



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

**DIRECCIÓN DE POSGRADO
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO
DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

***“CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA
A LOS CARBAPENÉMICOS DE TIPO VIM EN AISLADOS
CLÍNICOS DE P. AERUGINOSA DEL CENTRO DE
REFERENCIA NACIONAL A LOS ANTIMICROBIANOS EN
EL 2016”***

AUTORA: Lic. Raquel Martínez

TUTOR: Dr. Jorge Reyes Chacón, MSc.

**GUAYAQUIL – ECUADOR
MAYO, 2017**

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS

TÍTULO Y SUBTÍTULO: "Caracterización de mecanismos de resistencia a los carbapenémicos tipo VIM en DNA extraído de aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del Centro de Referencia Nacional a los Antimicrobianos en el 2016"		
AUTOR: Raquel Martínez	TUTOR: Dr. Jorge Reyes Chacón, MSc.	
	REVISORES: Dra. Maylén Espinosa García, MSc.	
INSTITUCIÓN: Universidad de Guayaquil	FACULTAD: Director de Posgrado	
CARRERA: Maestría en Biotecnología		
FECHA DE PUBLICACIÓN: Mayo, 2017	No. DE PÁGS: 68	
TÍTULO OBTENIDO: Magister en Biotecnología Molecular		
ÁREAS TEMÁTICAS: Microbiología		
PALABRAS CLAVE: Resistencia a Antimicrobianos, Carbapenémicos, <i>P. aeruginosa</i>		
RESUMEN: <i>P. aeruginosa</i> es uno de los patógenos nosocomiales globalmente dominantes; ocasiona una amplia gama de infecciones, además es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí y posee una gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, asociándola a elevados índices de mortalidad y convirtiéndola en un serio problema de salud pública. El objetivo de este estudio es caracterizar los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos tipo VIM en 21 cepas de aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> . La presencia de genes codificantes de carbapenemasas de clase B se llevó a cabo mediante PCR. Los resultados obtenidos nos permiten tener datos epidemiológicos a nivel zonal de los mecanismos de resistencia que presenta <i>P. aeruginosa</i> .		
No. DE REGISTRO (en base de datos):	No. DE CLASIFICACIÓN:	
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
CONTACTO CON AUTOR/ES	Teléfono: 098406824	E-mail:raketefania09@hotmai.com
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Dirección de Posgrado	
	Teléfono: 2325530-38 Ext. 114	
	E-mail: posgrado-ug@ug.edu.ec	

CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular, nombrado por el Director General de la Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo, CERTIFICO: que he analizado la Tesis presentada, como requisito para optar el grado académico de Magíster en Biotecnología Molecular, titulada: “Caracterización de mecanismos de resistencia a los carbapenémicos en aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Centro de Referencia Nacional a los Antimicrobianos” la cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de posgrado.

Firma

Dr. Jorge Aníbal Reyes Chacón, MSc.
N° de cédula: 1717730962

Guayaquil, 26 de mayo de 2017

CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO

Yo, Lenin Javier Ramirez Cando, con registro del SENESCYT 7470 R-15-26820, por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR**: Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado, elaborado (a) por el Señor (a) Raquel Estefanía Martínez Pérez, con C.I. 0502999535, previo a la obtención del título de MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.

Tema de tesis: “Caracterización de mecanismos de resistencia a los carbapenémicos tipo VIM en DNA extraído de aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Centro de Referencia Nacional a los Antimicrobianos en el 2016”

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.

Ing. M.Sc. Lenin Ramirez Cando PHD(c)

N° Cédula: 1104250426

DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR

Yo, Raquel Estefanía Martínez Pérez, declaro bajo juramento ante la Dirección de Posgrado de la Universidad de Guayaquil, que el trabajo aquí descrito, así como sus resultados, conclusiones y recomendaciones presentadas es de mi autoría y exclusiva responsabilidad, que es inédita y no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

La reproducción total o parcial de esta tesis en forma idéntica o modificada, no autorizada por los editores transgrede los derechos de autoría. Cualquier utilización debe ser previamente solicitada a la Universidad de Guayaquil, a través de la Dirección de Posgrado o al autor.

Lic. Raquel Martínez

0502333535

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento es para el Señor, el amante que he anhelado toda mi vida. Gracias por revelarte a mí, por confiarme una misión y por permitirme cumplir los sueños más hermosos que Tú mismo ya soñaste para mí.

A mis amados padres, gracias por su ejemplo, disciplina, paciencia, oraciones y amor. Ustedes han sido siempre el viento bajo mis alas, tuve mucha suerte de tenerlos como padres, pero más suerte aún de que sean mis amigos.

A mi hermana Lore, gracias por tu amor y por la alegría que me das siempre cuando llego a casa.

A mi hermano Raúl, gracias por ser el compañero de mi vida, mi mejor amigo, el bastón en el que me apoyo siempre en cada paso.

A mi sobrinito Andrés, gracias por tu amor, tu dulzura y sonrisa que siempre me inspiran a ser el mejor de los ejemplos para ti.

A mi pequeña sobrina que viene en camino, por alegrar mi corazón.

A mi cuñada Sussy por su apoyo y cariño.

A mi director de tesis gracias por su apoyo incondicional, por su confianza y amistad.

A Danny, gracias por tu obediencia a Dios, por tu apoyo, por tus oraciones y por tu amor.

A mis amigos Nadi, Anita, Isma, Augus, María Graciela, Geova, Gaby, Majo, Renata, Emi, Pame, Michelle y Kari, gracias por su hermandad, su amistad, sus oraciones y amor.

A Fabi por toda su inmensa ayuda y apoyo a lo largo de la investigación.

A Katty por su amistad y su ayuda en todo momento.

A mis sobrinos Samuel, Ana Joaquina, Guillermo, Juan Felipe, Juan Pablo y Alegría por sus sonrisas.

DEDICATORIA

A Raúl y Pilar, como padres, los mejores.

ÍNDICE

Agradecimientos	VII
Dedicatoria	VIII
Índice	IX
Índice de Gráficos	X
Índice de Tablas	XI
Resumen	XII
Summary	XII
Introducción	1
Capítulo 1 Problema	3
Capítulo 2 Marco Teórico	16
Capítulo 3 Metodología	36
Capítulo 4 Resultados	50
Capítulo 5 Discusión	53
Conclusiones	55
Recomendaciones	56
Bibliografía	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Especificaciones de los cebadores para el gen VIM de <i>P. aeruginosa</i>	37
Tabla 2: Especificaciones de los cebadores para el gen INTI de <i>P. aeruginosa</i>	39
Tabla 3.- Concentración de DNA de muestras provenientes de aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	43
Tabla 4: Perfil de susceptibilidad de 21 cepas	44
Tabla 5: Gen VIM II y gen Inti I en muestras de ensayo	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos	21
Figura 2. Bomba de Eflujo	26
Figura 3 Estructura básica de los integrones, casetes génicos y esquema de la recombinación sitio – específica. a) Plataformas de recombinación. b) Cassettes génicos (Cambray, Guerout, & Mazel, 2010)	31
Figura 4. Ejemplos de integrones de clase I que albergan en su región variable a genes de resistencia a carbapenémicos y aminoglucósidos	34
Figura 5. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control	46
Figura 6. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control	47
Figura 7. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control.	48
Figura 8. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control.	49
Figura 9. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control.	50
Figura 10. Homología de gen VIM con gen de ensayo	51
Figura 11. Homología entre Inti I de Integral con gen de ensayo	52

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos nosocomiales globalmente dominantes; ocasiona una amplia gama de infecciones, además es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí y posee una gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, asociándola a elevados índices de mortalidad y convirtiéndola en un serio problema de salud pública (Herrera , y otros, 2007).

La resistencia a los carbapenémico en *P. aeruginosa* está dada por la combinación, al menos, de dos mecanismos simultáneos de resistencia; el cierre de porinas junto con la producción de betalactamasas son los de mayor relevancia (Suárez, Kattán, Guzmán, & Villegas, 2006).

El objetivo de este estudio es caracterizar los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos tipo VIM en DNA extraído de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos que se presentaron en el 2016.

La presencia de genes codificantes de carbapenemasas de clase B (VIM) se llevó a cabo mediante PCR, y además se determinó la presencia asociada de integrones.

Los resultados obtenidos nos permiten tener datos epidemiológicos a nivel zonal de los mecanismos de resistencia que presenta *Pseudomonas aeruginosa* y establecer la vigilancia de cepas similares que nos ayuden a generar un mejor diagnóstico y oportunidades de estandarización de protocolos para diagnóstico dentro del laboratorio.

Palabras clave: Resistencia a Antimicrobianos, *P. aeruginosa*, PCR.

SUMMARY

P. aeruginosa is one of the globally dominant nosocomial pathogens; It causes a wide range of infections, is also intrinsically resistant to various types of antibiotics that are structurally unrelated and have a strong capacity to acquire new resistance mechanisms, associating it with high mortality rates and making it a serious public health problem (Herrera et al., 2007). Resistance to carbapenems in *P. aeruginosa* is due to the combination of at least two simultaneous resistance mechanisms; the closure of porins along with the production of betalactamasas son of alcalde relevance (Suárez, Kattán, Guzmán, & Villegas, 2006).

The objective of this study is to characterize the mechanisms of resistance to carbapenemics type VIM in the DNA extracted from the clinical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* of the National Reference Center of Resistance to Antimicrobials in 2016.

The presence of coding genes for class B carbapenemase (VIM) was analyzed by PCR, and in addition the associated presence of the intergons was determined.

The results obtained allow us to have epidemiological data at the zonal level of the resistance mechanisms presented by *Pseudomonas aeruginosa* and to establish the surveillance of the strains that facilitate diagnosis and opportunities for standardization of protocols for diagnosis within the laboratory.

Key words: Antimicrobial resistance, *P. aeruginosa*, PCR.

INTRODUCCIÓN

P. aeruginosa, es un patógeno oportunista con un notable incremento en la incidencia de resistencia antimicrobiana en infecciones intrahospitalarias y comunitarias, lo cual representa un problema de salud pública global, promovido básicamente, por el uso indiscriminado de antibióticos (Herrera, y otros, 2007).

