD6	28/11/2008	ESPUTO	
	PA38_SD7	03/12/2008	ESPUTO	
	P39	05/12/2008	ORINA	
	PA40_SD8	15/12/2008	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA	
	P41	17/12/2008	ESPUTO	
	P42	19/12/2008	SANGRE	
	PA44_SD10	29/12/2008	ESPUTO	
	P45	20/12/2008	ORINA	
	P46	31/12/2008	EXUDADO INGUINAL	
	2^o PERIODO	PA43_SD9	22/01/2009	BILIS
		P47	23/02/2009	ORINA
PA48_SD12		26/02/2009	SANGRE	
P49		12/03/2009	ORINA	
P50		17/03/2009	ESPUTO	
P51		18/03/2009	SANGRE	
P52		23/03/2009	SECRECCION TRAQUEAL	
P53		26/03/2009	ESPUTO	
P54		03/04/2009	ORINA	
PA55_SD13		03/04/2009	ORINA	
P56		06/04/2009	ORINA	
P57		14/04/2009	LÍQUIDO ABDOMINAL	
P58		22/04/2009	ESPUTO	
P59		22/04/2009	ORINA	
PP60_SD14		27/04/2009	ORINA	
P61		08/05/2009	LÍQUIDO PLEURAL	
P62		15/06/2009	ORINA	
P63		02/07/2009	SANGRE	
P64		06/07/2009	SECRECCIÓN TRAQUEAL	
P65		07/07/2009	ORINA	
P66		08/07/2009	ORINA	

ESTUDIO	CEPA	FECHA DE AISLAMIENTO	MUESTRA CLINICA Y COLONIZACIÓN
2° PERIODO	P67	16/07/2009	ORINA
	P68	24/07/2009	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P69	17/08/2009	SANGRE
	P70	25/08/2009	ORINA
	P71	25/08/2009	ORINA
	P72	27/08/2009	BILIS
	P73	01/09/2009	EXUDADO ABSCESO INGUINAL
	P74	01/09/2009	ESPUTO
	P75	21/09/2009	ORINA
	P76	24/09/2009	ESPUTO
	PP77_SD19	01/10/2009	SANGRE
	P78	19/10/2009	EXUDADO DRENAJE
	P79	26/11/2009	ORINA
	P80	01/12/2009	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P81	10/12/2009	ORINA
	P82	16/12/2009	ORINA
	P83	30/12/2009	ESPUTO
	P84	02/01/2010	EXUDADO ABSCESO PERIANAL
	P85	04/01/2010	ESPUTO
	P86	04/01/2010	ESPUTO
	P87	04/01/2010	ORINA
	P88	15/01/2010	ORINA
	P89	16/01/2010	ORINA
	P90	01/02/2010	EXUDADO FARINGEO
	P91	09/02/2010	SANGRE
	PA92_SD21	10/02/2010	SANGRE
	P93	11/02/2010	SANGRE
	P94	12/02/2010	EXUDADO INGUINAL
	P95	16/02/2010	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P96	22/02/2010	LÍQUIDO ABDOMINAL
	PA97_SD23	02/03/2010	BILIS
	P98	11/03/2010	ORINA
	P99	26/03/2010	EXUDADO CUTANEO
	P100	31/03/2010	ESPUTO
	P101	14/04/2010	ORINA
	P102	15/04/2010	ORINA

ESTUDIO	CEPA	FECHA DE AISLAMIENTO	MUESTRA CLINICA Y COLONIZACIÓN
2° PERIODO	P103	20/04/2010	ORINA
	P104	24/04/2010	ORINA
	P105	27/04/2010	SANGRE
	P106	29/04/2010	ESPUTO
	P107	08/05/2010	ORINA
	PA108_SD26	10/05/2010	ESPUTO
	PP109_SD25	11/05/2010	ORINA
	PP110_SD27	12/05/2010	ORINA
	P111	14/05/2010	SANGRE
	P112	21/05/2010	SANGRE
	P113	24/05/2010	ESPUTO
	P114	25/05/2010	ORINA
	P115	26/05/2010	ORINA
	P116	26/05/2010	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	PA117_SD28	28/05/2010	CATETER
	PA118_SD29	29/05/2010	SANGRE
	P119	31/05/2010	EXUDADO INGUINAL
	P120	07/06/2010	EXUDADO INGUINAL
	P121	07/06/2010	LÍQUIDO ORGÁNICO DRENAJE
	P122	08/06/2010	EXUDADO INGUINAL
	P123	11/06/2010	SANGRE
	P124	12/06/2010	ASPIRADO BRONQUIAL
	P125	23/06/2010	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P126	26/06/2010	ESPUTO
	P127	29/06/2010	EXUDADO ABSCESO VULVAR
	P128	02/07/2010	SANGRE
	P129	02/07/2010	ORINA
	P130	05/07/2010	ESPUTO
	P131	07/07/2010	ORINA
	P132	10/07/2010	ORINA
	P133	12/07/2010	ORINA
	P134	22/07/2010	ESPUTO
	P135	30/07/2010	BIOPSIA
	P136	02/08/2010	ORINA
	P137	05/08/2010	SANGRE
	P138	09/08/2010	ORINA

ESTUDIO	CEPA	FECHA DE AISLAMIENTO	MUESTRA CLINICA Y COLONIZACIÓN
2º PERIODO	P139	10/08/2010	ORINA
	P140	10/08/2010	ORINA
	P141	11/08/2010	ORINA
	P142	11/08/2010	ORINA
	P143	19/08/2010	ORINA
	P144	23/08/2010	EXUDADO INGUINAL
	P145	26/08/2010	ORINA
	P146	06/09/2010	ASPIRADO BRONQUIAL
	P147	06/09/2010	ORINA
	P148	06/09/2010	SANGRE
	P149	09/09/2010	ESPUTO
	P150	14/09/2010	ORINA
	P151	17/09/2010	ORINA
	P152	21/09/2010	ESPUTO
	P153	27/09/2010	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P154	03/10/2010	SANGRE
	P155	03/10/2010	SANGRE
	P156	04/10/2010	ORINA
	P157	05/10/2010	ESPUTO
	P158	07/10/2010	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P159	09/10/2010	ORINA
	P160	14/10/2010	ESPUTO
	P161	16/10/2010	ESPUTO
	P162	18/10/2010	ORINA
	P163	20/10/2010	ESPUTO
	P164	21/10/2010	ORINA
	P165	08/11/2010	BILIS
	P166	12/11/2010	ORINA
	P167	17/11/2010	ESPUTO
	P168	18/11/2010	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P169	23/11/2010	EXUDADO HERIDA QUIRÚRGICA
	P170	23/11/2010	ESPUTO
	P171	23/11/2010	ORINA
	P172	24/11/2010	ESPUTO
	P173	24/11/2010	ORINA
	P174	28/11/2010	SANGRE

ESTUDIO	CEPA	FECHA DE AISLAMIENTO	MUESTRA CLINICA Y COLONIZACIÓN
2º PERIODO	P175	07/12/2010	SANGRE
	P176	09/12/2010	SECRECCION TRAQUEAL
	P177	13/12/2010	ORINA
	P178	15/12/2010	ORINA
	P179	16/12/2010	SANGRE
	P180	17/12/2010	ORINA
	P181	20/12/2010	ORINA
	P182	21/12/2010	ESPUTO
	P183	24/12/2010	ESPUTO
	P183	24/12/2010	ESPUTO

Se marcan en negrita aquellas cepas que fueron seleccionadas para estudios de MLST, caracterización de mecanismos de resistencia y entornos genéticos

La identificación de las cepas y sensibilidad de los diferentes antibióticos se llevó a cabo con el sistema semiautomático WIDER (Soria Melguizo, Madrid, España). Se trata de paneles con sustratos para la identificación bioquímica de los microorganismos y con concentraciones de antimicrobianos en base 2 para la concentración mínima inhibitoria (CMI). El inóculo utilizado (5×10^4 UFC/mL) es el recomendado por el CLSI, realizándose una lectura de los paneles a las 18 horas tras la incubación a 35°C.

Cuando la identificación no fue posible a nivel de especie, se llevó a cabo por secuenciación del gen 16S ADNr (ver apartado 8.2).

Para conocer la resistencia o sensibilidad de las cepas a los diferentes antibióticos se siguieron los patrones de sensibilidad marcados por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Adicionalmente, se determinó la CMI de piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, ampicacina, ciprofloxacino y colistina por el método E-test (AB Biodisk) siguiendo las recomendaciones del CLSI, se

preparó un inóculo de 10^4 UFC/mL, con una turbidez al 0.5 McFarland y se plaqueó en placas Mueller-Hinton (bioMérieux).

- **Descripción de las cepas seleccionadas para el estudio de genotipado por MLST y estudio de los entornos genéticos.**

Durante los dos periodos de estudio y en función de los resultados preliminares, un total de 25 cepas fueron posteriormente seleccionadas, para llevar a cabo el genotipado por MLST, la caracterización de mecanismos de resistencia, y el análisis de los entornos genéticos de carbapenemasas.

- 1^{er} periodo de estudio: Se seleccionaron las cepas **PA4**, **PA14** y **PA28** (designados también como PA-A1, PA-A2, y PA-A3, respectivamente) como cepas representativas del primer brote por *P. aeruginosa*. En estas cepas se llevó a cabo además, el estudio de mecanismos de resistencia asociados a mutaciones en el cromosoma.
- 2^o periodo de estudio: Se seleccionaron cepas representativas que fueron portadoras de metalo- β -lactamasas: **PA17_SD2**, **PA26_SD3**, **PA31_SD4**, **PA37_SD6**, **PA38_SD7**, **PA92_SD21** (PA_21), **PA97_SD23** (PA_23), **PA108_SD26** (PA_26), **PA118_SD29** (cepas representativas del 2^o brote producido por *Pseudomonas aeruginosa* productoras de VIM-2), **PP6_SD1** (PP_1), **PA34_SD5** (PA_5), **PA40_SD8**, **PA43_SD9** (PA_9), **PA44_SD10** (PA_10), **PP36_SD11** (PP_11), **PA48_SD12** (PA_12), **PA55_SD13** (PA_13), **PP60_SD14** (PP_14), **PP77_SD19** (PP_19), **PP109_SD25** (PP_25), **PP110_SD27** (PP_27), **PA117_SD28** (PP_28) (cepas productoras de metalo- β -lactamasas)

3. EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS.-

3.1 Extracción de ADN genómico.-

El proceso de extracción se llevó a cabo mediante kit comercial previo tratamiento de las colonias con *proteinasas K*. Brevemente:

- Inocular la cepa en placa de agar sangre e incubar a 37°C O/N.
- Inocular 2-3 colonias y resuspender en 200 µl de TE 1X.
- Añadir 20 µl de *proteinasas K* (20mg/mL)
- Añadir 200 µl de buffer AL, mezclar bien con vortex.
- Incubar a 56°C durante 10 minutos.
- Continuar con centrifugación y purificación del sobrenadante mediante columnas de sílice donde el ADN se adsorbe específicamente siguiendo el protocolo del Kit comercial de extracción (DNeasy Blood and Tissue kit, Quiagen, GMBH, Hilden Alemania).
- Eluir con 200 µl de agua estéril.

3.2 Extracción de ADN plasmídico.-

i) Método de **lisis alcalina de Birnboim y Doly** (*Birnboim y cols., 1979*).-

Se basa en la diferente resistencia a valores de pH básicos del ADN plasmídico y cromosómico (*Birnboim y cols., 1979*). La lisis celular y desnaturalización del ADN plasmídico y cromosómico se produce por una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS 1%) y NaOH (0,2 N). La neutralización con acetato potásico (3 M, pH=5,0) permite que el ADN plasmídico vuelva a su configuración covalente circular cerrada y por tanto permanezca soluble mientras el ADN cromosómico y las proteínas precipitan en un complejo formado por potasio y SDS que se elimina por centrifugación. El ADN plasmídico en el sobrenadante se purifica con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (1:1:24) y una solución de cloroformo. El ADN plasmídico se recupera por precipitación con una solución de etanol-acetato potásico (1:10) y finalmente se concentra por precipitación con etanol. Este método se utiliza para la extracción de plásmidos de alto o medio número de copias y tamaños menores de 50 Kb. Existen versiones comerciales basadas en este método que utilizan resinas de intercambio iónico como método de purificación. En este trabajo se utilizó el método comercial QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen).

- Partir de un pre-inóculo de cultivo bacteriano en 5 ml de LB
- Incubar durante 6 h a 37°C en agitación. Posteriormente, realizar un inóculo 1:5 del cultivo anterior durante 18 h a 37°C.
- Continuar con la extracción siguiendo las indicaciones del fabricante.

ii) Método **Kado y Liu** (*Threlfall y cols., 1995*).-

Permite la rápida extracción de plásmidos en su conformación covalente circular cerrada con un amplio rango de peso molecular y combina el tratamiento a elevado pH con una elevada T^a (55°C) con lo que se intenta reducir la obtención de ADN cromosómico en la preparación final. Las proteínas residuales obtenidas en el proceso son eliminadas por extracción con fenol:cloroformo.

- Partir de un cultivo en placa de agar sangre de 24 h y a partir de aquí continuar la extracción siguiendo las recomendaciones del fabricante (QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen).

3.3 Extracción ARN.-

El método de extracción de ARN se basa en el uso de fuertes desnaturizantes como hidrocloreuro de guanidina o tiocianato de guanidina, una solubilización de los componentes desnaturizados y desnaturización de las RNAsas endógenas de forma simultánea. El protocolo llevado a cabo en este trabajo es el siguiente:

- Preparar inóculo en 5 mL de LB e incubar en agitación y a 37°C O/N.
- Hacer una dilución 1/100 en 10 mL de LB e incubar en agitación a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial con una densidad óptica a 600nm (OD_{600nm}) de aproximadamente 0.5.
- Obtener *pellet* mediante centrifugación (12000rpm, 3 minutos, 4°C).
- Añadir al *pellet* 100 µl de TE con lisozima e incubar 5 minutos a T^a ambiente.

- Continuar con el protocolo siguiendo las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, QUIAGEN).

4. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.-

La cuantificación tanto de ADN como de ARN se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro, modelo NanoDrop ND 1000 (Spectrophotometric). Para determinar la concentración del ADN y ARN se midió la DO a 260nm y 280nm, respectivamente. La relación entre ambas absorbancias debe de ser de entre 1.8 y 1.9 para asegurar un buen grado de pureza.

5. AMPLIFICACIÓN DEL ADN.-

La amplificación del ADN por PCR (polymerase chain reaction) se realizó para:

- Genotipar por MLST (genes *housekeeping*).
- Detectar resistencias mutacionales en genes codificantes de bombas de expulsión de antibióticos, *AmpC*, determinantes de resistencias a quinolonas y *oprD*.
- Caracterizar genes de β -lactamasas más comunes (*bla-*) y carbapenemasas.
- Caracterizar entornos genéticos de carbapenemasas.
- Obtener sondas utilizadas en la técnica de transferencia por *Southern-Blot* para la localización genética de las carbapenemasas.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termocicladores LabCycler (SensQuest®). Las cantidades utilizadas y las condiciones a las que se llevaron a cabo se detallan en cada uno de los apartados donde se realizó la PCR en cuestión.

De manera general, la mezcla o *mix* se componía de:

MIX, Volumen final=50 µl	muestra
Tampón o buffer de reacción (10mM TRIS-HCL pH=8, 50mM	
KCl) (10X)	5 µL
MgCl ₂ (25mM)	3 µL
dNTP (Deoxinucleótidos trifosfato) (10 mM)	1 µL
<i>Primer forward</i> (100µM)	0.5 µL
<i>Primer reverse</i> (100µM)	0.5 µL
Taq polimerasa (1-2 U)	0.5 µL
Agua de grado PCR c.s.p 50µL	39.5 µL
ADN muestra	1µL

Las Taq polimerasas utilizadas fueron ampliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, CONN, EEUU) y Taq Platinum (Invitogen), polimerasas de alta fidelidad de activación a altas temperaturas.

Las condiciones de las reacciones de PCR y los *primers* (Sigma, Promega e Invitrogen) utilizados se encuentran detallados en el anexo de tablas de la sección de Material y Métodos.

6. SEPARACIÓN Y VISUALIZACIÓN DEL ADN.-

6.1 Electroforesis de corriente continua.-

Para la separación y visualización de los fragmentos de ADN producto de amplificadores de PCR se usó siempre una electroforesis por corriente continua en geles de agarosa (*Sambrook y cols.*, 1989). La electroforesis se basa en la carga negativa del ADN a pH neutro por lo que va a condicionar su migración hacia el lado positivo cuando se somete a un campo eléctrico. La velocidad de migración es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular, lo que permite valorar el tamaño de diferentes fragmentos de ADN de igual conformación frente a un patrón de tamaños adecuados (marcadores de peso molecular). Por otro lado, existe una relación directa entre el logaritmo de la movilidad electroforética y porosidad del gel. Variando la concentración de agarosa se puede determinar qué rango de tamaños se puede separar. De esta forma, los geles de agarosa eran preparados con agarosa *D-1 Low EEO* (Pronadisa) que por su baja electrodísmosis (0,05-0,13%) permite una gran movilidad. Los geles se prepararon con tampón TBE 0,5x y agarosa a distintas concentraciones dependiendo del tamaño del fragmento a separar desde el 0,8% al 2,0% peso/volumen para separar de forma eficiente fragmentos desde 10Kb a las 0.1Kb. Las muestras eran cargadas a volúmenes variables de ADN (5 μ L en el caso de productos de PCR y 15-30 μ L para plásmidos) mezclado con un volumen de *buffer* de carga en proporción 1:5 μ L del volumen total, el cual actúa incrementando la densidad de la muestra para que ésta no difunda. La separación

de los distintos fragmentos se realizó en una cubeta de electroforesis, con tampón TBE 0,5x a 90-100V. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron 100 bp ADN ladder (100-1500 pb) (TaKaRa Bio Inc.), ØX174 RF *Hae III* (Invitrogen, life Technologies), Lambda ADN-*Hind III* Digest (bioLabs, Inglaterra) y Lambda ladder PFG (bioLabs, Inglaterra).

6.2 Tinción y visualización.

Los geles de agarosa se teñían en una solución de agua destilada con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL durante 15-20 min a T^a ambiente y protegido de la luz. El bromuro de etidio es un agente que se intercala en el ADN y que permite visualizar las moléculas de ácido nucleicos mediante luz ultravioleta. Los geles de agarosa destinados a la separación de productos de PCR se preparan con bromuro de etidio, al contrario de los destinados a la separación de plásmidos o de fragmentos de ADN por PFGE que se tiñen después de la electroforesis (10-15 min) para evitar que las moléculas intercaladas con el bromuro de etidio se degraden por efecto de la luz ultravioleta.

Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con el equipo Gel Logic 100 Imaging System (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EEUU).

7. PURIFICACIÓN DE ADN Y SECUENCIACIÓN.-

7.1 Purificación de ADN.-

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp., Cleveland, OH, EEUU). Esta exonucleasa trata los productos de PCR con un tamaño de entre 100 pares de bases hasta 20 kilobases y los deja libres de sales, nucleótidos, *primers*, etc. Para ello, se lleva a cabo una incubación de 15 minutos a 37°C para degradar restos de *primers* y nucleótidos, y una incubación a 80°C durante 15 minutos para desactivar la exonucleasa.

7.2 Reacción de Secuenciación.

La secuenciación de los genes amplificados se llevó a cabo con el método descrito por *Sanger*, el cual tiene como principio la síntesis de una cadena de ADN utilizando una ADN polimerasa y dideoxinucleótidos generando fragmentos de diferentes longitudes marcados radioactivamente o con fluoróforos que se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o en polímeros especiales en el caso de la electroforesis capilar. Una vez purificados los productos de PCR se llevaba a cabo una PCR de secuenciación para cada cadena de ADN con el kit ABI PRISM BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied biosystems).

MIX, Volumen final=10 μ l

Terminator Ready reaction Mix	4 μ L
<i>Primer forward/reverse</i>	4mM
Agua de grado PCR c.s.p 10 μ L	
ADN muestra (10-30ng μ L)	4 μ L

Las condiciones de amplificación fueron:

- Predesnaturalización: 96°C (2 minutos)
- 25 ciclos: 96°C (30 segundos) → Desnaturalización
50°C (15 segundos) → Alineamiento
60°C (4 minutos) → Extensión

Los *primers* utilizados en las diferentes reacciones de secuenciación están detallados en la tabla el anexo de tablas de la sección de Material y Métodos

Una vez terminada la PCR de secuenciación el producto era precipitado con Etanol 100% y Acetato Sódico 3M, pH=4.6, y posteriormente con Etanol al 70%.

La secuenciación se llevó a cabo con el secuenciador ABI PRISM® 3700 ADN Analyzer (Applied Biosystems).

7.3. Análisis Bioinformático.

El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante el programa Geneious 5.4.4 (Biomatters, Ltd.). La comparación y alineamientos entre las diferentes secuencias se realizaron utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Ésta, se basa en la realización de análisis comparativos entre las secuencias depositadas en las bases de datos y calcula la significancia estadística de los alineamientos. También fueron consultadas otras bases de datos como Integrall (www.integrall.bio.ua.pt), la cual recoge información sobre integrones ya depositados y asigna un nuevo número a integrones no descritos.

8. TIPIFICACIÓN MOLECULAR.-

8.1 Electroforesis en campo pulsado.-

Utilizada para reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y por tanto, derivados recientes de un microorganismo ancestral común. Esta técnica consiste en la combinación de una macorrestricción junto con una electroforesis. Para una especie bacteriana concreta, podemos encontrar enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana en cuestión. El uso de

este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria y la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 kb, y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, en las que se aplica un campo eléctrico constante ó estático, sino que requieren técnicas en las que la orientación del campo eléctrico es variable periódicamente, electroforesis en campo pulsado o *pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)*. Para ello, el ADN genómico es embebido en bloques de agarosa en los que se llevará a cabo la lisis, de manera que el ADN cromosómico también quede embebido en agarosa. El objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fracture accidentalmente, lo cual desvirtuaría los patrones de restricción y afectaría a la reproducibilidad de la técnica. Esta técnica se ha aplicado con mucha frecuencia en estudios epidemiológicos en bacteriología. Se obtienen así, patrones de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas.

Brevemente:

- Inocular una colonia en 5 mL de LB e incubar a 37°C en agitación O/N.
- Recoger 1mL del cultivo y centrifugar a 8000rpm 2 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el *pellet* con 500µL de PIV (Tris HCl 1M, pH=8, NaCl 5M). Centrifugar a 8000rpm 2 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el *pellet* con 200µL de PIV.
- Para ajustar la suspensión bacteriana, medir la densidad óptica (D.O₆₀₀) según la fórmula: $(D.O \times 40 \times 210) - 210 = \text{Vol de PIV}$. La D.O debe estar entre 1.8-2.

- Para la elaboración de los bloques o *plugs* de agarosa, mezclar 200µl de la suspensión ajustada con 200µl de agarosa específica de PFGE al 1.6% previamente atemperada a 42°C. Esta mezcla se irá depositando en los diferentes moldes, dejándolos enfriar hasta su solidificación.
- Introducir los *plugs* en la solución de lisis (1mL por cada *plug*) e incubar durante 5 horas a 37°C
 - EC: Tris HCl 1M, pH=8, Na CL 5 M, EDTA 0.5M pH=8, Desoxicolato Sódico 10% (w/v), Sarkosyl (w/v). → 985 µl
 - RNasa → 10 µl
 - Lisozima → 5 µl
- Decantar la solución anterior y añadir otra solución con *Proteinasa K* (20mg/mL) e incubar a 50°C O/N.
 - ES: EDTA 0.5M pH=8, SarKosyl (w/v). → 1000 µl
 - *Proteinasa K* (20mg/mL) → 10 µl
- Retirar la solución de lisis y realizar 4 lavados de los *plugs* de 30 minutos con TE1X (Tris HCl 1M, pH=7.5, EDTA 0.5M pH=8). Los lavados se realizarán en horizontal y en agitación. Una vez lavados, se pueden conservar en frío y listos para ser digeridos.
- Para realizar la digestión del ADN, utilizar la enzima de restricción *SpeI* (bioLabs, Inglaterra)(2.5 U por *plug*), enzima de baja frecuencia de corte. Incubar a 37°C O/N.
- La electroforesis se llevará a cabo en una cubeta de PFGE CHEF DR® III System (BioRads) con 2 litro de buffer TBE al 0,5%.
- Preparar un gel de agarosa al 1% con TBE al 0.5%.

- Cargar los *plugs* en cada uno de los pocillos junto con el marcador molecular Lambda ladder PFG (bioLabs, Inglaterra)
- Programar las condiciones de la electroforesis a 14°C, 6v/cm durante 20 horas divididas en 2 bloques.
 - Bloque I → 10 horas
 - Tiempo Inicial: 5 segundos
 - Tiempo Final: 15 segundos
 - Bloque II → 10 horas
 - Tiempo Inicial: 15 segundos
 - Tiempo Final: 45 segundos
- Teñir el gel durante 30 minutos con bromuro de etidio (0.5µg/mL)
- Lavar el gel con agua destilada.
- Visualizar el gel en un transluminador U-V y fotografiar.

La interpretación de los resultados se establecieron por comparación visual de los patrones obtenidos aplicando los criterios definidos por Tenover y cols., 1995.

Estos permiten clasificar los aislados en:

- indistinguibles: sin diferencia de bandas
- clonalmente relacionados: entre una y tres bandas de diferencia
- posiblemente relacionados clonalmente: entre 4 y 6 bandas de diferencia
- no relacionados clonalmente (más de 7 bandas de diferencia).

La migración de los fragmentos de ADN fue normalizada con un marcador de tamaño apropiado y el análisis del patrón del PFGE fue llevado a cabo usando el paquete de software Bionumerics version 3.0 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

8.2 Multi Locus Sequence Type.-

La técnica de Multi Locus Sequence Type o MLST consiste en el análisis mediante secuenciación del ADN de fragmentos internos de un número determinado de genes codificantes de distintos enzimas metabólicos bacterianos (*housekeeping genes*). La comparación de estas secuencias entre distintos aislamientos permite establecer identidades o diferencias clonales de utilidad en el análisis epidemiológico bacteriano. El hecho de utilizar enzimas metabólicos, no sometidos a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables. Por lo tanto, MLST es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo. Para cada especie bacteriana, es preciso establecer un grupo de genes metabólicos a estudiar. El esquema de MLST desarrollado para *P. aeruginosa* ([Curran y cols., 2004](#)) utiliza fragmentos internos de los siguientes genes: *acsA* (*Acetyl coenzyme A synthetase*) *aroE* (*Shikimate dehydrogenase*), *guaA* (*GMP synthase*) *mutL* (*DNA mismatch repair protein*), *nuoD* (*NADH dehydrogenase I chain C, D*) *ppsA* (*Phosphoenolpyruvate synthase*), *trpE* (*Anthralite synthetase component I*).

El procedimiento consta de las siguientes fases:

i) Extracción ADN

ii) Amplificación de los genes metabólicos:

Los primers tanto de amplificación como de secuenciación de los diferentes genes de este MLST, así como las condiciones de PCR y secuenciación se encuentran detallados en la tabla 1 del anexo de Material y Métodos.

De una forma general la mix de PCR, en este caso, era:

MIX, Volumen final=50 µl	Muestra
Tampón o <i>buffer</i> de reacción (10mM TRIS-HCL pH=8, 50mM KCl) (10X) MgCl ₂ (15mM)	5.0 µL
dNTP (Deoxinucleótidos trifosfato) (10 mM cada uno)	1.0 µL
<i>Primer forward</i> (10µM)	2.0 µL
<i>Primer reverse</i> (10µM)	2.0 µL
Taq polimerasa (5 U)	0.25 µL
Agua de grado PCR c.s.p 50µL	37.75 µL
ADN muestra (5-20 ng/ µL)	2µL

iii) Purificación de los amplificados con Exosap-it®

iv) Reacción de secuenciación. Los productos de la reacción fueron separado y detectados en el secuenciador ABI PRISM 3100 (PE Biosystems)

v) Análisis de las secuencias obtenidas. Éstas fueron analizadas mediante la base de datos MLST *Pseudomonas aeruginosa* database (<http://www.pubmlst.org/paeruginosa>).

9. CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA MUTACIONALES.-

La parte experimental de la caracterización de β -lactamasas de espectro extendido se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología del Hospital Son Dureta y Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, a cargo de los doctores Carlos Juan y Antonio Oliver, que amablemente aceptaron a colaborar en este estudio.

El estudio de la contribución de los mecanismos de resistencia mutacionales y transferibles al patrón de multirresistencia se realizó en 3 aislamientos (**PA4**, **PA14**, **PA28**) representativos de un clon epidémico de *P. aeruginosa* ampliamente diseminado en el Hospital 12 de Octubre de Madrid, entre abril de 2007 y junio de 2008 (primer periodo).

9.1 Expresión de bombas de expulsión (RT-PCR) y de β -lactamasa cromosómica (AmpC).-

Se cuantificó la expresión, por RT-PCR en tiempo real, de los genes de las bombas de expulsión de antibióticos *mexB*, *mexD*, *mexY*.

La PCR a tiempo real es un sistema basado en la detección de fluorescencia de amplicones de ADN obtenido en cada ciclo de la PCR. A través de esta técnica podemos comparar la expresión de genes bajo diferentes condiciones. El nivel relativa del ARNm de los genes que codifican para las principales bombas de expulsión en *P. aeruginosa* (*mexB*, *mexD* y *mexY*) y la cefalosporinasa

cromosómica (*AmpC*) fueron determinados por PCR a tiempo real siguiendo los protocolos previamente descritos (*Juan y cols., 2006* y *Obritsch y cols., 2004*). Brevemente, el ARN total se obtuvo a partir de cultivos en fase logarítmica con el RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania). 50 ng de ARN purificado fueron utilizados después para llevar a cabo la transcripción inversa que transformará el ARNm en ADNc y posteriormente, la PCR en tiempo real, utilizando el QuantiTect SYBR Green kit de transcripción inversa-PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) en el SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, EE.UU.). Las condiciones y *primers* que se utilizaron se describen en la tabla 2 del anexo de Material y Métodos. Como en toda comparación relativa se utilizó un gen housekeeping *rplS* (constitutivo) para normalizar la expresión relativa de cada gen. En todos los casos, los resultados eran los valores medios de expresión de ARNm obtenido en tres experimentos independientes (*Juan C y cols., 2005; Obritsch y cols., 2004*). Los aislamientos se consideraban hiperproductores si la expresión relativa del gen correspondiente fue de por lo menos 3 veces (*MexB*) o 10 veces (*MexD, MEXY, y ampC*) mayor que la documentada para la PAO1 cepa de referencia. La fórmula aplicada es:

$$X = \frac{\text{gen CT PAO1} - \{\text{cepa problema gen CT} + (\text{PAO1 CT rpsL} - \text{cepa problema CT rpsL})\}}{}$$

CT= cycle threshold

Mix de RT-PCR :

MIX, Volumen final=50 µl	1 muestra
<i>2X RT-PCR master mix</i>	12.5 µL
<i>Primer forward</i> (100µM)	0.1 µL
<i>Primer reverse</i> (100µM)	0.1 µL
<i>Quantitec RT mix</i>	0.25 µL
<i>RNase free water</i>	11.3 µL
Agua de grado PCR c.s.p 50µL	24.5 µL
ARN muestra (50ng/ µL)	1µL

9.2 Determinantes de Resistencia a Quinolonas.-

La presencia de mutaciones en las regiones de determinantes de resistencia a quinolonas fue investigada por amplificación y secuenciación de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, siguiendo el protocolo descrito previamente (*Akasaka y cols., 2001*). Los *primers* utilizados tanto para la PCR y secuenciación de los genes junto con las condiciones de las mismas se encuentran detallados en la tabla 2 del anexo de Material y Métodos.

9.3 oprD.-

Los genes que codifican para oprD fueron amplificados por PCR y secuenciados para detectar mutaciones inactivantes que causan resistencia al imipenem usando los primers y las condiciones detallados en la tabla 2 del anexo

de Material y Métodos (*Gutierrez y cols., 2007*). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las disponibles en *GenBank*.

10. CARACTERIZACIÓN DE β LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).-

La parte experimental de la caracterización de β -lactamasas de espectro extendido se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología del Hospital Son Dureta y Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, a cargo de los doctores Carlos Juan y Antonio Oliver, que amablemente aceptaron a colaborar en este estudio.

Este estudio se llevó a cabo en 3 aislados (**PA4, PA14, PA28**) representativos de un clon epidémico de *P. aeruginosa* ampliamente diseminado en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, entre abril de 2007 y junio de 2008 (primer periodo). La presencia de β -lactamasas adquiridas horizontalmente se exploró a través de métodos fenotípicos, métodos genéticos y métodos bioquímicos.

10.1 Detección fenotípica.-

La confirmación del fenotipo productor de BLEE se llevo a cabo mediante el método de la doble difusión en disco, descrito por *Jarlier y cols. (Jarlier y cols., 1998)* que consiste en un antibiograma en placas de Mueller-Hinton (Oxoid Ltd.) con discos convencionales (30 μ g) de cefotaxima y ceftazidima y con un

disco de amoxicilina-clavulánico (20/10 µg) (Oxoid, Ltd.) colocado en el centro de la placa a una distancia de 20-30 mm de los anteriores. La aparición de un halo ampliado alrededor de los discos de cefotaxima y ceftazidima en la zona próxima al disco de amoxicilina-clavulánico, tras incubación de 18-20 h a 37°C es indicativa de una posible producción de BLEE.

10.2 Amplificación (PCR) genes *bla* VIM, IMP, PER, CTX-M, SHV, TEM, OXA, PSE.-

Para la detección de los genes de β-lactamasas adquiridas horizontalmente, se llevó a cabo PCR y secuenciación utilizando primers específicos para los grupos más comunes: PSE, OXA, PER, TEM, CTX-M, y SHV (*Coque y cols., 2002; Gutierrez y cols., 2007; Oliver y cols., 2002*).

Las secuencias obtenidas fueron entonces comparadas con las disponibles en *GenBank* (www.ncbi.nih.gov/BLAST). Cepas de la colección del laboratorio, productoras de β-lactamasas tipo PER (PER-1), PSE (PSE-1), SHV (SHV-2), TEM (TEM-1), CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, y CTX-M-9, representantes de los grupos de las enzimas CTX-M más frecuentes), y OXA (OXA-1, OXA-2, y OXA-10, representantes de los grupos de las enzimas OXA más frecuentes) fueron usadas como controles en los experimentos de PCR.

Los *primers* utilizados junto con las condiciones de PCR se describen en la tabla 3 del anexo de Material y Métodos.

10.3 Detección Bioquímica.-

Esta técnica se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología del Hospital Son Dureta y Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, a cargo de los doctores Carlos Juan y Antonio Oliver, que amablemente aceptaron a colaborar en este estudio.

Para hallar genes de β -lactamasas potencialmente presentes, que no pudiesen ser amplificados con los *primers* utilizados, se realizó el isoelectroenfoque (IEF) de los extractos crudos sonicados usando Phast gels (gradiente de pH desde 3 a 9) en un aparato Phast System (Pharmacia AB) y así obtener el punto isoeléctrico.

- Isoelectroenfoque: Determinación del punto isoeléctrico

La técnica del isoelectroenfoque permite separar proteínas en geles de acrilamida sometidas a un gradiente de pH creciente. Las proteínas migran desde el ánodo hasta el cátodo cuando se les somete a corriente eléctrica hasta detenerse en el valor de pH donde su carga neta es cero, siendo este valor su punto isoeléctrico. Esta es una de las técnicas que permite obtener información del posible número y el tipo de BLEEs producidas por cada aislamiento.

La determinación del punto isoeléctrico de una proteína, se lleva a cabo en 3 pasos:

i) Obtención de extractos crudos enzimáticos

Los extractos enzimáticos se obtuvieron tras la lisis celular por sonicación o ultrasonidos (*Vecoli y cols., 1983*). Brevemente:

- Inocular 200 μ l de un cultivo de 18 h en 20 ml de caldo LB durante 6 h a 37°C en agitación.
- Tras alcanzar la fase exponencial, centrifugar a 4000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante, lavar las células en 10 ml de agua destilada, centrifugar nuevamente a 4000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Eliminar nuevamente el sobrenadante, resuspender las células en 1 ml de agua destilada y sonicar en hielo (Sonicator W-30, Heat Systems. Ultrasonics Inc., Farmingdale, NY, EEUU), utilizando 5-7 ciclos de 2 min cada uno.
- Centrifugar el sonicado a 12000 rpm durante 10 min.
- Añadir 3 ml de nitrocefin 100 μ M (Oxoid Ltd.) y 3 ml de extracto. El cambio de color amarillo a rojo del nitrocefin confirmó la presencia de actividad enzimática, y por tanto de actividad β -lactamasa.

ii) Separación en gel o isoelectroenfoque

La separación en gel de las distintas proteínas se realizó mediante la técnica descrita por Huovinen (*Huovinen y cols., 1988*) utilizando geles comerciales de poliacrilamida con anfolitos de rango de pH= 3-9 y el equipo Phastsystem (Pharmacia AB, Uppsala, Suecia). El isoelectroenfoque consiste en tres fases:

- Pre-enfoque a 15°C, 75 Vh y 2000 V donde se forma el gradiente de pH.
- Aplicación automática de la muestra en el gel.
- Enfoque a 500 Vh y 2000 V en el cual las proteínas migran hasta alcanzar su correspondiente punto isoeléctrico. Se utilizaron como controles β -lactamasas de pI conocidos.

iii) Tinción del gel

Para la visualización de las distintas bandas, el gel se tiñó con 100 µl de nitrocefin 100 µM (Oxoid Ltd.). El punto isoeléctrico de una proteína es inferido por comparación con las bandas obtenidas en los controles.

