



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de diferentes orígenes
Autor/es
Vanesa Estepa Pérez
Director/es
Carmen Torres Manrique y María Yolanda Sáenz Domínguez
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2013-2014



Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes orígenes, tesis doctoral

de Vanesa Estepa Pérez, dirigida por Carmen Torres Manrique y María Yolanda Sáenz Domínguez (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

- © El autor
- © Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2014
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

**Caracterización de mecanismos de resistencia a
carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas
de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes orígenes**



Vanesa Estepa Pérez
Tesis Doctoral, Logroño 2014



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA
Departamento de Agricultura y Alimentación
Área de Bioquímica y Biología Molecular



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Caracterización de mecanismos de resistencia a
carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en
cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes
orígenes

VANESA ESTEPA PÉREZ

Tesis Doctoral

Logroño, 2014



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Bioquímica y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

Caracterización de mecanismos de resistencia a
carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en
cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes
orígenes

Memoria presentada por **VANESA ESTEPA PÉREZ** para optar al título de Doctora
por la Universidad de La Rioja.

Logroño, junio de 2014



Dra. CARMEN TORRES MANRIQUE, Catedrática del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja

Dra. YOLANDA SÁENZ DOMÍNGUEZ, Investigadora del Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR)

Por la presente declaran que,

La memoria titulada “**Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes orígenes**”, que presenta Dña. VANESA ESTEPA PÉREZ, Licenciada en Química, ha sido realizada en el Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja y en el Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, bajo su dirección, y reúne las condiciones exigidas para optar al título de Doctor,

Lo que hacen constar en Logroño, a 14 de julio de 2014.

Fdo: Prof. Carmen Torres Manrique

Fdo: Dra. Yolanda Sáenz Domínguez

A mi familia

Índice

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN	xiii

INTRODUCCIÓN

1.- El género <i>Pseudomonas</i>	3
1.1.- La especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.- Resistencia a los antibióticos	10
2.1.- Mecanismos de acción de los antibióticos	15
2.2.- Mecanismos de resistencia a los antibióticos	16
2.3.- Mecanismos de acción y resistencia a beta-lactámicos	17
2.3.1- Carbapenemasas	22
2.4.- Mecanismos de acción y resistencia a aminoglucósidos	28
2.5.- Resistencia a antibióticos en <i>P. aeruginosa</i>	30
3.- Elementos genéticos de diseminación de resistencia	37
3.1.- Plásmidos	38
3.2.- Elementos genéticos transponibles	38
3.3.- Casetes génicos e integrones	40
3.4.- Elementos genéticos móviles en <i>P. aeruginosa</i>	48
4.- Tipificación Molecular	51
4.1.- Tipificación molecular de <i>P. aeruginosa</i>	53
OBJETIVOS	57

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Aislados de <i>Pseudomonas</i> spp. estudiados y muestras analizadas	61
1.1.- Muestras no clínicas analizadas	61
1.1.1.- Muestras fecales de individuos sanos	61
1.1.2.- Muestras fecales de caballos sanos	61
1.1.3.- Muestras de alimentos de origen cárnico	61
1.1.4.- Muestras de alimentos de origen vegetal	62
1.2.- Aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	62
1.2.1.- Hospital San Pedro de Logroño	62
1.2.2.- Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza	62
1.2.3.- Aislados de casos clínicos particulares	63
2.- Medios de cultivo y pruebas de identificación empleadas	64
2.1.- Medios de cultivo.....	64
2.2.- Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana	64
3.- Procesamiento de las muestras para el aislamiento bacteriano	65
3.1.- Muestras fecales de individuos y caballos sanos	65
3.2.- Muestras de alimentos de origen cárnico	66
3.3.- Muestras de alimentos de origen vegetal	66
4.- Determinación de la sensibilidad a antibióticos	67
4.1.- Difusión por disco	67
4.2.- Dilución en agar y Etest	68
4.3.- Test sinérgico de doble disco	70
5.- Extracción del DNA	71
5.1.- Métodos de extracción del DNA	71
5.1.1.- Resina (InstaGene TM Matrix, BioRad)	71
5.1.2.- “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche) ...	72
5.2.- Cuantificación del DNA	73