Las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* se presenta mayoritariamente en pacientes hospitalizados, inmunocomprometidos, portadores de materiales protésicos, pacientes con infecciones graves a quienes se les ha suministrado antibióticos de amplio espectro (Kluytmans, 2002).

Debido a la poca información sobre datos de presencia de genes adquiridos de resistencia en nuestro país, al número creciente de aislamientos de este tipo en muestras clínicas hospitalarias locales y a la epidemiología compleja de estas cepas resistentes existe la necesidad de caracterizar sus mecanismos de resistencia para el diseño e implementación de medidas de control de su expansión (Gamero, García, Rodríguez, Ibarra, & Casal, 2007).

El presente proyecto sería el primero en su tipo en Ecuador, para caracterizar los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos en cepas aisladas del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos.

CAPITULO 1

PROBLEMA

En las últimas décadas se ha declarado, por la Organización Mundial de la Salud, como un problema de salud pública a la diseminación de la resistencia bacteriana (Organización Mundial de la Salud, 2014). El uso indiscriminado de antimicrobianos de amplio espectro ha provocado el desarrollo de cepas multirresistentes y aunque los mecanismos de resistencia y la identificación continua de los mismos ha sido importante, pocos agentes antibacterianos se han desarrollado, dejando un número de opciones terapéuticas limitadas para el manejo de los pacientes que presentan infecciones bacterianas (Zambrano & Herrera, 2004).

P. aeruginosa es una de las bacterias que reúne mecanismos de virulencia más graves y fue el tercer patógeno aislado con mayor frecuencia en el reporte de SENTRY para Latinoamérica, este estudio mostró tasas de susceptibilidad de 71,9% para Imipenem y de 74,8% para Meropenem, con una tendencia al incremento de la resistencia a lo largo del tiempo (Suárez, Kattán, Guzmán, & Villegas, 2006).

El problema más agudo que plantean actualmente los aislados de *P. aeruginosa* es la resistencia por carbapenemasas, debida mayormente a metalo-carbapenemasas de varios tipos (IMP, VIM, SPM, GIM). Estas enzimas hidrolizan el imipenem, meropenem y todas las cefalosporinas, pero no destruyen al aztreonam; no son inhibidas por inhibidores de betalactamasas (Casellas, 2012).

En el Ecuador, los últimos datos registrados de resistencia bacteriana fueron en el 2015, los cuales arrojaron que *P. aeruginosa* tiene una resistencia del 66,4% a Imipenem y un 67,9 % a M

eropenem (Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, 2015).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Caracterizar los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos tipo VIM en DNA extraído de aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Centro de Referencia Nacional a los Antimicrobianos en el 2016

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar el tipo de gen VIM presente en las muestras de DNA
- Estandarizar el protocolo para PCR de Punto Final para detección de gen Inti de tipo I
- Determinar la presencia del gen Inti de tipo I en las muestras de DNA

CAPITULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Características generales de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, ampliamente distribuido en la naturaleza encontrándose típicamente en ambientes húmedos, como el agua, suelo, plantas, frutas, verduras, y animales (Vandecabeye, Pérez, Merino, & Lifschits, 2000). *P. aeruginosa* mide aproximadamente de 0,5 a 1 µm de ancho por 3 a 4 µm de largo, posee un solo flagelo, pero en ocasiones puede presentar dos o tres. Producen dos pigmentos de importancia clínica como la piocianina, que puede colorear de azul verdoso el pus de una herida, y pioverdina (fluoresceína), pigmento amarillo verdoso que fluoresce bajo la luz ultravioleta, sin embargo, existen cepas no productoras de pigmento (Kinsa & Guillen, 2003).

Microbiológicamente *P. aeruginosa* es típicamente aerobia estricta, crece en diferentes medios sólidos tanto a 37 como a 42°C, son no fermentadoras de hidratos de carbono y son positivas a la prueba de oxidasa (De la Fuente, 2011).

El género *Pseudomonas* es bien conocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Es un microorganismo muy ubicuo que se puede encontrar en el suelo, materia orgánica en descomposición, vegetación y agua. Se encuentran también en el ambiente hospitalario en reservorios húmedos como en los equipos de terapia respiratoria, en los equipos de diálisis, alimentos e incluso en las soluciones desinfectantes (Morrison & Wenzel, 1984). La amplia distribución ambiental de esta bacteria esta favorecida por sus escasos requerimientos nutricionales para su desarrollo, incluso con capacidad de crecer en el agua destilada, ya que es capaz de utilizar muchos compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de nitrógeno (Kinsa & Guillen, 2003). Por tanto, tienen capacidad de crecer prácticamente en cualquier medio y de resistir la mayoría de los antimicrobianos empleados habitualmente. La morfología

de la colonia, la pigmentación y las propiedades de movilidad pueden ser bastante heterogéneas en *P. aeruginosa* (De la Fuente, 2011).

2.2 Infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAS)

Las infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAS) representan un problema de salud por ser la principal causa de morbilidad y mortalidad, así como de la prolongación de la estancia hospitalaria y del elevado costo del tratamiento (Begué, Goide, Frías, Domínguez, & Leyva, 2015).

Una IAAS es una infección localizada o sistémica que se desencadena a partir de una reacción adversa a la presencia de uno o varios agentes infecciosos o sus toxinas, sin que haya evidencia de su presencia previa a la admisión en el centro de atención en salud respectivo y se manifiesta al menos 48 horas después de la admisión (Pacheco, Gutiérrez, & Gómez, 2014).

Hay cuatro tipos principales de IAAS, todas asociadas a procedimientos invasivos o quirúrgicos: Infección de tracto urinario asociada al uso de catéter (ITU-CA), Neumonía asociada al uso de ventilador (NAV), Infección de sitio quirúrgico (ISQ) e Infección del torrente sanguíneo asociada al uso de catéter (ITS-CVC) (Valdés & Leyva, 2013).

Los tres grupos de factores de riesgo para IAAS son: factores huésped, factores agentes y factores ambientales (Begué, Goide, Frías, Domínguez, & Leyva, 2015).

Un patógeno puede viajar por una ruta única o puede transmitirse por varias vías: el contacto es el modo de transmisión de IAAS más importante y frecuente; y puede ser contacto directo entre superficie corporal y superficie corporal, contacto indirecto que involucra el contacto entre un huésped susceptible y un objeto intermedio, transmisión por gotitas y transmisión por vectores animales o artrópodos (Pacheco, Gutiérrez, & Gómez, 2014).

2.3 Mecanismos de Resistencia a Antibióticos

Las bacterias pueden presentar una resistencia intrínseca o natural a determinados antibióticos (Normak & Normak, 2002) o pueden adquirir dicha resistencia mediante mutaciones o estar mediada por fenómenos de transferencia y adquisición génica que aporte nuevas funcionalidades bioquímicas hasta ser capaces de proteger o modificar el blanco de acción o de modificar los antibióticos (Davies, 2004).

En el ambiente hospitalario y más concretamente en las UCIs existe una elevada proporción de infecciones adquiridas causadas por microorganismos denominados “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) que son resistentes a los antibióticos (Boucher, y otros, 2009)

Infecciones nosocomiales y comunitarias por *P. aeruginosa* representan un desafío terapéutico importante, ya que presenta resistencia natural (por baja permeabilidad de su membrana externa, expresión constitutiva de bombas de flujo y de β -lactamasa cromosomal AmpC) frente a agentes antibacterianos no relacionados estructuralmente, dicha resistencia incluso puede ser adquirida durante la terapia antibiótica (Suárez, Kattán, Guzmán, & Villegas, 2006).

Estudios epidemiológicos han demostrado que infecciones causadas por cepas resistentes están relacionadas con el incremento en las tasas de morbi-mortalidad, y que la exposición a cualquier antibiótico antipseudomana como monoterapia es el principal factor de riesgo para que el desarrollo de resistencia antimicrobiana, otros factores son la hospitalización y estados de inmunocompromiso (Gante & Gines, 2011).

Los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* comprenden: presencia de β -lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de

membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales (Gómez, Leal, Pérez, & Navarrete, 2005).

La producción de enzimas metalo- β -lactamasas (MBLs) es uno de los principales mecanismos de resistencia con alta implicancia epidemiológica en *P. aeruginosa* debido a su capacidad de diseminación horizontal. Estas enzimas se caracterizan por presentar un amplio perfil de sustratos, que incluye penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, pero no hidrolizan a los monobactámicos (aztreonam) y su actividad es inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y otros quelantes de iones metálicos, lo cual limita las opciones terapéuticas e incrementa la morbi-mortalidad (Guevara, Sierra, & de Waard, 2012).

Mecanismos de resistencia menos frecuentemente documentados incluyen la resistencia a quinolonas asociadas a mutaciones de los sitios blanco. La mutación de la topoisomerasa tipo II, sitio blanco de ciprofloxacina, confiere una resistencia aislada a esta quinolona, sin embargo epidemiológicamente este mecanismo se considera menos importante, debido a que en el medio hospitalario el aumento de la resistencia a ciprofloxacina, está asociado con mayor frecuencia a bombas de expulsión que tienen como sustrato a este antibiótico como lo muestra la Figura 1. (Mouneimné, Robert, Jarlier, Cambau, Fridland, & Sahm, 2001).

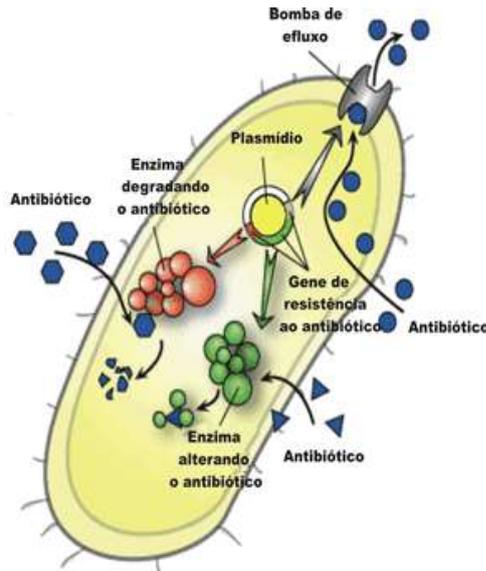


Figura 1. Principales Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos (Sandle, 2016).