10.4 Experimentos de Clonación/Transformación.-

Cuando el gel de IEF presentó bandas que no correspondían con las de las β-lactamasas cuyos genes pudieron ser amplificados por PCR se procedió a su clonación:

- Digerir el ADN genómico de las cepas con *EcoRI* y *HindIII* por separado y ligado al vector pUCP24 (*West y cols., 1994*) igualmente digerido (proporción 10:1).
- Transformar el producto de ligación a *Escherichia coli* XL1 Blue mediante el método del CaCl₂ (*Sambrook y cols., 1989*).
- Seleccionar los transformantes en placas de agar LB con gentamicina a 5 mg/l y ampicilina a 30 mg/l.

Los fragmentos clonados fueron secuenciados directamente a partir del ADN plasmídico, con *primers* diseñados específicamente. Como comprobación de los transformantes se llevó a cabo un test de sinergia de doble disco y la batería de CMI para PIP, PIP-TZ, TAZ, CEF, IMP, MER, GEN, TOB, AMK, CIP y COL por E-test.

11. CARACTERIZACIÓN DE CARBAPENEMASAS (Metallo- β -Lactamasas, MBL).-

Se llevó a cabo en todos los aislamientos recogidos durante el periodo de estudio. La caracterización de MBL incluía determinación fenotípica, amplificación y secuenciación de los genes *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1} y *bla*_{IMP-2}.

11.1 Test fenotípico.-

El screening fenotípico para la producción de MBL se realizó mediante E-test con una combinación de imipenem e imipenem-EDTA (AB Biodisk, Solna, Sweeden). Las tiras de E-test contienen en uno de sus extremos Imipenem y en el otro Imipenem más EDTA (IP/IPI; 4-256/1-64). Los resultados se interpretaron como positivos o negativos según las instrucciones del fabricante. Así una disminución de tres o más diluciones en la CMI del imipenem en presencia de EDTA era sugestiva de producción de MBL. La presencia de una zona “fantasma” entre los dos diferentes gradientes o la deformación de las elipses también era indicativa de MBL.

11.2 Amplificación y Secuenciación.-

Para la detección de los genes de MBL, se llevó a cabo PCR y secuenciación utilizando *primers* específicos para los grupos más comunes: *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1} y *bla*_{IMP-2}

Los *primers* utilizados junto con las condiciones de PCR se describen en la tabla 4 del anexo de Material y Métodos.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las disponibles en *GenBank* (www.ncbi.nih.gov/BLAST).

12. CARACTERIZACIÓN DE LOS ENTORNOS GENÉTICOS DE CARBAPENEMASAS. PRESENCIA O AUSENCIA DE INTEGRONES.-

Parte de la caracterización de los entornos de la metalo- β -lactamasas se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología del Hospital Son Dureta y Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, bajo la dirección de los doctores Carlos Juan y Antonio Oliver.

La caracterización de los entornos genéticos de las MBLs se investigó en aislamientos seleccionados durante las dos fases del estudio (Ver cepas seleccionadas en el apartado 2.2).

Para determinar la composición genética de los integrones potencialmente portadores de las MBL, se analizó la presencia del gen *intI1* que codifica para la integrasa definitoria de los integrones de clase I, y del fragmento inicial de *QacEdelta1*, mediante PCR con *primers* específicos (tabla 5 del anexo de Material y Métodos). Posteriormente, se trataron de amplificar los genes potencialmente situados entre *intI1* y el de la(s) posible(s) β -lactamasa(s) por un lado, y entre éstos y *QacEdelta1* por otro. Una vez realizadas las PCR se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos amplificados y las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en el *GenBank* mediante BLAST.

El estudio del contexto genético en el que se insertan los integrones, se realizó a través de PCR utilizando *primers* superpuestos para la amplificación de genes del módulo *tni* (*tniQ*, *tniC*, *tniB* y *tniA*, pertenecientes a estructuras *Tn402-like*) frecuentemente localizado *downstream* al 3'CS de los integrones clase 1, (*Scotta y cols 2011; Juan y cols., 2010; Marchiaro y cols., 2010; Tato y cols., 2010*). Obtenidos los amplificados, se llevó a cabo la secuenciación de los mismos. Las secuencias resultantes fueron comparadas con las ya depositadas en el GenBank,

Los *primers* y condiciones utilizados para la síntesis de sondas se encuentran en la tabla 5 del anexo de Material y Métodos

13. LOCALIZACION DE CARBAPENEMASAS.-

13.1 Ensayos de Transformación.-

La localización potencial de carbapenemasas en plásmidos fue inicialmente evaluada a través de ensayos de transformación. Para ello el ADN plasmídico extraído con QIAfilter plasmid midi kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) fue introducido por electroporación en la cepa PAO1 (cepa salvaje de *P. aeruginosa* de trabajo en el laboratorio), siguiendo el protocolo de *Smith y cols.* (1989). Los potenciales transformantes fueron seleccionados en placas de agar LB con 16 µg/mL de ceftazidima o con 200 µg/mL de carbenicilina.

13.2 Ensayos de Hibridación y Transferencia.-

Cuando los resultados de transformación resultaron negativos, la localización cromosómica o plasmídica de los genes *blaVIM* se determinó por hibridación de ADN digerido con *I-CeuI* o *S1* nucleasa y transferencia del mismo por el método de Southern blot. Los primers y condiciones utilizados para la síntesis de sondas se encuentran en la tabla 6 del anexo de Material y Métodos.

La técnica de PFGE se utiliza, en términos generales, para separar grandes fragmentos de ADN. En este caso, se incuba el ADN total con el enzima *nucleasa S1* (Fermentas Lithuania) que convierte los plásmidos súper enrollados en moléculas lineales, mientras que no digiere el ADN cromosómico. Debido a esto los grandes plásmidos migran como bandas discretas, de las que podemos determinar su peso molecular, mientras que el ADN cromosómico, al no haber sido digerido, no puede migrar, y únicamente lo detectamos en la zona de compresión del gel, situada en la parte superior del gel, donde las moléculas que superan un determinado tamaño, son incapaces de separarse unas de otras.

Para la separación de plásmidos grandes o megaplásmidos mediante PFGE, se utilizó el método descrito por *Zuccarelli y cols.*, modificado ligeramente. La digestión del ADN plasmídico se realizó con la enzima de restricción *nucleasa S1*, que es un enzima de *Aspergillus oryzae*: en 40µL de solución se añade el *plug* de agarosa (con el ADN embebido) y a continuación se incuba durante 45 minutos a 37°C.

Solución de restricción:

1U/200 μ L Buffer de enzima SpeI

S1nuclease Buffer 1x

Las condiciones de PFGE en este caso serán de 14°C, 6v/cm durante 20 horas divididas en 2 bloques.

- Bloque I \rightarrow 14 horas 0

Tiempo Inicial: 1 segundos

Tiempo Final: 45 segundos

- Bloque I \rightarrow 6 horas

Tiempo Inicial: 1 segundos

Tiempo Final: 25 segundos

Por otra parte, con el fin de utilizar una técnica que permitiera confirmar la presencia de elementos extracromosomales, se utilizó una metodología como la digestión con *I-Ceu-I*, utilizando PFGE e hibridización. La enzima de restricción *I-Ceu-I* (New England Biolabs, Boston, MA), pertenece a las endonucleasas tipo II, la cual esta codificada por el intrón móvil clase I, que se ha insertado en el gen *rrl* (gen que codifica para rRNA 23S) del cloroplasto de *Chlamydomonas eugamatos*. La enzima es específica porque reconoce una secuencia de 26 bp que se encuentra en el ADN de doble cadena de los genes rRNA 23S (operon *rrn*), por lo tanto digiere solo el ADN cromosómico dejando el ADN plasmídico sin digestión.

La digestión del ADN se realizó empleando 6 U de *I-Ceu-I* en el *buffer* 4 (tris-acetato 20 mM, acetato de potasio 50 mM, acetato de magnesio 10 mM, ditiotreitól 1 mM) adicionando BSA 2 X e incubando a 37°C 3 horas.

Las condiciones de PFGE en este caso serán de 14°C, 6v/cm durante 20 horas divididas en 2 bloques.

- Bloque I → 12 horas

Tiempo Inicial: 20 segundos

Tiempo Final: 120 segundos

- Bloque II → 8 horas

Tiempo Inicial: 60 segundos

Tiempo Final: 100 segundos

Esta técnica se lleva a cabo en los siguientes pasos: separación, transferencia y fijación del ADN a una membrana, marcaje de las sondas, hibridación del ADN y revelado. Brevemente:

- Realizar electroforesis en corriente continua o por PFGE para la separación de los fragmentos de ADN.
- Después de la tinción y visualización del gel, proceder con la transferencia de ADN a una membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) mediante el método *Southern blot* (Sambrook y cols., 1989), durante 48 h, utilizando NaOH 0,4 N como tampón de transferencia.
- Lavar la membrana con una solución de SSC 2x (Citrato sódico 30 mM, NaCl 0,3 M) y un lavado final con TrisHCl 0,5 M, pH=7,0.
- Fijar el ADN por exposición a la luz ultravioleta.

- Marcar la sonda y llevar a cabo la hibridación utilizando el kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System siguiendo las indicaciones del fabricante (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Para el marcaje se utilizó ADN purificado, a una concentración de 10 ng/μl. La hibridación se llevó a cabo con las sondas específicas obtenidas por PCR y ya marcadas a una temperatura de 42°C durante 18 horas, utilizando el horno Techne Hibridazer HB-1 (Techne Ltd, Cambridge, RU).
- Revelar. La detección de la señal se realizó mediante la adición de peroxidasa, por un lado y por otro, de luminol (ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System, GE Healthcare Bio-Sciences AB). El revelado de las placas se realizó de manera automatizada (ImageQuant LAS 4000).

La interpretación de los resultados se llevó a cabo de la siguiente manera: una hibridación positiva de la sonda 16S rADN y de la sonda del gen *bla_{VIM}* en el mismo fragmento indicaría una localización cromosómica del gen, mientras una hibridación positiva de la sonda *bla_{VIM}* en bandas que no hibridan con la sonda 16S rADN indicaría una localización plasmídica.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

Se realizó un estudio estadístico descriptivo para analizar las características de los pacientes y el perfil genético de los aislamientos. Las variables categóricas fueron analizadas en dos grupos (pacientes colonizados y/o

infectados por *P. aeruginosa* pertenecientes al clon A y B y pacientes colonizados y/o infectados por *P. aeruginosa* pertenecientes a los clones no A-no B). Estos grupos fueron comparados para su asociación usando el test χ^2 o el test exacto de Fisher. Las variables continuas fueron analizadas con la *t* Student's. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los datos fueron almacenados y analizados con el paquete informático *SPSS versión 1.7* para *Windows* (Analytical Software, St. Paul, MN USA).

Tabla 1.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR empleados en el estudio del MLST.

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Amplificación						
<i>acsA</i> (Acetyl coenzyme A synthetase)	<i>acsA</i>	acsA-F	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	147		
		acsA-R	GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT			
<i>aroE</i> (Shikimate dehydrogenase)	<i>aroE</i>	aroE-F	TGGGGCTATGACTGGAAACC	177		
		aroE-R	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA			
<i>guaA</i> (GMP synthase)	<i>guaA</i>	guaA-F	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	132		
		guaA-R	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA		1 ciclo de 1 min a 96°C ;	<i>Curran y cols., 2004</i>
<i>mutL</i> (ADN mismatch repair protein)	<i>mutL</i>	mutL-F	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	148	30 ciclos de 1 min a 96°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C;	
		mutL-R	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC		1 ciclo de 10 min a 72°C.	
<i>nuoD</i> (NADH dehydrogenase I chain C, D)	<i>nuoD</i>	nuoD-F	ACCGCCACCCGTACTG	94		
		nuoD-R	TCTCGCCCATCTTGACCA			
<i>ppsA</i> (Phosphoenolpyruvate synthase)	<i>ppsA</i>	ppsA-F	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	123		
		ppsA-R	GGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG			
<i>trpE</i> (Anthralite synthetase component I)	<i>trpE</i>	trpE-F	GCGGCCAAGGTCGTGAG	179		
		trpE-R	CCCGCGCTTGTTGATGGTT			

Tabla 1.- *Primers* y condiciones de secuenciación por PCR empleados en el estudio del MLST (Continuación)

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Secuenciación						
<i>acsA</i> (Acetyl coenzyme A synthetase)	<i>acsA</i>	acsA-F	GCCACACCTACATCGTCTAT	147	1 ciclo de 1 min a 96°C; 30ciclos de 10sg a 96°C, 5 sg a 51°C y 2 min a 60°C	<i>Curran y cols., 2004</i>
		acsA-R	AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC			
<i>aroE</i> (Shikimate dehydrogenase)	<i>aroE</i>	aroE-F	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	177		
		aroE-R	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG			
<i>guaA</i> (GMP synthase)	<i>guaA</i>	guaA-F	AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC	132		
		guaA-R	GACGTTGTGGTGC GACTTGA			
<i>mutL</i> (ADN mismatch repair protein)	<i>mutL</i>	mutL-F	AGAAGACCGAGTTCGACCAT	148		
		mutL-R	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT			
<i>nuoD</i> (NADH dehydrogenase I chain C, D)	<i>nuoD</i>	nuoD-F	ACGGCGAGAACGAGGACTAC	94		
		nuoD-R	TGGCGGTCGGTGAAGGTGAA			
<i>ppsA</i> (Phosphoenolpyruvate synthase)	<i>ppsA</i>	ppsA-F	GGTGACGACGGCAAGCTGTA	123		
		ppsA-R	GTATCGCCTTCGGCACAGGA			
<i>trpE</i> (Anthralite synthetase component I)	<i>trpE</i>	trpE-F	TTCAACTTCGGCGACTTCCA	179		
		trpE-R	GGTGTCCATGTTGCCGTTC			

Tabla 2.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR empleados en la caracterización de los mecanismos de resistencia por mutaciones en el cromosoma.

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Expresión bombas de expulsión						
Gen normalizador de la expresión	<i>RplS</i>	RplS-F RplS-R	GCTGCAAAACTGCCCGCAACG ACCCGAGGTGTCCAGCGAACC	250		
Bomba de expulsión	<i>Mex-B</i>	MexB-F MexB-R	CAAGGGCGTCGGTGA CTTCAG ACCTGGGAACCGTCGGGATTGA	273		
Bomba de expulsión	<i>Mex-D</i>	MexD-F MexD-R	GGAGTTCGGCCAGGTAGTGCTG ACTGCATGTCTCGGGGAAGAA	236	RT: 20 min a 50°C; Activación de la polimerasa: 15 min a 95°C Amplificación: 35 ciclos de 15sg a 95°C, 30sg a 62°C, 30sg a 72°C	<i>Oh H y cols., 2003</i>
Bomba de expulsión	<i>Mex-Y</i>	MexY-F Mexy-R	TGGAAGTGCAGAACCGCCTG AGGTCAGCTTGCCGGGTC	270		
Expresión AmpC	<i>AmpC</i>	AmpC-F AmpC-R	GGGCTGGCCTCGAAAAGAGGAC GCACCGAGTCGGGGA ACTGCA	247		

Tabla 2.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR empleados en la caracterización de los mecanismos de resistencia por mutaciones en el cromosoma (Continuación).

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Determinantes de resistencia a las quinolonas	<i>parC</i>	parC-F	CGAGCAGGCTATCTGAACTAT	--		
		Parc-R	GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA			
Amplificación y secuenciación	<i>parE</i>	parE-F	CGGCGTTCGTCTCGGGCGTGGTGAAGGA	--	1 ciclo de 3 min a 94°C;	
		parE-R	TCGAGGGCGTAGTAGATGTCCTTGCCGA			
Amplificación y secuenciación	<i>gyrA</i>	gyrA-F	AGTCCTATCTCGACTACGCGAT	421-630	35 ciclos de 30sg a 94°C, 30 seg a 55°C ,	<i>T. Akasaka y cols., 2001</i>
		gyrA-R	AGTCGACGGTTTCCTTTCCAG			
Mutación en la porina oprD (resistencia a imipenem)	<i>gyrB</i>	gyrB-F	TGCGGTGGAACAGGAGATGGGCAAGTAC	1213-1445	1min a 68-72°C	
		gyrB-R	CTGGCGGAAGAAGAAGGTCAACAGCAGGGT			
Amplificación y Secuenciación Secuenciación	<i>OprD</i>	OprD-F	CGCCGACAAGAAGAACTAGC	1,412	1 ciclo de 10min a 95°C;	<i>O. Gutierrez y cols., 2007</i>
		OprD-R	GTCGATTACAGGATCGACAG			
		OprD-F2	GCCGACCACCGTCAAATCG			

Tabla 3.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de BLEE

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Grupo PSE						
Amplificación y secuenciación	<i>blaPSE-1</i>	PSE-1F PSE-1R	ATGCTTTTATATAAAAATGTGTG TCAGCGCGACTGTGATGTA	914	1 ciclo de 5 min a 96°C; 35 ciclos de 1 min a 96°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
Grupo OXA						
	<i>blaOXA</i>					
	OXA-1	OXA-1F OXA-1R	ACACAATACATATCAACTTCGC AGTGTGTGTTTAGAATGGTGATC	814		
Amplificación y Secuenciación	OXA-2	OXA-2F OXA-2R	TTCAAGCCAAAGGCACGATAG TCCGAGTTGACTGCCGGGTTG	704	1 ciclo de 5 min a 96°C; 35 ciclos de 1 min a 96°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	<i>Oliver y cols., 2002</i>
	OXA-10	OXA-10R OXA-10R	CGTGCTTTGTAAAAGTAGCAG CATGATTTTGGT GGAATGG	651		
Grupo PER						
Amplificación y Secuenciación	<i>blaPER-1</i>	PER-F PER-R	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA ATGAATGTCATTATAAAAAGC	933	1 ciclo de 5 min a 96°C; 35 ciclos de 1 min a 96°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	<i>Xiaofei Jiang y cols., 2006</i>
Grupo TEM						
Amplificación y Secuenciación	<i>blaTEM-1</i>	TEM-F TEM-R	ATGAGTATTCAACATTTCCG CTGACAGTTACCAATGCTCTC	867	1 ciclo de 5 min a 96°C; 35 ciclos de 1 min a 96°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	<i>Oliver y cols., 2002</i>

Tabla 4.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de MBL.

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Amplificación y Secuenciación	<i>blaVIM-1</i>	VIM1-F VIM1-R	GTAAAAAGTTATTAGTAGTTTATTG CTACTCGGCGACTGAGC	799	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30sg a 94°C, 30sg a 56°C y 45sg a 72°C ; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
Amplificación y Secuenciación	<i>blaVIM-2</i>	VIM2-F VIM2-R	ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG CTACTCAACGACTGAGCG	801	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30sg a 94°C, 30sg a 56°C y 45sg a 72°C ; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
Secuenciación	<i>blaVIM</i>	VIM-F VIM-R	AGTGGTGAGTATCCGACAG ATGAAAGTGCGTGGAGAC		1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30sg a 94°C, 30sg a 54°C y 45sg a 72°C ; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y col.,s 2007</i>
Amplificación y Secuenciación	<i>blaIMP-1</i>	IMP1-F IMP1-R	ATGAGCAAAGTTATCTGTATTC TTAGTTGCTTGGTTTTGATGG	741	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30sg a 94°C, 30sg a 56°C y 45sg a 72°C ; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y col., s 2007</i>
Amplificación y Secuenciación	<i>blaIMP-2</i>	IMP2-F IMP2-R	ATGAAGAAATTATTTGTTTTATG TTAGTTACTTGGCTGTGATG	741	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30sg a 94°C, 30sg a 56°C y 45sg a 72°C ; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>

Tabla 5.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de los entornos genéticos de las MBL.

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Amplificación y Secuenciación de <i>intI</i>	<i>IntI</i>	INT-F	CTCTCACTAGTGAGGGGC	1,01	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 45sg a 94°C, 45sg a 56°C , 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
		INT-R	ATGAAAACCGCCACTGCG			
Amplificación y Secuenciación de gene(s) entre <i>intI</i> y <i>blaVIM-2</i>		INT-R-I	CGCAGTGGCGGTTTTTCAT	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 56°C , 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
		VIM2-F-I	CTTACTCAAAAAGTTTGAACAT			
Amplificación de <i>qacE</i> δ1	<i>qacE</i>	qacE-F	GAAAGGCTGGCTTTTTCTTG	210	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 45sg a 94°C, 45sg a 56°C, 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
		qacE-R	ATTATGACGACGCCGAGTC			
Amplificación y Secuenciación de gene(s) entre <i>blaVIM2</i> y <i>qacE</i> Δ1		qacE-F-I	CAAGAAAAAGCCAGCCTTTC	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 56°C, 3 min a 72°C ; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
		VIM-2-R-I	CGCTCAGTCGTTGAGTAG			
Amplificación y Secuenciación de gene(s) entre <i>intI</i> y <i>blaVIM-1</i>		INT-R-I	CGCAGTGGCGGTTTTTCAT	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 56°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
		VIM1-F-I	CTTACTCAAAAAGTTTGAACAT			
Amplificación y Secuenciación de gene(s) entre <i>blaVIM</i> y <i>qacE</i> Δ1		qacE-F-I	CAAGAAAAAGCCAGCCTTTC	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 56°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
		VIM-1-R-I	CGCTCAGTCGTTGAGTAG			

Tabla 5.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de los entornos genéticos de las MBL. Caracterización de los Integrones de clase 1 (Continuación).

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Amplificación y Secuenciación de gene(s) entre <i>intl1</i> y <i>blaIMP-2</i>		INT-R-I	CGCAGTGGCGGTTTTTCAT	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 56°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
		IMP2-F-I	CTTACTCAAAAAGTTTGAACAT			
Amplificación y Secuenciación de gene(s) entre <i>blaIMP</i> y <i>qacEΔ1</i>		qacE-F-I	CAAGAAAAAGCCAGCCTTTC	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 56°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Gutierrez y cols., 2007</i>
		IMP2-R-I	CGCTCAGTCGTTGAGTAG			
Amplificación y Secuenciación de <i>orf5</i>	<i>Orf5</i>	Orf5-F	CGATATCGACGAGGTTGTGC	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 45sg a 94°C, 45sg a 56°C , 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Tato y cols., 2010</i>
		Orf5-R	AGTTCTAGCGTTCTGCG			
Amplificación y Secuenciación de <i>qacEΔ1</i>	<i>qacEΔ1</i>	qacEΔ1- F	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 56°C, 3 min a 72°C ; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Tato y cols., 2010</i>
		qacEΔ1- R	CAAGCTTTGCCCATGAAGC			

Tabla 6.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR y secuenciación empleados en la caracterización de los entornos genéticos de los integrones de clase 1. Caracterización del módulo *tni*.

TIPO PCR	GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Amplificación y Secuenciación del módulo <i>tni</i>						
Amplificación y Secuenciación de <i>tniQ</i>	<i>tniQ</i>	TniC-F	TCGAGCTTCCACACGATCAG	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min a 56°C, 3 min a 72°C ; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Marchiaro y cols., 2010</i>
		TniB-R	GACGATTGCTGCTCACTGCT			
Amplificación y Secuenciación de <i>tniC</i>	<i>tniC</i>	TniC-R	CGATCTCTGCGAAGAACTCG	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 45sg a 94°C, 45sg a 56°C , 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Marchiaro y cols., 2010</i>
		TniC-F1	GCACTGAACAGCGCCCCGTTTC			
Amplificación y Secuenciación de <i>tniB</i>	<i>tniB</i>	TniB-F	CAGAGCCAGTTGCTCCATTT	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 45sg a 94°C, 45sg a 56°C , 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Marchiaro y cols., 2010</i>
		TniB-F1	CAGTGAGCAGCAATCGTCGT			
		TniB-F	CAGAGCCAGTTGCTCCATTT			
Amplificación y Secuenciación de <i>tniB</i>	<i>tniA</i>	TniB-F1	CAGTGAGCAGCAATCGTCGT	Variable	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 45sg a 94°C, 45sg a 56°C , 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Marchiaro y cols., 2010</i>
		TniA-R	CTTTCACCGCGAAGTCACTC			

Tabla 7.- *Primers* y condiciones de amplificación por PCR para la elaboración de sondas específicas utilizadas en la técnica de *Southern Blot*

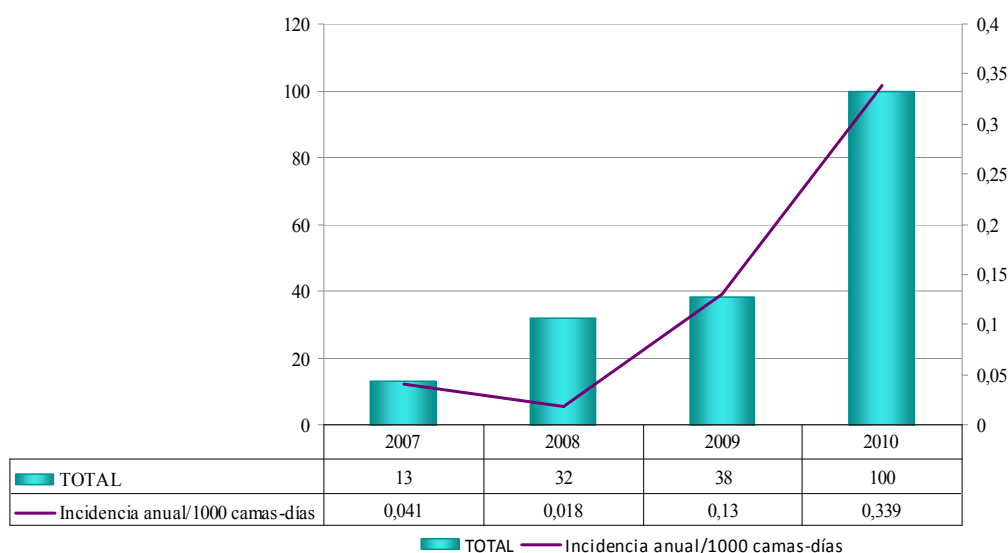
GENES	PRIMERS	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	CONDICIONES PCR	REFERENCIA
Secuenciación <i>16S rADN</i>	16S-27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	500	1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	<i>Smith y cols., 2004</i>
	16S-519R	GWATTACCGCGGCKGCTG			
Sonda <i>16S rADN</i>	16S rADN-F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	1.533	1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	<i>Weisburg y cols., 1991</i>
	16S rADN-R	AAGGAGGTGATCCAGCC			
Sonda <i>blaVIM-1</i>	VIM1-F	GTAAAAAGTTATTAGTAGTTTATTG	799	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30sg a 94°C, 30sg a 56°C, 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Viedma y cols., 2009</i>
	VIM1-R	CTACTCGGCGACTGAGC			
Sonda <i>blaVIM-2</i>	VIM2-F	ATGTTCAAACCTTTGAGTAAG	801	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30sg a 94°C, 30sg a 56°C, 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Viedma y cols., 2009</i>
	VIM2-R	CTACTCAACGACTGAGCG			
Sonda <i>blaIMP-2</i>	IMP2-F	ATGAAGAAATTATTGTTTTATG	741	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30sg a 94°C, 30sg a 56°C, 45sg a 72°C; 1 ciclo de 10min a 72°C	<i>Viedma y cols., 2009</i>
	IMP2-R	TTAGTACTTGGCTGTGATG			

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ESTUDIO

1.1 INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE AISLAMIENTOS DE *P. aeruginosa* DURANTE UN PERIODO DE 4 AÑOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE.-

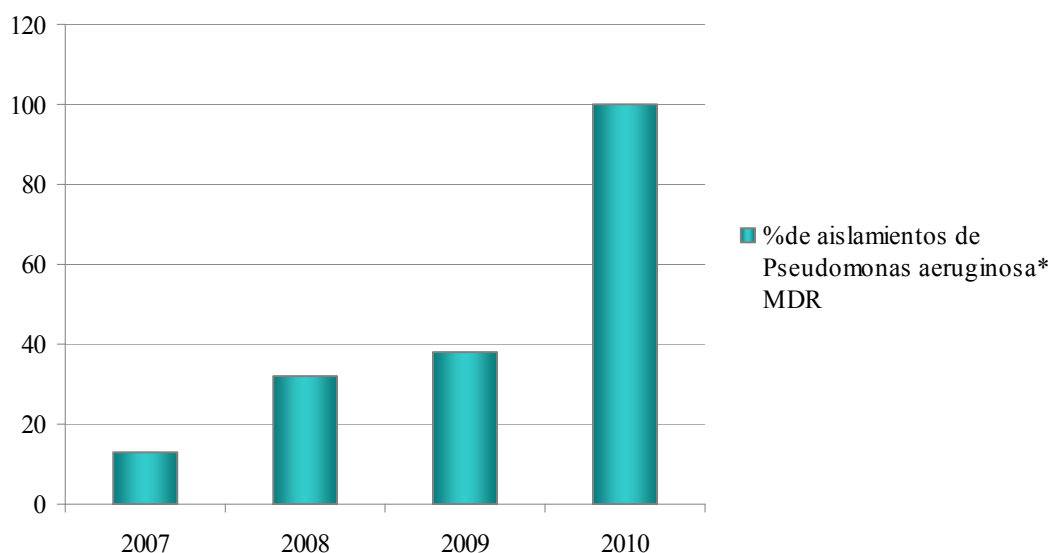
Durante los 4 años de estudio, de los 2145 pacientes que fueron infectados y/o colonizados por *Pseudomonas* spp., 183 se consideraron como MDR o XDR: 13 (2.8%) de 460 en 2007, 32 (6.2%) de 517 en 2008, 38 (7.4%) de 514 en 2009, y 100 de (15.3%) 654 en 2010. De los 183 aislamientos, 177 (96.7%) fueron identificados como *P. aeruginosa* y 6 (3.3%) como *P. putida*. La incidencia anual estimada de pacientes infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa* multirresistente se incrementó de 0.04/1,000 camas-día en 2007 a 0.34/1,000 camas-día en 2010 (Figura 1).



(incluidas los 6 aislamientos de *P. putida*)

Figura 1. Incidencia anual de infecciones y/o colonizaciones por *P. aeruginosa* MDR en el Hospital Universitario 12 de Octubre

Cuando se habla de prevalencia, se detectó un incremento en el número de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente (incluidos los 6 aislamientos de *P. putida*) de un 2.8% en el 2007 a un 15.3% en el 2010.



*: incluidos los 6 aislamientos de *P. putida*

Figura 2. Prevalencia de aislamientos de *P. aeruginosa* MDR en el Hospital Universitario 12 de Octubre

1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES INFECTADOS Y/O COLONIZADOS POR *P. aeruginosa* multirresistente.

Al analizar las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio se observó una media de edad (\pm DS) de 65.1 ± 15.7 años, y el 70.5% eran hombres (tabla 1). La mayoría de las infecciones y/o colonizaciones fueron de adquisición nosocomial (95%). Las principales unidades médicas donde *P. aeruginosa* fue aislada se correspondían con Medicina Interna (57 casos, 31.1%),

Cirugías (32 casos, 17.5%), Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (24 casos, 13.1%), Neumología (21 casos, 11.5%), y Hematología (15, 8.2%).

Las principales muestras clínicas donde *P. aeruginosa* multirresistente fue aislada fueron orinas (35%), muestras respiratorias (24%) y hemocultivos (20%) (figura 3).

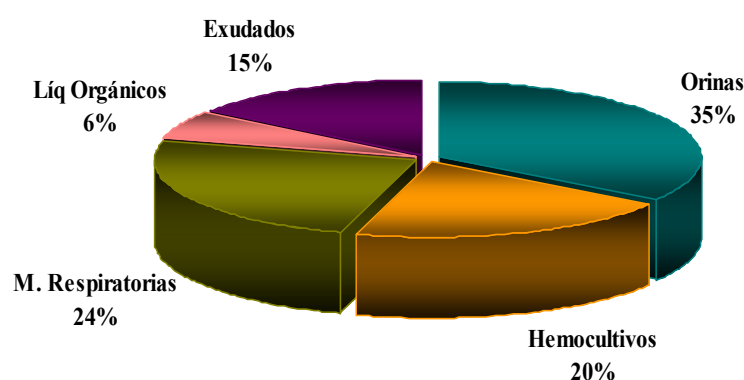


Figura 3: Distribución de aislamientos de *P. aeruginosa* en función de la muestra clínica.

En esta figura se encuentran incluidos los 6 aislamientos de *P. putida*.

De los 183 pacientes, 143 (78.1%) fueron considerados infecciones, entre las que predominaron las 36 (19.7%) infecciones del tracto respiratorio inferior, 30 (16.4%) infecciones del tracto urinario, 28 (15.3%) bacteriemias, y 22 (12%) infecciones intraabdominales (Figura 4).

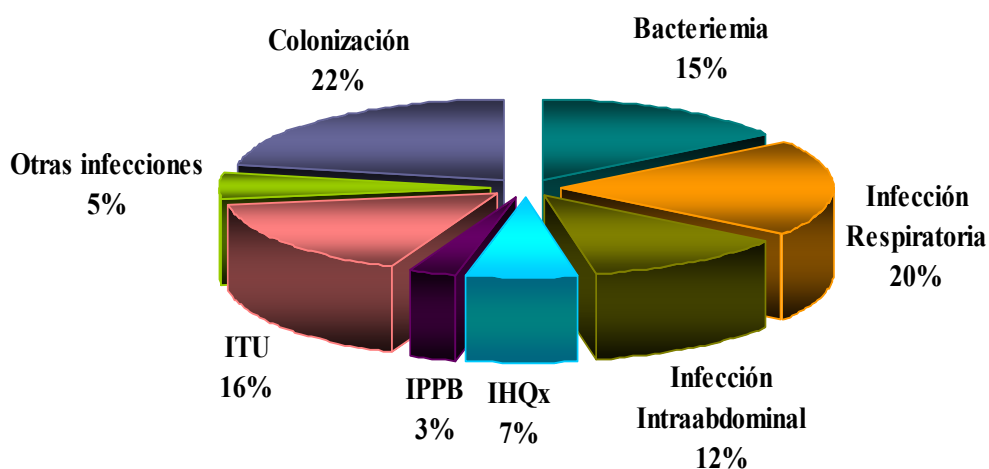


Figura 4: Infecciones producidas por cepas de *P. aeruginosa* multirresistente durante el periodo de estudio

En esta figura se encuentran incluidos los 6 aislamientos de *P. putida*

Los factores de riesgo que estuvieron mayoritariamente representados en la adquisición de la infección y/o colonización por estas cepas eran la presencia de un catéter central (77.6%), sonda urinaria (56.3) y hospitalización en los tres meses previos (46.4). Los pacientes infectados y o colonizados por *Pseudomonas spp.* presentaron diferentes patologías de base. De entre ellas, la patología respiratoria fue la mayoritaria con 49 casos. Durante el periodo de estudio, un total de 42 (23%) pacientes infectados y/o colonizados murieron durante las hospitalización. Las características clínicas de los pacientes que fueron infectados y/o colonizados por este microorganismo se detallan en la tabla 1.

Tabla 1.- Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa* (incluidos también los pacientes con aislamientos de *P. putida*).

Características Clínicas	No (%) Pacientes n=183
Edad ± DS	65.1 ± 15.7
Sexo masculino	129 (70.5)
Unidad de diagnóstico	
Cirugía	32 (17.5)
U.C.I	24 (13.1)
Medicina Interna	57 (31.1)
Hematología	15 (8.2)
Neumología	21 (11.5)
Nefrología	9 (4.9)
Factores de riesgo	
Hospitalización en los tres meses previos	85 (46.4)
Cirugía previa	61 (33.3)
Trasplante	12 (6.6)
Tumor hematológico	19 (10.4)
Tumor sólido	34 (18.6)
Diabetes Mellitus	50 (27.3)
EPOC	56 (30.6)
catéter central	142 (77.6)
Sonda urinaria	103 (56.3)
Adquisición intrahospitalaria	174 (95)
Pacientes infectados	143 (78.1)
Tipo de infección	
I. Respiratoria	36 (19.7)
I. Abdominal	22 (12)
I. Herida quirúrgica	12 (6.6)
I.T.U.	30 (16.4)
Bacteriemia	28 (15.3)
Enfermedad de base	
Patología Renal	18 (9.8)
Patología Abdominal	35 (19.1)
Patología Respiratoria	49 (26.8)
Patología Cardiovascular	23 (12.6)
Mortalidad durante el ingreso	42 (23)

1.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE LOS AISLAMIENTOS DE *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTE.