6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	73
6.1.- Identificación molecular de especie	75
6.2.- Detección de genes de resistencia mediante PCR múltiple	75
6.2.1.- Detección de genes codificantes de MBL	75
6.2.2.- Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A ...	77
6.3.- Detección de genes de resistencia a aminoglucósidos	79
6.4.- Estudio de la porina OprD	80
6.5.- Análisis de integrones y promotores	81
6.6.- Estudio de transposones	83
7.- Electroforesis en gel de agarosa	86
8.- Tipificación molecular	87
8.1.- Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)	87
8.2.- Determinación de la secuencia tipo	89
9.- Secuenciación	91
9.1.- Reacción de secuenciación	92
9.2.- Análisis de las secuencias	92
10.- Localización cromosómica y/o plasmídica del gen <i>bla</i>_{VIM-2}	93
10.1.- Digestión enzimática	93
10.2.- Preparación del Southern Blot	95
10.3.- Hibridación con sondas específicas	97
11.- Estudio de la estabilidad del gen <i>bla</i>_{VIM-2} y de las alteraciones adquiridas en OprD en cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a imipenem	100

RESULTADOS

1.- Prevalencia y caracterización de <i>Pseudomonas</i> spp. en muestras no clínicas	103
1.1.- Muestras fecales de individuos sanos	103
1.2.- Muestras fecales de caballos sanos	106
1.3.- Muestras de alimentos	106
1.4.- Comparativa entre las cepas de <i>Pseudomonas</i> aisladas de muestras no clínicas	112
2.- Caracterización de mecanismos de resistencia y tipificación molecular de cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos	116
2.1.- Hospital San Pedro (HSP) de Logroño	116
2.1.1.- Estudio de sensibilidad a antibióticos en las 61 cepas de <i>P. aeruginosa</i> Carb-R	117
2.1.2.- Detección y caracterización de integrones en las 61 cepas de <i>P. aeruginosa</i> Carb-R	118
2.1.2.1.- Tipificación molecular de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> portadoras de integrones	119
2.1.3.- Alteraciones en la porina OprD en las 61 cepas de <i>P. aeruginosa</i> Carb-R	120
2.2.- Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) de Zaragoza ..	128
2.2.1.- Estudio de sensibilidad a antibióticos en las 87 cepas de <i>P. aeruginosa</i> Carb-R	129
2.2.2.- Detección y caracterización de integrones en las 87 cepas de <i>P. aeruginosa</i> Carb-R	130
2.2.2.1.- Tipificación molecular de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> portadoras de integrones	133
2.2.3.- Alteraciones en la porina OprD en las 87 cepas de <i>P. aeruginosa</i> Carb-R	134
2.3.- Comparativa entre las cepas clínicas de los dos hospitales	142
3.- Localización cromosómica o plasmídica del gen <i>bla</i>_{VIM-2}	145
4.- Análisis de la estabilidad de la resistencia a imipenem en ausencia de presión antibiótica	148
5.- Otros casos clínicos de interés	150
5.1.- Cepa <i>P. aeruginosa</i> W37	150
5.2.- Cepa <i>P. aeruginosa</i> Ps121	152

DISCUSIÓN	157
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXOS	
Anexo I: Tablas y Figuras	213
Anexo II: Secuencias incluidas en la base de datos GenBank	233
Anexo III: Publicaciones científicas	251