2.3.1 Fenotipos y mecanismos de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos

El fenotipo susceptible en *P. aeruginosa* (wild-type) incluye sensibilidad frente a carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (azlocilina, piperacilina), algunas cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefsulodin, cefoperazona), la totalidad de cefalosporinas de cuarta generación, el monobactámico aztreonam y los carbapenémicos imipenem y meropenem. La resistencia natural/intrínseca en esta bacteria se presenta frente a bencilpenicilina, aminopenicilinas (incluyendo combinaciones con inhibidores para β -lactamasa) y cefalosporinas de primera y segunda generación (Strateva & Yordanov, 2009).

P. aeruginosa presenta cuatro fenotipos básicos de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos: i) un primer fenotipo de resistencia intrínseco a carbenicilina, presenta un incremento en 4-8 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la mayoría de los antibióticos β -lactámicos (incluyendo meropenem), sin producción de β -lactamasa cromosomal AmpC, y resistencia frente a antibióticos no β -lactámicos; ii) el segundo

fenotipo presenta resistencia a la totalidad de β -lactámicos, excepto cefalosporinas de cuarta generación (cefepime y cefpirome) y carbapenémicos; iii) en el tercer fenotipo, la resistencia a penicilinas (ticarcilina, azlocilina y piperacilina) es mayor que la presentada frente a cefalosporinas, como resultado de la producción de β -lactamasas tipo OXA; iv) el cuarto fenotipo se caracteriza por CMLs aumentadas frente a carbapenémicos, no presentándose resistencia frente a otros β -lactámicos, debido a que este fenotipo posee un nivel disminuido de OprD; otros fenotipos de resistencia están determinados, principalmente, por la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y se manifiestan también por resistencia a penicilinas y a cefalosporinas (Gómez, Leal, Pérez, & Navarrete, 2005).

En *P. aeruginosa*, los posibles mecanismos determinantes de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos pueden presentarse simultáneamente o de manera combinada (Strateva & Yordanov, 2009).

2.3.2 Inactivación enzimática

En *P. aeruginosa*, la producción de β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia adquirida frente a antibióticos β -lactámicos; estas enzimas rompen el enlace amida en el anillo β -lactámico del antibiótico, impidiendo su actividad (Gómez, Leal, Pérez, & Navarrete, 2005). Se reconocen cuatro clases de enzimas (clases A, B, C y D), de acuerdo a su clasificación molecular correlacionadas con su clasificación funcional (Strateva & Yordanov, 2009).

β -lactamasas Clase A

En *P. aeruginosa* se han descrito cuatro β -lactamasas (CARB-1-4) capaces de hidrolizar carbenicilina, con un perfil de sustrato que incluye carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y cefsulodin. BLEE clase A, generan

resistencia extra a cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima, cefepime, cefpirome) y aztreonam, con baja afinidad por carbapenémicos; también se han identificado otros tipos enzimáticos (PER, VEB, GES/IBC y BEL), similares en su perfil de hidrólisis, pero con baja identidad a nivel genético (Strateva & Yordanov, 2009).

β-lactamasas Clase B

Carbapenemasas o metalo-β-lactamasas (tienen zinc²⁺ en su centro activo), presentan resistencia frente a casi todos los antibióticos β-lactámicos, incluyendo los carbapenémicos imipenem y meropenem; excepto el monobactámico aztreonam. No son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam, pero sí por la acción de queladores iónicos bivalentes (EDTA). En *P. aeruginosa* se han identificado enzimas metalo-β-lactamasas tipo IMP, VIM, SPM y GIM, sus genes codificantes presentan una ubicación cromosomal y extracromosomal (Strateva & Yordanov, 2009).

Las metalo-β-lactamasas tipo VIM (VIM-1), se detectó por vez primera en *P. aeruginosa* en Verona, de ahí el origen de sus siglas Veronese Imipenemase (Laurettili, y otros, 1999). Sin embargo, se considera que VIM-2 es la carbapenemasa más común en todo el mundo (Maguire, Brown, Gray, & Desselberger, 2001). En *P. aeruginosa* se han detectado todos los tipos de VIM, con las excepciones de VIM-12, un híbrido entre VIM-1 y VIM-2, y que solo se ha detectado en *Enterobacteriaceae* (Pournaras, y otros, 2005). 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 & Bush, 2007).

Respecto al espectro de hidrólisis, VIM-1 parece hidrolizar mejor a prácticamente todos los β-lactámicos que VIM-2, lo cual parece explicarse

por cambios de aminoácidos cercanos o en el propio centro activo de la enzima (Docquier, Lamotte- Brasseur, Galleni, Amicosante, Frére, & Rossolini, 2003).

β -lactamasas Clase C

P. aeruginosa produce una β -lactamasa inducible y codificada cromosomalmente (AmpC) como algunas especies de la familia Enterobacteriaceae; esta enzima es producida en baja cantidad, presentando resistencia a aminopenicilinas y a la mayoría de las primeras cefalosporinas sintetizadas; sin embargo, puede adquirir resistencia a cefalosporinas de tercera generación a través de la hiperproducción de β -lactamasa AmpC en presencia de un antibiótico β -lactámico inductor (especialmente imipenem). Esta enzima es codificada por el gen ampC y los mecanismos regulatorios de su expresión en *P. aeruginosa* son similares a los estudiados en detalle para *Enterobacter cloacae*, con muchos genes involucrados en su inducción e íntimamente relacionados al mecanismo de reciclaje del peptidoglicano.

Sin embargo, no se han identificado genes codificantes plasmídicos para esta enzima (Strateva & Yordanov, 2009).

β -lactamasas Clase D

P. aeruginosa produce enzimas tipo OXA-1, OXA-2, OXA-10 que presentan resistencia a carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, pero no a ceftazidima, aztreonam y moxalactam. La mayoría de oxacilinas de espectro extendido están codificadas en genes localizados en plásmidos o integrones, favoreciendo su diseminación y prevalencia aumentada (Gómez, Leal, Pérez, & Navarrete, 2005).

2.3.3 Eflujo activo

P. aeruginosa posee un complejo enzimático llamado MexAB- OprM, se compone de una proteína bomba en la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa; tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y contra un gradiente de concentración a lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim (Strateva & Yordanov, 2009).

En *P. aeruginosa*, esta resistencia es mediada por 4 sistemas de eflujo activo (de tres componentes) genéticamente diferentes: MexA-MexB-OprM (Figura 2), MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN y MexX-MexY-OprM. Las bombas de eflujo están formadas por proteínas formadoras de canal en membrana externa (OMFs), un antiporter asociado a membrana interna (RND) y una proteína de fusión en el espacio periplásmico (MFP) (Lister, Wolter, & Hanson, 2009). Los sistemas de eflujo MexA-MexB-OprM y MexX-MexY-OprM participan en resistencia natural y adquirida, mientras que MexC-MexD-OprJ y MexE-MexF-OprN actúan solo en resistencia adquirida (Gómez, Leal, Pérez, & Navarrete, 2005).

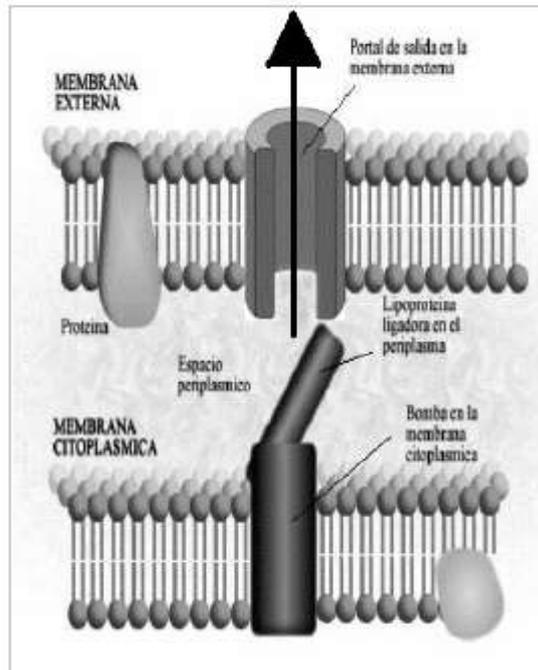


Figura 2. Bomba de Eflujo (Gómez, Leal, Pérez, & Navarrete, 2005)

2.3.4 Permeabilidad alterada

P. aeruginosa posee una porina de membrana llamada OprD cuyo papel primitivo es permitir la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa, sin embargo, también permite la entrada de antibióticos carbapenémicos (Ochis, McCusker, Bains, & Hancock, 2009). La mutación del gen OprD se sospecha ante una cepa francamente resistente a imipenem con susceptibilidad reducida o preservada a meropenem y sin afectar a otros β -lactámicos (Strateva & Yordanov, 2009).

2.3.5 Modificación del sitio blanco

Uno de los mecanismos más inusuales de resistencia en *P. aeruginosa* involucra la modificación de su sitio blanco, mediante la síntesis de

Penicillin-Binding Proteins (PBPs) con baja afinidad por β -lactámicos (Asli, Brouillete, Krause, Nichols, & Malouin, 2015).

2.4 Bases Genéticas de la Resistencia

Muchas resistencias intrínsecas encontradas en *P. aeruginosa* no poseen una base genética específica, y estas pueden deberse a mutaciones o a la adquisición de nuevos genes por transferencia horizontal (Normak & Normak, 2002).

2.4.1 Mutación

La mutación espontánea aporta una subpoblación resistente que será seleccionada en presencia del antibiótico, sin embargo la tasa de mutación se incrementa en presencia del agente selectivo (Strateva & Yordanov, 2009). Las mutaciones más frecuentes son las que afectan a la estructura molecular del sitio de acción del antibiótico, también existen mutaciones que modifican la pared o la membrana de modo que el antibiótico no se transporta al interior de la célula, y las que inducen la superproducción de proteínas de membrana encargadas de expulsar el antibiótico al exterior de la célula (Normak & Normak, 2002). La mutación espontánea depende del índice de mutación génica y de los sistemas bacterianos de reparación de ADN (Strateva & Yordanov, 2009).