El patrón de resistencia antibiótica de los 183 aislamientos de *Pseudomonas spp.* (177 aislamientos de *P. aeruginosa* y 6 aislamientos de *P. putida*) fue TAZ (100% de los aislamientos resistentes), CEF (100% de los aislamientos resistentes), IMP (100% de los aislamientos resistentes), MER (100% de los aislamientos resistentes), GEN (97.3% de los aislamientos resistentes), TOB (96.7% de los aislamientos resistentes), y CIP (94% de los aislamientos resistentes). La sensibilidad a PIP-TZ (50.3% de los aislamientos resistentes), a AMK (42.1% de los aislamientos resistentes) y a ATM (41% de los aislamientos resistentes) fue más variable. Cuando los puntos de corte recomendados por el European Committee on Susceptibility Testing (EUCAST; www.eucast.org) fueron aplicados, el porcentaje de aislamientos resistentes a PIP-TZ y a ATM se incrementaba hasta el 98.4% y el 97.8%, respectivamente. No se encontraron diferencias en los rangos de las CMIs para el resto de antibióticos ya fueran aplicados los puntos de corte recomendados por el CLSI o por el EUCAST. Todos los aislamientos se mostraron sensibles a COL.

1.4 ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LOS AISLAMIENTOS DE *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTE.-

El análisis genotípico de los aislamientos llevado a cabo por PFGE mostró que 104 aislamientos pertenecían a un único clon mayoritario, al que denominamos clon B, 29, pertenecían a un segundo clon (clon A), 2 aislamientos pertenecientes a un tercer clon (clon C) y otros 2 aislamientos pertenecientes a otro clon (clon D). El resto (46 aislamientos) , incluyendo las 6 cepas de *P. putida* mostraron un patrón electroforético único. En las figuras 5 y 6, se pueden observar el número de aislamientos detectados durante los cuatro años de estudio atendiendo a su clonalidad.

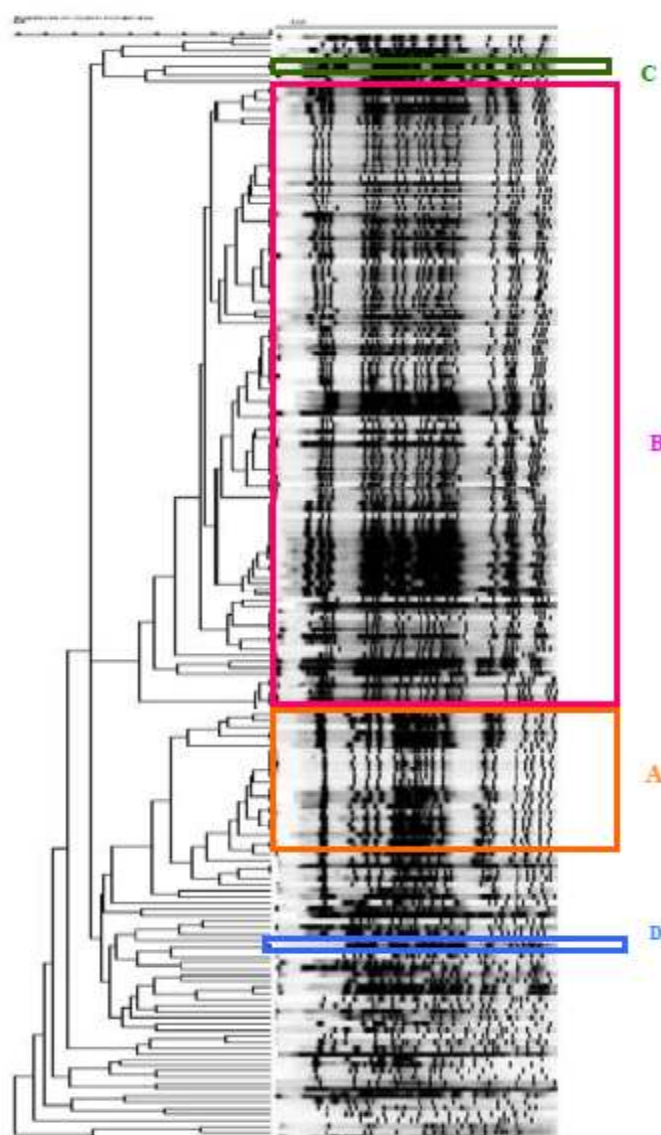


Figura 5.- Dendograma de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente (incluidas también los aislamientos de *P. putida*) entre los años 2007-2010.

Los 4 grupos clonales detectados quedan agrupados con las letras A (29 aislamientos), B (104 aislamientos), C (2 aislamientos) y D (2 aislamientos).

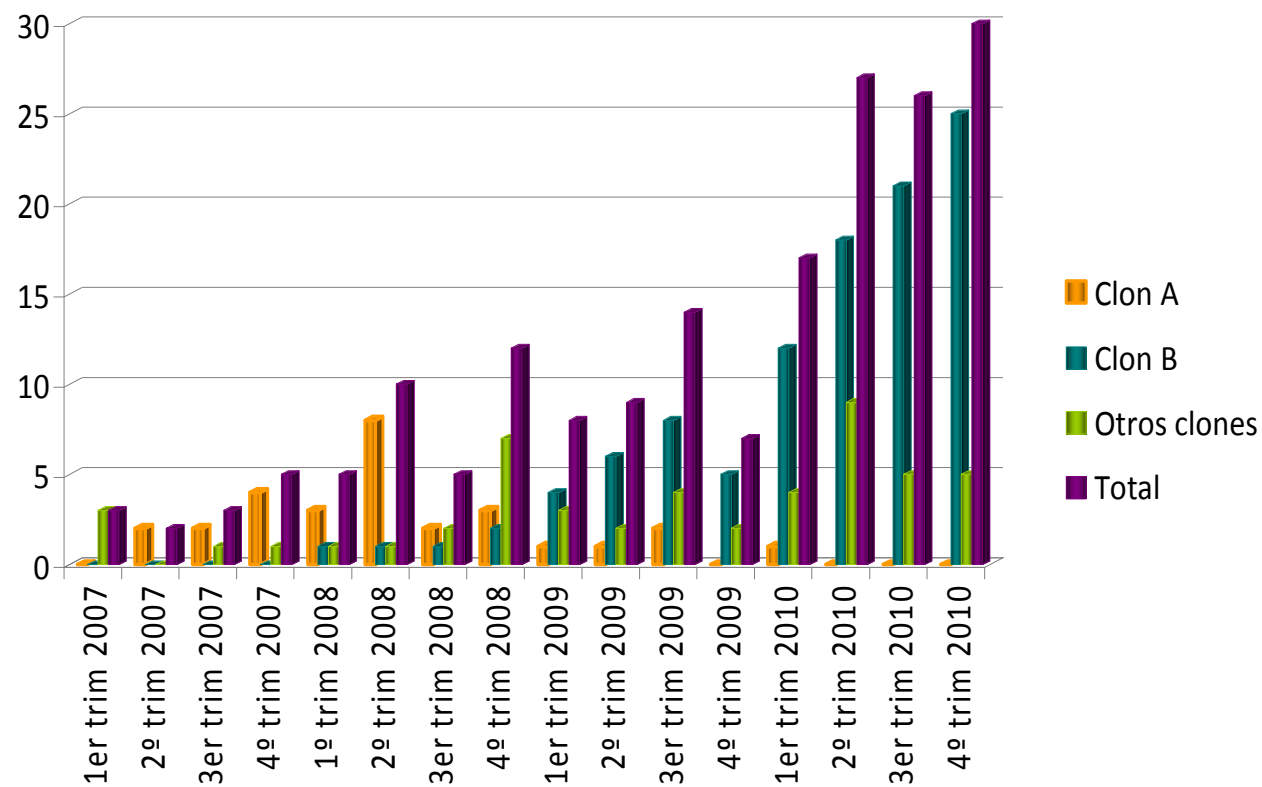


Figura 6: Distribución de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente (incluidas también los aislamientos de *P. putida*) entre los años 2007-2010.

En esta figura se observa el incremento a lo largo del tiempo en la prevalencia de aislamientos multirresistente de *P. aeruginosa*, así como la distribución temporal de los diferente grupos clonales detectados.

1.5 ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS DE *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTE DURANTE 2007-2010 EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE.-

Durante los cuatro años de estudio observamos un incremento en la prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Este incremento se debió principalmente a la emergencia de dos clones: clon A y clon B. El clon A alcanzó su pico máximo en el segundo trimestre de 2008 para ir disminuyendo progresivamente hasta desaparecer en el segundo semestre del año 2010 (Figura 7). En cambio el clon B, apareció en último trimestre de 2007 y a partir de ahí comenzó a aumentar poco a poco hasta el año 2010 donde el número de cepas pertenecientes al clon B acabó quintuplicándose con respecto al cuarto trimestre de 2009 (Figura 7).

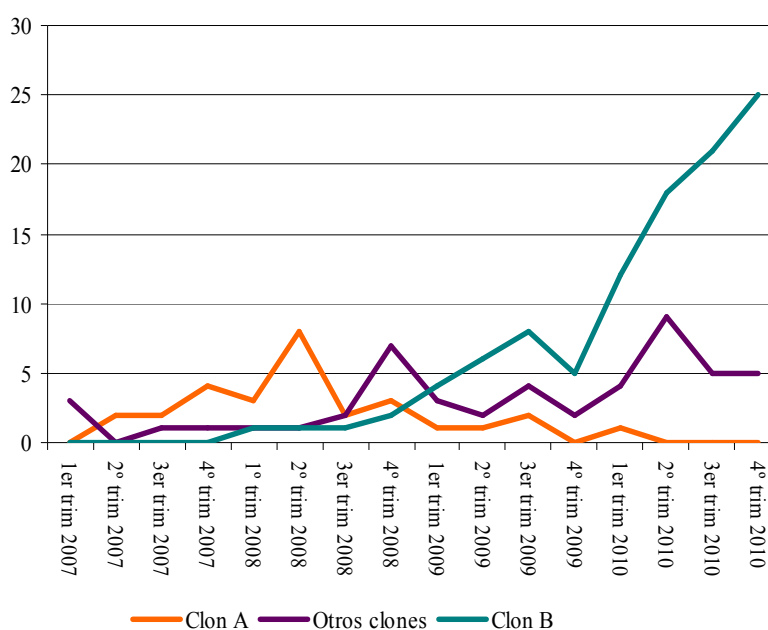


Figura 7: Distribución temporal de los clones mayoritarios de *P. aeruginosa* durante los cuatro años de estudio (207-2010)

- **Prevalencia de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente durante los años 2007-2010 en el Hospital Universitario 12 de Octubre.**

Debido a la emergencia de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente en nuestra institución, se estudió el posible papel de las carbapenemasas en el fenotipo de multirresistencia de estos aislamientos. La caracterización de estas carbapenemasas será desarrollada más adelante en los apartados de la sección de resultados correspondientes a la fase 1 y 2 del estudio.

El porcentaje de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente (incluyendo los aislamientos de *P. putida*) productoras de MBL durante el estudio fue de 63.9%, con lo que el incremento en la prevalencia de carbapenemasas se produce como consecuencia de la producción de MBL (figura 8). Si además consideramos el otro tipo de carbapenemasas adquiridas como fue GES1-5, esta prevalencia alcanza el 79.8%.

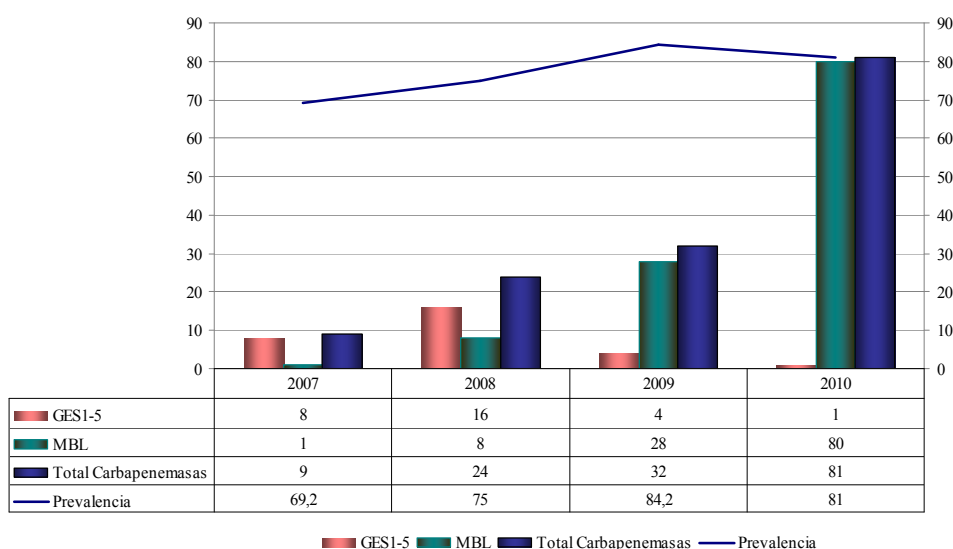


Figura 8: Prevalencia de carbapenemasas en aislamientos multirresistentes de *P. aeruginosa*.

En esta figura se encuentran incluidos los 6 aislamientos de *P. putida*

Cuando se analizó la prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* (junto con las 6 cepas de *P. putida*). multirresistente según fuese productora de carbapenemasas tipo GES1-5 o tipo MBL, se observó una evolución diferente. En la figura 8 se observa como se produce un incremento de las cepas productoras de GES1-5 durante el primer (2007, 61.5%) de estudio y a partir de ahí comienza a decrecer hasta prácticamente desaparecer (2008, 50%; 2009, 10.5%; 2010, 1%). Todo lo contrario ocurre con aquellas cepas productoras de MBL (figura 10), cuya expansión va “*in crescendo*” a lo largo de los años que comprende el estudio: 2007, 7.7%; 2008, 25%; 2009, 73.7%; 2010, 80%.

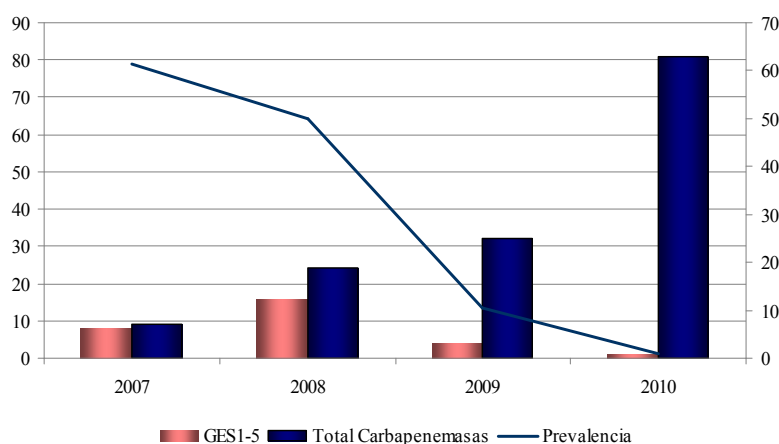


Figura 9: Prevalencia y distribución temporal de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente productora de GES1/5 durante el periodo de estudio

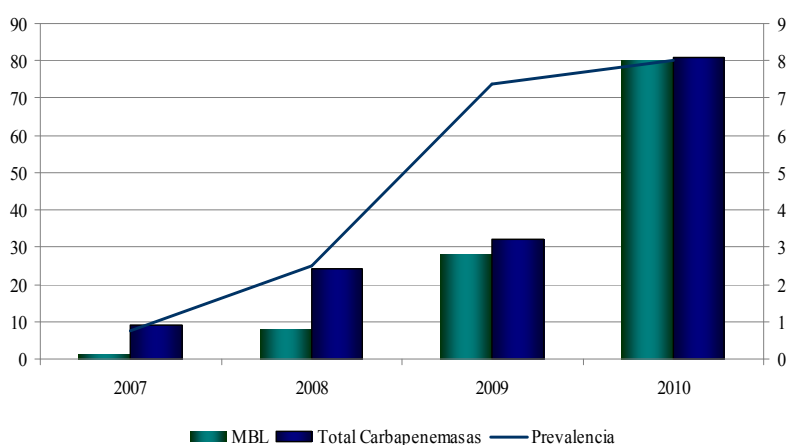


Figura 10: Prevalencia y distribución temporal de los aislamientos de *P. aeruginosa* (incluidos los aislamientos de *P. putida*) multirresistente productora de GES1/5 durante el periodo de estudio

2. FASE I: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE UN BROTE DE *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTE (CLON A) DETECTADO DURANTE 2007-2008.-

2.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

Durante los dos primeros años de estudio, un total de 1182 pacientes fueron colonizados y/o infectados por *P. aeruginosa*, y 48 (4.1 %) de estos aislamientos clínicos, 46 *P. aeruginosa* y 2 *P. putidas*, fueron resistentes a todos los agentes antipseudomónicos (incluyendo penicilinas, cefalosporinas y carbapenems). La proporción de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente en el segundo año de estudio fue más alta comparada con la del primer año de estudio, 5.5% (32/580) vs. 2.7% (16/602) ($p < 0.001$).

2.2 GENOTIPADO DE LOS AISLAMIENTOS DE *P. aeruginosa* DURANTE 2007 Y 2008.-

El estudio genotípico llevado a cabo por PFGE reveló que 24 (50%) de los aislamientos formaban parte de un mismo clon (clon A). El resto de aislamientos (24) mostraron una alta diversidad clonal (23 patrones electroforéticos diferentes).

En la figura 11 se puede observar como fue el patrón electroforético de las cepas que pertenecían al clon A.

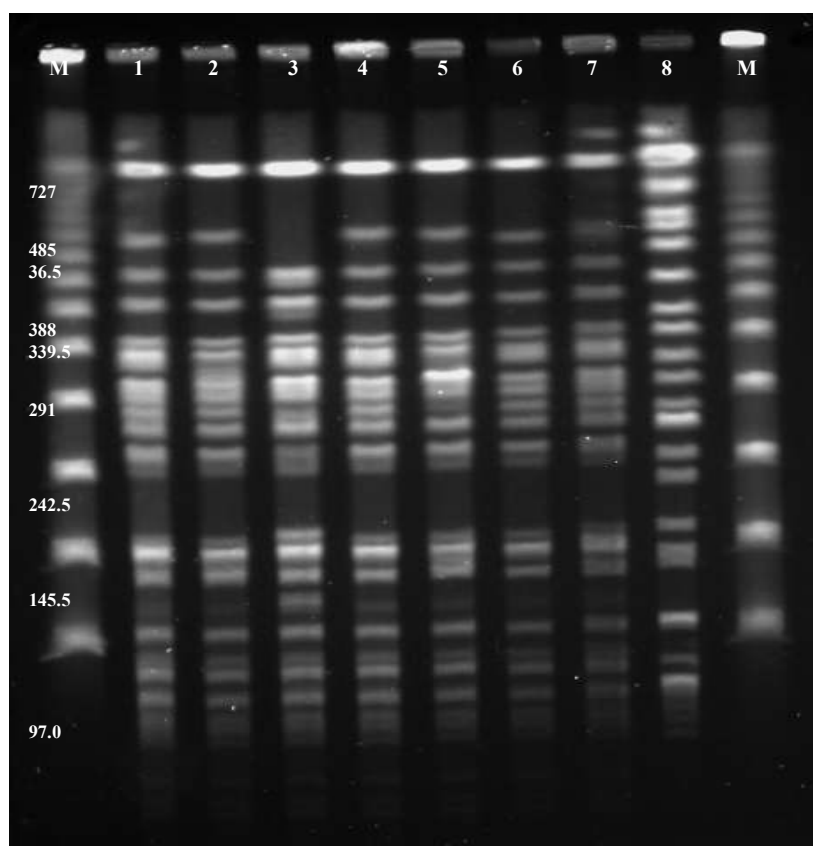


Figura 11: PFGE de aislamientos pertenecientes al clon A y un aislamiento no A

(M: marcador de peso molecular, [lambda ladder PFG, bioLabs, Inglaterra]; Carreras de 1-7: aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes al clon A; Carrera 8: aislamiento de *P. aeruginosa* multirresistente perteneciente a un clon único).

La representación de los distintos pulsotipos de las cepas de *P. aeruginosa* (incluidas dos cepas de *P. putida*) recogidas durante 2007 y 2008, se normalizaron en un dendograma (Figura 12) donde se puede observar como quedan agrupados los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes al clon A.

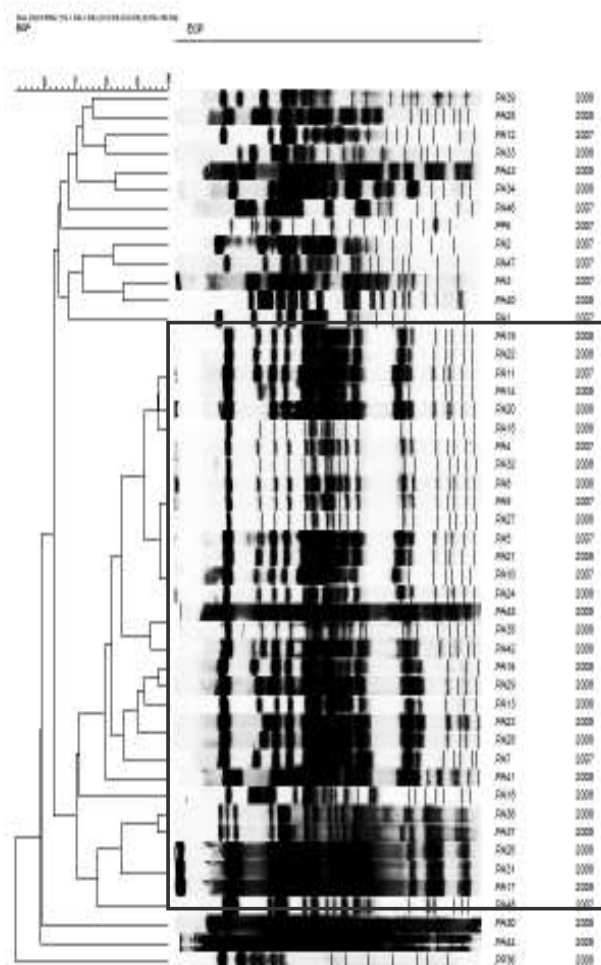


Figura 12.- Dendograma de *P. aeruginosa* multirresistentes durante 2007-2008.

Las cepas enmarcadas en el recuadro se engloban aquellas pertenecientes al clon epidémico A

La técnica de MLST se realizó en tres aislamientos representativos pertenecientes al clon A para determinar la relación con otros aislamientos previamente descritos. Los tres aislamientos mostraron similares perfiles alélicos (tabla 2). La comparación de este perfil con los disponibles en la base de datos de <http://pubmlst.org/paeruginosa>, mostró que la cepa pertenecía al ST235.

Tabla 2.- Esquema de MLST de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistentes representativos del clon A

MLST										
Cepa	Muestra	Fecha de aislamiento (dd/mm/yy)	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	ST
PA-A1	Hemocultivo	24-04-07	38	11	3	13	1	2	4	235
PA-A2	Espuito	29-01-08	38	11	3	13	1	2	4	235
PA-A3	Hemocultivo	25-06-08	38	11	3	13	1	2	4	235

La cepa epidémica A persistió al menos desde Marzo de 2007 a Enero de 2010, presentando su máximo pico en el 2º trimestre de 2008. A lo largo de los años 2009 y 2010 aparecieron 5 nuevas cepas pertenecientes al clon A hasta su desaparición a partir del segundo trimestre del año 2010.

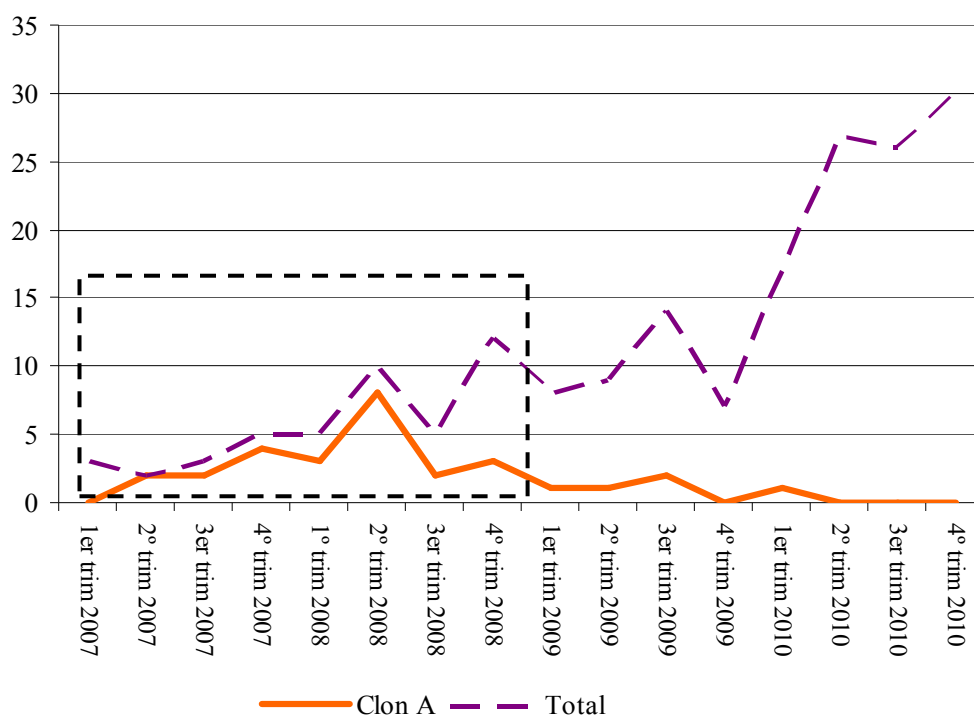


Figura 13.- Distribución temporal del clon A frente al total de aislamientos de *P. aeruginosa* (incluidos los clones de *P. putida*) a lo largo de los cuatro años de estudio.

(El marco con línea discontinua representa el periodo de tiempo donde el clon A se hizo más notable).

2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES COLONIZADOS Y/O INFECTADOS CON EL CLON MULTIRRESISTE

A.-

Aunque no se llevó a cabo una investigación epidemiológica en el sentido más estricto, fueron estudiadas las principales características clínicas de los pacientes que habían sido infectados y/o colonizados por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* (y *P. putida*) con el objetivo establecer algún tipo de relación entre la adquisición de esta tipo de cepa y algún aspecto clínico referido al paciente. La comparación entre las características clínicas de los pacientes infectados/colonizados por la cepa epidémica A (24 pacientes) en esta primera fase del estudio, con respecto al resto de pacientes infectados y/o colonizados por clones no A, reveló que la estancia en el Servicio de Hematología (33.3% vs. 4.2%, $p<0.023$) y con ello el sufrir malignidad hematológica (33.3% vs. 0.0%, $p<0.004$), se asociaba con la infección/colonización por el clon A. También la mortalidad durante la hospitalización fue mayor en estos pacientes (41.7% vs. 12.5%, $p<0.023$). Las características clínicas de estos pacientes quedan reflejadas más detalladamente en la Tabla 3.

Tabla 3.- Características clínicas de pacientes colonizados/infectados por *P. aeruginosa* multirresistente durante 2007 y 2008. Comparación entre Clon A y Clon no A.

Características	Pacientes con clon A	Pacientes con clon no A*	p
	n=24 (%)	n=24 (%)	
Edad media (año) (DS)	62.12(±15,19)	51.11(±24,17)	0.068
Sexo masculino	15 (62.1)	19 (79.2)	0.204
Servicio Diagnóstico			
Unidades quirúrgicas	2 (8,3)	7 (29,2)	0,137
Unidades de cuidados intensivos	5 (20.8)	5 (20,8)	0.638
Hematología	8 (33.3)	1 (4.2)	0,023
Medicina Interna	7 (29,2)	7 (29,2)	1
Neumología	2 (8.3%)	4 (16.7%)	0.666
Factores de riesgo			
Hospitalización en los 3 meses previos	13 (54.2)	14 (58.3)	0.771
Procedimientos quirúrgicos	6 (25)	13 (54.2)	0.039
Trasplante de órgano sólido	2 (8.3)	4 (16.7)	0.666
Tumor hematológico	8 (33.3)	0	0,004
Tumor sólido	2 (8.3)	6 (25)	0.245
EPOC	7 (29.2)	7 (29.2)	1.00
Catéter central	15 (62.5)	17 (70.8)	0.540
Sonda urinaria	9 (37.5)	13 (54.2)	0.247
Exposición antibiótica en los 30 día previos	17 (70.8)	15 (62.5)	0.540
No. de pacientes infectados	18 (76%)	20 (83.3)	0.247
Tipo de Infección			
Infección respiratoria	4 (16.7)	5 (20.8)	1
Bacteriemia	6 (25)	2 (8.3)	0.245
Infección intraabdominal	6 (25)	9 (37.5)	0.267
Otros**	8(33.3)	8(33.3)	0.763
Muerte durante la hospitalización	10 (41.7)	3 (12.5)	0.023

* Se incluyen los dos aislamientos multirresistentes de *P. putida*.

** incluidas ITUs (0 vs 3), infección de catéter (2 vs. 1) y colonizaciones (6 vs. 4)

2.4. PATRÓN DE RESISTENCIA DE LOS AISLAMIENTOS DE *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTE PERTENECIENTES AL CLON A DURANTE LOS AÑOS 2007 Y 2008.-

La determinación de las CMIs de los aislamientos clínicos pertenecientes al clon A, dio lugar a un fenotipo de resistencia tipo XDR: PIP/TZ (>64/4), TAZ (>16), CEF (>16), IMI (>8), MER (>8), CIP (>4), GM (>8), TB (>8), AK (>16). Solo dos aislamientos mantuvieron sensibilidad frente a algún aminoglucósido. Por otro lado, los aislamientos no A mostraron un patrón de resistencia más heterogéneo con respecto a aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Todos los aislamientos fueron sensibles a colistina.

Tabla 4.- Perfil de resistencia antibiótica de los aislamientos de *P. aeruginosa* durante la primera fase de estudio.

Antibióticos	CMIs (µg/ml)	Aislamientos resistentes No. (%)	Aislamientos Clon A	Aislamientos Clon no A
Piperacilina/Tazobactam	> 64	48 (100)	24 (100)	24 (100)
Cefepime	> 16	48 (100)	24 (100)	24 (100)
Ceftazidima	> 16	48 (100)	24 (100)	24 (100)
Imipenem	> 8	48 (100)	24 (100)	24 (100)
Meropenem	> 8	48 (100)	24 (100)	24 (100)
Gentamicina	> 8	42 (87.5)	24 (100)	20 (83.3)
Tobramicina	> 8	41 (85.4)	23 (95.8)	18 (75)
Amicacina	>8	41 (85.4)	22 (91.7)	19 (79.2)
Ciprofloxacino	> 8	42 (87.5)	24 (100)	18 (75)
Colistina	≥ 2	0 (0)	0 (0)	0 (0)

2.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MECANISMO DE RESISTENCIA DEL CLON EPIDÉMICO A

Como se ha descrito anteriormente, el clon epidémico A mostró resistencia a todos los antibióticos testados a excepción de COL. A pesar de este patrón de multirresistencia, la presencia de MBL fue descartada por PCR en estos aislamientos pertenecientes al clon A. Sin embargo, fue detectada la presencia de una MBL, concretamente el enzima *bla_{VIM-2}*, en 9 de los 24 aislamientos restantes (clones no A), los mismos que fueron positivos con el E-test MBL.



Figura 14: E-Test MBL positivo

De los nueve aislamientos de *Pseudomonas spp.* productores *bla_{VIM-2}* detectadas durante los años 2007 y 2008, dos se identificaron como *P. putida* y siete fueron identificadas como *P. aeruginosa*. Se observaron 5 patrones electroforéticos distintos: clon B (con cinco aislamientos), y clones E, H, F y G como clones únicos. Las cepas portadoras de esta MBL tuvieron el mismo patrón de resistencia, siendo resistentes a todos los antibióticos ensayados excepto a colistina. Estos aislamientos serán estudiados más profundamente durante la segunda fase del estudio.

Una vez descartada la producción de MBL en las cepas de *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes al clon A y con el fin de explorar los mecanismos responsables de este fenotipo, se llevó a cabo un análisis de los potenciales mecanismos de resistencia mutacionales y de adquisición horizontal. Se llevó a cabo en tres aislamientos representativos del clon epidémico A. Los aislamientos seleccionados fueron: PA4, PA14, PA28 (designados para este estudio como PA-A1, PA-A2, y PA-A3, respectivamente). La investigación de los posibles mecanismos de la multirresistencia en los aislamientos pertenecientes al clon A mostró que ésta fue el resultado de una acumulación de varios mecanismos de resistencia. Estos mecanismos fueron:

- Inactivación de *oprD*.

La represión o pérdida de la porina *oprD* está asociada con resistencia a imipenem y sensibilidad reducida a meropenem. El estudio de los eventos potencialmente inactivantes de OprD mostró la presencia de una secuencia de inserción de aproximadamente 1200pb (IS1001, ref. GenBank CP000304) en el nucleótido 629 de la secuencia de *oprD*.

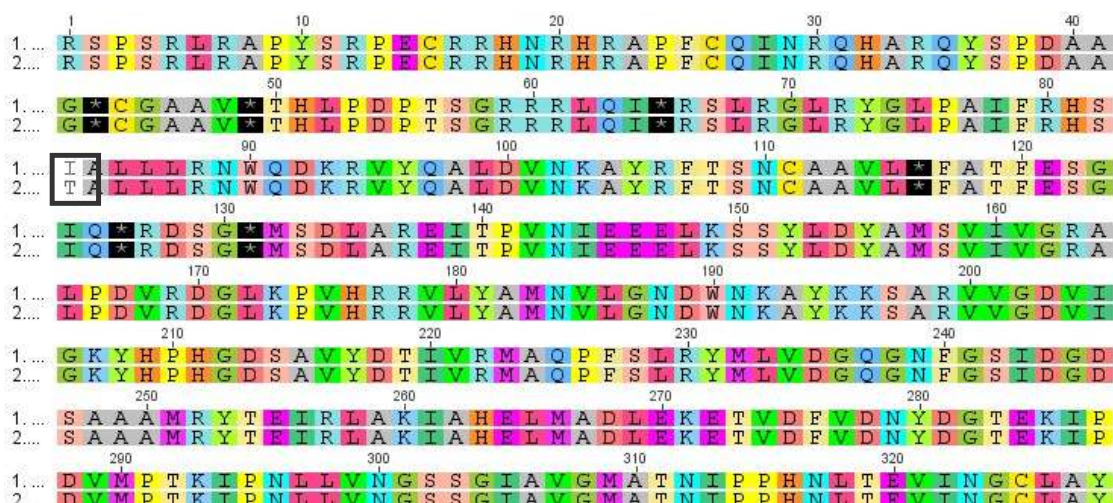


Figura 16: Proteína *gyrA*.

Esta figura muestra un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la proteína *gyrA* donde se produce la mutación responsable de la resistencia a fluoroquinolonas, exactamente en la posición

83, donde se produce un cambio de una treonina por una isoleucina.

1: Secuencia obtenida para *gyrA* de la cepa de *P. aeruginosa* multirresistente en estudio.

2: Secuencia de referencia de *gyrA*.

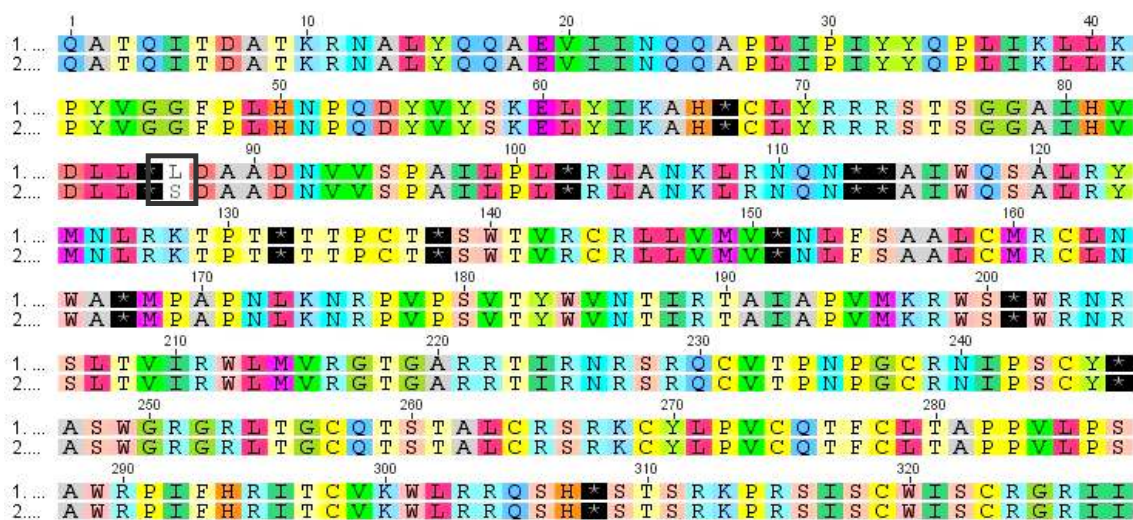


Figura 17: Proteína *parC*.

Esta figura muestra un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la proteína *parC* donde se produce la mutación responsable de la resistencia a fluoroquinolonas, exactamente en la posición

87, donde se produce un cambio de una serina por una leucina.