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
AAC	N-acetiltransferasa
AFLP	<u>a</u> mplified <u>f</u> ragment <u>l</u> ength <u>p</u> olymorphism analysis
AMC	amoxicilina-ácido clavulánico (antibiótico+inhibidor)
AMK	amikacina (antibiótico)
AmpC	cefalosporina de tipo AmpC
ANT	O-adeniltransferasa
APB	ácido 3-aminofenilborónico
APH	O-fosfotransferasa
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
ATM	aztreonam (antibiótico)
BHI	<u>B</u> rain <u>H</u> earth <u>I</u> nfusion (medio de cultivo)
BLEE	<u>b</u> eta- <u>l</u> actamasa de <u>e</u> spectro <u>e</u> xtendido
°C	grado centígrado / Celsius
Carb-R	resistente a carbapenémicos
CAZ	ceftazidima (antibiótico)
CFX	cefuroxima (antibiótico)
CFZ	cefazolina (antibiótico)
CG	casete génico
CIBIR	<u>C</u> entro de <u>I</u> nvestigación <u>B</u> iomédica de La <u>R</u> ioja
CIP	ciprofloxacina (antibiótico)
CLSI	<u>C</u> linical and <u>L</u> aboratory <u>S</u> tandards <u>I</u> nstitute
cm	centímetro
CMI	<u>c</u> oncentración <u>m</u> ínima <u>i</u> nhibitoria
CRO	ceftriaxona (antibiótico)
CS	segmento conservado (<u>c</u> onserved <u>s</u> egment)
CT	colistina (antibiótico)
DAP	daptomicina (antibiótico)
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótido
DOR	doripenem (antibiótico)

DOX	doxiciclina (antibiótico)
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (<u>E</u> uropean <u>C</u> entre for <u>D</u> isease Prevention and <u>C</u> ontrol)
EDTA	ácido <u>e</u> tilend <u>a</u> min <u>o</u> tetra <u>a</u> cético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (<u>E</u> uropean <u>F</u> ood <u>S</u> afety <u>A</u> uthority)
ERIC-PCR	<u>e</u> nterobacterial <u>r</u> epeated <u>i</u> ntergenic <u>c</u> onsensus PCR
<i>et al.</i>	y colaboradores
etc.	etcétera
ETP	ertapenem (antibiótico)
FEP	cefepime (antibiótico)
g	gramo
GEN	gentamicina (antibiótico)
h	hora
HAD	hospitalización a domicilio
HCULB	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (de Zaragoza)
HSP	Hospital San Pedro (de Logroño)
HUSE	Hospital Universitario Son Espases (de Palma de Mallorca)
I	sensibilidad intermedia
IPM	imipenem (antibiótico)
IS	secuencia de inserción (<u>i</u> nsertion <u>s</u> equence)
Kb	Kilobase
l	litro
LEV	levofloxacin (antibiótico)
LZD	linezolid (antibiótico)
m/v	masa/volumen
M	molar
Mb	Megabase
MBL	<u>m</u> etalo- <u>b</u> eta- <u>l</u> actamasa
MDR	multirresistente
MEM	meropenem (antibiótico)
mg	miligramo

MH	<u>M</u> üeller <u>H</u> inton (medio de cultivo)
MI	integrón de resistencia o móvil
min	minuto
ml	mililitro
MLST	<u>m</u> ulti <u>l</u> ocus <u>s</u> equence <u>t</u> yping
MLVA	<u>m</u> ulti <u>l</u> ocus <u>V</u> NTR <u>a</u> nalysis
mm	milímetro
mM	milimolar
MTZ	metronidazol (antibiótico)
n°	número
N.D.	no determinado
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NOR	norfloxacina (antibiótico)
nt	nucleótido
o/n	toda la noche (<u>o</u> vern <u>i</u> ght)
OMP	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein (porina)
OMS	<u>O</u> rganización <u>M</u> undial de la <u>S</u> alud
<i>orf</i>	Marco de lectura abierta (<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PDR	panresistente
PFGE	Electroforesis en Campo Pulsado (<u>P</u> ulsed- <u>F</u> ield <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
PRL	piperacilina (antibiótico)
R	resistente
RAPD-PCR	<u>r</u> andom <u>a</u> mplified <u>p</u> olymorphic <u>D</u> NA PCR
rDNA	DNA ribosómico
REIPI	<u>R</u> ed <u>E</u> spañola de <u>I</u> nvestigación en <u>P</u> atología <u>I</u> nfecciosa
rep-PCR	Amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos

RNA	ácido ribonucleico
RND	<u>r</u> esistance- <u>n</u> odulation- <u>d</u> ivision
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
S	sensible
SDS	solución dodecilsulfato de sodio
SI	superintegrón
SLST	<u>s</u> ingle- <u>l</u> ocus <u>s</u> equene <u>t</u> yping
spp.	especies
SSC	solución sal de citrato de sodio (<u>s</u> aline <u>s</u> odium <u>c</u> itrate buffer)
ST	secuencia tipo (<u>s</u> equene <u>t</u> ype)
SXT	trimetoprim-sulfametoxazol (antibiótico)
T ^a hib.	Temperatura de hibridación
TBE	solución <u>t</u> ris(hidroxi <u>m</u> etil)aminometano + ácido <u>b</u> órico + <u>E</u> DTA
TE	solución <u>t</u> ris(hidroxi <u>m</u> etil)aminometano + <u>E</u> DTA
TIC	ticarcilina (antibiótico)
Tn	transposón compuesto
TOB	tobramicina (antibiótico)
Tris	solución tris(hidroxi <u>m</u> etil)aminometano
TSI	agar triple azúcar y hierro (<u>T</u> riple <u>S</u> ugar <u>I</u> ron Agar)
TZP	piperacilina-tazobactam (antibiótico)
U	unidad de enzima
UCI	unidad de cuidados intensivos
UFC	<u>u</u> nidades <u>f</u> ormadoras de <u>c</u> olonias
UV	<u>u</u> ltravioleta
V	voltio
VAN	vancomicina (antibiótico)
XDR	extensivamente resistente
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
%	signo de porcentaje (por ciento)

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1.-** Rango funcional y ambiental de *Pseudomonas* spp. (Silby *et al.*, 2011).
- Figura 2.-** Visualización de los diferentes pigmentos secretados por distintos aislados de *Pseudomonas*.
- Figura 3.-** Evolución de la resistencia a carbapenémicos y a aminoglucósidos en la especie *P. aeruginosa* desde 2005 hasta 2012 en Europa (<http://ecdc.europa.eu>).
- Figura 4.-** Mecanismos de acción de los antibióticos.
- Figura 5.-** Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas (Peleg & Hooper, 2010).
- Figura 6.-** Lugar de ataque de las beta-lactamasas sobre el anillo beta-lactámico.
- Figura 7.-** Estructura química de los 4 carbapenémicos más utilizados.
- Figura 8.-** Clasificación de las carbapenemasas (adaptada Opazo *et al.*, 2012).
- Figura 9.-** Distribución geográfica a nivel mundial (A) y en Europa (B) de las enterobacterias productoras de los genes IMP y VIM (Nordmann *et al.*, 2011).
- Figura 10.-** Distribución geográfica a nivel mundial de las enterobacterias productoras de NDM (Dortet *et al.*, 2014).
- Figura 11.-** Estructura química de los 4 aminoglucósidos anti-pseudomónicos.
- Figura 12.-** Representación del sistema de expulsión activa MexAB-OprM y de la porina OprD en una cepa de *P. aeruginosa* (Papp-Wallace *et al.*, 2011).
- Figura 13.-** Estructura de la porina OprD (imagen tomada del Banco de Datos de Proteínas de Japón: http://pdj.org/eprts/index_en.cgi?PDB%3A2ODJ).
- Figura 14.-** Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la porina OprD de la cepa control PAO1 (GenBank: AE004091).
- Figura 15.-** Estructura de los elementos genéticos transponibles.
- Figura 16.-** Mecanismos de transposición.
- Figura 17.** Modelo de integración y escisión de casetes génicos en un integrón de clase 1 (adaptada Cambray *et al.*, 2011).
- Figura 18.-** Estructura de los integrones móviles o MI (Partridge *et al.*, 2009).
- Figura 19.-** Estructura completa del transposón Tn21 que alberga un integrón de clase 1 (In2) en su interior (Liebert *et al.*, 1999).