2.4.2 Transferencia horizontal

La transferencia horizontal permite a las bacterias adquirir material genético de otras células o del entorno y con ello aumentar sus capacidades bioquímicas, y constituye el mecanismo principal para la adquisición de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos (Normak & Normak, 2002).

La transferencia génica entre bacterias se puede llevar a cabo por tres mecanismos naturales: la conjugación, la transducción y la transformación (Alanis, 2005).

La resistencia antimicrobiana en *Pseudomonas aeruginosa* es de gran interés porque, además de su creciente implicación con infecciones graves, su resistencia es consecuencia de diversos mecanismos, desde la resistencia intrínseca a la adquisición de genes por transferencia horizontal mediada por elementos genéticos móviles (Normak & Normak, 2002).

Los plásmidos, los transposones conjugativos y los integrones son vehículos y estructuras para la movilización, adquisición y propagación de genes de resistencia (Fonseca, Vieira, Cipriano, & Vicente, 2005).

2.1 Elementos móviles de diseminación de genes resistentes a los antimicrobianos

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 (Naik, Shashidhar, Rath, Bandekar, & Rath, 2017).

2.1.1 Plásmidos

Un plósmido es una unidad de ADN extracromosómico de tamaño variable (1->100kb) que se replica de forma autónoma y autorregulada, y que puede ser movilizado entre diferentes células bacterianas a través de un proceso denominado conjugación (Kottara, Hall, Harrisom, & Brockurst, 2017).

La mayoría de los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena sin extremos libres, es decir, cada nucleótido de cada hebra esta unido de forma covalente al siguiente (Elmore, Furches, Wolff, Gorday, & Guss, 2017).

La participación de los plásmidos en el soporte y movilización de genes deresistencia antibiotica y otros componentes tóxicos, en la mayoría de especies bacterianas de interés médico esta 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 (Kottara, Hall, Harrisom, & Brockurst, 2017). La secuenciación completa de plásmidos ha llevado al conocimiento de otras piezas fundamentales en la movilizacion genética, como son los transposones e integrones presentes en los mismos, y de como estos participan tambien en la transmisión de la resistencia a agentes antimicrobianos (Cantón, Valverde, Novais, Baquero, & Coque, 2007).

2.1.2 Transposones

Los transposones son elementos geneticos moviles que tienen habilidad de moverse tanto intra- como inter-molecularmente entre diferentes tipos de secuencias de ADN (Naik, Shashidhar, Rath, Bandekar, & Rath, 2017).

Al movimiento de un transposon 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 (Subedi, Vijay, & Willcox, 2017)

2.5.1. Integrones

La estructura básica que define al integrón consiste en un gen *IntI* que codifica una integrasa de la familia de las tirosinas recombinasas, encargada de catalizar la inserción o escisión específica de genes en casete (Ortega & Zurita, 2013)

La integración ocurre en un segundo elemento genético adyacente al gen *IntI*, *attI* que es el sitio primario de recombinación (Collis & Hall, 1992). Y para asegurar la expresión de los genes insertados, un integrón funcional contiene uno o dos promotores en el gen de la integrasa o la secuencia *attI* (Jove, Denis, Mazel, & Ploy, 2010)

Los casetes insertados constituyen la parte variable del integrón y en principio se pueden insertar un número indefinido de genes en casete en la región variable de un integrón, su estructura consta de dos elementos funcionales: un marco de lectura abierto (open reading frame, orf), que frecuentemente carece de promotor, y un sitio de recombinación *attC*, contiene dos secuencias palindrómicas imperfectas, las cuales son reconocidas por la integrasa para iniciar la recombinación como se muestra en la Figura 3 (Ortega & Zurita, 2013)

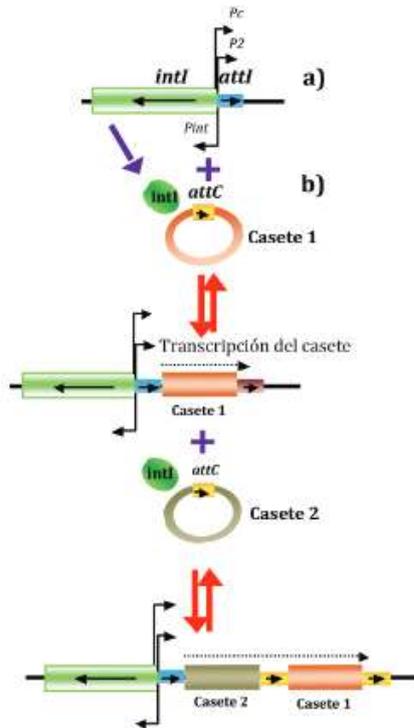


Figura 3 Estructura básica de los integrones, casetes genéticos y esquema de la recombinación sitio – específica. a) Plataformas de recombinación. b) Cassetes genéticos (Cambray, Guerout, & Mazel, 2010)

Actualmente están descritas hasta 9 clases de integrones definidas sobre la base de la secuencia de la integrasa, pero si hablamos de aquellas relacionadas con la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos, encontramos solo 5 grupos o clases de integrones (Rapa & Labbate, 2013). Estas 5 clases han sido encontradas ligadas a elementos móviles como secuencias de inserción, transposones y plásmidos conjugativos, que permiten la transmisión del material genético contenido en los integrones (Mazel, Dychinco, Webb, & Davies, 2000).

La clase 1 es la más comúnmente encontrada entre bacterias patógenas resistentes a los antibióticos. Entre un 22 % - 59% de los aislados clínicos de bacterias Gram negativas portando un integrón, contienen el integrón tipo 1 (Maguire, Brown, Gray, & Desselberger, 2001). Aunque la mayoría de los integrones tipo 1 han sido hallados en bacterias Gram negativas en

miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* y *Vibrio*, cada vez hay más estudios que vinculan esta clase de integrones con bacterias Gram positivas como *Corynebacteria*, *Aerococci*, *Brevibacteria* y *Staphylococci* (Naik, Shashidhar, Rath, Bandekar, & Rath, 2017).

La integrasa tipo 1 reconoce el sitio de recombinación attI presente en el integrón, attC de los cassettes génicos, así como otros sitios secundarios de recombinación (Rapa & Labbate, 2013). Los integrones tipo 1 están relacionados con transposones funcionales y no funcionales derivados de la familia de los Tn402, que han sido embebidos en largos transposones como el Tn21 (Maguire, Brown, Gray, & Desselberger, 2001).

La mayoría de los cassettes que portan genes de Introducción 35 resistencia a los antibióticos están incluidos dentro de la estructura de un integrón tipo 1. Entre ellos podemos destacar aquellos cassettes que confieren -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, quinolonas, entre β resistencia a muchos otros como lo muestra en la figura 4 (Mazel, Dychinco, Webb, & Davies, 2000).

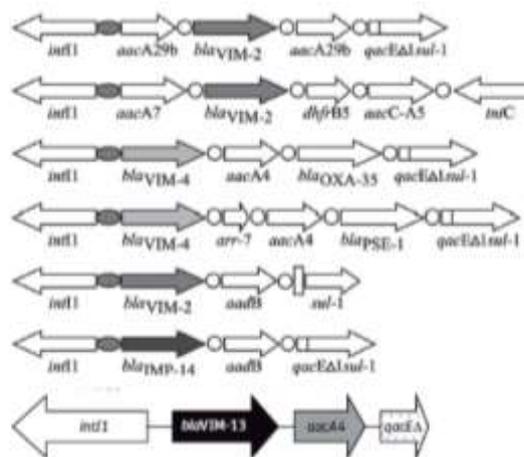


Figura 4. Ejemplos de integrones de clase I que albergan en su región variable a genes de resistencia a carbapenémicos y aminoglucósidos (Mazel, Dychinco, Webb, & Davies, 2000)

2.6 Identificación de carbapenemasas

2.6.1 Pruebas fenotípicas

El disco de EDTA, es empleado en la detección fenotípica de Metallo- β -lactamasa (MBLs), por el método de triple disco, el cual consiste en colocar, sobre una placa de agar Mueller-Hinton inoculado con la cepa problema, un disco que contiene un agente quelante (EDTA, SMA, ácido dipicolínico o ácido 2-mercaptopropiónico) rodeado por un disco de imipenem y otro de meropenem (Navarro, Calvo, Fernández, & Mirelis, 2011). Esta prueba es positiva si se observa un aumento del halo de inhibición o la presencia de una zona de inhibición entre el imipenem y/o el meropenem y el agente quelante (Nordmann, Poirel, Carrer, Toleman, & Walsh, 2011).

Este mismo principio se utiliza con las tiras de Etest que en un extremo contienen imipenem y en el otro imipenem con EDTA (Navarro, Calvo, Fernández, & Mirelis, 2011).

2.6.2 Pruebas colorimétricas

El sistema automatizado VITEK permite la identificación bacteriana a través de colorimetría avanzada, este sistema se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas y también se puede determinar la sensibilidad antimicrobiana a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por CLSI (Romeu, 2010).

2.6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los métodos moleculares más ampliamente utilizados son los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. La PCR es sin duda la técnica más ampliamente adoptada, incluyendo sus muchas variaciones, como PCR convencional, PCR en tiempo real y PCR multiplex. Se ha explicado el que el desarrollo de métodos de diagnóstico molecular, especialmente los que utilizan PCR, ha contribuido en gran medida a la identificación y control de estos patógenos, aumentando la velocidad de diagnóstico, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad e interpretación (Stensvold, Ahmed, Adersen, & Nielsen, 2012). La optimización de la PCR convencional se complica por la naturaleza impredecible de las reacciones, donde incluso pequeñas variaciones en cualquiera de los factores pueden tener un efecto sobre el amplicón resultante (Rahman, Uddin, Sultana, Moue, & Setu, 2013).