1: Secuencia obtenida para *parC* de la cepa de *P. aeruginosa* multirresistente en estudio.

2: Secuencia de referencia de *parC*.

- Hiperexpresión de AmpC y bombas de expulsión.-

Los experimentos de RT-PCR no se detectaron modificaciones en la expresión de la cefalosporinasa cromosómica (*ampC*) ni de la bomba MexCD-OprJ con respecto a los valores de la cepa de referencia PAO1. Aún así, los 3 aislamientos presentaron un cierto grado de hiperexpresión de las bombas de expulsión MexAB-OprM (1,8-2,4 veces) y MexXY-OprM (5,4-6,6 veces) respecto a la cepa de referencia PAO1. Sin embargo, no parece que este nivel de hiperproducción detectado tuviese gran impacto sobre la resistencia.

- β -lactamasas (Carbapenemasas de Clase A y D).-

El estudio realizado en los tres aislamientos mediante IEF detectó la presencia de 2 β -lactamasas adquiridas, una de pI= 8,6 y otra de pI= 6. La primera correspondió con la OXA-2, hecho que fue comprobado mediante PCR y secuenciación. La β -lactamasa con pI= 6 no pudo ser identificada con la batería de PCR utilizada, por lo que se procedió a su clonación. Los transformantes se obtuvieron (fragmento clonado de aproximadamente 10 Kb) a través de la digestión con *Bam*HI del ADN genómico de la cepa PA-A1, que fue clonada en *pUCP24*, para producir el plásmido *pAI*. Este plásmido fue electroporado en la cepa de referencia PAO1. Las CMI obtenidas en los transformantes se muestran en la Tabla 4. Los fragmentos clonados conferían resistencia a aminoglucósidos y a todos los β -lactámicos testados, incluyendo PIP-TZ, TAZ, CEF, ATM, IMP y MER.

Para completar este análisis se llevó a cabo la secuenciación del fragmento de ADN clonado (aprox. 10Kb). La secuenciación reveló la presencia de una

estructura completa de un integrón (Figura 18). Este integrón albergaba hasta 7 determinantes de resistencia, incluyendo 3 genes que codifican para tres enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) y 3 genes que codificaban para 3 β -lactamasas. Las EMAS fueron *aacA4*, *aadA1*, y una variante no descrita hasta ese momento, designada *aac(6')-33*(ACT99625), la cual muestra un 92% de identidad con *aac(6')-I30*.

Respecto a las β -lactamasas, una de ellas codificaba para la ya detectada por PCR, OXA-2, mientras que las otras dos codificaban para las BLEEs GES-1 y GES-5.

Un análisis detallado de las secuencias nucleotídicas reveló que *bla*_{GES-5} fue originada a partir de una duplicación en tándem de *bla*_{GES-1}, localizada entre 2 repeticiones directas de 5 nucleótidos (ACAAA) situadas al final de la región *attI* [*upstream* de *bla*_{GES-1}], y al principio del *cassette aacA4* [*downstream* de *bla*_{GES-1}]). Todo esto seguido de una selección de una mutación (Gly170Ser) (Figura 19).

Por otro lado, se realizaron experimentos de PCR para detectar la presencia de *intI1*, y de la citada *bla*_{OXA-2}, con resultados positivos. Estos resultados indicaron la presencia de un integrón de clase 1 codificando, entre otros, el gen de la citada oxacilinas. Para determinar el resto de genes presentes en el integrón se inició la secuenciación desde el extremo 3' del mismo (*qacEdelta1*). Los genes obtenidos se muestran en la Figura 18.

Brevemente, entre *bla*_{OXA-2} y *qacEdelta1* se hallaron los genes del enzima modificante de aminoglucósidos *aadA1*, además de *qacF* (que codifica para una proteína determinante de resistencia a compuestos de amonio). *Upstream*

con respecto de *bla*_{OXA-2} se halló el gen del enzima modificante de aminoglucósidos *aacA4*, seguida de los genes de las BLEE *bla*_{GES-5} y *bla*_{GES-1}.

Dichas β-lactamasas corresponden a la banda de pI=6 del IEF.

Un análisis por PCR confirmó que la estructura de este integrón (incluyendo la duplicación de *bla*_{GES}) era conservada en los tres aislamientos representativos estudiados del clon A. Este integrón se corresponde con el In647 según la base de datos de Integrall.

Localización genética las BLEEs GES1/5.-

Con el fin de determinar la localización de las BLEEs detectadas se realizaron experimentos de transformación y de *Southern Blot*.

Se llevaron a cabo varios intentos de transferencia de la *bla*_{GES} contenida en el integrón por electroporación en la PAO1, pero todos resultaron fallidos. Por tanto, no se puede concluir una localización plasmídica del citado integrón. Además, la hibridación de las sondas de *bla*_{GES} con ADN genómico y no con ADN plasmídico en el *Southern-Blot*, sugería una localización cromosómica del integrón detectado en los aislamientos del clon A.

Tabla 5: CMI y mecanismos de resistencia de los aislados seleccionados de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon epidémico A.

Cepa	Muestra	Fecha de aislamiento (mm/dd/yy)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)											Mecanismos de resistencia cromosómica					
			PIP	PIP-TZ	ATM	TAZ	CEF	IMP	MER	GM	TOB	AMK	CIP	COL	GyrA	ParC	OprD	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>
PAO1	-	-	3	2	1.5	1	1	1	0.25	2	1	4	0.064	1	-	-	-	-	-
PA-A1	Hemocultivo	24-04-07	>256	>256	>256	>256	>256	>32	>32	>256	>256	>256	>32	2	T83I	S87L	IS100I	1.9 \pm 0.3	6.6 \pm 1.6
PA-A2	Espuito	29-01-08	>256	>256	>256	>256	>256	>32	>32	>256	>256	>256	>32	2	T83I	S87L	IS100I	1.8 \pm 0.4	6.2 \pm 2.5
PA-A3	Hemocultivo	25-06-08	>256	>256	>256	>256	>256	>32	>32	>256	>256	>256	>32	2	T83I	S87L	IS100I	2.4 \pm 1.1	5.4 \pm 0.4
PAO1 ^a (pA1)	-	-	>256	>256	>256	>256	>256	8	>32	ND ^b	16	32	0.064	1	-	-	-	-	-

^a CMIs de los transformantes de PAO1 portadores del plásmido pUCP24 que contiene el integrón completo (plásmido PA-A1) del clon A (cepa PA_A1)

^b No determinado ya que pUCP24 contiene GM como marcador de resistencia

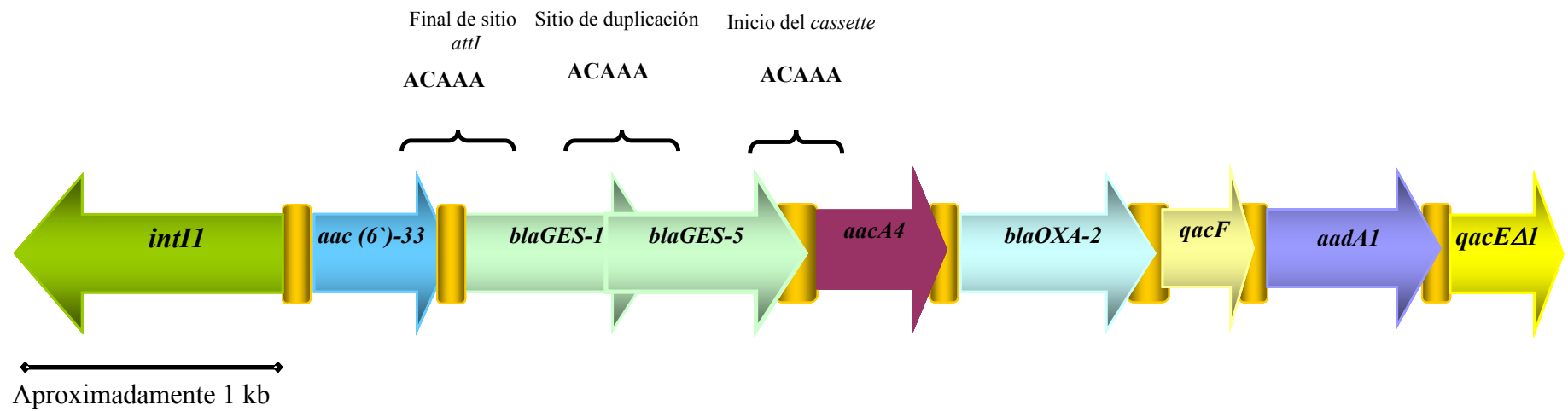


Figura 18: Representación de la estructura del integrón de clase 1 detectado en las cepas de *P. aeruginosa* multirresistente representativas del clon A (GQ337064)

3. FASE II: DISEMINACIÓN DE UN CLON EPIDÉMICO DE *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTE (CLON B), CARBAPENEMASAS Y SUS ENTORNOS GENÉTICOS.-

Esta segunda fase comprende el estudio de aquellos aislamientos portadores de MBL que se detectaron a lo largo de los 4 años de estudio en los que se basa esta tesis, incluyendo aquellos aislamientos que ya fueron detectados en el periodo de estudio de la fase I. Además intenta dar respuesta a la gran expansión de un clon multirresistente de *P. aeruginosa* que observamos durante los años siguientes del estudio (2009-2010), que surge por vez primera en el año 2008 y cuya clonalidad no se correspondía con la del clon epidémico A estudiado a la primera fase del estudio.

3.1 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DEL CLON MAYORITARIO.-

3.1.1 Genotipado de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente.-

El análisis genotípico del total de los aislamientos de *Pseudomonas spp.* recogidos desde 2007 a 2010 que se llevó a cabo por PFGE mostró que 104 aislamientos de *P. aeruginosa* (incluidos los aislamientos de *P. putida*) pertenecían a un único clon mayoritario, al que denominamos clon B, 29 aislamientos de *P. aeruginosa*, pertenecían al clon A, (caracterizado en la fase I del estudio), 2 aislamientos de *P. aeruginosa* pertenecientes a un tercer clon (clon C) y otros 2 aislamientos de *P. aeruginosa* pertenecientes a otro clon (clon D). El

resto de los aislamientos (40 aislamientos de *P. aeruginosa* y 6 aislamientos de *P. putida*) mostraron un patrón electroforético único.

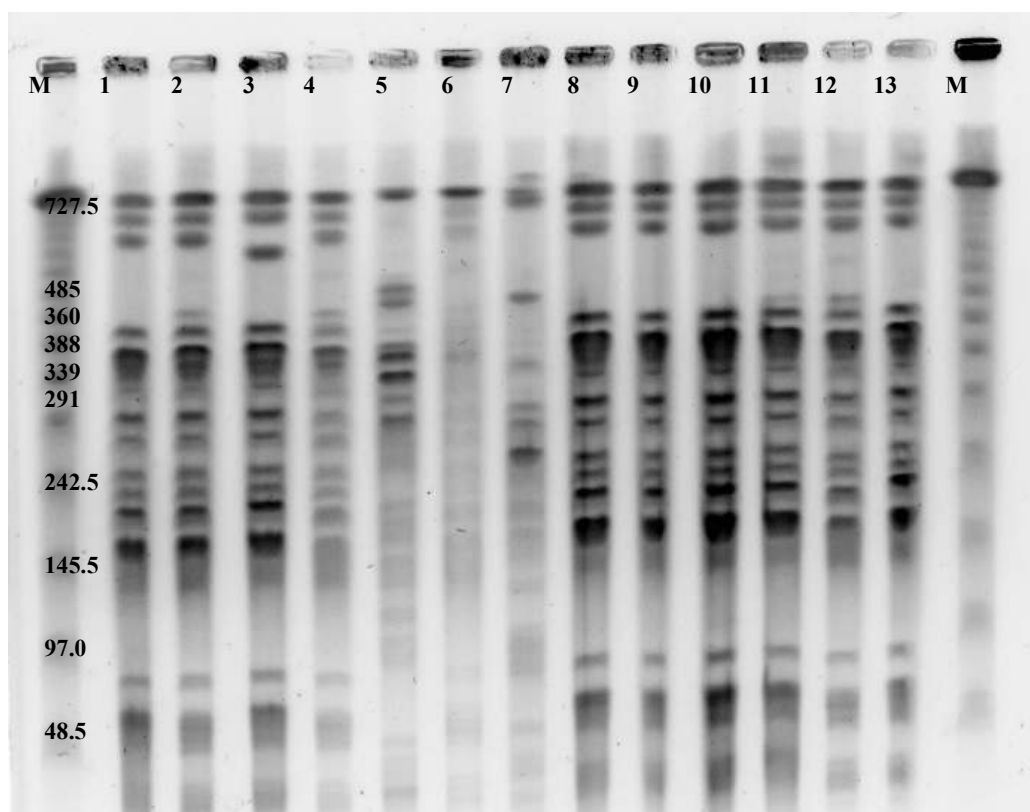


Figura 19: PFGE de aislamientos de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon mayoritario B y tres aislamientos con pulsotipos únicos recogidos durante los años 2009 y 2010.

(M: marcador de peso molecular, [λ Alder PFG, violaos, Inglaterra]; Carreras de 1-4 y 8-13: aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes al clon B; Carrera 5, 6, 7: aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes a un clones diferentes).

En la siguiente figura (Figura 20) se muestra el dendrograma de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente que fueron recogidos durante los años 2009 y 2010, (incluyendo los 4 aislamientos de *P. putida* recogidos durante este periodo) con un total de 138 aislamientos.

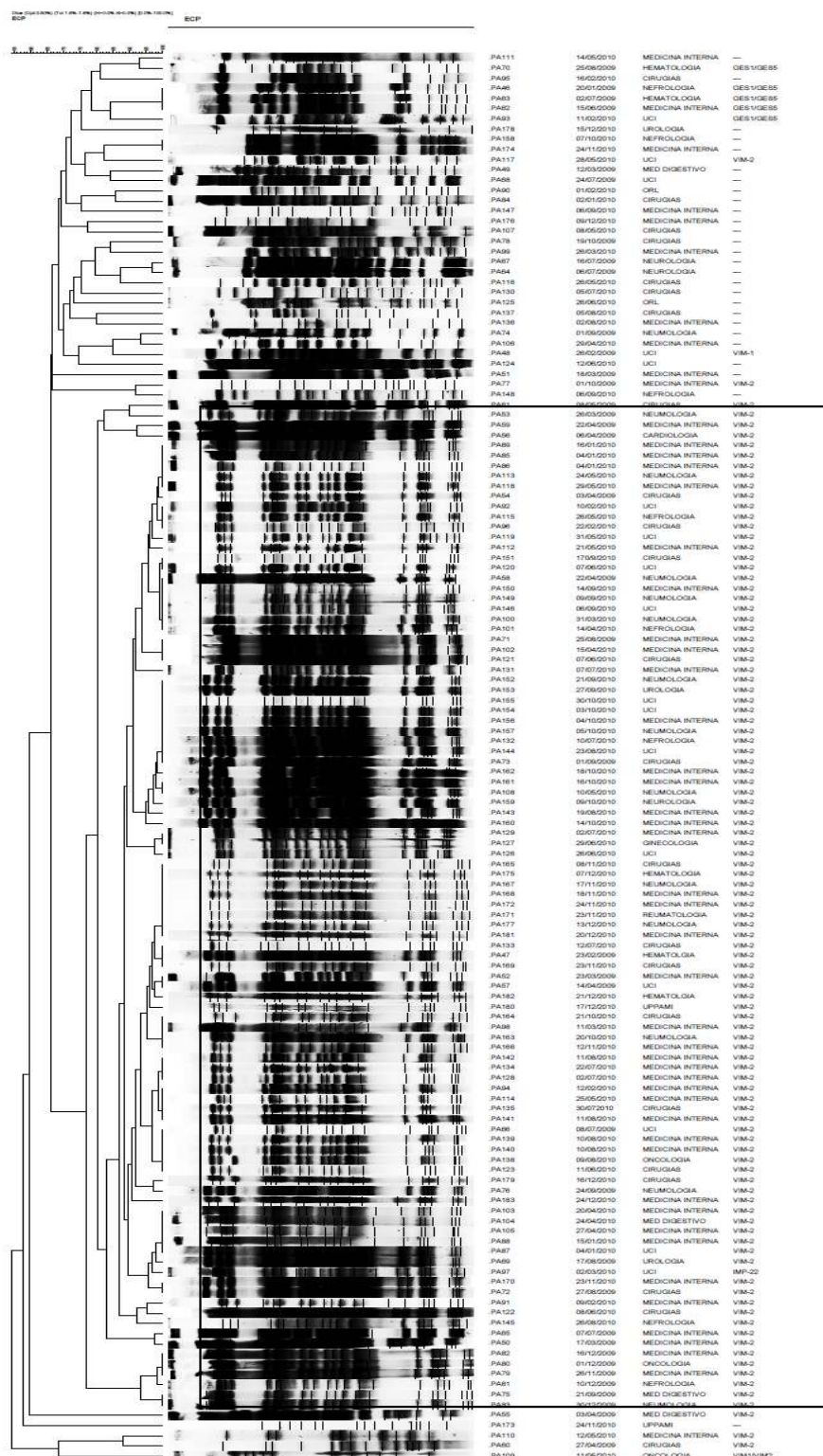


Figura 20: Dendrograma de *P. aeruginosa* multiresistentes durante 2009-2010.

En este dendograma se puede observar la aparición de 5 nuevas cepas pertenecientes al clon A detectado durante el periodo de 2007 a 2008. Si embargo el grueso de los aislamientos recogidos (99 aislamientos), se engloban en un clon mayoritario (clon B).

El análisis por MLST fue llevado a cabo en 9 aislamientos representativos del clon B para determinar su relación con otras cepas descritas. Todos los aislamientos estudiados presentaron el mismo perfil alélico identificándose como ST 175 (Tabla 6).

Tabla 6: Tipado molecular por MLST de cepas de *P. aeruginosa* multirresistente representativas del clon B

		MLST								
Cepa	Muestra	Fecha de aislamiento (dd/mm/yy)	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	ST
PA17_SD2	Espuito	04/02/2008	28	22	5	3	3	14	19	175
PA26_SD3	Orina	02/05/2008	28	22	5	3	3	14	19	175
PA31_SD4	Espuito	07/08/2008	28	22	5	3	3	14	19	175
PA37_SD6	Espuito	28/11/2008	28	22	5	3	3	14	19	175
PA38_SD7	Espuito	03/12/2008	28	22	5	3	3	14	19	175
PA92_SD21	Hemocultivo	10/02/2010	28	22	5	3	3	14	19	175
PA97_SD23	Bilis	02/03/2010	28	22	5	3	3	14	19	175
PA108_SD26	Espuito	10/05/2010	28	22	5	3	3	14	19	175
PA118_SD29	Hemocultivo	29/05/2010	28	22	5	3	3	14	19	175

3.1.2 Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por el clon B.-

El clon B fue inicialmente aislado, como hemos indicado anteriormente, en Febrero de 2008 de un paciente ingresado en el servicio de neumología y diagnosticado de una infección respiratoria de vías bajas. Posteriormente a este aislamiento, se detectan 4 aislamientos más en el 2008, 23 en 2009 y 76 en 2010. Observamos, también, que doce pacientes infectados y/o colonizados con este clon habían sido referidos al Hospital Universitario 12 de Octubre, procedentes de 5 hospitales diferentes: 4 de Madrid y un quinto de las Islas Canarias. En 5 de estos pacientes, el aislamiento de *P. aeruginosa* multirresistente fue recogido en el momento del ingreso en el hospital

Se llevó a cabo el estudio de las características clínicas de aquellos pacientes que habían sido infectados y/o colonizados por aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes al clon B frente a aquellos pacientes que habían sido infectados y/o colonizados por aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente no pertenecientes al clon B. El estudio comparativo de estos dos grupos: pacientes con clon B y pacientes sin clon B (en este último grupo estaban incluidos aquellos pacientes que se infectaron y/o colonizado por aislamientos de *P. putida*) reveló que los pacientes con clon B resultaron ser ligeramente más mayores (edad media 67.5 vs. 61.9 años; $p = 0.016$) y fueron ingresados más frecuentemente en el servicio de medicina interna (37.5% vs. 22.8%; $p = 0.033$) y servicio de neumología (16.3% vs. 5.1%; $p = 0.018$). Los pacientes infectados con clon B presentaban frecuentemente una enfermedad respiratoria de base, como la

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (36.5% vs. 22.8%; $p = 0.046$). (Tabla 7).

Al analizar las diferencias entre los pacientes infectados y/o colonizados por el clon A y aquellos en los que se aisló el clon B, reveló las diferencias que ya han sido reseñadas al analizar a los pacientes infectados y/o colonizados por ambos clones de forma independiente. Así de forma general el clon A fue aislado mas frecuentemente en el servicio de hematología a diferencia del clon B que fue aislado mayormente en medicina interna. Hay que destacar también que los pacientes que fueron infectados y/o colonizados por el clon A desarrollaron más frecuentemente bacteriemia (27.6% vs. 11.5%, $p=0.033$) y en general presentaban una mayor mortalidad (44.8% vs. 19.2%, $p=0.004$). Ver tabla 8.

Tabla 7: Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes y no pertenecientes al clon B.

Características	No (%) Pacientes n=183	No (%) Pacientes con clon B n=104	No (%) Pacientes sin clon B n=79	P
Edad año(±DS)	65.1 ± 15.7	67.5±15.4	61.9±15.7	0.016
Sexo masculino	129 (70.5)	74 (57.4)	55(42.6)	0.822
Unidad de diagnóstico				
Cirugía	32 (17.5)	15 (46.9)	17 (53.1)	0.211
U.C.I	24 (13.1)	11 (45.8)	13 (54.2)	0.243
Medicina Interna	57 (31.1)	39 (68.4)	18 (31.6)	0.033
Hematología	15 (8.2)	4 (26.7)	11 (73.3)	0.014
Neumología	21 (11.5)	17 (81)	4 (19)	0.018
Nefrología	9 (4.9)	5 (55.6)	4 (44.4)	0.599
Factores de riesgo				
Hospitalización en los tres meses previos	85 (46.4)	48 (56.5)	37 (43.5)	0.927
Cirugía previa	61 (33.3)	29 (47.5)	32 (52.5)	0.073
Trasplante	12 (6.6)	4 (33.3)	8 (66.7)	0.089
Tumor hematológico	19 (10.4)	8 (42.1)	11(57.9)	0.171
Tumor sólido	34 (18.6)	21 (61.8)	13 (38.2)	0.520
Diabetes Mellitus	50 (27.3)	29 (58)	21 (42)	0.845
EPOC	56 (30.6)	38 (67.9)	18 (32.1)	0.046
Cateter central	142 (77.6)	83 (58.5)	59 (41.5)	0.410
Sonda urinaria	103 (56.3)	60 (58.3)	44 (41.7)	0.441
Adquisición intrahospitalaria	174 (78)	99 (56.9)	75 (43.1)	0.599
Pacientes infectados	143 (78.1)	82 (57.3)	61 (42.7)	0.791
Tipo de infección				
I. Respiratoria	36 (19.7)	25 (69.4)	11 (30.6)	0.088
I. Abdominal	22 (12)	7 (31.8)	15 (68.2)	0.012
I. Herida quirúrgica	12 (6.6)	4 (33.3)	8 (66.7)	0.089
I.T.U.	30 (16.4)	19 (63.3)	11 (36.7)	0.432
Bacteriemia	28 (15.3)	12 (42.9)	16 (57.1)	0.105
Enfermedad de base				
Patología Renal	18 (9.8)	12 (66.7)	6 (33.3)	0.375
Patología Abdominal	35 (19.1)	14 (40)	21 (60)	0.025
Patología Respiratoria	49 (26.8)	37 (75.5)	12 (24.5)	0.002
Patología Cardiovascular	23 (12.6)	15 (65.2)	8 (34.8)	0.385
Mortalidad durante el ingreso	42 (23)	20 (47.6)	22 (52.4)	0.170

Tabla 8: Características clínicas de los pacientes infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa* multirresistente pertenecientes al clon B frente a los pertenecientes al clon A.

Características	No (%) Pacientes	Pacientes con clon A No (%) n=29	Pacientes con clon B No (%) n=104	p
Edad año(±DS)	65.1 ± 15.7	62.6±13.9	67.5±15.4	0.362
Sexo Masculino	129 (70.5)	18(62.1)	74 (71.1)	0.348
Unidad de diagnóstico				
Cirugía	32 (17.5)	2(6.9)	15 (14.4)	0.284
U.C.I	24 (13.1)	6(20.7)	11 (10.6)	0.150
Medicina Interna	57 (31.1)	5(17.2)	39 (37.5)	0.041
Hematología	15 (8.2)	10(34.5)	4 (3.8)	0.000
Neumología	21 (11.5)	2(6.9)	17 (16.3)	0.245
Nefrología	9 (4.9)	2(6.9)	5 (4.8)	0.646
Factores de riesgo				
Hospitalización en los 3 meses previos	85 (46.4)	15(51.7)	48 (46.1)	0.596
Cirugía previa	61 (33.3)	8(27.6)	29 (27.9)	0.974
Trasplante	12 (6.6)	3(10.3)	4 (3.8)	0.175
Tumor hematológico	19 (10.4)	11(37.9)	8 (7.7)	0.000
Tumor sólido	34 (18.6)	2(6.9)	21 (20.2)	0.953
Diabetes Mellitus	50 (27.3)	9(31)	29 (27.9)	0.740
EPOC	56 (30.6)	6(20.7)	38 (36.5)	0.110
Cateter central	142 (77.6)	19(65.5)	83 (79.8)	0.108
Sonda urinaria	103 (56.3)	12(41.4)	60 (57.7)	0.120
Tipos de Infección				
I. Respiratoria	36 (19.7)	4(13.8)	25 (24)	0.239
I. Abdominal	22 (12)	5(17.2)	7 (6.7)	0.081
I. Herida quirúrgica	12 (6.6)	3(10.3)	4 (3.8)	0.175
I.T.U.	30 (16.4)	3(10.3)	19 (18.3)	0.404
Bacteriemia	28 (15.3)	8(27.6)	12 (11.5)	0.033
Mortalidad durante el ingreso	42(23)	13(44.8)	20 (19.2)	0.004

3.1.3 Resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *P. aeruginosa*

pertenecientes al clon B.-

El perfil de resistencia de los aislamientos de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon B fue del tipo MDR: TAZ (100%), CEF (100%), IMP (100%), MER (100%), CIP (100%), GEN (100%), y TOB (100%), AMK (25%) y ATM (13.5%). El porcentaje de aislamientos resistentes a PIP/TZ de acuerdo a los puntos de corte recomendados por el CLSI y EUCAST fueron 20.2% y 97.1%, respectivamente. Todos fueron sensibles a COL.

Tabla 9: Número de aislamientos de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon B resistentes a los diferentes antibióticos ensayados.-

ANTIMICROBIANO (CMI, µg/ml CLSI)	No. (%) aislamientos resistentes	
	Total aislamientos N=183	Clon B aislamientos N=104
Piperacilina/Tazobactam($\geq 128/4$)	92 (50.3)/ 180(98.4)	21(20.2)/ 101(97.1) ^a
Ceftazidima (≥ 16)	183 (100)	104 (100)
Cefepime (≥ 16)	183 (100)	104 (100)
Imipenem (≥ 8)	183 (100)	104 (100)
Meropenem (≥ 8)	183 (100)	104 (100)
Aztreonam (≥ 16)	75 (41)/179(97.8)	14 (13.5)/100(95.2) ^b
Gentamicina (≥ 8)	178 (97.3)	104 (100)
Tobramicina (≥ 8)	177 (96.7)	104 (100)
Amicacina (≥ 32)	77(42.1)	26 (25)
Ciprofloxacino (≥ 2)	172 (94)	104 (100)
Colistina (≥ 4)	183 (100)	104 (100)

^a Número (%) de aislamientos resistentes a piperacilina/tazobactam según se apliquen los puntos de corte recomendados por el CLSI, 2009 (21 (20.2)) o los puntos de corte recomendados por EUCAST (101 (97.1)). ^b Número (%) de aislamientos resistentes a aztreonam según se apliquen los puntos de corte recomendados por el CLSI, 2009 (14 (13.5)) o los puntos de corte recomendados por EUCAST (100 (95.2)).

3.1.4. Detección y tipado de Metallo- β -Lactamasas en aislamientos de *P.*

***aeruginosa* multirresistente.-**

Todos los aislamientos del clon B fueron positivos para la producción de MBL a través del método fenotípico. El análisis por PCR y secuenciación confirmó la presencia de la MBL tipo VIM-2 en 103 aislamientos y IMP-22 en un único aislado. VIM-2 también fue detectada en los aislamientos del clon C, en 4 clones únicos de *P. aeruginosa* y en 5 de las 6 *P. putida*. En un aislamiento de *P. putida*, fueron detectadas tanto VIM-2 como VIM-1. La MBL tipo VIM-1 también fue detectada en un clon de *P. aeruginosa*.

Tabla 10.- Características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de *P. aeruginosa* y *P. putida* multirresistente aislados en el periodo de 2007-2010.-

Tipos Clonales ^a	No aislamientos por año ^b				Carbapenemasas ^c (No. aislamientos)	ST ^d	No (%) aislamientos resistentes ^e										
	2007	2008	2009	2010			PIP/TZ	CAZ	CEF	IM	MP	ATM	GM	TB	AK	CI	CO
Aislamientos totales de <i>Pseudomonas</i> spp	13	32	38	100	VIM-1, VIM-2, IMP-22, GES1-5		92 (50.3)/180(98.4)	183 (100)	183 (100)	183 (100)	183 (100)	75(41)/179(97.8)	178 (97.3)	177 (96.7)	77 (42.1)	172 (94)	0 (0)
<i>P. aeruginosa</i> (tipos clonales)																	
B(104)	0	5	23	76	VIM-2 (103), IMP-22 (1)	175	21(20.2)/101(97.1)*	104 (100)	104 (100)	104 (100)	104 (100)	14 (13.5)	104 (100)	104 (100)	26 (25)	104 (100)	0 (0)
A (29)	8	16	4	1	GES 1/5 (29)	235	29(100)	29 (100)	29 (100)	29 (100)	29 (100)	25 (86.2)	29 (100)	26 (89.6)	25 (86.2)	28 (96.5)	0 (0)
C (2)	0	0	1	1	VIM-2 (2)	450	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)
D (2)	0	0	0	2	No Carbapenemasas (2)	ND	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)
Clones Únicos(40)	4	10	8	18	No Carbapenemasas (35)		31(88.6)/35(100)*	35 (100)	35 (100)	35 (100)	35 (100)	26 (74.3)	30 (85.7)	32 (65.7)	17 (48.3)	25 (71.4)	0 (0)
		-			PA_5 VIM-2	111											
		-			PA_10 VIM-2	244											
			-		PA_12 VIM-1	155	4(80)/5(100)*	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	4 (80)	5 (100)	5 (100)	3 (60)	5 (100)	0 (0)
			-		PA_13 VIM-2	244											
			-		PA_28 VIM-2	253											

Tabla 10.- Características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de *P. aeruginosa* y *P. putida* multirresistente aislados en el periodo de 2007-2010 (Continuación).-

Tipos Clonales ^a	No aislamientos por año ^b				Carbapenemas ^c (No. aislamientos)	ST ^d	No (%) aislamientos resistentes ^e										
	2007	2008	2009	2010			PIP/TZ	CAZ	CEF	IM	MP	ATM	GM	TB	AK	CI	CO
Aislamientos totales de <i>Pseudomonas</i> spp	13	32	38	100	VIM-1, VIM-2, IMP-22, GES1-5		92 (50.3)/ 180(98.4)	183 (100)	183 (100)	183 (100)	183 (100)	75(41) 179(97.8)	178 (97.3)	177 (96.7)	77 (42.1)	172 (94)	0 (0)
<i>P. putida</i> (tipos clonales)																	
Clones Únicos(6)	1	1	2	2													
	-	-	-	-	PP_1 VIM-2	ND											
					PP_11 VIM-2	ND											
					PP_14 VIM-2	ND	3(50)/ 6(100)*	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	4 (66.6)	6 (100)	6 (100)	2 (33.3)	6 (100)	0 (0)
					PP_19 VIM-2	ND											
					PP_25 VIM-1/VIM-2	ND											
					PP_27 VIM-2	ND											

^a Aislamientos de *Pseudomonas* spp. multirresistentes durante los años 2007-2010 atendiendo a su pulstipo obtenido por PFGE.

^b Número de aislamientos de *Pseudomonas* spp. multirresistentes detectadas por año de estudio (2007, 2008, 2009 y 2010).

^c Número de aislamientos de *Pseudomonas* spp. multirresistentes durante el estudio atendiendo al tipo de carbapenems producida.

^d ST correspondiente a cada clon de *P. aeruginosa* multirresistente productor de carbapenemasa (GES1/GES5 o MBL) a lo largo del estudio

^e Número (%) de aislamientos de *Pseudomonas* spp. resistentes a cada uno de los antimicrobianos testados en el estudio durante los años 2007-2010

* CMI obtenida cuando eran aplicados los puntos de corte recomendados por EUCAST

3.2 ESTUDIO DE LOS ENTORNOS GENÉTICOS DE MBL EN CEPAS DE *P. aeruginosa* Y *P. putida* MULTIRRESISTENTES DURANTE EL PERIODO 2007-2010.-

Durante los cuatro años de estudio un total de 117 (111 cepas de *P. aeruginosa* y 6 *P. putidas*). fueron productoras de MBL (VIM-1, VIM-2 e IMP-22). Para llevar a cabo el estudio de los entornos genéticos de estas cepas portadoras de MBL se seleccionaron un total de 16 cepas:

- 4 cepas representativas del clon B. Dada la extraordinaria capacidad de diseminación de este clon, se escogieron 4 cepas pertenecientes a este clon, con el fin de encontrar potenciales diferencias en sus determinantes de resistencia: PA_4, PA_21, PA_23, PA_26.
- 1 cepa perteneciente al clon C: PA_9.
- 11 cepas con patrones de PFGE únicos: 6 *P. putida* y 5 *P. aeruginosa*.

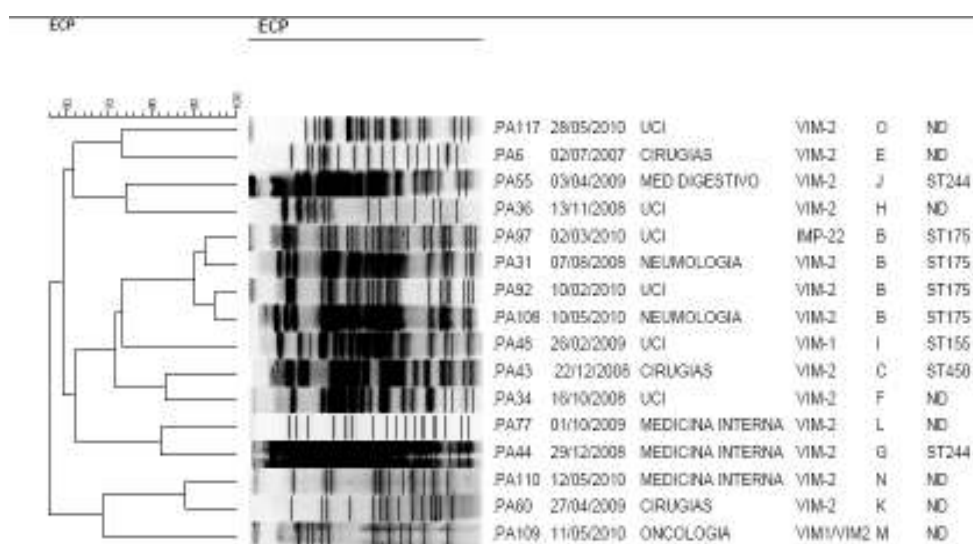


Figura 21: Dendrograma de las cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes seleccionadas para el estudio del entorno de genéticos de las MBL

3.2.1 Descripción general: Características clínicas, análisis genotípico y perfil de resistencia de las cepas de *Pseudomonas spp.* portadoras de MBL.-

Las características clínicas, tales como el servicio diagnóstico, el tipo de muestra o el tipo de infección de los pacientes que fueron infectados y/o colonizados por cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes portadoras de MBL se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11.- Características clínicas de cepas de *Pseudomonas spp.* portadoras de MBL durante el periodo 2007-2010.-

CEPA	ESPECIE	FECHA AISLAMIENTO	PFGE	SERVICIO DIAGNOSTICO	TIPO DE ADQUISICION	TIPO DE MUESTRA	TIPO DE INFECCION
PA_1	<i>P. putida</i>	02/07/2007	E	CIRUGIA DIGESTIVO	NOSOCOMIAL	ORINA	ITU
PA_4	<i>P. aeruginosa</i>	07/08/2008	B	NEUMOLOGIA	NOSOCOMIAL	ESPUTO	COLONIZACION
PA_5	<i>P. aeruginosa</i>	16/10/2008	F	UCI	NOSOCOMIAL	ORINA	ITU
PA_9	<i>P. aeruginosa</i>	22/01/2009	C	CIRUGIA DIGESTIVO	NOSOCOMIAL	BILIS	INFECCION ABDOMINAL
PA_10	<i>P. aeruginosa</i>	29/12/2008	G	MEDICINA INTERNA	NOSOCOMIAL	ESPUTO	INFECCION RESPIRATORIA
PP_11	<i>P. putida</i>	13/11/2008	H	UCP CARDIO	NOSOCOMIAL	EX. INGUINAL	COLONIZACION
PA_12	<i>P. aeruginosa</i>	26/02/2009	I	UCP CARDIO	NOSOCOMIAL	SANGRE	BACTERIEMIA
PA_13	<i>P. aeruginosa</i>	03/04/2009	J	MEDICINA AP. DIGESTIVO	NOSOCOMIAL	ORINA	ITU
PP_14	<i>P. putida</i>	27/04/2009	K	CIRUGIA GENERAL	NOSOCOMIAL	ORINA	ITU
PP_19	<i>P. putida</i>	01/10/2009	L	MEDICINA INTERNA	NOSOCOMIAL	SANGRE	BACTERIEMIA
PA_21	<i>P. aeruginosa</i>	10/02/2010	B	UCI	NOSOCOMIAL	SANGRE	BACTERIEMIA
PA_23	<i>P. aeruginosa</i>	02/03/2010	B	UCI	NOSOCOMIAL	BILIS	INFECCION ABDOMINAL
PP_25	<i>P. putida</i>	11/05/2010	M	ONCOLOGIA	NOSOCOMIAL	ORINA	ITU
PA_26	<i>P. aeruginosa</i>	10/05/2010	M	NEUMOLOGIA	NOSOCOMIAL	ESPUTO	INFECCION RESPIRATORIA
PP_27	<i>P. putida</i>	12/05/2010	B	MEDICINA INTERNA	NOSOCOMIAL	ORINA	COLONIZACION
PP_28	<i>P. aeruginosa</i>	28/05/2010	N	UCI	NOSOCOMIAL	CATÉTER	INFECCION ABDOMINAL

Para la caracterización genotípica de las cepas seleccionadas se realizó MLST a todas las cepas seleccionadas, obteniéndose además del ST175 correspondiente al clon B ya caracterizado, otros STs como ST111, ST155, ST250 o ST450. Los perfiles alélicos correspondientes a cada ST se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 12.- Perfiles alélicos obtenidos por MLST de las cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes portadoras de MBL durante el periodo de 2007 a 2010.