Figura 20.- Modelo del origen de los integrones de clase 1 derivados del transposón Tn402 (Sajjad *et al.*, 2011).

Figura 21.- Modelo hipotético de evolución de los integrones de clase 1 (Toleman *et al.*, 2007).

Figura 22.- Ejemplos de integrones de clase 1 que albergan en su región variable genes de resistencia a carbapenémicos y aminoglucósidos (Juan *et al.*, 2010; Samuelsen *et al.*, 2010).

Figura 23.- Estructura de los dos integrones de clase 1 localizados en sendos transposones en el plásmido pOZ176 (Xiong *et al.*, 2013).

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 24.- Homogeneizador y bolsa estéril con filtro lateral para la homogeneización y vertido de la muestra vegetal con agua peptonada tamponada.

Figura 25.- Replicador de Steers y placa sembrada con él.

Figura 26.- Test sinérgico de doble disco para la detección de MBL (a), BLEE (b) y carbapenemasa de clase A (c). Todas las imágenes presentan resultados positivos.

Figura 27.- Combinaciones de cebadores utilizadas en las PCR en busca del entorno del gen *bla*_{VIM-2}.

Figura 28.- Montaje de transferencia por el método Southern Blot.

Figura 29.- Distribución de los antibióticos en el antibiograma diario del estudio de estabilidad.

RESULTADOS

Figura 30.- Foto de PFGE con los 10 aislados de voluntarios sanos junto a las dos cepas control (PAO1 y ATCC27853).

Figura 31.- Distribución de las muestras de origen cárnico analizadas por lugar de compra y tipo de carne.

Figura 32.- Distribución de las muestras de origen vegetal analizadas por tipo de fruto y por lugar de recogida/compra.

Figura 33.- Foto de PFGE con 18 aislados de origen alimentario obtenidos.

Figura 34.- Comparación entre el gen *oprD* completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank: AE004091) con el gen *oprD* truncado por la nueva secuencia de inserción IS*Pa47* de la cepa Ps159.

Figura 35.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción *ISPa47* (número de acceso en GenBank: **KC502912**) de la cepa Ps159.

Figura 36.- Dendograma de los 30 aislados de *Pseudomonas* de muestras no clínicas obtenidas. Se han incluido también dos de las cepas control utilizadas en diferentes experimentos (*P. aeruginosa* PAO1 y ATCC27853).

Figura 37.- Distribución de las 61 cepas por origen de muestra.

Figura 38.- Distribución de las 61 cepas por servicio del hospital.

Figura 39.- Porcentajes de resistencia y sensibilidad de las 61 cepas del HSP frente a los 15 antibióticos testados.

Figura 40.- Comparación de las secuencias nucleotídicas de los casetes génicos *aadB* y *aadB-2*.

Figura 41.- Comparación entre el gen *oprD* completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank: AE004091) con los genes *oprD* truncados por la presencia de las secuencias de inserción *ISPa1328* e *ISPsp4* en las cepas Ps92 y W64, respectivamente.

Figura 42.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción *ISPa1328* (número de acceso en GenBank: **KF517097**) de la cepa Ps92.

Figura 43.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción *ISPsp4* (número de acceso en GenBank: **KF517098**) de la cepa W64.

Figura 44.- Distribución de las 87 cepas por origen de muestra.

Figura 45.- Distribución de las 87 cepas por servicio del hospital.

Figura 46.- Porcentaje de resistencia de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB de Zaragoza frente a 12 de los antibióticos testados.

Figura 47.- Antibiograma confirmatorio de una cepa productora de MBL.

Figura 48.- Porcentajes de resistencia de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB a 12 de los antibióticos testados distinguiendo las cepas productoras de MBL (color verde) de las cepas no productoras (color morado).