PCR es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es amplificar un fragmento de DNA particular delimitado por un par de cebadores. La PCR se basa en la síntesis de cebadores de polaridad opuesta y de secuencia complementaria a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA de doble cadena que queremos amplificar. Para llevar a cabo la amplificación, este método se basa en tres reacciones sucesivas que tienen lugar a diferente temperatura: desnaturalización, hibridación y elongación. Estos tres pasos se repiten un número determinado de veces con el fin de conseguir millones de copias de la secuencia original (Bricker, 2005).

Las muestras utilizadas para realizar la PCR han sido principalmente cultivos animales, tejidos humanos y productos de origen animal como leche, y exudados vaginales u órganos, así como muestras de sangre contaminada, que son más adecuadas por ser más fáciles de obtener y su disponibilidad es perenne, a diferencia de la leche o los exudados (Ilhan, 2008)

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Instituciones

El presente trabajo de investigación fue desarrollado gracias a la cooperación entre el Laboratorio del Centro Nacional de Referencia de Resistencia a los Antimicrobianos y el Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de la Parasitosis Desatendida en el Ecuador (PROPAD).

3.2 Tamaño de la población

Se utilizaron 21 muestras de DNA extraídas de aislados clínicos de *P. aeruginosa* con resistencia a los carbapenémicos que presentaron un halo de inhibición menor a 15 mm a Imipenem y Meropenem según CLSI, recolectadas durante el año 2016 (Clinical & Laboratory Standards Institute, 2017), y previamente caracterizadas con el gen tipo VIM mediante PCR de punto fina. El DNA fué extraído por el método de calentamiento y almacenado en solución TBE a - 20 °C. La calidad del DNA se evaluó utilizando espectrofotometría en el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, USA). Se efectuaron mediciones de absorbancia y se obtuvieron las relaciones 260/280 y 260/230, para analizar la presencia de contaminantes proteínicos y orgánicos que todas las muestras tenían una concentración superior a 200 ng/ µl. La concentración deseada se alcanzó por medio de diluciones con TBE.

3.5 Amplificación de gen VIM

Se realizó una PCR punto final (PCR_{Rep}) para la detección del gen VIM mediante la amplificación del gen, que generan un amplicon con un tamaño de 766 pares de bases, por medio de los cebadores específicos, que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Especificaciones de los cebadores para el gen VIM de *P. aeruginosa*

Primer Forward	5'TGGTCTACATGACCGCGTCT3'
Primer Reverse	5'CGACTGAGCGATTTGTGTG3'
Fuente	(Touati, Diene, Dekhil, Djahoudi, Racherache, & Rolain, 2013) doi: 10.1128/AAC.00032-13

Se utilizó el kit comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, USA) para la optimización de la PCR y caracterización del gen VIM. La concentración final de los diferentes componentes de la reacción para la amplificación fue: 10 uL de Agua de Grado Molecular, 1uL de cada cebador, 12 uL de GoTaq® Green Master Mix (2x) y 1 uL de ADN, para una reacción final de 25 uL.

La PCR fue realizada en el termociclador Bio-Rad modelo CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), una vez determinadas las mejores condiciones se procedió a la amplificación mediante termociclación con una temperatura inicial de desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos, un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos, una temperatura de 60 °C de hibridación durante 30 segundos, una temperatura de elongación de 72°C durante 1 minuto, estos ciclos se repitieron 30 veces, una elongación final a 72°C durante 5 minutos, y finalmente una temperatura de 4°C durante 10 minutos para detener la reacción.

El ADN utilizado como control positivo fue el de una de las muestras, además se incluyó un control negativo NTC (no template control) incluyendo todos los reactivos y colocando agua en lugar de ADN para

verificar que no exista presencia de contaminantes que pueden invalidar los resultados.

3.6 Estandarización de la Identificación del Integron clase I por Real – Time PCR en DNA bacteriano

La optimización de la PCR es crucial para obtener resultados fiables. Para la cual es importante variar uno de los parametros que se sabe contribuyen a la fidelidad de la técnica (Roux, 2009). Un paso crítico es el alineamiento de los cebadores con sus secuencias diana, ya que tiene que ocurrir a una temperatura y concentración correctas, evitando la no especificidad y la formación de dímeros (Taylor, Wakem, Dijkman, Alsarraj, & Nguyen, 2010).

La optimización de la PCR se realizó probando diferentes gradientes de temperatura y concentraciones de los cebadores, variando un parámetro a la vez, para encontrar las condiciones óptimas para la reacción. Se utilizaron cebadores específicos, que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Especificaciones de los cebadores para el gen INTI de *P. aeruginosa*

Primer Forward	5´TAAA ACC GCC ACT GCG CCG TTA 3´
Primer Reverse	5´ GAA GAC GGC TGC ACT GAA CG ´
Fuente	(Fonseca, Vieira, Cipriano, & Vicente, 2005) doi: 10.101628

El ADN utilizado como control positivo fue el de una de las muestras, además se incluyó un control negativo NTC (no template control) incluyendo todos los reactivos y colocando agua en lugar de ADN para

verificar que no exista presencia de contaminantes que pueden invalidar los resultados.

Se utilizó el kit comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, USA) para la optimización de la PCR y caracterización del gen INTI I. La concentración final de los diferentes componentes de la reacción para la amplificación fue: 10,5 uL de Agua de Grado Molecular, 0,75 uL de cada cebador, 12 uL de GoTaq® Green Master Mix (2x) y 1 uL de ADN, para una reacción final de 25 uL.

La PCR fue realizada en el termociclador Bio-Rad modelo CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), una vez determinadas las mejores condiciones se procedió a la amplificación mediante termociclación con una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 55°C durante 30 segundos, una temperatura de elongación de 72°C durante 1 minuto, estos ciclos se repitieron 35 veces, una elongación final a 72°C durante 5 minutos, y finalmente una temperatura de 4°C durante 10 minutos para detener la reacción y observado en gel de agarosa.

3.7 Amplificación de integrones clase I

En la Tabla 3 podemos ver las condiciones de amplificación y los cebadores utilizados en las PCRs llevadas a cabo para detectar la presencia de integrasas de tipo 1.

La amplificación se realizó con una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 55°C durante 30 segundos, una temperatura de elongación de 72°C durante 1 minuto, estos ciclos se repitieron 35 veces,

una elongación final a 72°C durante 5 minutos, y finalmente una temperatura de 4°C durante 10 minutos para detener la reacción y observado en gel de agarosa.

3.8 Electroforesis en gel de agarosa

Para observar los resultados de las diferentes amplificaciones mediante PCR, los productos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% (p/v) con buffer tampón TBE (Tris-HCl, Ácido Bórico, EDTA 0,5 M pH=8) 1X y teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Se utilizó un marcador de peso molecular TrackIt™ 100bp DNA ladder (Invitrogen, Waltham, MA, USA) y se realizó la corrida durante 45 minutos a 120 voltios. La visualización se efectuó en el Fotodocumentador Gel Doc XR+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.9 Secuenciación de amplicones

Los productos de PCR fueron secuenciados por Macrogen Inc, Seoul, Korea. Las secuencias fueron editadas con Mega versión 7.0 y se buscaron homologías con las secuencias de nucleótidos que se encuentran en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

La limpieza de las secuencias se realizó mediante el programa Mega versión 7.0. Los alineamientos y análisis filogenéticos fueron hechos en Mega versión 7.0 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, and Kumar 2013).

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 ADN bacteriano

La concentración promedio fue de 172.1 ng/μL, la cual resultó óptima para los fines requeridos. Los promedios de los valores de absorbancia fueron de 1,87 para la relación 260/280 y 1.01 para la 260/230. En todas las muestras se llegó a una concentración de 50 ng/μl en todas las muestras

Tabla 3.- Concentración de DNA de muestras provenientes de aislados clínicos de *P. aeruginosa*

Muestra	Concentración de DNA (ng/uL)	260/280	260/230
84	130,7	1,87	0,98
	133,4	1,86	1
470	205,7	1,82	0,96
	198,1	1,81	0,95
498	178,4	1,84	1,05
	177	1,84	1,06
529	192,9	1,8	1,03
	191,6	1,81	1,03
532	166,4	1,86	0,85
	170,7	1,84	0,99
574	249,5	1,91	1,23
	251,7	1,91	1,22
575	111,8	1,79	0,99
	115,3	1,79	0,96
578	148,5	1,88	1
	147,5	1,87	1,03
579	174,5	1,87	1,11
	163,7	1,88	1,14
584	176,2	1,88	1,08
	172,3	1,9	1,08
585	170,6	1,9	1,04
	170,4	1,89	1,04
684	240,9	1,74	0,94
	233,1	1,91	1,12
686	208	1,92	1,03
	212,5	1,91	1,1
948	155,6	1,91	1,21
	157,9	1,9	1,18
970	54,3	1,85	0,98
	55,2	1,84	0,99

999	156,8	1,9	1,22
	156,9	1,91	1,26
1156	283,8	2,04	1,38
	280,8	2,04	1,38
1298	280,4	1,87	1,13
	277,7	1,87	1,11
1345	113,6	1,9	1,06
	113,8	1,91	1,05
1391	119,3	1,85	1,06
	121,1	1,84	1,04
1462	104,6	1,89	0,92
	103,4	1,9	0,93

4.2 Perfil de susceptibilidad de las 21 cepas

En el perfil de susceptibilidad de las cepas de estudio se observa una resistencia a diferentes familias de antibióticos, pero principalmente a Imipenem y Meropenem por lo que fueron categorizadas como resistentes a los carbapenémicos y positivas para el gen VIM.