MLST								
Cepa	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	ST
PP_1	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_4	28	22	5	3	3	14	19	175
PA_5	17	5	5	4	4	4	3	111
PA_9	11	5	11	13	3	4	1	450
PA_10	17	5	12	3	14	4	7	244
PP_11	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_12	28	5	36	3	3	13	7	155
PA_13	17	5	12	3	14	4	7	244
PP_14	-	-	-	-	-	-	-	-
PP_19	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_21	28	22	5	3	3	14	19	175
PA_23	28	22	5	3	3	14	19	175
PP_25	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_26	28	22	5	3	3	14	19	175
PP_27	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_28	4	4	16	12	1	6	3	253

El patrón de resistencia de las cepas seleccionadas para llevar a cabo el estudio del entorno genético de las MBL mostró, como ya se ha reseñado anteriormente, resistencia a todos los β -lactámicos incluidos carbapenems, gentamicina, tobramicina y ciprofloxacino. La sensibilidad a piperacilina-tazobactam, amicacina y aztreonam fue más variable, presentando algunas un perfil XDR. Todas las cepas fueron sensibles a colistina. Las CMIs obtenidas se muestran en la tabla 13.

Tabla 13.- CMIs de las cepas de *Pseudomonas spp.* multirresistentes portadoras de MBL durante los años 2007 a 2010.

CEPA	P/T	TAZ	CEF	IP	MP	GM	TO	AK	CI	ATM	CO
PA_1	>256	96	64	>32	>32	>256	>256	16	>32	>32	<1
PA_4	>256	32	24	>32	8	>256	24	4	>32	16	<1
PA_5	>256	16	96	>32	>32	>256	>256	>256	>32	>32	<1
PA_9	>256	>256	24	>32	8	6	6	24	>32	>32	<1
PA_10	>256	>256	>256	>32	>32	>256	>256	24	>32	>32	<1
PP_11	>256	>256	>256	>32	>32	>256	>256	>256	>32	>32	<1
PA_12	>256	>256	>256	>32	>32	>256	32	64	>32	<8	<1
PA_13	64	>256	>256	>32	>32	>256	48	8	>32	>32	<1
PP_14	32	16	8	>32	>32	96	16	8	>32	<8	<1
PP_19	48	16	8	>32	>32	6	6	4	>32	<8	<1
PA_21	64	64	48	>32	>32	>256	>256	6	>32	16	<1
PA_23	8	>256	>256	>32	>32	>256	>256	6	>32	16	<1
PP_25	>256	>256	>256	>32	>32	32	6	3	>32	>32	<1
PA_26	48	>256	32	>32	>32	>256	24	4	>32	16	<1
PP_27	64	32	16	>32	>32	>256	>256	24	>32	>32	<1
PP_28	48	8	8	>32	>32	6	6	3	>32	16	<1

3.2.2. Estudio de los entornos genéticos de las cepas portadoras de MBL.-

Para investigar el entorno genético de las MBL ya caracterizadas se llevó a cabo una batería de PCRs y posterior secuenciación que cubría, por una parte la zona *up-stream* de la MBL en cuestión, y por otro lado, la zona *down-stream* de la misma.

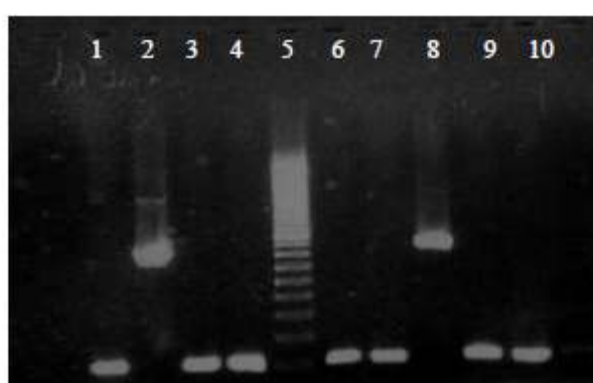


Figura 22: PCR *up-stream* de VIM-2.

Los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se corresponde con PA-1, PA_11, PA_10, PA_13, marcador 1kb plus ADN Alder, PA_14, PA_19, PA_25, PA_21 y PA_28, respectivamente.

En la figura 22 se observa una banda de aproximadamente 100pb correspondientes a las cepas PA_1, PA_10, PA_13, PA_14, PA_19, PA_21 y PA_28. Esto sugiere que no existe ningún gen *cassette* entre la integrasa y VIM-2. Para las cepas PA_11 y PA_25 se observa una banda de aproximadamente 1000pb lo que sugiere la inserción de uno o varios genes *cassettes* entre la integrasa y VIM-2.

En la siguiente figura (figura 23) se observa que solo una cepa (PA_28) presenta una banda de aproximadamente 100pb que sugiere la no presencia de gen *cassette* alguno entre VIM-2 y *qacE*. El resto de cepas muestran bandas de tamaños que van entre los 1000 y los 2000 pb aproximadamente, lo que se corresponde con una posible incorporación de uno o varios genes *cassettes* entre VIM-2 y *qacE*.

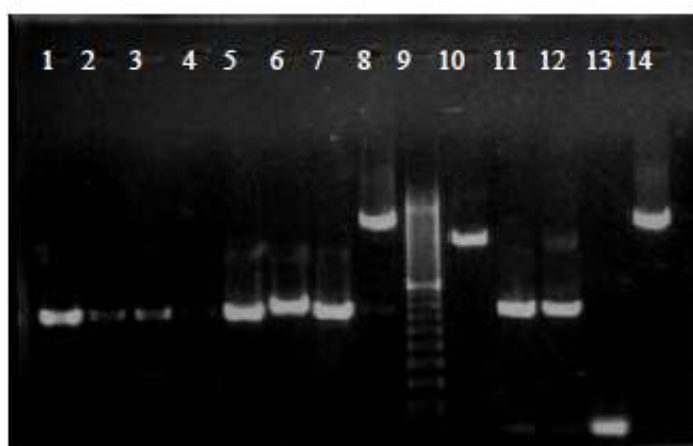


Figura 23: PCR *down-stream* de VIM-2.

Los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se corresponde con PA-1, PA_4, PA_5, PA_9, PA-10, PA_11, PA_13, PA_14, marcador 1kb plus ADN Alder, , PA_19, , PA_21, PA_26, PA_28, PA_27, respectivamente.

Tabla 14.- Estructura de los integrones portadores de MBL en cepas de *P. aeruginosa* y *P. putida* durante los años 2007-2010

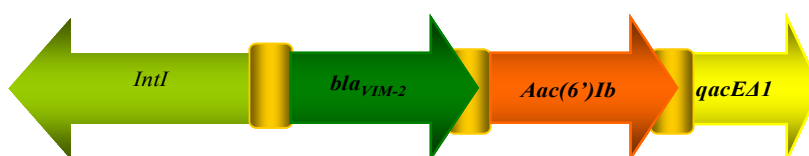
Cepa	Fecha de aislamiento dd/mm/yy	ST	MBL	N°In	Estructura Integrón
PP_1	02/07/07	E	VIM-1	41	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PA_4	07/08/08	B;175	VIM-2	41	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PA_5	16/10/08	F;111	VIM-2	41	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PA_9	22/01/09	C;450	VIM-2	41	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PA_10	29/12/08	G;244	VIM-2	41	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PP_11	13/11/08	H-	VIM-2	902	<i>intI1-aacA4-bla_{VIM-2}-aadB-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PA_12	26/02/09	I;155	VIM-1	903	<i>intI1-bla_{VIM-1}-orf1-aacA4-aadA1-smr-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA3-tniA</i>
PA_13	03/04/09	J;244	VIM-2	41	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PP_14	27/04/09	K-	VIM-2	908	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aadB-aac49-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PP_19	01/10/09	L-	VIM-2	896	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')32-aadA1-qacEΔ1-sul1-orf5-/--</i>
PA_21	10/02/10	B;175	VIM-2	41	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PA_23	02/03/10	B;175	IMP-22		<i>intI1-bla_{IMP2-2}-/--/--qacEΔ1-sul1-orf5- tniBA1-tniA</i>
PP_25	11/05/10	M-	VIM-1;	488	<i>intI1-bla_{VIM-1}-aacA4-aadA1-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
			VIM-2	927	<i>intI1-aac49-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PA_26	10/05/10	B;175	VIM-2	41	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aac(6')Ib-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PP_27	12/05/10	N-	VIM-2	908	<i>intI1-bla_{VIM-2}-aadB-aac49-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>
PA_28	28/05/10	O;253	VIM-2	56	<i>intI1-bla_{VIM-2}-qacEΔ1-sul1-orf5-tniBA1-tniA</i>

• ESTRUCTURA DE INTEGRONES PORTADORES DE MBL.-

Los experimentos de PCR y posterior secuenciación revelaron que todas las MBL se encontraron incluidas en integrones de clase 1. En 13 de las 16 cepas estudiadas se demostró la presencia de 6 genes diferentes de enzimas modificantes de aminoglucósidos. La enzima modificante de aminoglucósidos más frecuentemente encontrada (en 10 aislamientos) fue *aac(6')Ib*. Otras EMAS encontradas fueron *aacA7*, *aadA1*, *aacA4*, *aadB*, *aac6'32* y una nueva variante de EMA *aac6'49*.

A continuación se describe más detalladamente las diferentes estructuras de integrones detectadas.

• Integrón In41 e integrón de la cepa PA_23.-

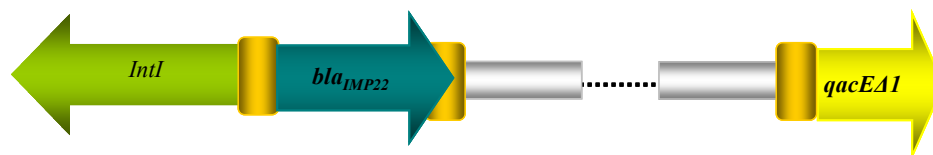


Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas

En esta estructura no presenta ningún gene *cassettes up-stream* de VIM-2. En la zona *down-stream* de VIM-2 se situaba una EMA, la *aac(6')Ib*.

El integrón In41 estuvo representado en 8 de las cepas estudiadas (PP_1, PA_5, PA_9, PA_10 y PA_13). Además la estructura predominante en aquellos aislamientos pertenecientes al clon B, a excepción de la cepa PA_23.

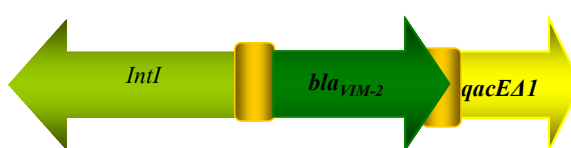
La cepa 23, productora de IMP-22, presentaba una estructura de integrón diferente a pesar de pertenecer al mismo clon.



Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas. Las zonas en gris representan aquella zona codificante desconocida que no pudo amplificarse por PCR

IMP-22 también era codificada en un integrón de clase 1. Al igual que ocurría con el integrón 41, no se detectó gen *cassette* alguno *up-stream* de IMP-22. El fragmento entre *blaIMP-22* y *qacEA1* no fue posible amplificarlo por PCR, quizás debido al gran tamaño de este fragmento de ADN, con lo que la estructura del integrón *down-stream* de IMP-22 no pudo ser completada.

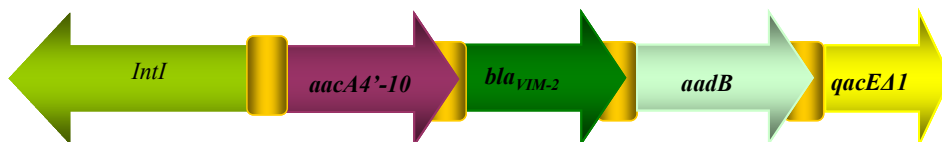
- Integrón In56.-



Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas

El integrón In56 fue detectado en una única cepa (PA_28). Este no albergaba ningún gen *cassette* flanqueando a la MBL VIM-2.

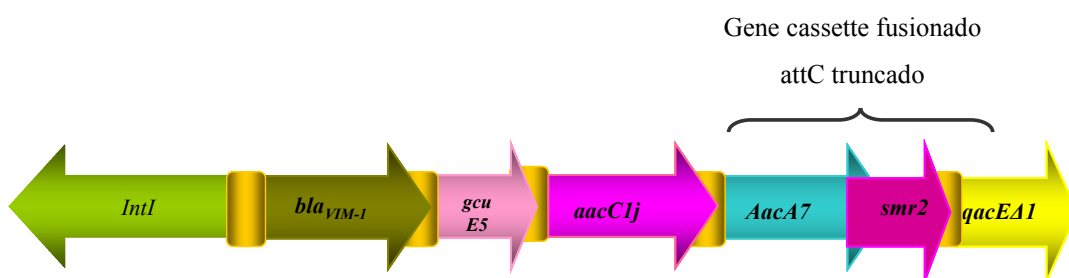
- Integrón In902.-



Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas

Este integrón se detectó en la cepa PP_11. Esta estructura no se encontraba descrita con lo que una vez completados los genes *cassettes* y sus respectivos *attC* fueron depositados en la base de datos Integrall para asignarle un número. El integrón In902, de 4200pb aproximadamente, alberga en su estructura dos EMAS que flanquean a VIM-2: una *up-stream* (*aacA4*, en su variante 10) y otra *down-stream* (*aadB*).

- Integrón In903.-



Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas

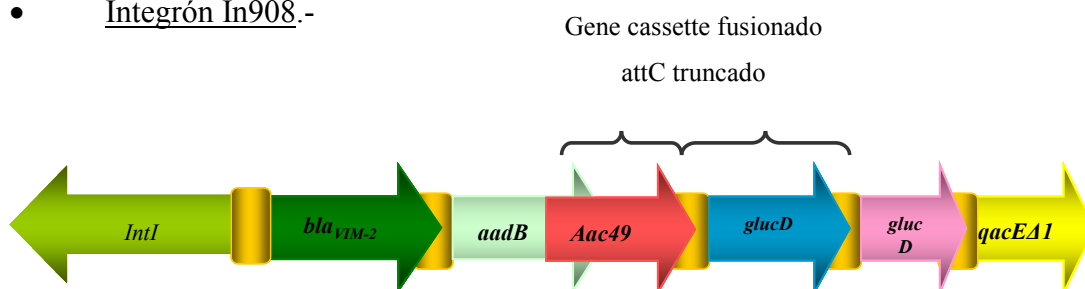
La MBL tipo VIM-1 detectada en la cepa PA_12 está incluida en un nuevo integrón: In903, es el segundo integrón caracterizado en el estudio que no

había sido descrito hasta la fecha. Este integrón que tiene un tamaño de casi 5000 pb, alberga hasta 4 determinantes de resistencia, todos ellos *down-stream* de VIM-1 y en el siguiente orden: *gcuE5*, *aacCIIj*, *aacA7* y *smr2*.

El gen *aacCIIj* es una nueva variante derivada del gen de referencia *aacCI* (Genbank U90945) que presenta las siguientes variaciones: Lys15Asn, Asp60Glu, y Glu142Asp.

Hay que destacar la presencia de una importante mutación en el *attCaacA7* que da lugar a una inactivación del *attC_{aacA7}* quedando éste truncado, lo que trae como consecuencia que tanto *aacA7* como *smr2D* quedan embebidos en un mismo gene *cassete*. Este gen *cassete* también quedará truncado ya que es incapaz de recombinarse desde su propio *attC*

- Integrón In908.-



Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas

Las cepas PP_14 y PP_27 albergaban un nuevo integrón no descrito hasta ese momento, siendo el cuarto nuevo integrón detectado en este estudio. El In908 tenía un tamaño aproximado de 5600 pb y contenía la enzima *aadB* *down-stream* de VIM-2, la cual se continuaba con una nueva variante de una EMA, la *aac(6')49* (nº GenBank KF469214), presumiblemente con actividad

acetiltransferasa, dada su homología con otra aminoglucósido 6'-N-acetiltransferasa (53-55% de homología aminoacídica).

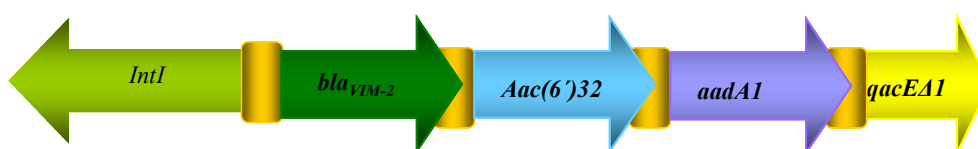
```

1   mniqilnlae ctefquesaar vlldgfrevg kiawatyeea mvevqectei pniaicavdn
61  nkvvvgwvir pmydyvwelh pmivtkkyqk kgigtkllke ieqiakekgl lglalgtdde
121 tdstslskcd fsrdniliei anikssmshp yafyekngyf ivgvipnang krkpdiumwk
181 eles
  
```

Figura 24: Secuencia de aminoácidos de la enzima *aac49* detectada en los integrones de tipo 1 de tres cepas de *P. putida* (PA_14, 27 y 25)

En el In908 la enzima *aac49* presenta una mutación que afecta a su *attC* lo que podría reducir la habilidad de recombinación del gen *cassette*. Por otro lado, el gen *cassette aacA3* queda truncado debido a un *frameshit* en el inicio del ORF (en el codón de inicio).

- Integrón In896.-

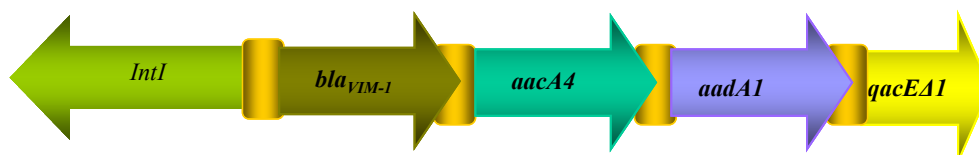


Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas

Otro nuevo integrón portador de VIM-2 en la cepa PP_19, fue el In 896 (4800 pb aproximadamente), el cual contenía dos EMA *down-stream* de la MBL; *aac6'32* y *aadA1*.

- Integrón In488 e In 927. –

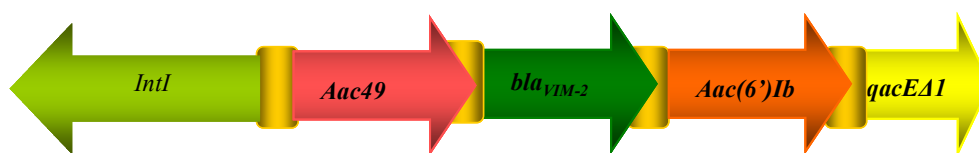
En la cepa PP_25 se demostró la presencia de dos integrones diferentes: In488 e In927.



Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas

El In488 había sido descrito previamente, y era portador de dos EMAs diferentes *down-stream* de VIM-1: *aacA4* y *aadA1*.

El otro integrón detectado se trataba de un nuevo integrón, In927, de 4500pb aproximadamente. Éste era portador de una VIM-2. *Up-stream* a esta VIM-2 se encontró la nueva EMA *aac49* que también fue detectada en las cepas PA_14 y PA_27, y *downstream* de VIM-2 la EMA *acc6'Ib*.



Los bloques en amarillo intenso se corresponden con zonas intergénicas

3.2.3 Localización de las MBL tipo VIM-2.-

Con el fin de conocer la localización, plasmídica o cromosómica, de las MBL detectadas en los integrones, y así poder tener más información acerca de su posible vía de diseminación, se llevaron a cabo varios experimentos de electroporación en la cepa de referencia PAO. Los intentos por transferir el AND plasmídico resultaron fallidos. Sin embargo, a través de la técnica de *southern blot*, la hibridación de la membrana previa digestión de ADN con *I-Ceu*

I o *SI nucleasa* e hibridación con las sondas ARNr 16S y VIM-2, nos proporcionó los siguientes resultados:

- La digestión con *SIN* y posterior hibridación fue negativo en todas las cepas.
- En el caso de la digestión e hibridación usando la enzima *I-Ceu* mostró hibridación de las sondas VIM-2 con las bandas con las que también habían hibridado las sondas ARNr 16S.

Estos resultados sugieren una localización cromosómica de las MBL tipo VIM-2 en todas las cepas estudiadas.

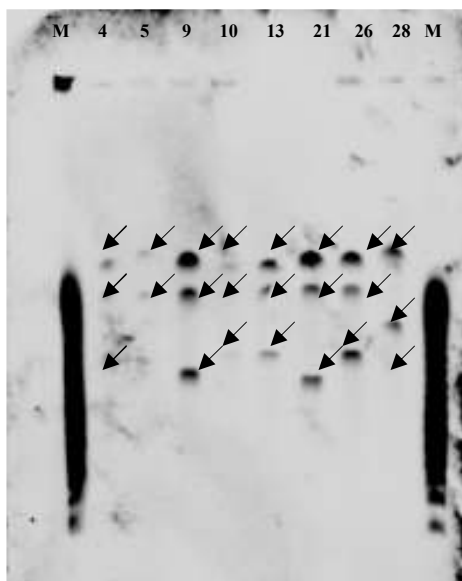


Figura 25a.

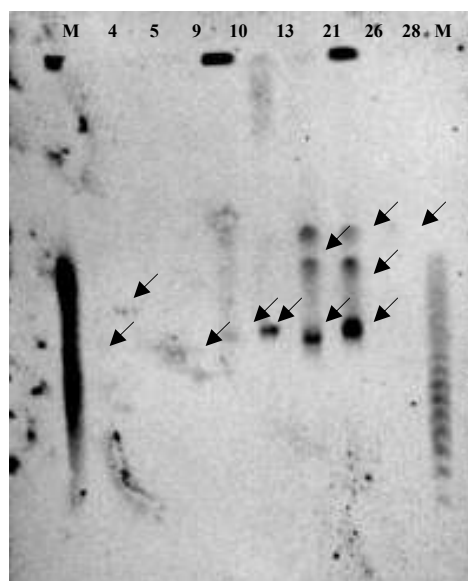


Figura 25b.

Digestión con *ICeuI* de cepas de *P. aeruginosa* productoras de VIM-2. figura a): hibridación con sonda ARNr; figura b): hibridación con sonda VIM-2

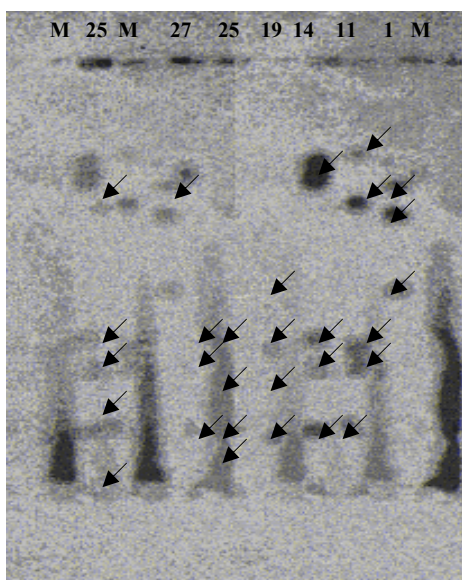


Figura 26a.

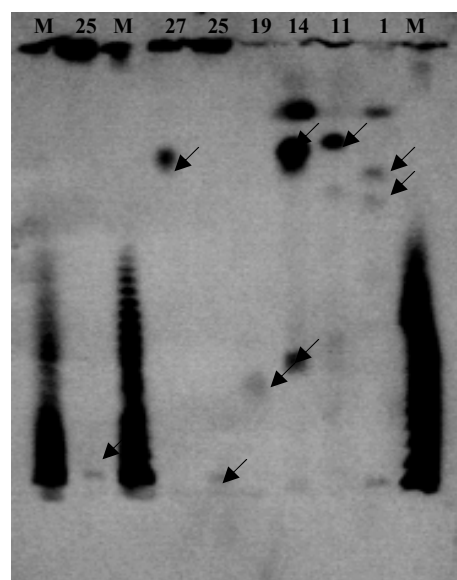


Figura 26b.

Digestión con *ICeuI* de cepas de *P. putida* productoras de VIM-2. figura a): hibridación con ARNr; figura b): hibridación con sonda VIM-2.

3.2.4 Caracterización genética del entorno del integrón.-

A fin de conocer los potenciales mecanismos de diseminación de estos integrones y las particularidades de su origen, se llevaron a cabo las reacciones de PCR para amplificación de los genes *tni* pertenecientes a la estructura del transposón Tn402-like frecuentemente localizado *downstream* del extremo 3'CS de los integrones de clase 1.

El análisis por PCR reveló dos tipos de estructuras (Figuras A y B). Ambas eran integrones de clase 1 con el extremo 3CS' completo pero con el módulo *tni* truncado (interrumpido en un sitio común que da lugar a un fragmento de *tniB* denominado previamente *tniBΔI*). Solamente una cepa, PP_19, no pudo amplificar para *tniA* ni *tniB*.

Figura 27:

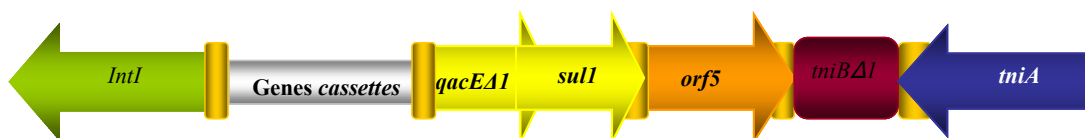


Figura 27A: Estructura de integrones con módulo 3'CS completo junto con los elementos *tniBΔI* y *tniA*

Esta fue la estructura más representada entre las cepas estudiadas, en 14 de las 16 cepas. Las secuencias nucleotídicas *tniBΔI* y *tniA* mostraron un alto grado de homología entre todas estas cepas (más del 97%).

Figura 27B:



Figura 27B: Estructura de integrones con módulo 3'CS completo junto con los elementos *tniBΔ3* y *tniA*

Esta estructura solo estuvo representada en la cepa PA_12. Esta particular estructura contiene un sitio específico de delección diferente al del *tniBΔ1*, el *tniBΔ3*.

DISCUSIÓN

1. *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTE Y EL PAPEL DE LAS CARBAPENEMASAS.-

P. aeruginosa es uno de los principales agentes causales de infecciones nosocomiales. Estas infecciones, por una parte suelen cursar clínicamente con cierta gravedad y por otra, son de difícil tratamiento debido a la limitada sensibilidad antimicrobiana de este organismo, y a su gran capacidad para adquirir nuevos determinantes de resistencia durante el tratamiento (*Carmeli y cols., 1999*).

En esta tesis se analiza la emergencia de aislamientos de *Pseudomonas spp.* multirresistente, y más concretamente de *P. aeruginosa*, durante un periodo de 4 años (Enero 2007-Diciembre 2010) en el Hospital Universitario 12 de Octubre en Madrid. En este periodo la prevalencia de estos aislamientos pasó de un 3% en 2007 a un 15% en el año 2010, con un incremento de la incidencia anual estimada desde el 0.04/1000 camas-día en 2007 al 0,34/1000 camas-día en el 2010. De acuerdo con programa MYSTIC llevado a cabo entre los años 1997 y 2000, la incidencia de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente en Europa fue del 4.7% (*Souli y cols., 2008*).

Los aislamientos recogidos a lo largo de nuestro estudio se caracterizaban por ser, en su inmensa mayoría, resistentes a todos los antibióticos ensayados a excepción de colistina y de amicacina, antibiótico al cual el 58% de los aislamientos fueron sensibles. Esto supone un gran problema ya que los carbapenems son comúnmente usados como agentes de primera línea en el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa*. Sin

embargo, la aparición de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems y/o multirresistentes siguen incrementándose en hospitales de todo el mundo, y aunque la colistina ha resurgido como una opción razonable para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram negativas MDR (*Hachmen y cols., 2007; Li y cols., 2006*), todavía no está claro que este agente pueda ser tan eficaz o seguro en comparación con los antibióticos de primera línea. Además, hay que tener en cuenta que, aunque todavía no es algo frecuente, la resistencia a colistina podría también empezar a emerger (*Johansen y cols., 2008*).

Esta situación determina un importante problema de salud, ya que deja al clínico casi sin opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones nosocomiales causadas por *P. aeruginosa*, las cuales afectan con frecuencia a pacientes inmunodeprimidos provocando una alta morbilidad y mortalidad (*Aloush y cols., 2006*). Son varios los estudios que sugieren una mayor mortalidad en pacientes infectados por cepas no sensibles (*Mesnaros y cols., 2007; Tam y cols., 2010; Suarez y cols., 2010*).

La multirresistencia en *Pseudomonas spp.* durante el periodo de estudio fue debida, en parte, a la producción de carbapenemasas. Tanto es así, que el porcentaje de *P. aeruginosa* multirresistente productor de MBL (VIM-1, VIM-2 e IMP-22) fue del 64%, y si además, consideramos las carbapenemasa duplicada adquirida (GES-1/ GES-5) que portaban los aislamientos pertenecientes al clon A, esta prevalencia alcanzaba casi el 80%.

La primera detección de una carbapenemasa adquirida por *Pseudomonas spp.* en nuestro país fue VIM-2 y se documentó durante el período de 1996-2001 en un estudio retrospectivo en el Hospital de Sant Pau de Barcelona en cepas de *P.*

aeruginosa resistentes a ceftazidima e imipenem (Prats y cols., 2002). En 2007 se describió el primer brote epidémico también por una cepa productora de VIM- 2 en un Hospital de Bellvitge (Barcelona), el cual afectó a 34 pacientes durante el periodo de 2004 a 2006 (Peña y cols., 2007). También en el año 2007 se publicó el primer estudio multicéntrico nacional de epidemiología molecular y mecanismos de resistencia a los carbapenems en el que se analizaron 236 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en noviembre de 2003 (Gutiérrez y cols., 2007). En este estudio sólo una cepa (0,4%) fue productora de carbapenemasa (VIM-2). Según los datos del año 2008 del estudio multicéntrico de bacteriemias por *P. aeruginosa* llevado a cabo dentro de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), la prevalencia de cepas productoras de carbapenemasa habría aumentado de forma significativa (10 veces) en los últimos años, llegando ya al 4% de las resistentes a imipenem, todas ellas productoras de VIM-2 (Suarez y cols., 2009). En otros países de Europa se ha documentado también la producción de MBL tipo VIM como el mecanismo de resistencia más común entre aislamientos de *P. aeruginosa* en los años 2001 y 2002 (Walsh, 2008).

La aparición de *P. aeruginosa* MDR productora de MBL anula la posibilidad del uso de carbapenems para tratar las infecciones nosocomiales causadas por *P. aeruginosa*. Nuestros resultados mostraron que los aislamientos que pertenecían al clon ST175 solo eran sensibles a ATM (86.5 %), AK (75 %) y colistina (100 %). La diferencia en los puntos de corte establecidos para PIP / TZ según eran aplicados los criterios recomendados por el CLSI o EUCAST, eran bastante notables. Cuando eran aplicados los criterios de EUCAST, sólo 2,9 % de

los aislamientos eran sensibles a PIP/TZ en comparación con el 80% de aislamientos sensibles si eran aplicados los criterios recomendados por el CLSI. Un estudio reciente concluyó que bacteriemias causadas por cepas de *P. aeruginosa* con sensibilidad reducida para PIP/TZ (32/4 µg/ml o 64/4 µg/ml) eran asociadas a un aumento de la mortalidad cuando era aplicada terapia empírica con PIP/TZ (*Tam y cols., 2008*). La mayoría de los aislamientos recogidos en nuestro estudio presentaban una sensibilidad para PIP/TZ en el rango de 32/4-64/4 µg/ml. No fue hasta el 2012 cuando el CLSI estableció nuevos puntos de corte para PIP / TZ (*CLSI, 2012*), coincidiendo así con el punto de corte establecido por EUCAST (16/4 µg / mL). La confluencia en los criterios de los ensayos de sensibilidad entre las diferentes agencias de estandarización son útiles para la optimización de las estrategias terapéuticas para tratar la infecciones graves por *P. aeruginosa* MDR.

En nuestro estudio el incremento en la resistencia de los aislamientos de *P. aeruginosa* en el hospital se debió básicamente a la a la suma de varios mecanismos:

- Brote en el servicio de hematología por un clon (clon A) de *P. aeruginosa* extremadamente resistente (XDR) que albergaba en su genoma diferentes mecanismos de resistencia, entre ellos, la producción de GES-1 y GES-5 en un mismo integrón.
- Diseminación en el hospital de un clon epidémico (clon B) de *P. aeruginosa* multirresistente productor de VIM-2.
- Emergencia policlonal de *Pseudomonas spp.* multirresistentes productoras de MBL.

2. BROTE DE *P. aeruginosa* MULTIRRESISTENTE ST235.-

Durante la primera fase de estudio de esta tesis (años 2007 y 2008) se investigaron los mecanismos subyacentes responsables de la creciente prevalencia de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* multirresistente en el Hospital Universitario 12 de Octubre. El aumento en la prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* multirresistente observada en esta primera parte de este estudio se produjo principalmente como consecuencia de la diseminación de una cepa epidémica (clon A), que parece estar asociada a la hospitalización en el departamento de hematología y, que presentó una mayor mortalidad.

La combinación de los tres factores detectados en el clon A, hicieron prioritario su seguimiento:

- (i) la resistencia extrema de este clon: los aislamientos solo eran sensibles a colistina
- (ii) la alta capacidad de propagación nosocomial: el clon A persistió al menos desde Marzo de 2007 a Enero de 2010, presentando su pico máximo en el 2º trimestre del año 2008.
- (iii) una alta mortalidad asociada: el 45% de los pacientes infectados por este clon murieron durante su hospitalización.

Este último dato podría explicarse debido a que la gravedad de la enfermedad de base puede actuar de forma sinérgica con la infección debido a microorganismos resistentes aumentando la mortalidad. Además, factores como la disminución en la efectividad antibiótica o el retraso en el inicio de la terapia pueden también contribuir a una peor evolución en pacientes infectados por

organismos multirresistentes (Peña y cols., 2012). Sin embargo, un estudio reciente sugiere que la adquisición de determinantes de resistencia o las mutaciones pueden alterar el *fitness* de la bacteria así como su virulencia, reduciéndola (Giamarello-Bourbouli y cols., 2004).

La alta resistencia del clon A nos llevó a realizar una investigación genética profunda de los mecanismos de resistencia involucrados, tanto cromosómicos como transferibles. En efecto, varios de los mecanismos de resistencia mutacionales clásicos, incluyendo mutaciones en los genes *GyrA* y *ParC* (confiriendo resistencia a fluoroquinolonas), o la inactivación de *oprD* (confiriendo resistencia a carbapenems), se detectaron en el clon A. Sin embargo, los mecanismos de resistencia transferibles detectadas eran mucho más destacables: un integrón de codificación cromosómica que contenía hasta 7 determinantes de resistencia, incluyendo 3 genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*aacA4*, *aadA1* y *aac (6')-33*) y 3 genes codificadores de β -lactamasas (*blaOXA-2*, *blaGES-1*, y *blaGES-5*). Aunque GES-1 hidroliza penicilinas, oximinocefalosporinas y aztreonam, GES-5, (que difiere solo en un aminoácido, Gly170Ser), extiende su actividad hacia carbapenems (Lee y cols., 2005; Vourli y cols., 2004). Un análisis detallado de las secuencias de nucleótidos sugiere que *blaGES-5* se originó a través de una duplicación en tándem de *blaGES-1*. Este resultado es, a nuestro entender, el primer ejemplo natural de la relevancia de duplicaciones de genes en tándem en la evolución de la resistencia a los antibióticos (Song y cols., 2009). De hecho, esta es la primera descripción de integrones que codifican para dos enzimas GES, así como la primera descripción de este tipo de ESBL en España. Variantes GES se

han identificado en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* con una difusión geográfica aún limitada (Naas y cols., 2008). Sin duda, el aspecto más preocupante de algunas BLEE GES, como GES-2, GES-4, GES-5 y GES-8 es su actividad carbapenemasa (Naas y cols., 2008; Poirel y cols., 2009).