Tabla 4: Perfil de susceptibilidad de 21 cepas caracterizadas en el CRN-RAM INSPI

Muestra	Tipo de muestra	Microorganismo	bla-VIM	bla-IMP	EDT	CAZ Halo mm	CIP Halo mm	GEN Halo mm	MEM Halo mm	IPM Halo mm	TZP Halo mm	ATM Halo mm
84	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	18	25	13	6	6	22	17
470	secreción herida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	18	24	13	7	6	20	20
498	secreción úlcera	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	17	21	9	10	6	19	20
529	úlceras	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	14	28	16	12	10	23	14
532	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	14	24	16	7	6	22	15
574	secreción úlcera	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	19	18	6	6	6	18	16
575	secreción toracotomía	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	17	21	12	6	6	17	19
578	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	14	26	13	6	6	29	20
579	sangre	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	7	12	6	14	13	21	15
584	orina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	6	6	16	6	6	18	15

585	secreción traqueal	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	-	+	14	37	22	18	9	31	15
684	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	6	6	6	6	6	11	17
686	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	6	6	6	6	6	13	20
948	secreción tibia derecha	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	12	6	14	6	6	14	21
970	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	6	10	---	6	6	10	17
999	sangre	<i>Pseudomonas spp.</i>	+	-	+	6	6	6	6	6	8	6
1156	líquido pleural	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	14	28	11	13	13	17	13
1298	orina	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	-	+	12	40	6	12	14	21	30
1345	secreción	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	12	6	6	6	6	12	16
1391	orina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	6	11	6	6	6	6	19
1462	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	12	6	13	6	6	20	23

Halo mm ceftazidima ≤ 14 (R), ciprofloxacina ≤ 15 (R), gentamicina ≤ 6 (R), meropenem ≤ 15 (R), imipenem ≤ 15 (R), tazobactam < 14 (R), azitromicina $<$ (R).

Todos los resultados del Perfil de susceptibilidad de las 21 cepas caracterizadas en el CRN-RAM INSPI fueron enviados a los hospitales para diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

4.3 Genes VIM en *P. aeruginosa*

Se amplificó el gen VIM en las 21 cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

En el primer ensayo el 90% de las cepas estudiadas fueron positivas para la amplificación del gen codificante de VIM como lo muestra la figura 5.

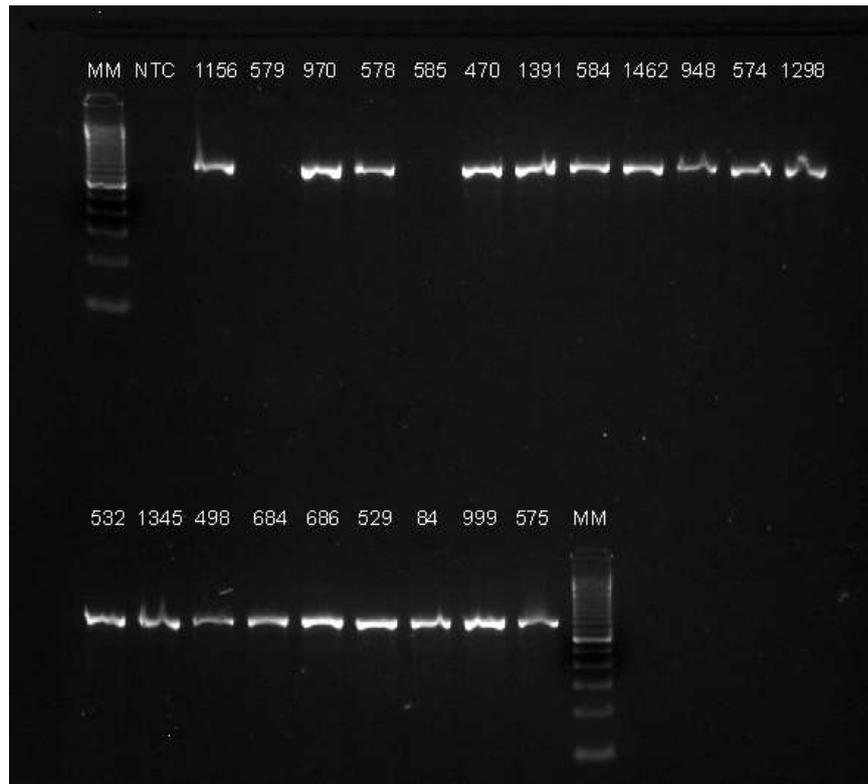


Figura 5. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control.

En el segundo ensayo se observó amplificación en las muestras 579 y 585 para el gen codificante de VIM como lo muestra la figura 6.



Figura 6. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control

4.4 Evaluación de distintas concentraciones de cebadores para la reacción en cadena la polimerasa punto final para el gen Inti I

Se probaron diferentes volúmenes de primers para la PCR, determinando que el volumen más apropiado es 0,75 μ l puesto que se observó una banda más clara y con menor inespecificidad, en la figura 7 se observa la prueba realizada para concentración de cebadores.



Figura 7. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control.

4.5 Identificación de Integron I en DNA extraído de cepas de *P. aeruginosa*

Una vez realizadas las pruebas de optimización se determinó una temperatura óptima de anillamiento para la PCR de 65°C en 30 ciclos, con una volúmen de cebadores de 0,75 uL, asegurando el anillamiento al templado sin inespecificidades, luego de la optimización, se determinó la presencia del material genético de Inti I en las muestras de ADN extraídas de *P. aeruginosa* por ausencia o presencia de la banda correspondiente. Se realizaron dos paneos de las muestras, puesto que en el primer paneo no se amplificó una muestra como lo muestra la Figura 8.

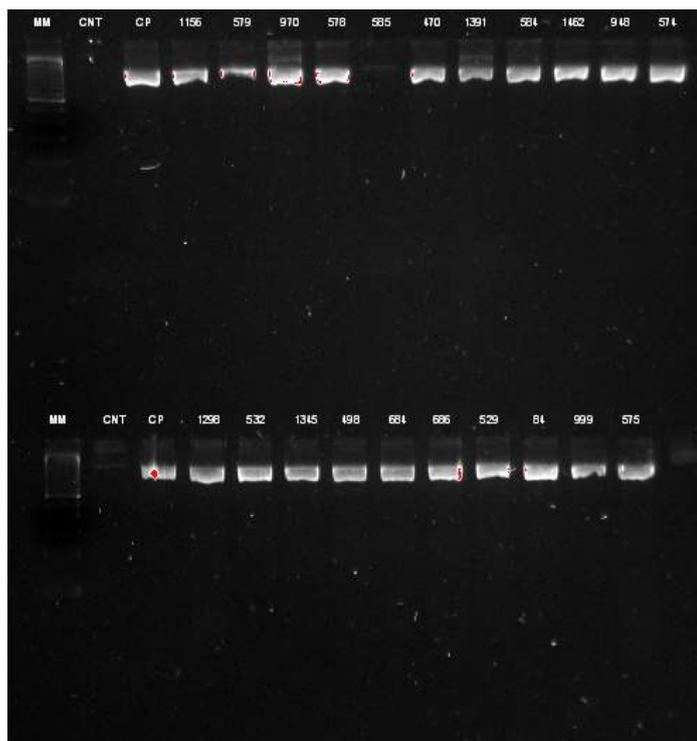


Figura 8. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control.

En el segundo ensayo el 100% de las cepas estudiadas fueron positivas para la amplificación del gen codificante de Inti I como lo muestra la figura 9.

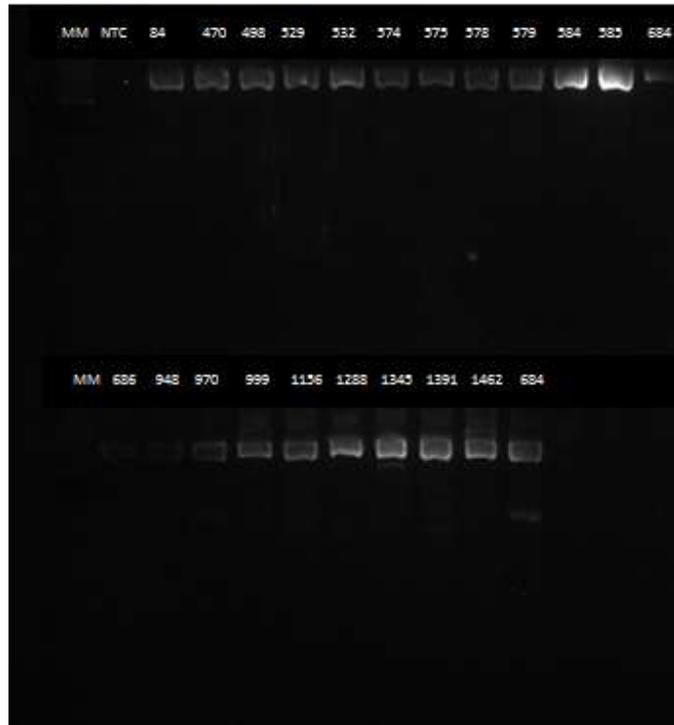


Figura 9. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (1000pb). NTC: no template control.

4.6 Secuencias génicas VIM

Para confirmar la identidad del gen VIM de los ensayos de PCR, estos productos se enviaron a secuenciar, obteniendo resultados que confirman la amplificación del fragmento correcto.

Al comparar estas secuencias con las secuencias de nucléotidos que se encuentran disponibles en el NCBI, la homología encontrada fue sólo con genes VIM tipo II.

En la Figura 10 se muestra el gen VIM II en *Pseudomonas aeruginosa* con una homología del 100% con el gen de las muestras del ensayo.