El análisis por MLST catalogó al clon A como ST235. Curiosamente este clon, que pertenece al complejo BG11, presenta una muy amplia difusión ya que ha sido detectado en Turquía, Grecia, Italia, Hungría, Polonia, Suecia o Rusia (Empel y cols., 2007).

Sin duda, una profunda comprensión de los mecanismos genéticos implicados y su difusión horizontal y longitudinal, tanto a escala global como local, es fundamental para la implementación de estrategias para la prevención, detección y control de las infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* multirresistente sensible solo a colistina.

En nuestro caso el estudio epidemiológico llevado a cabo junto con la aplicación de todas estas medidas han logrado abordar el problema con esta cepa con éxito, y a día de hoy podemos decir que el brote ha quedado totalmente resuelto.

3. DISEMINACIÓN DE UN CLON DE *P. aeruginosa* PRODUCTOR DE VIM-2 DE GRAN EXPANSIÓN.-

La segunda fase de esta tesis se centra en el estudio de aquellos aislamientos de *P. aeruginosa* (también los aislamientos detectados de *P. putida*) portadores de MBL que se detectaron a lo largo de los 4 años de estudio, incluyendo aquellos aislamientos que habían sido detectados en el periodo de la primera fase del estudio. Además, intentamos dar respuesta a la gran expansión de un clon multirresistente de *P. aeruginosa* ocurrida durante los años 2009-2010, y que surge por vez primera en el año 2008. Los brotes de *P. aeruginosa* productoras de MBL se han documentado en hospitales de varios países, siendo VIM la variante más dominante en España y en todo el mundo (Peña y cols., 2007; Pournaras y cols., 2003; Gibb y cols., 2002; Crespo y cols., 2004; Deplano y cols., 2007; Lolans y cols., 2005; Castanheira y cols., 2009). En esta segunda fase de la tesis, presentamos una de las mayores diseminaciones de *P. aeruginosa* multirresistente productora de VIM- 2 que se han documentado en un hospital. Este clon que pertenecía al ST175 se detectó por primera vez en febrero de 2008, y llegó a afectar a 104 pacientes durante el periodo de estudio para llegar a convertirse en una cepa endémica en nuestra institución. El clon de *P. aeruginosa* ST175 se detectó en varios servicios de diagnóstico del hospital, aunque se encontró con más frecuencia en pacientes ingresados en medicina interna y neumología. La propagación del clon ST175 podría considerarse una pandemia emergente. Este clon fue identificado por primera vez en 2005 en el Reino Unido y Canadá (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). A partir de ese momento, se han

documentado casos en Hungría, Rusia, República Checa, Polonia, Francia, España, Estados Unidos y China (*Riera y cols., 2011; Garcia-Castillo y cols., 2011; Cholley y cols., 2011; Nemec y cols., 2010*).

En esta tesis se presenta también por primera vez en España, un linaje de *P. aeruginosa* multirresistente ST175 productor de IMP-22. Las MBL de tipo IMP entre los aislamientos clínicos *Pseudomonas spp.* han sido detectados más frecuentemente en Asia, aunque que se han documentado en algunos países de Europa como Italia y Austria (*Pagani y cols., 2005; Duljasz y cols., 2009*). Con este hallazgo añadimos esta variante de IMP a la larga lista de β -lactamasas adquiridas asociadas con este clon epidémico.

Aunque se desconoce el origen de la cepa *P. aeruginosa* multirresistente ST175 productor de VIM- 2, este clon fue detectado en nuestro hospital siete meses después de la primera detección de MBL tipo VIM-2, concretamente en una cepa de *P. putida*. Podríamos decir que tanto *P. putida* como otras especies de *Pseudomonas* podrían desempeñar un papel importante como reservorios potenciales de determinantes de multirresistencia mediante la mejora de su transferencia a los clones de *P. aeruginosa* (*Queenan y cols., 2007*).

El clon ST175 fue capaz de persistir en nuestro hospital durante más de 34 meses y se ha diseminado ampliamente, a pesar de las medidas de control que se llevadas a cabo como el aislamiento estricto de los pacientes, la vigilancia activa de los pacientes en el momento de entrada en unidades de cuidados intensivos, y la investigación de posibles fuentes de colonización. Desconocemos también, la razón o factores que pudieron dar lugar a la aparición, incremento, diseminación y persistencia de este clon en nuestro hospital. Es precisamente esta diseminación

por prácticamente todas las áreas del hospital lo que ha dificultado la efectividad de las medidas de control para la contención y erradicación de esta cepa. La diseminación del clon B en los pacientes ingresados en las diferentes plantas del hospital y la alta presión selectiva ejercida por los antimicrobianos podría haber facilitado su persistencia. Recientemente, nos enfrentamos a una situación similar en nuestro hospital con un gran brote de *Acinetobacter baumannii* multirresistente que persistió durante más de 30 meses, pero que finalmente fue controlado (Acosta y cols., 2011). El diseño e implementación de estrategias de control de infecciones en estas situaciones hiperendémicas constituyen por tanto, un verdadero reto para el control de estas infecciones.

Es necesario un profundo conocimiento de los mecanismos genéticos implicados en la diseminación horizontal y vertical, sobre todo en aquellos aislamientos portadores de integrones con MBL, dada su capacidad adicional para la propagación de la resistencia a múltiples fármacos tanto intra- como interespecie. Aunque no era un objetivo en esta tesis, se llevó a cabo la secuenciación del genoma de una de las cepas pertenecientes al clon ST175 (PA21_ST175) mediante *whole-genome shotgun sequencing* (AOIH00000000). Un primer análisis reveló la ausencia de plásmidos en el genoma de esta cepa, así como, la presencia de hasta 152 genes y varias mutaciones cromosómicas relacionados con resistencia a antibióticos y antisépticos incluyendo la MBL VIM-2, previamente documentadas en otros linajes de ST175 (Viedma y cols., 2013; Cabot y cols., 2012).

En conclusión, presentamos una gran expansión clonal de *P. aeruginosa* ST175 multirresistente productora de VIM- 2 que fue responsable de 76% de las

infecciones y colonizaciones por *P. aeruginosa* multirresistente en el año 2010 en nuestro hospital, y de más del 50 % de las infecciones o colonizaciones durante todo el período de estudio. Las razones subyacentes para el éxito generalizado de este clon todavía tienen que ser aclaradas, incluyendo la potencial mayor capacidad para adquirir determinantes resistentes a múltiples fármacos antimicrobianos que facilitan la persistencia en condiciones de presión selectiva de drogas encontradas en el ambiente hospitalario (*Libisch y cols., 2009; Maiden y cols., 1998*). Descifrar la epidemiología y los aspectos moleculares que impulsan la aparición y propagación de estas cepas es crucial para la aplicación de medidas eficaces de control de la difusión de las mismas.

4. EMERGENCIA POLICLONAL DE CEPAS DE *Pseudomonas spp.* MULTIRRESISTENTES PRODUCTORAS DE MBL.-

Durante los cuatro años de estudio, además de los clones A y B, se detectó la emergencia de varias cepas multirresistentes de *Pseudomonas spp.* (7 cepas de *P. aeruginosa* y 6 cepas *P. putida*) pertenecientes 12 patrones electroforéticos diferentes. Estas cepas eran además productoras de MBL de los tipos VIM-2 y VIM-1. Esta emergencia policlonal de cepas productoras de MBL contrasta con varios estudios realizados previamente donde describen una propagación clonal de aislamientos productores de VIM-2 (*Peña y cols., 2007; Juan y cols., 2008*). La naturaleza policlonal de la resistencia basada en la producción de MBL podría tener importantes implicaciones epidemiológicas debido al aislamiento esporádico de este tipo de cepas que eventualmente pueden diseminarse en el ambiente

hospitalario o actuar como reservorio para la transferencia horizontal de determinantes de resistencia.

5. PAPEL DE LOS INTEGRONES EN LA ADQUISICIÓN DE DETERMINANTES DE RESISTENCIA.-

De las 16 cepas en las que se llevó a cabo el estudio del entorno genético (4 cepas del clon B, 6 *P. aeruginosa* y 5 *P. putida*) 14 eran productoras de VIM - 2 (una de ellas además de VIM-2, era productora también de VIM - 1), las otras dos cepas restantes eran productoras de VIM-1 e IMP-22, respectivamente. Estas MBL se encontraban vinculadas a clones de diseminación global de alto riesgo (Juan y cols., 2010; Woodford y cols., 2011; Elias et al CMI 2010, Nemeč y cols., 2010, Riera y cols., 2011). Como ya se ha referido en apartados anteriores, el análisis por MLST análisis indicó una amplia difusión de ST175 (clon B). Pero además, se detectaron los clones internacionales ST111 y ST244 (Vatcheva - Dobrevska y col., 2013; Edalucci y cols., 2008; Gilarranz y cols., 2013; Fournier y cols., 2012). Al analizar la composición de los integrones de las cepas portadoras de MBL, se observó una gran variabilidad, mostrando diferentes combinaciones de MBL y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, un total de 6 EMAs diferentes. La EMA más frecuentemente encontrada fue *aac6'1b*, detectada en 10 aislamientos. Por otra parte, dos cepas de *P. putida* albergaban una nueva variante de una enzima modificadora de aminoglucósidos, designada *aac49*, presumiblemente con la actividad de acetil-transferasa, dada su homología con otros aminoglucósidos 6'-N-acetyltransferasas.

De entre los integrones analizados, cinco fueron detectados por primera vez: In896, In902, In903, In908 e In927 (Viedma y cols., 2013). En cuanto a los otros integrones detectados [In41 (AM180753); In56 (AF191564); In488 (GQ422826)], el integrón In 41 fue el más prevalente apareciendo en 8 cepas, entre las que se encontraba las cepas representativas del clon ST175. Este integrón fue detectado por primera vez en Italia en cepas de *P. aeruginosa*. A diferencia de nuestro integrón, éste carecía de la región conservada 3'CS típica (Lagatolla y col., 2006).

La mayoría de los estudios relacionados con integrones portadores de MBL se han centrado en la composición de *cassettes*, en esta tesis se intenta ahondar más en el estudio del entorno genético donde se insertan los integrones, con el fin de entender los posibles mecanismos de difusión y las particularidades del origen de los mismos. La ubicación de integrones portadores de MBL dentro de las estructuras de transposones derivados de Tn402 es un patrón ampliamente documentado en integrones de clase 1, tal y como describen los resultados obtenidos en este trabajo. En nuestro país (Scotta y col., 2011; Marchiaro y cols., 2010) se han documentado integrones que carecen de toda la estructura del extremo 3'CS (*qacE*, *sull* y *orf5*), y que muestran un módulo completo de *tni* (TniC, TniQ, TniB y TniA). En nuestro estudio no se detectó este patrón en ninguna de las cepas estudiadas. Estos integrones que tienen una estructura del módulo *tni* completa se han propuesto para ser elementos de transposición aún funcionales, a diferencia de los integrones con la estructura del extremo 3'CS completo pero con el módulo *tni* truncado, que son por lo tanto, derivados de transposones con una transposición defectuosa que deberían ser incorporados en

un transposón grande adicional para ser movilizados (*Marchiaroy cols., 2010; Tato y cols., 2010; Martínez y cols., 2012*). Precisamente estas variantes truncadas fueron las más habituales en este trabajo (14 de 16 cepas), con un alto grado de homología en la *tniBA* y secuencias de nucleótidos *tniA* (más de 97 % de identidad entre todas las cepas). Esto sugiere un origen ancestral común para la mayoría de los elementos genéticos que albergan las MBL en este trabajo, diferente al de los integrones de clase 1 con el citado módulo de *tni* completo que se han detectado en EE.UU., Rusia e India (*Toleman y cols., 2007; Castanheira y cols., 2009*). Otra estructura particular, previamente descrita (*Tato y cols., 2011*), fue la que contenía *tniBA3*, la cual presenta una delección específica diferente a la de *tniB*. Esta estructura solo se encontró en la cepa PA_12, lo que sugiere también un origen muy particular y diferencial para este integrón. En una de las cepas no se detectó *tniA* ni *tniB*, lo que podría ser debido a la presencia de un elemento genético alternativo aún no escrito que albergue el integrón y que necesitaría ser explorado en futuros trabajos, ya que en todas las cepas estudiadas fue descartada la localización plasmídica de las MBL. Esta conclusión se apoya en varios estudios previos que han demostrado también que la mayoría de los genes de MBL se encuentra cromosómicamente en *P. aeruginosa*, probablemente debido a una mala replicación de los plásmidos dentro de esta especie, y la necesidad de una integración cromosómica de los genes (*Samuelsen y cols., 2010; Ruiz-Martínez y cols., 2011*). Sin embargo, también se observó localización cromosómica en todas las cepas de *P. putida*. Este resultado contrasta con los de otro hospital en España donde en la gran mayoría de las cepas de *P. putida*

productoras de MBL, ésta era encontrada dentro del plásmido (Juan y cols., 2010).

De esta manera, a pesar del dominio uniforme de la producción VIM-2 en integrones de clase 1, los resultados indican la presencia de características específicas que definen la epidemiología de varios niveles en *Pseudomonas spp.* productoras de MBL en nuestro hospital en términos de diversidad clonal, predominio de determinados clones de alto riesgo, composición y diversidad de integrones y su relación con las estructuras Tn402-like. Por lo tanto, a pesar de que hay claras tendencias mundiales que impulsan la epidemiología de *Pseudomonas spp.* productora de MBL, la presencia de las especificidades locales también deben tenerse en cuenta para entender esta creciente amenaza y para la aplicación de estrategias de control óptimo.

6. DISEMINACIÓN DE CLONES DE ALTO RIESGO.-

El estudio de la epidemiología molecular de los aislamientos multirresistente de *P. aeruginosa* reveló la presencia de diferentes complejos clonales. Además del ST 235 asociado al clon A y el ST175 del clon B, también fueron detectados los clones ST111, ST450, ST244, ST155 y ST253. Todos ellos asociados a perfiles de multirresistencia. Por su diseminación internacional, destacan los ST235, ST175 y ST111.

Recientemente, Samuelsen y col. (Samuelsen y col, 2010) encontraron que las cepas de los complejos internacionales **CC111** (en concreto, la ST111 y ST229; VIM-2) y el **CC235** (ST235 y ST230; VIM-4) eran los clones

representativos de los aislamientos productores de MBL tipo VIM aislados en Noruega y Suecia entre 1999 y 2007. En este estudio, se incluían pacientes procedentes de países como Grecia, Chipre, Dinamarca, que dieron lugar a la diseminación de CC111 en Suecia. El resto de cepas portadoras de VIM provenían de Ganhá (dio lugar al primer aislamiento productor de MBL en Noruega, ST654) y Túnez (*Samuelsen y cols., 2009, 2010*). Los autores concluyeron que tanto la importación de clones internacionales exitosos como la expansión clonal local contribuyeron a la aparición de *P. aeruginosa* productora de MBL en Escandinavia. Estos dos CCs (ST111 y ST235) también han representado siempre a las cepas productoras de MBL tipo VIM en Hungría (*Libisch y cols., 2008b*). En nuestro estudio el clon ST235, representaba a una cepa resistente a todos los antibióticos a excepción de colistina y productora de BLEE tipo GES1/GES5. Previamente, ST235 había sido asociado a β -lactamasas tipo PER, OXA y MBL tipoVIM (*Woodford y cols., 2011*). Nuestros resultados suman, además de seis *cassettes* de resistencia diferentes, una nueva BLEE a esta lista cada vez más preocupante de cepas multirresistentes.

Diferentes estudios que se centraron en las cepas resistentes a carbapenems pertenecientes a CC235 identificaron una serie de diferentes regiones variables en integrones que representan varias combinaciones de genes de carbapenemasas codificadas con al menos otros 15 *cassettes* de genes de resistencia (*Giske y cols., 2006; Kouda y cols., 2009; Lepsanovic y cols., 2008; Libisch y cols., 2008b; Samuelsen y cols., 2010*). Sin embargo, algunos estudios (*Cholley y cols., 2011*), sugieren que no es imprescindible la adquisición horizontal de determinantes de resistencia para hacer que un clon sea exitoso. Cholley y cols. encontraron el clon

ST235 como el ST mayoritario (junto con ST111 y ST175) en hospitales de Francia sin ser portador de MBL ni de integrones. Estas cepas eran productoras de PER-1 y OXA-48.

En 2010, Nemeč y cols., llevaron a cabo en la República Checa un estudio de MLST en aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente procedentes de hospitales de diferentes regiones del país. Este estudio mostró que el 82% de los aislamientos estudiados pertenecían a tres tipos clonales diferentes: ST235, ST175 y ST132. ST175 fue el segundo grupo más prevalente y albergaba aislamientos que eran resistentes a todos los antibióticos con excepción de colistina y amicacina. Estos, eran además portadores de un integrón con un *cassete aadB-aadA13*. ST175 se ha asociado con los aislados resistentes a múltiples fármacos y la adquisición de diferentes β -lactamasas, en su mayoría situados en elementos móviles, tales como integrones (*Riera y cols., 201; Libisch y cols., 2009; Elias y cols., 2010*).

Nuestros resultados muestran como el 57% de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente recogidos pertenecían este clon tan persistente, el clon ST175. En general, los aislamientos pertenecientes a este clon en nuestra institución también resultaron resistentes a todos los antimicrobianos con excepción de colistina y amicacina, antimicrobiano que mostraba una sensibilidad más variable ente los aislamientos. Sin embargo, a diferencia del estudio llevado a cabo por Nemeč y cols., (*Nemeč y cols., 2010*), eran portadores de un integrón de clase 1 que albergaba una MBL tipo VIM-2 y una EMA (*aac6'1b*).

El hecho de que en España se hayan documentado varios casos de *P. aeruginosa* ST175 multirresistentes portadoras de VIM-2, (*García-Castillo y*

cols., 2011) se ve apoyado por el hallazgo de este clon en pacientes remitidos a nuestra institución desde otros 5 hospitales del país.

Un reciente estudio multicéntrico realizado en nuestro país (*Cabot y cols.*, 2012), reveló que los aislamientos de *P. aeruginosa* extremadamente resistente [(resistente a todos los antibióticos a excepción de 1 o 2 familias de antimicrobianos, (*Magiorakos y cols.*, 2011) pertenecían en su gran mayoría al ST175, mientras que existía una mayor diversidad genética en aquellos aislamientos multirresistentes (resistente a todos los antibióticos a excepción de 1 o 2 o 3 familias de antimicrobianos, (*Magiorakos y cols.*, 2011), y aún más, en aquellos moderadamente sensibles. Aunque en España el ST175 se ha asociado principalmente a la producción de MBL tipo VIM (*García-Castillo y cols.*, 2011; *Riera y cols.*, 2011), en este estudio, la multirresistencia no se debía a la producción de β -lactamasas, sino a la acumulación de mutaciones en su cromosoma. Esto se tradujo en una hiperproducción de AmpC, inactivación de oprD, resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas, mutaciones en bombas de expulsión y la presencia de un integrón de clase 1 que albergaba el *gen cassette aadB*.

Por otro lado y como ya se ha comentado anteriormente el clon ST175 en nuestra institución fue productor en casi su totalidad de VIM-2, a excepción de una única cepa ST175 que era productora de IMP en su variante IMP-22. A diferencia de lo que ocurre con los aislamientos de *P. aeruginosa* portadores de VIM, los aislamientos portadores de MBL tipo IMP están geográficamente más dispersos y pertenecen a diversas STs. En la base de datos del MLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) encontramos incluidos los ST 235 y 357 (IMP-1,

Japón; IMP-7, República Checa), 260 (IMP-14, Noruega), 620 y 621 (IMP- 22 y -13, respectivamente, Austria), 741, 742, 743 (IMP-1, Singapore), 744, 745 (IMP-7, Singapur) y ST 235, 593 y 654 (alelos IMP no especificadas, Brasil y Singapur) (*Duljasz y cols., 2009;. Kouda y cols., 2009; Samuelsen y cols., 2010*). Nuevamente, sumamos otra variante de IMP al gran arsenal de determinantes de resistencia albergados en el clon ST 175.

En la actualidad estamos llevando a cabo el análisis comparativo del genoma de nuestro clon ST175 con otros clones de diseminación de alto riesgo detectados durante el periodo de estudio que comprende esta tesis (clon ST111 y clon ST235), con el fin de poder elucidar el secreto del éxito de estos clones multirresistentes internacionales, y así poder dar un paso adelante, crucial para el establecimiento de medidas globales y de nuevas estrategias en el tratamiento de infecciones producidas por los mismos.

CONCLUSIONES

1. Durante los 4 años de estudio, de los 2145 pacientes que fueron infectados y/o colonizados por *Pseudomonas spp.*, 183 (177 *P. aeruginosa* y 6 *P. putida*) presentaron un perfil tipo multirresistente (MDR) o extremadamente resistente (XDR): 2.8% en 2007, 6.2% en 2008, 7.4% en 2009, y 15.3% en 2010. La incidencia anual estimada de pacientes infectados y/o colonizados por *P. aeruginosa* multirresistente se incrementó desde el 0.04/1,000 camas-día en 2007 al 0.34/1,000 camas-día en 2010.
2. El porcentaje de aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente productoras de MBL durante el estudio fue de 63.9%. Si se incluyen las carbapenemasas adquiridas tipo GES1-GES5, este porcentaje alcanzó el 79.8%.
3. El estudio de la epidemiología molecular de los aislamientos multirresistentes de *P. aeruginosa* reveló que el incremento en la prevalencia de *P. aeruginosa* multirresistente se debió fundamentalmente a la emergencia de dos clones: clon A (ST235) y clon B (ST175). Además, se detectaron los clones ST111, ST450, ST244, ST155 y ST253, Todos ellos asociados a perfiles de multirresistencia.
4. La cepa epidémica A persistió al menos desde Marzo de 2007 a Enero de 2010, presentando su máximo pico en el 2º trimestre de 2008 para llegar a desaparecer a partir del segundo trimestre del año 2010. Esta cepa fue responsable de un brote intrahospitalario en pacientes del servicio de hematología y causó una elevada mortalidad.

5. Los aislamientos clínicos pertenecientes al clon A presentaron un fenotipo de resistencia tipo extremadamente resistente (XDR), únicamente sensibles a colistina. Los mecanismos de resistencia incluían mutaciones en los genes *GyrA* y *ParC*, inactivación de la porina *oprD*, así como, la presencia de 7 determinantes de resistencia, incluyendo enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*aacA4*, *aadA1* y *aac(6')-33*) y 3 β -lactamasas (*blaOXA-2*, *blaGES-1* y *blaGES-5*), todos ellos detectados en un integrón de codificación cromosómica (*In647*).
6. El análisis genotípico del total de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistentes demostró la extraordinaria diseminación de un único clon mayoritario, denominado clon B, perteneciente al ST175 y resistente a todos los antibióticos ensayados a excepción de colistina, aztreonam y ampicilina. Este clon afectó a 104 pacientes durante el periodo de estudio para llegar a convertirse en una cepa endémica en nuestra institución.
7. La caracterización molecular de los mecanismos de resistencia adquiridos a los carbapenems en el clon B reveló la presencia de una MBL tipo VIM-2 en 103 aislamientos. Esta MBL se encontraba en un integrón de clase 1 de codificación cromosómica junto con un cassette génico que albergaba una EMA, la *aac6'Ib*.
8. La presencia de MBL tipo VIM-2 también fue detectada en otros 5 clones de *P. aeruginosa* y en 6 clones de *P. putida*.

- 9.** El análisis de la composición de los integrones de las cepas portadoras de MBL reveló una gran variabilidad, mostrando diferentes combinaciones de MBL y enzimas modificadoras de aminoglucósidos. La enzima modificadora de aminoglucósidos más frecuentemente encontrada fue aac6'Ib, detectada en 10 aislamientos. Por otra parte, dos cepas de *P. putida* albergaban una nueva variante de una enzima modificadora de aminoglucósidos designada aac49.

- 10.** El integrón In41 se detectó en los aislamientos pertenecientes al clon B, y también en aislamientos pertenecientes a otros clones. En este estudio se han detectado además cinco nuevos tipos de integrones denominados: In896, In902, In903, In908 e In927. Todos los integrones tuvieron localización cromosómica. Éstos contaban con estructuras Tn402-like con el extremo 3'CS completo pero con el módulo tni truncado.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, Chaves F, Bou G.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis.* **2011**;17(6):1064-7.
2. **Actis LA, Tolmasky ME, Crosa HS.** Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Bioscience.* **1999**; 3: d43-62.
3. **Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K.** Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;45(8):2263-8.
4. **Alekshun MN, Levy SB.** *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance.* *Cell.* **2007**;128:1037-1050.
5. **Aloush V., S. Navon-Venezia, Y. Seigman-Igra, S. Cabili, and Y. Carmeli.** Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**;50: 43-48.
6. **Alvarez, M., and M. C. Mendoza.** Molecular epidemiology of two genes encoding 3-N-aminoglycoside acetyltransferases AAC(3)I and AAC(3)II among gram-negative bacteria from a Spanish hospital. *Eur. J. Epidemiol.* **1993**;9:650-657.
7. **Amabile-Cuevas CF, Chicuresl ME.** Bacterial plasmids and gene flux. *Cell.* 1992; 70: 189-99
8. **Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **1980**;289:321-31.
9. **Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG.** A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* **1991**;276:269-270.
10. **Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharota Yankur R, Ohsuka S, Kato N, Ohta.** A novel integron-like element carrying the metallo β -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39: 1612-5.
11. **Aumeran C, Paillard C, Robin F, Kanold J, Baud O, Bonnet R, Souweine B, Traore O.** *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* outbreak associated with contaminated water outlets in an oncohaematology paediatric unit. *J Hosp Infect.* **2007**;65:47-53.
12. **Azaro MA, Landy A.** λ integrase and the λ Int family. En: Craig N, Craigie R, Gellert M and AM Lambowitz, ed. *Mobile ADN II.* ASM Press, Washington, DC, USA. **2002**; 118-48.
13. **Barlow M, Reik RA, Jacobs SD, Medina M, Meyer MP, McGowan JE, Jr, Tenover FC.** High rate of mobilization for blaCTX-Ms. *Emerg Infect Dis.* **2008**;14: 423-8.
14. **Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ.** A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* **1995**; 226: 235-40.
15. **Bennett PM.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother.* **1999**; 43: 1-4

16. **Bennett PM.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.* **2008**;111:1-11.
17. **Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid ADN. *Nucleic Acids Res.* **1979** ;24;7(6):1513-23.
18. **Bissonnete L, Roy PH.** Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestro of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* **1992**; 174: 1248-57.
19. **Bouet JY, Nordstrom K, Lane D.** Plasmid partition and incompatibility the focus shifts. *Mol Microbiol.* **2007**;65(6):1405-14.
20. **Bradford, P. A.** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**;14: 933-951.
21. **Brzezinska, M., R. Benveniste, J. Davies, P. J. Daniels, and J. Weinstein.** Gentamicin resistance in strains of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by enzymatic N-acetylation of the deoxystreptamine moiety. *Biochemistry.* **1972**;11:761-765.
22. **Bunny, K. L., R. M. Hall, and H. W. Stokes.** New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, aacA7, and a chloramphenicol resistance gene, catB3, in an integron in pBWH301. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**;39:686-693.
23. **Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guèdon G.** Conjugative transposón: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol.* **2002**;43(6):601-610.
24. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**;39:211-33.
25. **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(3):969-76.
26. **Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**;56(12):6349-57.
27. **Cantón R, Coque TM, Baquero F.** Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis.* **2003**;16:315-325.
28. **Cantón R, Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutiérrez-Fuentes JA.** Epidemiology and evolution of betalactamases. En: *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens.* ASM Press, Washington D.C. **2008**; pp. 249-270.
29. **Carattoli A.** Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* **2001**; 32: 243-59

30. **Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH.** Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**;43(6):1379-82.
31. **Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN.** Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for Nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53(3):1225-7.
32. **Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR.** Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48:4654-61.
33. **Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X.** Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol.* **2011**;49:2578–83.
34. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** Vol. 26, no. 3. 16th informational supplement. M100–S16. Wayne (PA): The Institute; **2006**.
35. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 22nd informational supplement. M100–S22. Wayne (PA): The Institute; **2012**.
36. **Collis CM, Hall RM.** Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron ADN integrase. *J Bacteriol.* **1992**;174(5):1574-85.
37. **Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM.** Site-specific insertion gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol.* **1993**; 9: 41- 52
38. **Collis C, Hall RM.** Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integron. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39: 155-62
39. **Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R.** Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46(2):500-10.
40. **Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK.** Identification and classification of bacterial plasmid. *Microbiol Rev.* **1988**;52(3):375–395.
41. **Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG.** Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* **2004**;42(12):5644-9.
42. **del Solar G, Giraldo R, Ruiz Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz Orejas R.** Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1998**;62(2):434–464.
43. **Dobrindt U, Hacker J.** Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Infect Diss.* **2001**;4:550-557.

44. **Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM.** On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* **2003**;51:257-66
45. **Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G and Rossolini GM.** IMP- 12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**;47:1522-8.
46. **Dornbusch K, Hallander HO.** Gentamicin resistance in gramnegative bacilli: occurrence of modifying enzymes and their influence on susceptibility testing. *Scand. J. Infect. Dis.* **1980**;12:295–302.
47. **Dornbusch K, Miller GH, Hare RS, Shaw KJ.** Resistance to aminoglycoside antibiotics in gram-negative bacilli and staphylococci isolated from blood. Report from a European collaborative study. *J. Antimicrob. Chemother.* **1990**;26:131–144.
48. **Dubois V, Arpin C, Noury P and Quentin C.** Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a blaTEM-21 gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46:3624–3626.
49. **Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann C, Quentin C.** Molecular characterization of a novel class 1 integron containing blaGES-1 and a fused product of aac3-Ib/aac6_-Ib_ gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46:638–645.
50. **Duljasz W, Gniadkowski M, Sitter S, Wojna A, Jebelean C.** First organisms with acquired metallo-b-lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53: 2221–2222.
51. **Edalucci E, Spinelli R, Dolzani L, Riccio ML, Dubois V, Tonin EA, Rossolini GM & Lagatolla C.** Acquisition of different carbapenem resistance mechanisms by an epidemic clonal lineage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infec.* **2008**;14: 88–90.
52. **Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'souza JW, Tapalski DV, Azizov IS, Sukhorukova MV, Pavlukov RA, Kozlov RS, Toleman MA, Walsh TR.** Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis.* **2013**;13(10):867-76.
53. **El Salabi A, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR.** First report of the metallo-β-lactamase, SPM-1, in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(1):582.
54. **Elias J, Schoen C, Heinze G, Valenza G, Gerhaz E, Gerharz H, Vogel U.** Nosocomial outbreak of VIM-2 metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with retrograde urography. *Clin Microbiol Infect.* **2010**;16:1494–500.
55. **Empel J, Filczak K, Mrowka A, Hryniewicz W, Livermore DM & Gniadkowski M.** Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with PER-1 extended-spectrum b-

- lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol.* **2007**;45: 2829–2834.
56. **European Study Group on Antibiotic Resistance (ESGAR).** In vitro susceptibility to aminoglycoside antibiotics in blood and urine isolates consecutively collected in twenty-nine European laboratories. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **1987**;6:378–385.
57. **Falkiner, F. R., G. A. Jacoby, C. T. Keane, and S. R. McCann.** Amikacin, gentamicin and tobramycin resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a leukaemic ward. *Epidemiology and genetic studies. J. Hosp. Infect.* **1982**;3:253–261.
58. **Fournier D, Jeannot K, Robert-Nicoud M, Muller E, Cholley P, van der Mee-Marquet N, Plésiat P.** Spread of the bla(IMP-13) gene in French *Pseudomonas aeruginosa* through sequence types ST621, ST308 and ST111. *Int J Antimicrob Agents.* **2012**;40(6):571-3.
59. **Galimand, M., P. Courvalin, and T. Lambert.** Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**;47:2565–2571.
60. **García-Castillo M, Del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, van Mansfeld R, Oliver A, Cantón R.** Wide dispersion of ST175 clone despite highgenetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol.* **2011**;49:2905–10.
61. **García Rodríguez JA.** Antimicrobianos en Medicina 2ª ed. Sociedad Española de Quimioterapia **2006**.
62. **Gerdes K, Møller-Jensen J, Bugge Jensen R.** Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol.* **2000**;37(3):455-66.
63. **Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E.** IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**;44:2247-53.
64. **Giamarellos-Bourboulis EJ, Plachouras D, Tzivra A, Kousoulas V, Bolanos N, Raftogiannis M, Galani I, Dontas I, Dionyssiou-Asteriou A, Giamarellou H.** Stimulation of innate immunity by susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro and in vivo study. *Clin Exp Immunol.* **2004**;135(2):240-6.
65. **Gilarranz R, Juan C, Castillo-Vera J, Chamizo FJ, Artiles F, Álamo I, Oliver A.** First detection in Europe of the metallo-β-lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ClinMicrobiol Infect.* **2013**; 19:E424-427.
66. **Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, Stokes HW.** The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol.* **2008**;190(14):5095-100
67. **Girlich D, Naas T, Nordmann P.** Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48:2043-8.

68. **Giske CG, Libisch B, Colinson C, Scoulica E, Pagani L, Fuzi M, Kronvall G & Rossolini GM.** Establishing clonal relationships by multilocus sequence typing between VIM-1- like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. **2013**;19(9):E424-7.
69. **Gutiérrez, O., C. Juan, E. Cercenado, F. Navarro, E. Bouza, P. Coll, J. L. Pérez, and A. Oliver.** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. **2007**;51:4329-4335
70. **Hachem, R. H., R. F. Chemaly, C. A. Ahmar, Y. Jiang, M. R. Boktour, G. A. Rjaili, G. P. Bodey, and I. I. Raad.** Colistin Is Effective in Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Cancer Patients. Antimicrob. Agents Chemother. **2007**;51: 1905-1910.
71. **Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE.** OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **1993**; 37: 1637-44.
72. **Hall RM, Collis CM.** Mobile gene *cassettes* and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. Mol Microbiol. **1995**; 15: 593-600
73. **Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH.** *IntI2* integron integrase in *Tn7*. J Bacteriol **2002**;1184(6):1712-1721.
74. **Hořtje, J. V., U. Kopp, A. Ursinus, and B. Wiedemann.** The negative regulator of β -lactamase induction AmpD is a N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase. FEMS Microbiol. Lett. **1994**;122:159-164.
75. **Høiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A.** *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. Microbes Infect. **2001**;3(1):23-35.
76. **Honore, N., M. H. Nicolas, and S. T. Cole.** Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. EMBO J. **1986**;5:709-714.
77. **Huovinen S.** Rapid isoelectric focusing of plasmidmediated β -lactamases with Pharmacia PhastSystem. Antimicrob Agents Chemother. **1988**; 32: 1730-32.
78. **Jacoby GA.** Beta-lactamase nomenclature. Antimicrob Agents Chemother. **2006**;50:1123-9.
79. **Jarlier V.** Beta-lactamase producers and other bacteria: which ones to take into consideration and when? [The concept of beta-lactamase inhibitor]. Presse Med. **1998**;27 Suppl 4:17-8.
80. **Johansen, H. K., S. M. Moskowitz, O. Ciofu, T. Pressler, and N. Hoiby.** Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. J. Cys Fibrosis. **2008**;7: 391-397.

81. **Jones ME, Peters E, Weersink AM, Fluit A, Verhoef J.** Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet*. **1997**; 349: 1742-3.
82. **Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, Kojic M.** Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother*. **2011**;55(8):3929-31
83. **Juan C, Beceiro A, Gutierrez O, Alberti S, Garau M, Perez JL, Bou G, Oliver A.** Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. **2008**;52(10):3589-96.
84. **Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A.** Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**;49:4733-8
85. **Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A.** Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother*. **2006**;50(5):1780-7
86. **Juan C, Zamorano L, Mena A, Alberti S, Perez JL & Oliver A.** Metallo-b-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J Antimicrob Chemoth*. **2010**;65: 474–478.
87. **Kettner, M., P. Milosovic, M. Hletkova, and J. Kallova.** Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates. *Infection*. **1995**;23:380–383.
88. **Kevin B. Laupland, Michael D. Parkins, Deirdre L. Church, Daniel B. Gregson, Thomas J. Louie, John M. Conly, Sameer Elsayed, and Johann D. D. Pitou.** Population-Based Epidemiological Study of Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Importance of Metallo-b-Lactamase (MBL)-Producing Strains (*J Infect Dis*. **2005**:192.
89. **Kong KF, Jayawardena SR, del Puerto A, Wiehlmann L, Laabs U, Tümmler B, Mathee K.** Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene*. **2005**;358:82-92.
90. **Kono, M., and K. O'Hara.** Mechanisms of streptomycin (SM)-resistance of highly SM-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Antibiot*. **1976**;29:169–175.
91. **Kouda S, Ohara M, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, Kashiya S, Hayashida S, Harino T, Tsuji T, Itaha H, Gotoh N, Matsubara A, Usui T, Sugai M.** Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the bla_{IMP-1} gene cassette in Hiroshima. *J Antimicrob Chemoth*. **2009**;64: 46–51.
92. **Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S,**

- Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N.** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* **2010**;10(9):597-602.
93. **Labbate M, Roy Chowdhury P, Stokes HW.** A class 1 integron present in a human commensal has a hybrid transposition module compared to Tn402: evidence of interaction with mobile DNA from natural environments. *J Bacteriol.* **2008**;190(15):5318-27.
94. **Lagatolla C, Edalucci E, Dolzani L, Riccio ML, De Luca F, Medessi E, Rossolini GM, Tonin EA.** Molecular evolution of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial setting of high-level endemicity. *J Clin Microbiol.* **2006**;44(7):2348-53.
95. **Lambert T, Gerbaud G, Courvalin P.** Characterization of transposon Tn1528, which confers amikacin resistance by synthesis of aminoglycoside 3'-O-phosphotransferase type VI. *Antimicrob Agents Chemother.* **1994** ;38(4):702-6.
96. **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante A, Fontana R, Rossolini GM.** Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**;43:1584-90.
97. **Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y.** Novel acquired metallobeta- lactamase gene, *bla(SIM-1)*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49:4485-91.
98. **Lee SH, Jeong SH.** Nomenclature of GES-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49:2148.
99. **Leibovici, L., I. Shraga, M. Drucker, H. Konigsberger, Z. Samra, and S. D. Pitliks.** The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern. Med.* **1998**;244: 379-386.
100. **Lepsanovic Z, Libisch B, Tomanovic B, Nonkovic Z, Balogh B & Fuzi M.** Characterisation of the first VIM metallo-blactamase- producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung.* **2008**;55: 447–454.
101. **Levy SB.** Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread.* Ed. Chadwick DJ. **1992.**
102. **Li, J., R. L. Nation, J. D. Turnidge, R. W. Milne, K. Coulthard, C. R. Rayner, and D. L. Paterson.** Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect. Dis.* **2006**;6: 589-601.
103. **Libisch B, Balogh B & Fuzi M.** Identification of two multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clonal lineages with a countrywide distribution in Hungary. *Curr Microbiol.* **2009**;58: 111–116.

104. **Libisch B, Poirel L, Lepsanovic Z, Mirovic V, Balogh B, Paszti J, Hunyadi Z, Dobak A, Fuzi M, Nordmann P.** Identification of PER-1 extended-spectrum β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunol Med Mic.* **2008a**;54: 330–338.
105. **Libisch B, Watine J, Balogh B, Gacs M, Muzslay M, Szabo G & Fuzi M.** Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. *Res Microbiol.* **2008b**;159: 162–168.
106. **Lindberg, F., S. Lindquist, and S. Normark.** Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* β -lactamase. *J. Bacteriol.* **1987**;169:1923–1928.
107. **Lindquist, S., F. Lindberg, and S. Normark.** Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single ADN site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* β -lactamase gene. *J. Bacteriol.* **1989**;171: 3746–3753
108. **Livermore, D. M.** β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**;8:557–584
109. **Livermore, D. M.** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **2002**;34: 634–640.
110. **Lynch JP.** Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest.* **2001**;119 Suppl 2:S373-84.
111. **Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL, Oliver A.** Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49:3382-6
112. **MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, Lin BB, Lockwood LG, Dirk JE, Miller GH, Burns JL, Garber RL.** Aminoglycoside- resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J. Infect. Dis.* **2000**;181:1180–1184.
113. **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance *Clin Microbiol Infect.* **2012**;18(3):268-81.
114. **Mahillon J, Chandler M.** Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1998**;62(3):725–774.
115. **Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**;17;95(6):3140-5.

116. **Marchiaro P, Viale AM, Ballerini V, Rossignol G, Vila AJ, Limansky A.** First report of a Tn402-like class 1 integron carrying blaVIM-2 in *Pseudomonas putida* from Argentina. *J Infect Dev Ctries.* **2010**; 30; 4:412-416.
117. **Martinez E, Marquez C, Ingold A, Merlino J, Djordjevic SP, Stokes HW, Chowdhury PR, Diverse.** Mobilized Class 1 Integrons Are Common in the Chromosomes of Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **2012**; 56: 2169-2172.
118. **Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, Jones ME.** Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**;43(3):686-9
119. **Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL.** Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection.* **2007**;35:457-60.
120. **Masuda N. E., Sakagawa S., Ohya, N., Gotoh H., Tsujimoto and T. Nishino.** Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**;44: 3322-3327.
121. **May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK, Misra TK, Chakrabarty AM.** Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev.* **1991**;4(2):191-206.
122. **Mazell D, Dychinco O B, Webb VA, Davies J.** A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* **1998**; 280: 605-8,
123. **Mendonça N, Ferreira E, Louro D; ARSIP Participants, Caniça M.** Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int J Antimicrob Agents.* **2009**; 34: 29-37.
124. **Mesnaros, N., P. Nordmann, P. Plesiat, M. Roussel-Delvallez, J. Van Eldere, Y. Glupczynski, Y. van Laethem, F. Jacobs, P. Lebesque, A. Malfroot, P. M. Tulkens, and F. van Bambeke.** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options in the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.* **2007**;13: 560-578.
125. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, L. Naples, R. S. Hare, K. J. Shaw, et al. Aminoglycoside Resistance Study Groups.** Resistance to aminoglycosides in *Pseudomonas*. *Trends Microbiol.* **1994** ;2:347–353.
126. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, L. Naples, R. S. Hare, K. J. Shaw, et al. Aminoglycoside Resistance Study Groups.** The most frequently occurring aminoglycoside resistance

- mechanisms— combined results of surveys in eight regions of the world. *J. Chemother.* **1995**; 7(Suppl. 2):17–30.
127. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, L. Naples, R. S. Hare, K. J. Shaw, et al. Aminoglycoside Resistance Study Groups.** The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin—a new broad-spectrum aminoglycoside. *J. Chemother.* **1995** ;7(Suppl. 2):3144.
128. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, L. Naples, R. S. Hare, K. J. Shaw, et al. Aminoglycoside Resistance Study Groups.** The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms— changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? *Clin. Infect. Dis.* **1997**;24(Suppl. 1):S46–S62.
129. **Moya B, Dötsch A, Juan C, Blazquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A.** Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a non-essential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* **2009**;5.
130. **Mugnier, P., P. Dubrous, I. Casin, G. Arlet, and E. Collatz.** A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**;40:2488–2493.
131. **Myhall CG.** Nosocomial pneumonia: diagnosis and prevention. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **1997**; 11:427-457
132. **Naas T, Nordmann P.** OXA-type β -lactamases. *Curr Pharm Des.* **1999a**;5:865–79;
133. **Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Molecular characterisation of In51, a class 1 integron containing a novel aminoglycoside adenyltransferase gene cassette, aadA6, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys Acta.* **1999b**;1489:445–451.
134. **Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* **2008**;14 (Supl 1): 42-52.
135. **Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M.** Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol.* **2010**;161:234–42.
136. **Normark S.** β -Lactamase induction in Gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb. Drug Resist.* **1995**;1:111–114.
137. **Novick RP.** Plasmid Incompatibility. *Microbiol Rev.* **1987**;51(4):381–395
138. **Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R.** National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(12):4606–10
139. **Oh, H., J. Stenhoff, S. Jalal, and B. Wretling.** Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb Drug Res.* **2003**; 8: 323–328.
140. **Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blazquez J.** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* **2000**;288:1251–4

141. **Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan Jr JE Jr, Raney P, Tenover FC.** Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46(12):3829-36.
142. **Oliver, A., L. M. Weigel, J. K. Rasheed, J. E. McGowan , P. Raney, and F. C. Tenover.** Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**; 46: 3829-3836.
143. **Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N.** Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **1994**;38:71-8.
144. **Pagani L, Colinon C, Migliavacca R, Labonia M, Docquier JD, Núcleo E, Spalla M, Li Bergoli M, Rossolini GM.** Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol.* **2005**;43:3824–8.
145. **Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, CollisCM, Stokes HW, Hall RH.** Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiol.* **2000**; 146: 2855-64
146. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* **2005**;18:657-86.
147. **Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG.** ARI 1: beta lactamase mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* **1993**;2:81-7.
148. **Pedersen SS.** Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *APMIS.* **1992**;Suppl 28:S1-79.
149. **Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, Galleni M, Segatore B, Sacchetti E, Volpe R, Amicosante G, Perilli M.** Identification of bla(IMP-22) in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J Antimicrob Chemother.* **2009**;63:901-8.
150. **Peña C, Gómez-Zorrilla S, Suarez C, Dominguez MA, Tubau F, Arch O, Oliver A, Pujol M, Ariza J.** Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk of bloodstream infection in hospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2012**;31(10):2791-7.
151. **Peña C, Suarez C, Tubau F, Gutierrez O, Dominguez A, Oliver A, Pujol M, Gudiol F, Ariza J.** Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clin Microbiol Infect.* **2007**;13:1026-9.
152. **Philippon A, Labia R, Jacoby G.** Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **1989**;33(8):1131-6).
153. **Phillips, I., A. King, and K. Shannon.** Prevalence and mechanisms of aminoglycoside resistance. A ten-year study. *Am. J. Med.* **1986**;80:48–55.

154. **Piersigilli AL, Enrico MC, Bongiovanni ME, Bilbao LE, Martínez G, Ledesma EM.** Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* producers of extended spectrum beta-lactamases at a private institution in Cordoba. *Rev Chilena Infectol.* **2009**; 26: 331-5.
155. **Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, Deschaght P, Vanechoutte M, Jennes S, Pitt T, De Vos D.** *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One.* **2009**; 4: e7740.
156. **Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D, Vatopoulos AC & Legakis NJ.** Multiresistant serotype O 12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epidemiol Infect.* **1989**;103: 565–576.
157. **Pitt TL, Livermore DM, Miller G, Vatopoulos A & Legakis NJ.** Resistance mechanisms of multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Europe. *J Antimicrob Chemoth.* **1990**;26: 319–328.
158. **Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P.** Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49:3593-7.
159. **Poirel L, Carrër A, Pitout JD, Nordmann P.** Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53(6):2492-8
160. **Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P.** OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 b-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001a**; 45:447–53).
161. **Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P.** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000a**;44:622-32.
162. **Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P.** Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and its plasmid and integron borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000b**; 44: 891-7
163. **Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, de Champs C, Dove MG, Nordmann P.** GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001b**;45:2598-603.
164. **Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P.** Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(6):2420-4
165. **Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P.** A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β-lactamase GES-2 in South Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**; 49:561–565.
166. **Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P.** Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenem-

- hydrolyzing β -lactamase gene and two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001c**;45:546–552.
167. **Pollack M.** *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 5.a ed. Nueva York: Churchill Livingstone; **2000**. p. 1980-2003
168. **Poole, K.** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**; 10: 12-26.
169. **Poole K.** Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;479-487.
170. **Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleakis LS, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A.** VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49:5153-6.
171. **Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P.** First isolation of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46:932-3.
172. **Quale, J., S. Bratu, J. Gupta, and D. Landman.** Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**; 50: 1633-1641.
173. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **2007**;20:440-58.,
174. **Quinteira S, Ferreira H, Peixe L.** First isolation of blaVIM-2 in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49: 2140-1.
175. **Rajan S, Saiman L.** Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect.* **2002**;17(1):47-56.
176. **Recchia GD, Hall RM.** Origins of mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* **1997**; 5: 389-94
177. **Rechia GD, Sherrat DJ.** Gene acquisition in bacteria by integron mediated site specific recombination. En: Craig N, Craigie R, Gellert M and AM Lambowitz, ed. Mobile ADN II. ASM Press, Washington, DC, USA **2002**; 162-76
178. **Reynolds AV, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W.** In vitro activity of amikacin and ten other aminoglycoside antibiotics against gentamicin- resistant bacterial strains. *J. Infect. Dis.* **1976**; 134(Suppl.):S291–S296.
179. **Riccio ML, Docquier JD, Dell’Amico E, Luzzaro F, Amicosante G, Rossolini GM.** Novel 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**;47:1746–1748.
180. **Rice LB.** Bacterial monopolist: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in gram-positive bacteria. *Clin Infect Dis.* **2000**;31:762–769.

181. **Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, Del Campo R, Juan C, Cantón R, Oliver A.** *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanism in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother.* **2011**;66:2022–7.
182. **Rodríguez EF, Gonzalez MM, Gonzalez LZ, Sabatelli FJ, Tejedor Junco MT.** Aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the Canary Islands. *Zentbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt.* **2000**; 289:817–826.
183. **Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Cantón R, Nordmann P.** Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**;50(7):2544–2546.
184. **Rolain JM, Parola P, Cornaglia G.** New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect.* **2010**; 16: 1699–701
185. **Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas M.** Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob.* **2011**; 38:398-402.
186. **Saavedra, S., D. Vera, and C. H. Ramirez-Ronda.** Susceptibility of aerobic gram-negative bacilli to aminoglycosides. Effects of 45 months of amikacin as first-line aminoglycoside therapy. *Am. J. Med.* **1986**;80:65–70.
187. **Sabtcheva SM, Galimand G, Gerbaud P, Courvalin, Lambert T.** Aminoglycoside resistance gene ant(4')-IIb of *Pseudomonas aeruginosa* BM4492, a clinical isolate from Bulgaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**;47:1584–1588.
188. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd edition. **1989.** Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
189. **Samuelson O, Buaro L, Toleman MA, Giske CG, Hermansen NO, Walsh TR & Sundsfjord A.** The first metallo-beta-lactamase identified in Norway is associated with a Tn1C-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53: 331–332.
190. **Samuelson O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, Lia A, Ranheim TE, Rajendra Y, Hermansen NO, Walsh TR, Giske CG.** Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54: 346–352.
191. **Schmidts AS, Bruun MS, Larsen JL, Dalsgaard I.** Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *J Antimicrob Chemother.* **2001**; 47: 735-43

192. **Schwocho, L. R., C. P. Schaffner, G. H. Miller, R. S. Hare, and K. J. Shaw.** Cloning and characterization of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ib*, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**;39:1790–1796.
193. **Scotta C, Juan C, Cabot G, Oliver A, Lalucat J, Bennasar A, Albertí S.** Environmental microbiota represents a natural reservoir for dissemination of clinically relevant metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**; 55:5376-5379.
194. **Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T.** KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**;52:4194-7.
195. **Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K. Kato N, Otha M.** PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol.* **1996**;34:2909-13
196. **Severino, P., and V. D. Magalhaes.** The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Res. Microbiol.* **2002**;153: 221–226.
197. **Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM.** First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol.* **2009**;57:493-5. 7
198. **Shaw KJ, Cramer CA, Rizzo M, Mierzwa R, Gewain K, Miller GH, Hare RS.** Isolation, characterization, and ADN sequence analysis of an AAC(6⁷)-II gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**;33:2052–2062.
199. **Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y.** PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* **2003**;41:5407-13.
200. **Shimizu K, Kumada T, Hsieh WC, Chung HY, Chong Y, Hare RS, Miller GH, Sabatelli FJ, Howard J.** Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**;28:282–288.
201. **Smith, A.W., and B. H. Iglewski.** Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1989;**17**: 10509.
202. **Smith AD, Lui TW, Tillier ER.** Empirical models for substitution in ribosomal RNA. *Mol Biol Evol.* **2004**;21(3):419-27.
203. **Snyder L, Champness W.** *Molecular genetics of bacteria.* ASM Press: 1^a ed. 1997; 3^a ed. **2007.** ISBN: 978-1-55581-399-4.
204. **Song, S., O. G. Berg, J. R. Roth, and D. I. Andersson.** Contribution of Gene Amplification to Evolution of Increased Antibiotic Resistance in *Salmonella typhimurium*. *Genetics.* **2009** ;182(4):1183-95.

205. **Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouvelekis LS.** Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **2004**;15;234(2):209-13.
206. **Souli M, Galani I, Giamarellou H.** Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* **2008**; 20;13(47).
207. **Souza Dias MB, Habert AB, Borrasca V, Stempliuk V, Ciolli A, Araujo MR, Costa SF, Levin AS.** Salvage of long-term central venous catheters during an outbreak of *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia* infections associated with contaminated heparin catheter-lock solution. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2008**;29:125-30,
208. **Stokes HW,** *Mol Microbiol* **1997**
209. **Stokes HW, Hall RM.** A novel family of potentially mobile ADN elements encoding site specific gene integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* **1989**; 3: 1669-83
210. **Studemeister AE, Quinn JP.** Selective imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* associated with diminished outer membrane permeability. *Antimicrob Agents Chemother.* **1988**;32(8):1267-8.
211. **Suarez C, Peña C, Campo A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al.** Impact of carbapenem- resistance on *Pseudomonas aeruginosa* (PA) bloodstream infections outcome. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, **2009**.
212. **Suárez C, Peña C, Gavaldà L, Tubau F, Manzur A, Dominguez MA, Pujol M, Gudiol F, Ariza J.** Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Int J Infect Dis.* **2010**;14 Suppl 3:e73-8.
213. **Tam VH, Gamez EA, Weston JS, Gerard LN, Larocco MT, Caeiro JP, Gentry LO, Garey KW.** Outcomes of bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to piperacillin-tazobactam: implications on the appropriateness of the resistance breakpoint. *Clin Infect Dis.* **2008**; 15;46(6):862-7
214. **Tam VH, Rogers CA, Chang KT, Weston JS, Caeiro JP, Garey KW.** Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(9):3717-22.
215. **Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(1):320-7.
216. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** Interpreting chromosomal ADN restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* **1995**;33(9):2233-9.

217. **Thomas CM, Nielsen KM.** Mechanism of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol.* **2005**;3:711–721.
218. **Threlfall EJ, Woodford N.** Plasmid profile typing and plasmid fingerprinting. *Methods Mol Biol.* **1995**;46:225-36.
219. **Toleman MA, Vinodh H, Sekar U, Kamat V, Walsh TR.** blaVIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**;51(7):2636-8.
220. **Tran JH, Jacoby GA.** Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2002**; 99: 5638-42.
221. **Tribuddharat C, Fennewald M.** Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**; 43 960-2.
222. **Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M.** Widespread detection of PER-1–type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* **1997**; 41:2265–9).
223. **van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM).** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* **2007**;13: 1–46.
224. **Van Duyn GD.** A structural view of tyrosine recombinase site-specific recombination. En: Craig N, Craigie R, Gellert M and AM Lambowitz, ed. *Mobile ADN II.* ASM Press, Washington, DC, USA. **2002**; 93-117
225. **Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I, Zamorano L, Dobрева E, Velinov T, Kantardjiev T, Oliver A.** Molecular Epidemiology and Multidrug Resistance Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bulgarian Hospitals. *Microb Drug Resist.* **2013**; 19:355-361.
226. **Vecoli C, Prevost FE, Ververis JJ, Medeiros AA, O'Leary GP Jr.** Comparison of polyacrylamide and agarose gel thin-layer isoelectric focusing for the characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **1983**; 24: 186-9.
227. **Viedma E, Juan C, Otero JR, Oliver A, Chaves F.** Draft Genome Sequence of VIM-2-Producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175, an Epidemic High-Risk Clone. *Genome Announc.* **2013**; 11;1(2).
228. **Viedma E, Estepa V, Castillo-Vera J, Rojo-Bezares B, Seral C, Castillo FJ, Sáenz Y, Torres C, Chaves F, Oliver A, Juan C.** Comparison of local features from two Spanish hospitals reveals common and specific traits at multiple levels of the molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas spp.* **2013**; **Submitted.**

229. **Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, Colombian Nosocomial Resistance Study Group.** First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**;51:1553-5.
230. **Vincent JL.** Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet.* **2003**;361:2068-77.
231. **Vliegthart, J. S., P. A. Ketelaar-van Gaalen, and J. A. van de Klundert.** Nucleotide sequence of the aacC3 gene, a gentamicin resistance determinant encoding aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase III expressed in *Pseudomonas aeruginosa* but not in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**;35:892-897.
232. **Waine DJ, Honeybourne D, Smith EG, Whitehouse JL & Dowson CG.** Cross-sectional and longitudinal multilocus sequence typing of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum samples. *J Clin Microbiol.* **2009**;47: 3444-3448.
233. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* **2005**;18:306-25.
234. **Walsh TR.** Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis.* **2008**;21(4):367-71
235. **Walsh, T. R., M. A. Toleman, W. Hryniewicz, P. M. Bennett, and R. N. Jones.** Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**;52:116-119.
236. **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* **2007**;60:470-82.
237. **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* **2006**;57:373-83.
238. **Wang C, Cai P, Chang D, Mi ZA.** *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* **2006**; 57:1261-2.
239. **West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ.** Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* **1994**; 11;148(1):81-6.
240. **White PA, Mciver CJ, Rawlinson WD.** Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;45: 2658-61.
241. **Wihlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, Köhler T, van Delden C, Weinel C, Slickers P, Tümmler B.** Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *P Natl Acad Sci USA.* **2007**;104: 8101-8106.
242. **Wohlleben, W., W. Arnold, L. Bissonnette, A. Pelletier, A. Tanguay, P. H. Roy, G. C. Gamboa, G. F. Barry, E. Aubert, and J. Davies.** On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (aacC1) for gentamicin

- acetyltransferase-3-I (AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol. Gen. Genet.* **1989**; 217:202–208
243. **Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND.** Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53:557-62.
244. **Woodford N, Turton JF, Livermore DM.** Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* **2011**;35(5):736-55.
245. **Xiaofei Jiang, Zhe Zhang, Min Li, Danqiu Zhou, Feiyi Ruan and Yuan Lu.** Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**;50(9):2990-2995
246. **Yigit H, Qucenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC.** Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;52:809. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):809
247. **Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, Walsh TR.** Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* **2012**;56(12):6154-9.
248. **Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL.** Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-(beta)-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother.* **2005**;56:1148-51.
249. **Zuccarelli AJ, Roy I, Harding GP, Couperus JJ.** Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid [ADN](#) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **1990** ;28(1):97-102.

ANEXOS

Molecular and epidemiologic characterization of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.-

INTRODUCTION.-

Members of the bacterial genus *Pseudomonas*, especially *P. aeruginosa*, are among the major nosocomial pathogens because of their ubiquitous nature and ability to colonize and survive in hospital reservoirs and because of their role in causing infections in immunocompromised and critically ill patients. *P. aeruginosa* shows a high level of intrinsic resistance to antimicrobial drugs and an ability to become even more drug resistant. These characteristics are caused by selective pressure of mutations in chromosomal genes that lead to *ampC* hyperexpression, repression or inactivation of *oprD*, and overexpression of efflux pumps. In addition, *P. aeruginosa* is able to acquire other drug-resistance determinants by horizontal transfer of mobile genetic elements coding for class B carbapenemases (also called metallo- β -lactamases [MBLs]). MBL genes are normally encoded in class 1 integrons along with other resistance determinants, such as the aminoglycoside-modifying enzymes. The integrons are frequently located in plasmids or transposons, the dissemination of which contributes to the global spread of this resistance mechanism. The versatility and ability of *P. aeruginosa* to combine different resistance mechanisms has led to emergence of strains that are resistant to multiple antimicrobial drugs, which severely limits therapeutic options for treating infections.

We have observed a sharp increase in infections with multidrug resistant *P. aeruginosa* in our institution. Thus, we conducted a study to determine the clinical and molecular epidemiologic characteristics of drug-resistant *P. aeruginosa* isolates detected during 2007–2010.

MATERIAL AND METHODS.-

We conducted a retrospective study of all non-cystic fibrosis adult patients who were colonized or infected with *Pseudomonas spp.* isolates during January 2007–December 2010 at the Hospital Universitario 12 de Octubre in Madrid.

Identification and antimicrobial drug susceptibility testing of *P. aeruginosa* isolates included in this study were performed by using semi-automated microdilution panels. The antimicrobial drugs tested were PIP-TZ, TAZ, CEF, ATM, IMP, MER, CIP, GEN, TOB, AMK and colistin (COL). Break points were applied according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Additionally, MICs for the same antibiotics were determined by Etest in selected strains.

Epidemiologic relatedness of isolates was studied by using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). PFGE was conducted by macrorestriction of chromosomal DNA with *SpeI*. MLST was performed on selected isolates. Standard DNA amplification and sequencing of 7 housekeeping genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, and *trpE*) were performed. Isolates were assigned a sequence type (ST) number according to the allelic profiles available in the MLST database ([http:// pubmlst.org/paeruginosa](http://pubmlst.org/paeruginosa)).

Analysis of the mutational and horizontally acquired resistance mechanisms was performed in three representative *P. aeruginosa* multidrug-resistant isolates. The relative mRNA levels of the genes encoding the major *P. aeruginosa* efflux pumps (*mexB*, *mexD*, and *mexY*) and the chromosomal cephalosporinase (*ampC*) were determined by real-time PCR. The presence of mutations in *oprD*, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* was investigated by PCR amplification and sequencing. Also we evaluated the presence of acquired β -lactamases through isoelectric focusing on these *P. aeruginosa* multidrug-resistant isolates.

The presence of horizontally acquired β -lactamases was determined by using phenotypic and genetic approaches in all isolates. The identification of the involved β -lactamases was attempted through PCR amplification of genes encoding VIM-, IMP-, PER-, CTX-M-, SHV-, TEM-, OXA-, and PSE-type enzymes.

Integrans harbouring MBL-encoding genes (VIM- and IMP-) were characterized by PCR and DNA sequencing by using specific primers to amplify the *IntI1* and *qacE Δ 1* markers, the DNA region located between *intI1* and *qacE Δ 1*, and the corresponding MBL-encoding gene.

The composition of the MBL-carrying integrans was analyzed through PCR amplification and sequencing in order to understand the potential mechanisms of dissemination and particularities of their origin. To gain insights into this matter, PCRs using previously described overlapping primers for the amplification of *tni* genes (*tniQ*, *tniC*, *tniB*, and *tniA*, belonging to Tn402-like structures) and subsequent sequencing were performed.

Regarding the potential plasmid/chromosomal location of the different MBLs, all the attempts to transfer the plasmid DNA (obtained using the Ultraclean Plasmid Prep Kit, MoBio) to the PAO1 reference strain through electroporation/conjugation. Furthermore, the *southern blot* hybridisation over the *I-CeuI / S1nuclease* digested genomes.

Univariate analysis was performed by using the t test for continuous variables and the χ^2 or Fisher exact tests for categorical variables. A p value <0.05 was considered significant. Data were stored and analyzed by using SPSS version 17.0 for Windows software (Analytical Software, St. Paul, MN USA).

RESULTS.-

During the 4-year study, 183 patients were infected or colonized with *Pseudomonas* spp., harboured MDR or XDR isolates (177 *P. aeruginosa* and 6 *P. putida*): 13 (2.8%) of 460 in 2007, 32 (6.2%) of 517 in 2008, 38 (7.4%) of 514 in 2009, and 100 of (15.3%) 654 in 2010. The estimated annual incidence of MDR *Pseudomonas*-infected persons increased from 0.04/1,000 bed-days in 2007 to 0.34/1,000 bed-days in 2010.

Genotyping analysis of clinical isolates by PFGE showed that 104 isolates belonged to a single major clone (clone B), 29 belonged to a second clone (clone A), and 2 belonged to 2 clones (clones C and D). The remaining isolates, including the 6 *P. putida* isolates, showed unique PFGE patterns. MLST analysis identified as ST235 the clone A isolates and as ST175 the clone B isolates.

Clone A persisted at least from March 2007 to January 2010. The comparison of clinical variables of patients infected/colonized by clone A

revealed a strong association with admission in the haematology department (33.3% versus 4.2%, $P= 0.023$) and, remarkably, higher mortality during hospitalization (41.7% versus 12.5%, $P = 0.023$).

A deep analysis of the mutational and horizontally acquired resistance mechanisms was performed in three representative isolates from clone A. All clone A isolates were negative for MBL production. The relative mRNA levels of the genes encoding the major *P. aeruginosa* efflux pumps showed no significant changes in the expression of *mexD* or *ampC* genes with respect to that in PAO1, and the slightly increased expression of *mexB* and *mexY* suggests a limited impact (if any) on the resistance phenotype. On the other hand, high-level fluoroquinolone resistance was produced by GyrA Thr83Ile and ParC Ser87Leu mutations, while carbapenem resistance was, at least partially, a consequence of the disruption of *oprD* at nucleotide 629 by the insertion sequence IS100. Through isoelectric focusing, performed as described elsewhere, two β -lactamase bands, of pIs 8.4 and 6, were detected. While the pI 8.4 band corresponded to OXA-2, the other β -lactamase could not be identified with the primers used. Therefore, cloning of the corresponding *bla* gene was attempted. Sequencing of the cloned DNA fragment revealed the presence of a complete integron structure. The integron contained up to seven resistance determinants, including three genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes (*aacA4*, *aadA1* and a previously undescribed *aac* variant designated *aac(6')-33*), and three β -lactamases. One of the β -lactamase genes coded for the already-detected narrow-spectrum OXA-2, but remarkably, the other two coded for the ESBLs GES-1 and GES-5. A close analysis of the nucleotide sequences suggested that *bla*GES-5 could have

originated through a tandem duplication of *bla*GES-1 occurring between two 5-nucleotide (ACAAA) direct repeats (located at the end of the *attI* region [*upstream* of *bla*GES-1] and at the beginning of the *aacA4* cassette [*downstream* of *bla*GES-1]), followed by the selection of the Gly170Ser mutation and the acquisition of the last cassette of the integron [*aac(6')-33*]. The potential plasmid location of the integron was initially evaluated through transformation assays. Results showed hybridization with chromosomal but not plasmid DNA.

Clone B was initially isolated in February 2008 from a patient admitted to the pulmonology ward with a diagnosis of lower tract respiratory infection. Subsequently, 4 additional clone B isolates were detected in 2008, 23 in 2009, and 76 in 2010.

Comparison of clinical characteristics for patients infected or colonized with clone B and other MDR *P. aeruginosa* clones showed that patients infected with clone B were slightly older (mean age 67.5 vs. 61.9 years; $p = 0.016$) and they were more frequently admitted to the internal medicine (37.5% vs. 22.8%; $p = 0.033$) and pulmonology wards (16.3% vs. 5.1%; $p = 0.018$). Patients infected with clone B had more frequent underlying respiratory disease such as chronic obstructive pulmonary disease (36.5% vs. 22.8%; $p = 0.046$) than patients infected with other clones. All isolates in clone B were positive by phenotypic methods for MBL. PCR analysis and sequencing identified MBL VIM-2 in 103 isolates and IMP-22 in 1 isolate. VIM-2 was also detected in isolates in clone C, in 4 unique clones of *P. aeruginosa*, and in 5 of 6 isolates of *P. putida*. In 1 *P. putida* isolate, VIM-1 and VIM-2 MBLs were detected. A VIM-1-type MBL was also found in 1 clone of *P. aeruginosa*. To investigate the genetic content of integrons from clone B

isolates, we conducted PCR mapping of blaVIM-2 and blaIMP-22 genes for 4 strains. The structure of integrons from isolates producing VIM-2 was IntI-VIM2- aac(6')Ib-qacEΔ1 in all isolates. IMP-22 was also found to be encoded in a class 1 integron, but we were unable to amplify the fragment between blaIMP-22 and qacEΔ1 by PCR, perhaps because of the large size of this DNA fragment.

We studied integrons structure in 16 selected multidrug resistant *Pseudomonas spp*: 6 *P. putida* and 6 *P. aeruginosa* clones and 4 representative isolates belonged to clone B. This analysis revealed the presence of 6 different aminoglycosides modifying enzymes(AME) in 13 of 16 selected strains. The AME most frequently detected was (10 isolates) *aac(6')Ib*. Others AMEs was found: *aacA7*, *aadA1*, *aacA4*, *aadB* and *aac6'32* Moreover, two *P. putida* strains harboured a new aminoglycoside modifying enzyme gene variant, designated *aac(6')-49*, presumably with acetyl-transferase activity, given its homology with other aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases (53-55% in amino acid identities). Five of the MBL-harboursing integron structures detected were novel: In896, In902, In903, In908 and In927. PCR analysis showed two types of structures of integrons on basis of *tni* module. Both structures located integrons within transposon structures deriving from Tn402. Those integrons showed with complete 3'CS but truncated *tni* module.

Finally, regarding the potential plasmid/chromosomal location of the different MBLs, all the attempts to transfer the plasmid DNA to the PAO1 reference strain through electroporation/conjugation yielded negative results. Furthermore, the southern blot hybridisation suggested the chromosomal location

of MBL genes in all the strains, given that the respective MBL genes probes hybridized with bands which also hybridized with the rRNA gene probe.

DISCUSSION/CONCLUSIONS.-

The growing threat of antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* is driven by the extraordinary capacity of this microorganism for developing resistance to almost any available antibiotic by the selection of mutations in chromosomal genes, in conjunction with the emergence and dissemination of transferable resistance determinants of high concern during the last decade.

In this work, we analyzed the emergency of multidrug resistant *P. aeruginosa* isolates, during 4 years period (2007-2010) in Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid. The prevalence of *P. aeruginosa* multidrug resistant isolates was 3% in 2007 and reached 15% in 2010.

The prevalence of multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolates observed during 2007 and 2008 occurred as a result of widespread of epidemic strain (clone A), which seems to be associated with admission in the hematology department and higher mortality during hospitalization. Nevertheless, further studies are needed in order to elucidate whether infection by this clone is an independent risk factor for poor prognosis.

Indeed, several of the traditional mechanisms mutational resistances, including mutations in *GyrA* and *ParC* gene, or the inactivation of OprD were detected in clone A. However, transferable resistance mechanisms were detected much more remarkable: one encoding chromosomal integron containing up to 7 resistance

determinants, including 3 genes encoding aminoglycoside modifying enzymes (*aacA4* , *aadA1* and *aac (6') -33*) and three β -lactamase (*blaOXA - 2* *blaGES -1* , and *blaGES -5*) .

Although GES-1 hydrolyzed penicillins, and aztreonam oximinocefalosporinas, GES- 5, (which differs only in one amino acid, Gly170Ser) extending its activity toward carbapenems. A detailed analysis of the nucleotide sequence analysis suggests that originated *blaGES-5* through a tandem duplication *blaGES-1*. This result is, to our knowledge, the first natural example of the relevance of tandem gene duplications in the evolution of antibiotic resistance. In fact, this is the first description of integrons coding for two GES enzymes as well as the first description of this type of ESBL in Spain. Although the alternative explanation (independent acquisition of the two *blaGES cassettes*) cannot be completely ruled out, the presence of the ACAA sequence between *blaGES-1* and *blaGES-5* supports the former but not the latter hypothesis.

Outbreaks by MBL-producing *P. aeruginosa* have been documented in hospitals in several countries, and VIM- is the most dominant MBL variant in Spain and worldwide. We report a large outbreak of infections caused by a VIM-2-producing. Clone B was first detected on February 2008, and it has become increasingly common in Hospital Universitario 12 de Octubre, affecting 104 patients. This MDR *P. aeruginosa* clone was found in several wards of the hospital, although it was more frequently associated with patients in the internal medicine and pulmonology wards.

The spread of the ST175 clone should be considered an emerging pandemic. It was first identified in 2005 in the United Kingdom and Canada

(<http://pubmlst.org/> paeruginosa) and has been reported in Hungary, the Czech Republic, Poland, Spain, the Unites States, and China. In our study, all MDR *P. aeruginosa* isolates belonging to ST175 produced VIM-2 type MBLs, except for 1 that produced IMP-22. PCR mapping showed that VIM-2 was inserted in a class 1 integron with an aminoglycoside modifying enzyme (*aac6'-1b*). The IMP-type MBLs are most common among *Pseudomonas* spp. isolates in Asia, although they have been reported less frequently in some countries in Europe such as Italy and Austria. The ST175 clone was able to persist in Hospital Universitario 12 de Octubre for >34 months and has disseminated widely in spite of control measures that have been implemented.

ST175 MDR *P. aeruginosa* strain was responsible for 76% of infections or colonizations by MDR *P. aeruginosa* in 2010 at Hospital Universitario 12 de Octubre, and >50% of infections or colonizations during the study period. Overall, the percentage of MBL-producing MDR or XDR *Pseudomonas* spp. isolates during the study was 64%. Moreover, if one considers the clone producing GES-1-GES-5, the overall prevalence of isolates producing acquired carbapenemasas reaches 80%.

This study also detected emergence of multiple strains of *Pseudomonas* spp. that produced VIM-2- and VIM-1- type MBLs, including >6 *P. aeruginosa* and 6 *P. putida* clones. The polyclonal nature of MBL-based resistance might have major epidemiologic implications because sporadically isolated strains may eventually spread in the hospital environment or act as a reservoir for horizontal transfer of resistance determinants.

The location of MBL integrons within transposon structures deriving from Tn402, a widely reported pattern for the class 1 integrons with complete 3'CS but truncated *tnt* module, which are thus transposition-defective transposon derivatives that would need to be embedded in additional larger transposons to be mobilized. This fact suggests a common ancestral origin for most of the MBL-harbouring genetic elements in this work.