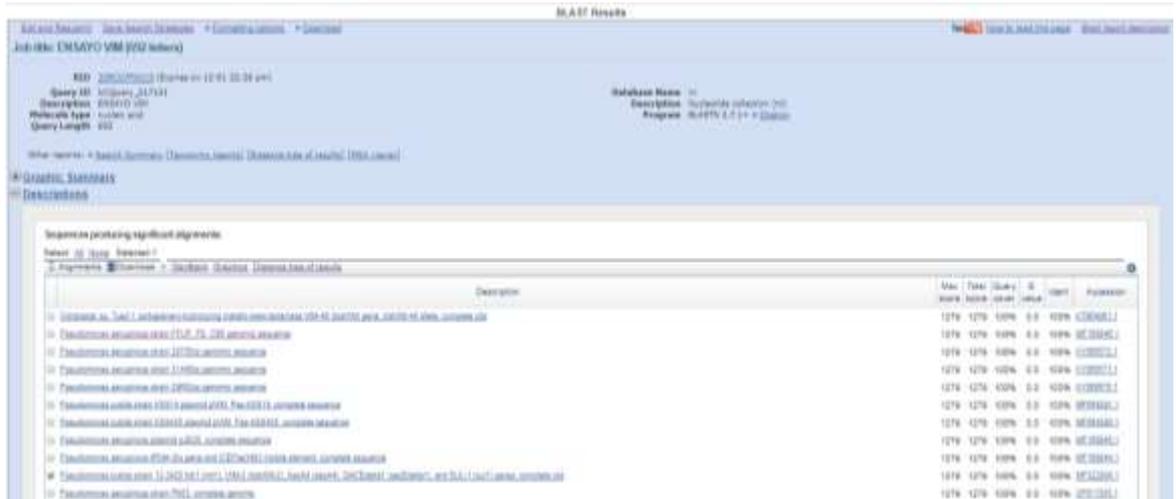


Figura 10. Homología de gen VIM con gen de ensayo

4.7 Secuencias del gen Inti I

Para confirmar la identidad del gen Inti I de los ensayos de PCR, estos productos se enviaron a secuenciar, obteniendo resultados que confirman la amplificación del fragmento correcto.

Al comparar estas secuencias con las secuencias de nucléótidos que se encuentran disponibles en Integrall (The Integron Database), y la homología encontrada fue con el gen que codifica la Integrasa I como lo muestra la Figura 11.

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
gnl P56A0A	idb1554	Pseudomonas aeruginosa IntI1	1744	0.0
gnl ZU157004	idbc9021	Klebsiella pneumoniae 5'CS	1744	0.0
gnl HE616910	idbc9035	Aeromonas sp. P261 5'CS	1744	0.0
gnl Q0393592	idbc9981	Achromobacter xylosoxidans 5'CS	1744	0.0
gnl Y18850	idb1746	Pseudomonas aeruginosa IntI1	1495	0.0
gnl Y14748	idb1748	Corynebacterium glutamicum IntI1	1495	0.0
gnl XNU37105	idb1471	Pseudomonas aeruginosa IntI1	1495	0.0
gnl X12870	idb11515	Escherichia coli IntI1	1495	0.0
gnl TRNH21165	idb11509	Shigella sonnei IntI1	1495	0.0
gnl PLPH05	idb1814	Escherichia coli Plasmid p5a IntI1	1495	0.0
gnl PAM48101	idb1350	Pseudomonas aeruginosa IntI1	1495	0.0
gnl NC_011017	idb11746	Klebsiella pneumoniae plasmid pKP90 ...	1495	0.0
gnl NC_010880	idb12397	Klebsiella pneumoniae plasmid pK245 ...	1495	0.0
gnl NC_010119	idbc6909	Salmonella enterica subsp. enterica ...	1495	0.0
gnl NC_008272	idb12609	IncP-epsilon plasmid pJK5 IntI1	1495	0.0
gnl NC_007100	idb1234	Pseudomonas aeruginosa IntI1	1495	0.0
gnl 106418	idb1185	Escherichia coli plasmid p060100 IntI1	1495	0.0
gnl XK486120	idbc9558	uncultured bacterium 5'CS	1495	0.0
gnl XK486126	idb12936	uncultured bacterium IntI1	1495	0.0
gnl XK486125	idb12917	uncultured bacterium IntI1	1495	0.0
gnl XK424423	idbc9587	Klebsiella pneumoniae 5'CS	1495	0.0
gnl XK424423	idb12943	Klebsiella pneumoniae IntI1...	1495	0.0
gnl XK141473	idbc9564	Aeromonas hydrophila 5'CS	1495	0.0
gnl X000541	idb12874	Proteus mirabilis IntI1	1495	0.0
gnl X0004407	idb12839	IncP-epsilon Plasmid pHH3408 IntI1...	1495	0.0
gnl X0004407	idb9291	IncP-epsilon Plasmid pHH3408 5'CS	1495	0.0
gnl X0004406	idb12838	IncP-epsilon Plasmid pHH128 IntI1...	1495	0.0
gnl X0004406	idbc9283	IncP-epsilon Plasmid pHH128 5'CS	1495	0.0
gnl X0040620	idbc9225	plasmid pRSB115 5'CS	1495	0.0
gnl X0040620	idb12825	plasmid pRSB115 IntI1	1495	0.0

Figura 11. Homología entre Inti I de Integral con gen de ensayo

Durante el estudio se determinó que todas las muestras del ensayo evidenciaban la presencia del gen VIM II y del gen Inti I como lo muestra la Tabla 5.

Tabla 5: Gen VIM II y gen Inti I en muestras de ensayo

Muestra	Tipo de muestra	Microorganismo	bla-VIM II	Inti I
84	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
470	secreción herida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
498	secreción úlcera	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	+
529	úlceras	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
532	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
574	secreción úlcera	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
575	secreción toracotomía	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
578	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
579	sangre	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
584	orina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+

585	secreción traqueal	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	+
684	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
686	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
948	secreción tibia derecha	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
970	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
999	sangre	<i>Pseudomonas spp.</i>	+	+
1156	líquido pleural	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
1298	orina	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	+
1345	secreción	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
1391	orina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
1462	secreción traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La resistencia a los carbapénmicos en *Pseudomonas aeruginosa* supone un gran problema ya que estos antibióticos son comunmente usados como agentes de primera línea en el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por esta bacteria (Casellas, 2012).

Se han reportado MBLs clínicamente relevantes en Europa y Asia, encontrándose también algunas subclases de VIM en Estados Unidos de Norteamérica. VIM-2 es la segunda metaloenzima hidrolizante de carbapenem caracterizada a partir de un aislado de *P. aeruginosa* en Francia (Poirel, y otros, 2000). Un gran número de *Pseudomonas* spp. Productoras de VIM-2 se han detectado en un hospital coreano desde 1995 (Lee, Lee, Uh, Yim, Cho, & Chong, 2003), también se han reportado reportes de brotes nosocomiales en los Estados Unidos de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* pan-resistentes debido a una metalo- β -lactamasa de origen integron, VIM-2 (Lolans, Queenan, Bush, Sahud, & Quinn, 2005). En Latinoamérica no habían sido descritas hasta 2003, fecha en que se identificó el gen blaVIM-2 codificante para la MBL VIM-2, en 1 cepa de *Pseudomonas fluorescens* de Chile y 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de Venezuela resistentes a imipenem (Pérez, y otros, 2008)

Para este estudio se seleccionaron muestras de DNA extraídas de aislados clínicos de la especie *P. aeruginosa* con resistencia a los carbapenémicos, catalogada así por presentar resistencia a al menos uno de los antibióticos carbapenémicos (Imipenem y Meropenem).

Se han identificado varias MBL adquiridas en *P. aeruginosa*, incluyendo las enzimas VIM, IMP, SPM, GIM, AIM, FIM y NDM. Los genes que

codifican estas MBL están asociados con elementos genéticos móviles, como secuencia de inserción región común (ISCR) elementos, transposones y plásmidos, y como gen casetes en estructuras de integrones (Moyo, y otros, 2105).

En *P. aeruginosa*, se descubrió que los alelos blaVIM se transportan en elementos móviles conocidos como cassettes de genes que se insertan en integrones de clase 1, en aislamientos de *P. aeruginosa* de Beijing, Hangzhou y Guangzhou se encontró cassettes de aacA4 [aac (6') - Ib] seguidos inmediatamente aguas abajo por blaVIM-2 (Pallecchi, Riccio, Docquier, Fontana, & Rossolini, 2001), en Shanghai se encontró que aacA4 fue el primer cassette, seguido de blaVIM-2 y aadB (Yu, Qu, Zhou, Wang, Li, & Walsh, 2006) . Debido a la asociación reportada entre VIM- 2 y de IntI I, se evidenció en este estudio la presencia de estos dos genes en las muestras de DNA.

En la investigación de las bases genéticas de *P. aeruginosa* multirresistente, un aspecto importante que se ha considerado es el integrón y los casetes génicos asociados, su papel en la adquisición horizontal y expresión de genes, así como también su función de reservorio de genes, se ha asociado con la aparición de resistencia a los antibióticos entre aislados clínicos de bacterias (Fonseca, Vieira, Cipriano, & Vicente, 2005).

Se han identificado varios elementos genéticos que participan en el reclutamiento y la transferencia de genes como plásmidos, transposones, secuencias de inserción (IS), bacteriófagos, elementos conjugativos integrativos (ICE), islas genómicas y, más recientemente, los integrones y cassettes genéticos (Casellas, 2012).

Las estructuras de integrones son frecuentes entre las cepas clínicas, pues éstas les permite almacenar, como casetes génicos en su región variable, genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos (Ruiz, López, Fusté, Martínez, & Viñas, 2011). La detección de integrones en muestras de DNA extraídas de aislados clínicos de *P. aeruginosa* reveló que todas las muestras portaban integrones de la clase 1.

A pesar de determinar una asociación entre el gen VIM II y el gen IntI I, en el presente estudio no se pudo describir si el gen VIM II estaba dentro del integrón y si existen más casetes génicos dentro del integrón caracterizado.

CONCLUSIONES

- Se identificó la presencia del gen VIM de tipo II en todas las muestras de DNA.
- La estandarización de la técnica de PCR tuvo énfasis en la determinación de la mejor temperatura de annealing y el volumen de primers para la identificación de la bacteria, así como también de la cuantificación de DNA.
- Se identificó la presencia asociada del gen IntI tipo I en todas las muestras de DNA.

RECOMENDACIONES

- Los programas de control deberían recurrir a pruebas moleculares para la confirmación de resistencia a carbapenémicos de *P. aeruginosa*.

BIBLIOGRAFIA

Alanis, A. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era. *Archives of Medical Research* , 697-705.

Asli, A., Brouillete, E., Krause, K., Nichols, W., & Malouin, F. (2015). Distinctive Binding of Avibactam to Penicillin* Binding Proteins of Gram-Negative and Gram- Positive Bacteria. *Antibiotic Agents Chemother* , 752-756.

Begué, N., Goide, E., Frías, N., Domínguez, E., & Leyva, R. (2015). Caracterización clinicoepidemiológica de las infecciones asociadas a la atención sanitaria en niños y adolescentes. *Medisan* , 1-4.

Bricker, B. (2005). Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for differentiation of Brucella abortus vaccine strains S19 and RB51. *Clinical Microbiology* , 59-67.

Boucher, H., Talbot, G., Bradley, J., Edwards, J., Gilbert, D., Rice, L., y otros. (2009). Bag bugs, no drugs: no ESKAPE An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* , 1-12.

Cantón, R., Valverde, A., Novais, A., Baquero, F., & Coque, T. (2007). Evolución y panorama actual de las BLEE. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* , 2-10.

Cambray, G., Guerout, A., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics* , 141-66.

Casellas, J. (2012). Resistencia a los antimicrobianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría* , 519-528.

Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos. (2015). *Datos de Resistencia Ecuador 2015*. Quito: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez".

Clinical & Laboratory Standards Institute. (29 de Noviembre de 2017). Recuperado el 29 de Noviembre de 2017, de Clinical & Laboratory Standards Institute: <https://clsi.org/>

Collis, C., & Hall, R. (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Molecular Microbiology* , 2875-85.

Davies, J. (2004). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* , 375-382.

De la Fuente, C. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead resistance. *Trends Microbiology* , 419-426.

Docquier, J., Lamotte- Brasseur, J., Galleni, M., Amicosante, G., Frère, J., & Rossolini, G. (2003). On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *Journal Antimicrob Chemoter* , 257-66.

Elmore, J., Furches, A., Wolff, G., Gorday, K., & Guss, A. (2017). Development of a high efficiency integration system and promoter library for rapid modification of *Pseudomonas putida* KT 2440. *Metab Enf Commun* , 1-8.

Fonseca, E., Vieira, V., Cipriano, R., & Vicente, A. (2005). Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon Region, Brazil. *Immunology & Medical Microbiology* , 303-309.

Gamero, M., García, A., Rodríguez, F., Ibarra, A., & Casal, M. (2007). Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Revista Española Quimioterapia* , 230-233.

Gante, E., & Gines, J. (2011). Pseudomonas aeruginosa y la Implicación de los Mecanismos de Resistencia. *Sociedad Médica de Culiacán* , 80-85.

Gómez, C., Leal, A., Pérez, M., & Navarrete, M. (2005). Mecanismos de Resistencia en Pseudomonas aeruginosa: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina Scielo* , 1-2.

Guevara, A., Sierra, C., & de Waard, J. (2012). Caracterización molecular de Pseudomonas aeruginosas resistentes a carbapenémicos provenientes de cuatro hospitales de Venezuela. *Rev Chilena Infectol* , 614-621.

Herrera , K., Espinoza, M., Mejía, Y., Zambrano, L., Silva, E., Rojas, J., y otros. (2007). Resistencia antimicrobiana en Hospitales nor-occidentales de Nicaragua. *Universitas* , 27-32.

Ilhan, Z. (2008). Comparison of culture and PCR for the detection of Brucella melitensis in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Microbiology* , 89-94.

Jove, T., Denis, F., Mazel, D., & Ploy, M. (2010). Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genetics* , 1000-93.

Kinsa, D., & Guillen, P. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: Murry.

Kluytmans, J. (2002). Prevenion and Control of Nosocomial Infections. *Surgical infections including burns* , 924-925.

Kottara, A., Hall, J., Harrisom, E., & Brockurst, M. (2017). Variable plasmid fitness effects and mobile genetic elemnt dynamics acriss Pseudomonas species. *Microbiol Ecol* , 1090-1093.

Lauretti, L., Riccio, M., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, A., Fontana, R., y otros. (1999). Cloning and characterization of bla Vim, a new integron- borne metallobeta- lactamase gene from Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* , 1548-90.

Lee, K., Lee, W., Uh, Y., Yim, G., Cho, J., & Chong, Y. (2003). VIM- and IM-Type Metallo- B- lactamase- Producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean Hospitals. *Emerging Infectious Diseases* , 868-871.

Lister, P., Wolter, D., & Hanson, N. (2009). Antibacterial-Resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* , 582-610.

Lolans, K., Queenan, A., Bush, K., Sahud, A., & Quinn, J. (2005). First Nosocomial Outbreak of Pseudomonas aeruginosa Producing an Integron- Borne Metallo- B- Lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrobial Agents Chemother* , 3538-3540.

Maguire, A., Brown, D., Gray, J., & Desselberger, U. (2001). Rapid Screening Technique for Class 1 Integrons in Enterobacteriaceae and Nonfermenting Gram- Negative Bacteria and Its Use in Molecular Epidemiology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 1022-1029.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V., & Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob Agents Chemother* , 1568-1574.

Mouneimné, H., Robert, J., Jarlier, V., Cambau, E., Fridland, I., & Sahm, D. (2001). Type II Topoisomerase Mutation in Ciprofloxacin - Resistant

Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemother* , 87-102.

Moyo, S., Haldorsen, B., Aboud, S., Blomberg, B., Maselle, S., Sundsfjord, A., y otros. (2015). Identification of VIM-2- Producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania IS Associated with Sequence Types 244 and 640 and the Location of blaVim-2 in a TniC Integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 682-685.

Naik, O., Shashidhar, R., Rath, D., Bandekar, J., & Rath, A. (2017). Characterization of multiple antibiotic resistance of culturable microorganisms and metagenomic analysis of total microbial diversity of marine fish sold in retail shops in Mumbai, India. *Environment Science Pollut Rest* , 0945-0947.

Navarro, F., Calvo, J., Fernández, F., & Mirelis, B. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos*. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Normak, B., & Normak, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal International of Medicine* , 91-106.

Nordmann, P., Poirel, L., Carrer, A., Toleman, M., & Walsh, T. (2011). How to detect NDM-1 producers. *Journal Clinical Microbiology* , 718-721.

Ochis, M., McCusker, M., Bains, M., & Hancock, R. (2009). Negative Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Porin OprD Selective for Imipenem and Basic Amino Acids. *Antimicrob Agents Chemother* , 1085-1090.

Organización Mundial de la Salud. (2014). *Informe Mundial de la OMS sobre la Resistencia a los Antibióticos*. Ginebra: OMS.

Ortega, D., & Zurita, J. (2013). Integrones: plataformas bacterianas de recombinación genética y su influencia en la resistencia bacteriana. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* , 1-19.

Pacheco, V., Gutiérrez, D., & Gómez, M. (2014). Vigilancia epidemiológica de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria. *Revista Ciencias Médicas* , 1561-19594.

Pallecchi, L., Riccio, M., Docquier, J., Fontana, R., & Rossolini, M. (2001). Molecular heterogeneity of bla (VIM)- containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo-beta-lactamase. *FEMS Microbiology* , 145-150.

Pérez, A., García, P., Poggi, H., Braun, S., Castillo, C., Román, C., y otros. (2008). Presencia de metalo-B- lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem. *Reevista Médica Chile* , 423-432.

Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J., y otros. (2000). Characterization of Vim-2, a Carbapenem- Hydrolyzing Metallo- B. Lactamase and Its Plasmid-and- Integron- Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 891-897.

Pournaras, S., Iknomidis, A., Tzouvelekis, L., Tokatlidou, D., Spanakis, N., Maniatis, A., y otros. (2005). VIM 12, a novel plasmid- mediates metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* , 5153-56.

Queenan, A., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology* , 440-58.

Rahman, M., Uddin, M., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal* , 41-45.

Rapa, R., & Labbate, M. (2013). The function of integron- associated gene cassettes in *Vibrio* species: the tip of the iceberg. *Front Microbiology* , 384-385.

Reboli, A., Houston, E., Monteforte, J., Wood, C., & Hamill, R. (1994). Discrimination of Epidemic and Sporadic Isolates of *Acinetobacter baumannii* by Repetitive Element PCR-Mediated DNA FINGERPRINTING. *Journal of Clinical Microbiology* , 2635-2640.

Romeu, B. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulce acuícolas. *Red de Revistas Científicas de América Latina* , 4.

Roux, K. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols* , pdb.ip66.

Ruiz, L., López, L., Fusté, E., Martínez, J., & Viñas, M. (2011). Class integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Antomicrob agents* , 398-402.

Sandle, T. (2016). *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control*. Amsterdam: Woodhead Publishing.

Subedi, D., Vijay, A., & Willcox, M. (2017). Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp oPTOM* , 1010-1011.

Stensvold, C., Ahmed, U., Adersen, L., & Nielsen, H. (2012). Development and Evaluation of a Genus- Specific, Probe- Based, Internal- Process- Controlled Real- Time PCR Assay for Sensitive and Specific Detection of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology* , 1847-1851.

Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). Pseudomonas aeruginosa- a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* , 1133-1148.

Suárez, C., Kattán, J., Guzmán, A., & Villegas, M. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en P. aeruginosa, Acinetobaacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. *Asociación Colombiana de Infectología* , 85-91.

Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR. *Publishing data that conform to the MIQE guidelines.* , 50.

Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., & Murray, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* , 2233-2239.

Touati, M., Diene, S., Dekhil, M., Djahoudi, A., Racherache, A., & Rolain, J. (2013). Dissemination of Class I Integron Carrying VIM-2 Carbapenemase in Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates from a Hospital Intensive Care Unit in Annaba, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 2426-2427.

Valdés, L., & Leyva, T. (2013). Prevalencia de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria en hospitales provinciales de Santiago de Cuba. *Medisan* , 1029-3029.

Vandecabeye, G., Pérez, M., Merino, L., & Lifschits, V. (2000). *Sensibilidad de Pseudomonas aeruginosa a Levofloxacin y Trovafloxacin*. Buenos Aires: Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000.

Yu, Y., Qu, T., Zhou, J., Wang, J., Li, H., & Walsh, T. (2006). Integrons Containing the VIM-2 Metallo- beta - lactamase Gene among Imipinem - Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Different Chinese Hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* , 4242-4245.

Zambrano, A., & Herrera, N. (2004). Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de ANtofagasta, Chile. *Revista Chilena de Infectología* , 117-124.