The underlying reasons for the widespread success of those strains still need to be elucidated fully, including the potential for an enhanced ability to acquire MDR determinants that facilitate persistence under conditions of antimicrobial drug selective pressure encountered in the hospital environment.

Deciphering the epidemiology and molecular aspects driving the emergence and spread of such strains is crucial to the implementation of efficient measures to control their dissemination.

**PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS
DOCTORAL**

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS INTERNACIONALES

- **Comparison of local features from two Spanish hospitals reveals common and specific traits at multiple levels of the molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas spp.***
Viedma E, Estepa V, Castillo-Vera J , Rojo-Bezares B, Seral C , Castillo FJ, Sáenz Y, Torres C, Chaves F, Oliver A, Juan C.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2013; Submitted.
- **Draft Genome of VIM-2-Producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175, an Epidemic High-Risk Clone.**
Esther Viedma , Carlos Juan , Joaquín R. Otero, Antonio Oliver, Chaves F.
Genome Announcements. March/April 2013, Volume 1 Issue 2.
- **VIM-2–producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone, Spain.**
Esther Viedma, Carlos Juan, Jennifer Villa, Laura Barrado, M. Ángeles Orellana, Francisca Sanz, Joaquín R. Otero, Antonio Oliver, and Fernando Chaves.
Emerg Infect Dis. 2012 Aug;18(8):1235-41.
- **Nosocomial Spread of Colistin-Only-Sensitive Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing the Extended-Spectrum - β -Lactamases GES-1 and GES-5 in Spain.**
Esther Viedma, Carlos Juan, Joshi Acosta, Laura Zamorano, Joaquín R. Otero, Francisca Sanz, Fernando Chaves, Antonio Oliver.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nov. 2009, p. 4930–4933

1 **Comparison of local features from two Spanish hospitals reveals common and**
2 **specific traits at multiple levels of the molecular epidemiology of metallo- β -**
3 **lactamase-producing *Pseudomonas* spp.**

4
5 Esther Viedma^a, Vanesa Estepa^b, Carlos Juan^{c#}, Jane Castillo-Vera^c, Beatriz Rojo-
6 Bezares^d, Cristina Seral^{e,f}, Francisco Javier Castillo^e, Yolanda Sáenz^d, Carmen Torres^{b,d},
7 Fernando Chaves^a, and Antonio Oliver^c

8
9 ^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

10 ^b Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Agricultura y
11 Alimentación, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

12 ^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca,
13 Spain.

14 ^d Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja
15 (CIBIR), Logroño, Spain.

16 ^e Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza,
17 Spain.

18 ^f Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza,
19 Zaragoza, Spain

20
21 **Running head:** Multilevel epidemiology of MBL+ *Pseudomonas* in 2 Spanish hospitals

22
23 #Address correspondence to: Carlos Juan (carlos.juan@ssib.es)

24 E.V. and V.E. contributed equally to this work.

25

26

27 **Abstract**

28 A collection of 27 representative and characterized metallo- β -lactamase (MBL)-producing
29 *Pseudomonas* spp. strains from two distantly located Spanish hospitals was analyzed. Our
30 results indicate the presence of specific features defining the multilevel epidemiology of MBL-
31 producing strains from each hospital in terms of species, clonality, particular high-risk clones'
32 predominance, composition and diversity of integrons and linkage to Tn402-related structures.
33 Therefore, despite there are global trends driving the epidemiology of MBL-producing
34 *Pseudomonas* spp., the presence of local features has to be considered for understanding this
35 growing threat and implementing optimal control strategies.

36

37 **Keywords:** *Pseudomonadaceae*, class B carbapenemases, Tn402-like transposons, class
38 1 integrons, high risk clones.

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52 The growing incidence of horizontally-acquired resistance in *Pseudomonas*
53 *aeruginosa* and other related non-fermenters (such as *P. putida*), added to its
54 extraordinary capacity for the acquisition of resistance through chromosomal mutations,
55 dramatically limits our arsenal for the treatment of nosocomial infections [1, 2]. In this
56 regard, the transferable class B carbapenemases, also known as metallo- β -lactamases
57 (MBLs), are of particular concern. While multiple reports denote a growing prevalence
58 and diversity of such enzymes world-wide, linked to class 1 integrons and particular
59 clones in certain areas [3, 4], there is still scarce information on the transferable
60 elements responsible for their dissemination and whether these elements are different or
61 similar in different geographical locations. Thus, in order to define common or specific
62 epidemiological traits, we performed a multilevel comparison (clones, enzymes,
63 integrons, and particularly transferable elements) of the epidemiology of MBL-positive
64 *Pseudomonas* spp. from two distantly-located (approx. 300 km) Spanish hospitals.

65 For this purpose, two previously established collections of MBL-positive
66 *Pseudomonas* spp. strains detected between June of 2008 and June of 2010 in the
67 Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HLB) (Zaragoza, 848 beds), and Hospital
68 12 de Octubre (H12O) (Madrid, 1300 beds), were used [5, Rojo-Bezarez et al 2013,
69 submitted]. The H12O collection included one isolate representing each *Pseudomonas*
70 spp. PFGE clone proved to harbor an MBL during the study period: 5 *P. putida* and 6 *P.*
71 *aeruginosa* clones. Additionally, due to the extraordinary epidemic spread (104 patients
72 between 2007 and 2010) of an additional *P. aeruginosa* clone (the previously described
73 clone B), 4 representative samples of it were also studied, in order to find potential
74 differences in their acquired resistance determinants [5, 6], hence constituting a total of
75 10 *P. aeruginosa* samples from H12O. Regarding the collection of HLB, none MBL-
76 positive isolates of *Pseudomonas* species different from *P. aeruginosa* were detected,
77 but a high number of different clones was found (up to 30), being selected 12 strains of
78 representative pulsotypes (Rojo-Bezarez et al 2013, submitted). The clinical data,
79 resistance profiles and clonal relatedness (PFGE and MLST) of both collections are
80 shown in Table 1. Twenty five of the 27 strains produced VIM-2 (one was additionally
81 positive for VIM-1), while the remaining two strains produced VIM-1 or IMP-22
82 (Table1). MBLs were frequently linked to globally spread high-risk clones [7, 8, 9, 10,
83 11, 12, 13] in both hospitals with different distribution: ST111 and ST244 were detected
84 only among H12O strains, whereas ST235 was only in HLB. Moreover, MLST analysis

85 indicated distinct wide dissemination of ST175 in H12O hospital and ST235 in HLB
86 (represented by 8 different pulsotypes). In this sense, it was attention-calling the low
87 number of different STs harboring MBLs (just three) among the HLB isolates, in
88 contrast with a relatively high number of STs (six) in H12O. Likewise, polyclonal
89 MBL-positive *P. putida* strains, found to act as environmental reservoirs of genetic
90 elements harboring these resistance determinants [7, 12], were also only found among
91 H12O isolates.

92 The composition of the MBL-carrying integrons was analyzed through PCR
93 amplification and sequencing following previously described protocols [7, 14, 15], and
94 results are shown on Figure 1. Those combinations of cassettes not previously described
95 were uploaded on the Integrall database (integrall.bio.ua.pt), and the provided
96 nomenclature is also shown in the Figure 1. Interestingly, most of the HLB *bla*_{VIM-2}
97 integrons were quite uniform in their simplicity, given that in all the strains but two
98 (PA-HLB-Ps12 and PA-HLB-W378), the *bla*_{VIM-2} was the unique cassette detected into
99 the variable region (In56). This fact suggests a potential recent and contemporary
100 acquisition of the VIM-2-carrying integrons in most of the strains, which would not
101 have had enough time to accumulate new cassettes. On the other hand, the sequencing
102 of the PA-HLB-W378 strain integron revealed a partial structure, containing *ISPa34*,
103 which has been previously described in another Spanish hospital [16]. Interestingly,
104 exactly the same complete integron from this latter work (codifying two copies of
105 *bla*_{VIM-2} among other genes) was found in the strain PA-HLB-W336, which additionally
106 harbored another class 1 integron with only *bla*_{VIM-2}. The integrons of H12O strains
107 were much more variable, showing different combinations of MBLs and
108 aminoglycoside modifying enzymes, even with a strain (PP-H12O-25) harboring *bla*_{VIM-1}
109 and *bla*_{VIM-2} codified in two different integrons). Moreover, two *P. putida* strains from
110 H12O harbored a new aminoglycoside modifying enzyme gene variant, designated
111 *aac(6')-49*, presumably with acetyl-transferase activity, given its homology with other
112 aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases (53-55% in amino acid identities). Five of the
113 11 MBL-harboring integron structures detected were novel: In896, In902, In903, In908
114 and In927 most detected in H12O (Figure 1).

115 Most of the studies dealing with MBL-carrying integrons focus on their cassette
116 composition, but fewer works aim to study the genetic context where the integrons are
117 inserted, in order to understand the potential mechanisms of dissemination and

118 particularities of their origin. To gain insights into this matter, PCRs using previously
119 described overlapping primers for the amplification of *tni* genes (*tniQ*, *tniC*, *tniB*, and
120 *tniA*, belonging to Tn402-like structures) often located downstream of the 3' conserved
121 segment (3'CS) of class 1 integrons, and subsequent sequencing were performed [7, 14,
122 17, 18]. The resulting sequences were then compared with those on GenBank, and the
123 obtained data are shown in Figure 1. The location of MBL integrons within transposon
124 structures deriving from Tn402, a widely reported pattern for the class 1 integrons, was
125 very frequent (19 of the 27 studied strains) (Figure 1). However, the structures of
126 integrons lacking the whole 3'CS (*qacE1*, *sul1* and *orf5*), and showing a complete *tni*
127 module instead (*tniC*, *tniQ*, *tniB* and *tniA*), which have been already described in our
128 country and elsewhere [14, 17] were not detected in any of the strains from the two
129 hospitals. These particular integron-*tni* complete module structures have been proposed
130 to be still functional transposable elements, in contrast to those integrons with complete
131 3'CS but truncated *tni* module, which are thus transposition-defective transposon
132 derivatives that would need to be embedded in additional larger transposons to be
133 mobilized [17, 18, 19]. Precisely these truncated variants were those most usual in our
134 work (19 of the total 27 strains), with a high degree of homology in the *tniBΔ* and *tniA*
135 nucleotide sequences (more than 97% among all the strains). The presence of particular
136 Tn402-like variants with insertion sequences interrupting *tniB*, was exceptional: only
137 the PA-HLB-Ps56 strain showed an IS1326 between *orf5* and *tniB*. However, the
138 widely described presence of IS1353 upstream of IS1326 was not found in this strain,
139 constituting a rare variant of Tn402-like structure, probably indicating a very particular
140 origin proceeding from the described *In0* [18, 20, 21]. Another particular structure,
141 containing a different specific deletion site for *tniB*, previously described as *tniBΔ3*
142 [18], was found only in one strain, PA-H12O-12, suggesting also a very particular and
143 differential origin for this integron (Figure 1). In contrast, in most cases (17 strains), the
144 PCRs for partial *tniB* (disrupted in a common site yielding a particular *tniB* fragment
145 previously denominated as *tniBΔ1*) and *tniA* genes provided positive results (Figure 1).
146 This fact suggests a common ancestral origin for most of the MBL-harboring genetic
147 elements in this work, different to that of integrons with the cited complete *tni* module,
148 as has been shown for the USA, Russian and Indian class 1 integrons [21, 22]. For 8 of
149 the strains neither *tniA* nor *tniB* could be amplified using different combinations of
150 primers suggesting the presence of alternative not yet described genetic elements
151 carrying the integrons of these strains that need to be explored in future works. This

152 alternative structure was almost exclusively detected in HLB strains, further supporting
153 the concept that each health center shows particular and not generalizable epidemiologic
154 features, also regarding the origin of the dominant MBL integrons.

155 Finally, regarding the potential plasmid / chromosomal location of the different
156 MBLs, all the attempts to transfer the plasmid DNA (obtained using the Ultraclean
157 Plasmid Prep Kit, MoBio) to the PAO1 reference strain through
158 electroporation/conjugation yielded negative results. Furthermore, the southern blot
159 hybridisation following described protocols [14] using the North2South Complete
160 Biotin Random Primer labeling & detection kit (Thermo scientific), over the I-CeuI / S1
161 nuclease digested genomes, suggested the chromosomal location of MBL genes in all
162 the strains, given that the respective MBL genes probes hybridized with bands which
163 also hybridized with the rRNA gene probe (data not shown). This finding is supported
164 by several previous studies that have also shown that the majority of MBL genes are
165 chromosomally located in *P. aeruginosa*, probably due to a poor replication of plasmids
166 within this species, and the necessity of a chromosome integration of the genes [23, 24].
167 Moreover, chromosomal location was also observed in all *P. putida* strains analyzed.
168 This result contrasts with those of a different hospital in Spain for which in the vast
169 majority of MBL-producing *P. putida* strains plasmid location was demonstrated [7]

170 In conclusion, despite the uniform dominance of VIM-2 production, our results
171 indicate the presence of specific features defining the multilevel epidemiology of MBL-
172 producing *Pseudomonas* spp. in each of the two participating hospitals, in terms of
173 *Pseudomonas* species, clonal diversity, predominance of particular high-risk clones,
174 composition and diversity of integrons and their linkage to Tn402-related structures.
175 Therefore, despite there are clear global trends driving the epidemiology of MBL-
176 producing *Pseudomonas* spp., the presence of specific local features also need to be
177 considered for understanding this growing threat and implementing optimal control
178 strategies.

179

180

181

182

183 **Acknowledgments**

184 This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and
185 the Instituto de Salud Carlos III, through the Spanish Network for the Research in
186 Infectious Diseases (RD06/0008 and RD12/0015), the projects FIS PI12/01276 and
187 SAF2012-35474, the Direcció General d'Universitats, Recerca i Transferència del
188 Coneixement del Govern de les IllesBalears and Fondo Europeo de Desarrollo Regional
189 (FEDER). During the experimental work for this study, V. Estepa had a pre-doctoral
190 fellowship from the University of La Rioja, Spain.

191

192 **Legends to figures**

193 **Figure 1.** Composition of the MBL-carrying integrons and their genetic context.

194 The grey boxes / arrows represent the genes belonging to Tn402-related structures
195 carrying the integrons. The thick black lines interrupted by two diagonals represent the
196 areas that could not be amplified by PCR. The black oval dots represent the intergenic
197 DNA. The integrons' names and their cassettes were obtained in the Integrall database
198 [integrall.bio.ua.pt]. ^aThe dashes indicate an incomplete integron structure; the Integrall
199 database (<http://integrall.bio.ua.pt/>) does not provide In names for partial integrons. ^bPA:
200 *Pseudomonas aeruginosa*; PP: *Pseudomonas putida*; ST: sequence type. HLB: Hospital
201 Clínico Universitario Lozano Blesa, H12O: Hospital 12 de octubre. ^cC: chromosomal.

202

203

204

205 **References**

- 206 1. **Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND.** 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas*
207 *aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded
208 resistance mechanisms. Clin. Microbiol. Rev. **22**:582–610.
- 209 2. **Poole K.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front.
210 Microbiol. **2**:65.
- 211 3. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** 2011. Metallo- β -lactamases: a
212 last frontier for β -lactams? Lancet Infect. Dis. **11**:381-393.
- 213 4. **Juan C, Oliver A.** 2010. Carbapenemases in *Pseudomonas* spp. Enferm. Infecc.
214 Microbiol. Clin. **1**:19-28.
- 215 5. **Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MA, Sanz F, Otero JR,**
216 **Oliver A, Chaves F.** 2012. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas*
217 *aeruginosa* ST175 clone, Spain. Emerg. Infect. Dis. **18**:1235-1241.
- 218 6. **Viedma E, Juan C, Otero JR Oliver A, Chaves F.** 2013. Draft Genome
219 Sequence of VIM-2-Producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*
220 ST175, an Epidemic High-Risk Clone. Genome Announc. **1**(2):e0011213.
- 221 7. **Juan C, Zamorano L, Mena A, Albertí S, Pérez JL, Oliver A.** 2010. Metallo-
222 beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug
223 resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas*
224 *aeruginosa* clones. J. Antimicrob. Chemother. **65**:474–478.
- 225 8. **Viedma E, Juan C, Acosta J. Zamorano L, Otero JR, Sanz F, Chaves F,**
226 **Oliver A.** 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235
227 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-
228 lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:
229 4930–4933.
- 230 9. **Woodford N, Turton JF, Livermore DM.** 2011. Multiresistant Gram-negative
231 bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance.
232 FEMS Microbiol. Rev. **35**:736-755.

- 233 10. **Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C,**
234 **Cantón R, Oliver A.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance
235 mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and
236 doripenem. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:2022-2027.
- 237 11. **Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I Zamorano L, Dobрева E,**
238 **Velinov T, Kantardjiev T, Oliver A.** 2013. Molecular Epidemiology and
239 Multidrug Resistance Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from
240 Bulgarian Hospitals. *Microb. Drug. Resist.* **19**:355-361.
- 241 12. **Gilarranz R, Juan C, Castillo-Vera J, Chamizo FJ, Artiles F, Álamo I,**
242 **Oliver A.** 2013. First detection in Europe of the metallo- β -lactamase IMP-15 in
243 clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin.*
244 *Microbiol. Infect.* **19**:E424-427.
- 245 13. **Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA Domínguez MA, Zamorano L, Juan**
246 **C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver**
247 **A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** 2013.
248 Biological Markers of *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic High-Risk Clones.
249 *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:5527-5535.
- 250 14. **Scotta C, Juan C, Cabot G Oliver A, Lalucat J, Bennasar A, Albertí S.** 2011.
251 Environmental microbiota represents a natural reservoir for dissemination of
252 clinically relevant metallo-beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*
253 **55**:5376-5379.
- 254 15. **Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E Navarro F, Bouza E, Coll P, Pérez JL,**
255 **Oliver A.** 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem
256 resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals.
257 *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4329-4335.
- 258 16. **Rojo-Bezares B, Estepa V, de Toro M Undabeitia E, Olarte I, Torres C,**
259 **Sáenz Y.** 2011. A novel class 1 integron array carrying *blaVIM-2* genes and a
260 new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a
261 Spanish hospital. *J. Med. Microbiol.* **60**:1053-1054.

- 262 17. **Marchiaro P, Viale AM, Ballerini V, Rossignol G, Vila AJ, Limansky A.**
263 2010. First report of a Tn402-like class 1 integron carrying *bla*VIM-2 in
264 *Pseudomonas putida* from Argentina. *J. Infect. Dev. Ctries.* **4**:412-416.
- 265 18. **Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** 2010. Dispersal of carbapenemase
266 *bla*VIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons,
267 and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*.
268 *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:320-327.
- 269 19. **Martinez E, Marquez C, Ingold A, Merlino J, Djordjevic SP, Stokes HW,**
270 **Chowdhury PR.** 2012. Diverse mobilized class 1 integrons are common in the
271 chromosomes of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.
272 *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 2169-2172.
- 273 20. **Partridge SR, Brown HJ, Stokes HW, Hall RM.** 2001. Transposons Tn1696
274 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob.*
275 *Agents Chemother.* **45**:1263-1270.
- 276 21. **Toleman MA, Vinodh H, Sekar U, Kamat V, Walsh TR.** 2007. *bla*VIM-2-
277 harboring Integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an
278 ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence.
279 *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2636-2638.
- 280 22. **Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN.** 2009.
281 Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India:
282 evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones
283 (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob.*
284 *Agents Chemother.* **53**:1225-1227.
- 285 23. **Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas**
286 **M.** 2011. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of
287 *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **38**:398-402.
- 288 24. **Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM,**
289 **Walder M, Lia A, Ranheim TE, Rajendra Y, Hermansen NO, Walsh TR,**
290 **Giske CG.** 2010. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing
291 *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of

292 international clones and local clonal expansion. *Antimicrob. Agents Chemother.*
293 **54**:346-352.
294

Integron name ^a	Strain (species-hospital-code) [ST]	Location
	PA-H120-9 [ST450], PA-H120-13 [ST244], PA-H120-4, PA-H120-21 and PA-H120-26 [ST175], PA-H120-5 [ST111], PA-H120-10 [244]	C
	PA-H120-28 [ST253], PA-HLB-Ps24 and PA-HLB-W368 [ST973], PA-HLB-Ps27, PA-HLB-Ps32 and PA-HLB-W335 [ST235]	C
	PA-HLB-Ps60, PA-HLB-W336 and PA-HLB-W343 [ST235], PA-HLB-W340 [ST973]	C
	PP-H120-14, PP-H120-27	C
	PP-H120-11	C
	PP-H120-19	C
	PA-H120-23 [ST175]	C
	PP-H120-25	C
	PP-H120-25	C
	PA-H120-12 [ST155]	C
	PA-HLB-Ps12 [ST235]	C
	PA-HLB-W336 [ST235]	C
	PA-HLB-W378 [ST235]	C
	PA-HLB-Ps56 [ST175]	C

Figure 1. Composition of the MBL-carrying integrons and their genetic context.

The grey boxes / arrows represent the genes belonging to Tn402-related structures carrying the integrons. The thick black lines interrupted by two diagonals represent the areas that could not be amplified by PCR. The black oval dots represent the intergenic DNA. The integrons' names and their cassettes were obtained in the Integrall database [integrall.bio.ua.pt]. ^aThe dashes indicate an incomplete integron structure; the Integrall database (<http://integrall.bio.ua.pt/>) does not provide In names for partial integrons. ^bPA: *Pseudomonas aeruginosa*; PP: *Pseudomonas putida*; ST: sequence type. HLB: Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, H120: Hospital 12 de octubre. ^cC: chromosomal.

Table 1. Molecular epidemiology, clinical and antimicrobial susceptibility data of all the strains included in this study.

Strain code	Species ^a	Hospital ^b	Date of isolation dd/mm/yy	Sample	PFGE	ST	MBL	Resistance pattern ^c
W335	PA	HLB	03/07/08	Urine	HLB-3	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
W340	PA	HLB	04/07/08	Bronchial aspirate	HLB-11	973	VIM-2	IMP, MER, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP
W336	PA	HLB	05/07/08	Bronchial aspirate	HLB-8	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, CIP
W343	PA	HLB	16/07/08	Urine	HLB-6	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
W368	PA	HLB	20/02/09	Urine	HLB-12	973	VIM-2	IMP, MER, CAZ, GEN, TOB, AMK, CIP
W378	PA	HLB	07/05/09	Surgical wound	HLB-7	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, CIP
Ps24	PA	HLB	22/07/09	Bronchial aspirate	HLB-10	973	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP
Ps27	PA	HLB	17/08/09	Bronchial aspirate	HLB-4	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, CIP
Ps56	PA	HLB	18/12/09	Sputum	HLB-9	175	VIM-2	IMP, CAZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
Ps12	PA	HLB	18/12/09	Pharynx exudate	HLB-1	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, AMK, CIP
Ps32	PA	HLB	23/03/10	Urine	HLB-2	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP
Ps60	PA	HLB	28/05/10	Urine	HLB-5	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
1204	PA	H120	07/08/08	Sputum	120-B	175	VIM-2	IMP, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
1205	PA	H120	16/10/08	Urine	120-F	111	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
1209	PA	H120	22/12/08	Bile	120-C	450	VIM-2	IMP, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
12010	PA	H120	29/12/08	Sputum	120-G	244	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
12011	PP	H120	13/11/08	Inguinal exudate	120-H	-	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP

12012	PA	H120	26/02/09	Blood culture	120-I	155	VIM-1	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, AMK, CIP
12013	PA	H120	03/04/09	Urine	120-J	244	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, CIP
12014	PP	H120	27/04/09	Urine	120-K	-	VIM-2	IMP, MER, CAZ, PTZ, GEN, TOB, CIP
12019	PP	H120	01/10/09	Blood culture	120-L	-	VIM-2	IMP, MER, CAZ, PTZ, GEN, TOB, CIP
12021	PA	H120	10/02/10	Blood culture	120-B	175	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
12023	PA	H120	02/03/10	Bile	120-B	175	IMP-22	IMP, MER, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP
12025	PP	H120	11/05/10	Urine	120-M	-	VIM-1 and VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, CIP
12026	PA	H120	10/05/10	Sputum	120-B	175	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
12027	PP	H120	12/05/10	Urine	120-N	-	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
12028	PA	H120	28/05/10	Catheter	120-O	253	VIM-2	IMP, MER, PTZ, GEN, TOB, CIP

^aPA: *Pseudomonas aeruginosa*; PP: *P. putida*. ^bHLB: Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, H120: Hospital 12 de octubre. ^cThe displayed antibiotics are those to each strain showed clinical resistance following the EUCAST breakpoints, year 2013. IMP: imipenem, MER: meropenem, CAZ: ceftazidime, FEP: cefepime, PTZ: piperacillin-tazobactam, ATM: aztreonam, GEN: gentamicin, TOB: tobramycin, AMK: amikacin, CIP: ciprofloxacin.

Draft Genome Sequence of VIM-2-Producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175, an Epidemic High-Risk Clone

Esther Viedma,^a Carlos Juan,^b Joaquín R. Otero,^a Antonio Oliver,^b Fernando Chaves^a

Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain^a; Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Spain^b

The VIM-2-producing multidrug-resistant high-risk clone *Pseudomonas aeruginosa* sequence type (ST) 175 was isolated in the setting of a large outbreak in Hospital Universitario 12 de Octubre (Spain) from 2007 to 2010. This strain was resistant to all β -lactams, fluoroquinolones, and aminoglycosides, with the exception of amikacin, and has become an endemic clone in our institution.

Received 19 February 2013 Accepted 13 March 2013 Published 11 April 2013

Citation Viedma E, Juan C, Otero JR, Oliver A, Chaves F. 2013. Draft genome sequence of VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175, an epidemic high-risk clone. *Genome Announc.* 1(2):e00112-13. doi:10.1128/genomeA.00112-13.

Copyright © 2013 Viedma et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Fernando Chaves, fernando.chaves@salud.madrid.org.

Pseudomonas aeruginosa is among the most relevant nosocomial pathogens, frequently causing severe infections in immunocompromised and critically ill patients, due to its ubiquitous nature, ability to colonize and survive in hospital reservoirs, and remarkable intrinsic antibiotic resistance and virulence (1). The versatility of *P. aeruginosa* to combine mutation-driven and horizontally acquired resistance mechanisms has led to the emergence of strains that are resistant to nearly all antimicrobials, dramatically compromising our therapeutic options to treat the infections caused by these pathogens (2, 3). Particularly concerning are the increasing reports of outbreaks, in multiple hospitals from several countries, of strains producing metallo- β -lactamases (MBL), with VIM-2 being the dominant MBL variant in Spain and worldwide (4–7). Moreover, most of these outbreaks are caused by a very limited number of *P. aeruginosa* genotypes, denominated international high-risk clones (8). Thus, deciphering the genetic determinants driving the success of these clones is crucial for the establishment of control and treatment strategies.

The *P. aeruginosa* strain PA21_ST175 was isolated from a blood culture in the setting of a large outbreak by a VIM-2-producing multidrug-resistant *P. aeruginosa* clone. The outbreak affected a total of 104 patients and persisted in our hospital for at least 34 months despite the control measures that were implemented. This strain was responsible for over half of the infections or colonizations by multidrug-resistant *P. aeruginosa* from 2007 to 2010, reaching 76% in the last year of the period studied (9). Moreover, it belonged to the international high-risk clone of sequence type (ST) 175 and was resistant to all beta-lactams, fluoroquinolones, and aminoglycosides, with the exception of amikacin. Particularly noteworthy, the strain produced a VIM-2 MBL and an aminoglycoside-modifying enzyme (AAC6'Ib) located in a class I integron (9).

Whole-genome shotgun sequencing was performed using a Roche 454 Junior sequencer. A total of 164,273,685 bp was obtained from Roche 454, providing approximately 22-fold coverage and 368,892 reads, with a G+C content of 66.1%.

Sequences obtained were used for *de novo* assembly using Newbler Assembler v2.7 (Roche). The draft genome sequence consists of 100 contigs with an N_{50} contig size of 278,105 nucleotides and a total length of 6,889,935 bp. Sequences were annotated using the NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server (10), yielding a total of 6,488 coding DNA sequence (CDS) genes and 58 tRNAs. This approach highlighted the presence of up to 152 genes related to antibiotic and antiseptic resistance, including the previously characterized *bla*_{VIM-2}. Several chromosomal mutations involved in antibiotic resistance, including many of those previously reported for other ST175 lineages (11), were also detected.

Ongoing comparative genomic analysis with other widespread high-risk clones, such as ST111 or ST235 (12), and nonepidemic multidrug-resistant strains will help to elucidate the secret of the success of these international multidrug-resistant clonal lineages, a crucial step in the establishment of global control and treatment strategies to combat them.

Nucleotide sequence accession number. The draft genome sequence of *P. aeruginosa* ST175 has been included in the GenBank Whole-Genome Shotgun (WGS) database under the accession no. [AOIH00000000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/entry/view.cgi?accession=AOIH00000000).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (RD12/0015/0009, RD12/0015/0006) and by the Spanish Ministry of Health (FIS PI12/00103) from the Instituto de Salud Carlos III, Spain. This work was also supported by the Fundación Mutua Madrileña (FMM 2011/0064).

REFERENCES

1. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. 2006. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:43–48.
2. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. 2004. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates ob-

VIM-2-producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone, Spain

Esther Viedma, Carlos Juan, Jennifer Villa, Laura Barrado, M. Ángeles Orellana, Francisca Sanz, Joaquín R. Otero, Antonio Oliver, and Fernando Chaves

A total of 183 patients were colonized or infected with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates at a hospital in Spain during 2007–2010; prevalence increased over this period from 2.8% to 15.3%. To characterize these isolates, we performed molecular epidemiologic and drug resistance analysis. Genotyping showed that 104 (56.8%) isolates belonged to a single major clone (clone B), which was identified by multilocus sequence typing as sequence type (ST) 175. This clone was initially isolated from 5 patients in 2008, and then isolated from 23 patients in 2009 and 76 patients in 2010. PCR analysis of clone B isolates identified the *bla*_{VIM-2} gene in all but 1 isolate, which harbored *bla*_{IMP-22}. ST175 isolates were susceptible to only amikacin (75%) and colistin (100%). Emergence of the ST175 clone represents a major health problem because it compromises therapy for treatment of *P. aeruginosa* nosocomial infections.

Members of the bacterial genus *Pseudomonas*, especially *P. aeruginosa*, are among the major nosocomial pathogens because of their ubiquitous nature and ability to colonize and survive in hospital reservoirs and because of their role in causing infections in immunocompromised and critically ill patients (1). *P. aeruginosa* shows a high level of intrinsic resistance to antimicrobial drugs and an ability to become even more drug resistant. These characteristics are caused by selective pressure of mutations in chromosomal genes that lead to *ampC* hyperexpression, repression or inactivation of *oprD*, and overexpression of efflux pumps (2). In addition, *P. aeruginosa* is able to acquire other drug-resistance

Author affiliations: Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (E. Viedma, J. Villa, L. Barrado, M.Á. Orellana, F. Sanz, J.R. Otero, F. Chaves); and Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Spain (C. Juan, A. Oliver)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.111234>

determinants by horizontal transfer of mobile genetic elements coding for class B carbapenemases (also called metallo-β-lactamases [MBLs]), which hydrolyze all β-lactams except aztreonam (ATM) (3).

Because they can be disseminated horizontally through transfer of resistance determinants, MBLs have become a serious concern in hospitals worldwide over the past decade. Such acquired MBLs include the IMP and VIM types SPM-1, GIM-1, SIM-1, AIM-1, KHM-1, NDM-1, and SID-1 (4,5). MBL genes are normally encoded in class 1 integrons along with other resistance determinants, such as the aminoglycoside-modifying enzymes. The integrons are frequently located in plasmids or transposons, the dissemination of which contributes to the global spread of this resistance mechanism (6,7). The versatility and ability of *P. aeruginosa* to combine different resistance mechanisms has led to emergence of strains that are resistant to multiple antimicrobial drugs, which severely limits therapeutic options for treating infections (8,9). Interim definitions defining multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR), and pandrug-resistant bacteria, including *P. aeruginosa*, have been recently reported (10).

Although the prevalence of *P. aeruginosa* strains producing carbapenemases in Spain was considered low (0.4% of carbapenem-resistant isolates) (11) compared with prevalence in other countries in Europe, such as Italy (12.6% of carbapenem-resistant isolates) (12), detection of these isolates is no longer sporadic (13,14). Recent evidence from multicenter studies indicates an ≈10-fold increase in prevalence of these isolates in the past 5 years (15). During 2007 and 2008, a polyclonal outbreak of VIM-2-producing *P. aeruginosa* was detected in a hospital in Spain. At the same time, another outbreak in the hematology department of a hospital in Spain was caused by a *P. aeruginosa* ST235 clone, which produced GES-1 and GES-5, 2 extended-

Nosocomial Spread of Colistin-Only-Sensitive Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing the Extended-Spectrum β -Lactamases GES-1 and GES-5 in Spain[∇]

Esther Viedma,¹ Carlos Juan,² Joshi Acosta,¹ Laura Zamorano,² Joaquín R. Otero,¹ Francisca Sanz,¹ Fernando Chaves,¹ and Antonio Oliver^{2*}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain,¹ and Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Palma de Mallorca, Spain²

Received 1 July 2009/Returned for modification 14 August 2009/Accepted 29 August 2009

The mechanisms responsible for the increasing prevalence of colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Spanish hospital were investigated. Pulsed-field gel electrophoresis revealed that 24 (50%) of the studied isolates belonged to the same clone, identified as the internationally spread sequence type 235 (ST235) through multilocus sequence typing. In addition to several mutational resistance mechanisms, an integron containing seven resistance determinants was detected. Remarkably, the extended-spectrum β -lactamase GES-1 and its Gly170Ser carbapenem-hydrolyzing derivative GES-5 were first documented to be encoded in a single integron. This work is the first to describe GES enzymes in Spain and adds them to the growing list of β -lactamases of concern (PER, VIM, and OXA) detected in ST235 clone isolates.

The growing threat of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is driven by the extraordinary capacity of this microorganism for developing resistance to almost any available antibiotic by the selection of mutations in chromosomal genes, in conjunction with the emergence and dissemination of transferable resistance determinants of high concern during the last decade (8, 10, 11, 14–16). Class B carbapenemases (or metallo- β -lactamases [MBLs]) and extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), frequently encoded on integrons along with aminoglycoside-modifying enzymes, are likely the transferable resistance determinants currently having the highest impact on antimicrobial therapy in hospitals worldwide (2, 26, 30). The simultaneous detection of MBLs and ESBLs in the same clone (32) and the recent emergence of ESBLs with carbapenem-hydrolyzing activity, such as KPC and GES enzymes, add further complexity and concern (7, 23, 28).

The objective of this study was to determine the underlying mechanisms responsible for the increasing prevalence of *P. aeruginosa* clinical isolates showing resistance to all antipseudomonal agents except colistin (colistin-only-sensitive [COS] isolates) in a Spanish hospital (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid).

General description, clinical characteristics, and molecular typing. A retrospective study of all patients colonized/infected by *P. aeruginosa* isolates resistant to penicillins, cephalosporins, and carbapenems during 2007 and 2008 was conducted. Identification and susceptibility testing were performed using semiautomatic microdilution Wider panels (Soria Melguizo, Spain) (3). The antibiotics tested were piperacillin-tazobac-

tam (PTZ), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IMP), meropenem (MER), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GEN), tobramycin (TOB), amikacin (AMK), and colistin. Breakpoints were applied according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations (4). Additionally, MICs for the same antibiotics were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) in selected strains.

During the 2-year study, a total of 1,182 patients were colonized/infected with *P. aeruginosa*, and 56 (4.7%) of them met the inclusion criteria. The proportion of resistant isolates in the second year of the study was significantly higher than that in the first year, 7.1% (41/580) versus 2.5% (15/602) ($P < 0.001$), respectively. β -Lactam-resistant isolates frequently showed coresistance to non- β -lactam antibiotics, and up to 65% of them were COS.

Genotyping, through pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), revealed that 24 (50%) isolates were part of the same clone (A). The remaining 24 isolates showed a high clonal diversity (21 different PFGE patterns). Multilocus sequence typing (MLST) analysis was performed, following previously established protocols (6), in three isolates belonging to clone A, identified as sequence type 235 (ST235) according to the MLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa>).

Almost all (22/24) clone A isolates showed a COS phenotype characterized by resistance to PTZ, CAZ, FEP, IMP, MER, CIP, GEN, TOB, and AMK; only two clone A isolates maintained susceptibility against TOB and/or AMK. On the other hand, the susceptibility patterns of non-clone A isolates were much more variable.

The presence of MBLs was explored through phenotypic (Etest MBL) and genotypic (PCR and sequencing) approaches. While all clone A isolates were negative for MBL production, *bla*_{VIM-2} was detected in 9 of the 24 non-clone A isolates, each

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta, C. Andrea Doria N° 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain. Phone: 34 971 175 148. Fax: 34 971 175 185. E-mail: antonio.oliver@ssib.es.

[∇] Published ahead of print on 8 September 2009.