Figura 49.- Estructuras de los integrones de clase 1 presentes en las cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB.

Figura 50.- Comparación entre el gen *oprD* completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank: AE004091) con los genes *oprD* truncados por las secuencias de inserción *ISPa45* e *ISPpu21* de las cepas Ps33 y W368, respectivamente.

Figura 51.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción *ISPa45* (número de acceso en GenBank: **JX440361**) de la cepa Ps33.

Figura 52.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción *ISPpu21* (número de acceso en GenBank: **JX440360**) de la cepa W368.

Figura 53.- Estructura del transposón *Tn21* (imagen tomada de Liebert *et al.*, 1999).

Figura 54.- Variantes del transposón *Tn21* encontradas en nuestras 11 cepas.

Figura 55.- Resultados de las PCR del gen *oprD* y el gen *bla_{VIM}* en el día 5 y el día 100 de las cuatro cepas seleccionadas.

Figura 56.- Inalterabilidad de los resultados de los antibiogramas realizados a las 4 cepas seleccionadas durante los 100 días.

Figura 57.- Resultados de las pruebas de la tira comercial Etest (A) y el test sinérgico de doble disco (B) para la confirmación del fenotipo MBL en la cepa W37.

Figura 58.- Estructuras de los integrones de clase 1 que albergan las 3 copias del gen *bla_{VIM-2}* en la cepa clínica *P. aeruginosa* W37.

Figura 59.- Estructuras de los integrones de clase 1 que albergan los genes *bla_{VIM-2}* en la cepa de *P. aeruginosa* Ps121 (A y B) y en la cepa de *C. freundii* W1052 (C).

Figura 60.- Foto de PFGE con las cepas de *P. aeruginosa* W37 y Ps121 de los casos clínicos analizados.

DISCUSIÓN

Figura 61.- Comparación de las secuencias de inserción en el gen *oprD* de diferentes cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem pero no productoras de MBL (Diene *et al.*, 2013).

ANEXOS

Figura S1.- Dendograma de las 61 cepas seleccionadas del HSP.

Figura S2.- Dendograma de las 87 cepas seleccionadas del HCULB.

LISTA DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

TABLA 1.- Datos de sensibilidad a carbapenémicos (a) y a aminoglucósidos (b) en la especie *P. aeruginosa* durante el período 2005-2012 en España (<http://ecdc.europa.eu>).

TABLA 2.- Categorías antimicrobianas y antibióticos utilizados para definir los microorganismos MDR, XDR y PDR en la especie *P. aeruginosa* (Magiorakos *et al.*, 2012).

TABLA 3.- Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos (adaptada Suárez & Gudiol, 2009).

TABLA 4.- Clasificación de las beta-lactamasas (adaptada Bush & Jacoby, 2010).

TABLA 5.- Clasificación de los carbapenémicos (Bassetti *et al.*, 2013).

TABLA 6.- Distribución de las carbapenemasas adquiridas de relevancia clínica en las principales especies bacterianas (adaptada Miriagou *et al.*, 2010).

TABLA 7.- Principales metalo-beta-lactamasas descritas (adaptada Palzkill, 2013).

TABLA 8.- Fenotipos de resistencia asociados a enzimas modificantes de aminoglucósidos (adaptada Martínez-Martínez & Ruiz de Alegría, 2009).

TABLA 9.- Genes de resistencia adquiridos más frecuentemente detectados en *P. aeruginosa*.

TABLA 10.- Mutaciones detectadas en la porina OprD de cepas clínicas resistentes y sensibles a los antibióticos carbapenémicos de *P. aeruginosa*.

TABLA 11.- Variantes más frecuentes de los promotores Pc y P2 (adaptada Jové *et al.*, 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

TABLA 12.- Carga de antibiótico de los discos y diámetro de los puntos de corte recomendados por el CLSI (2013) de diferentes antibióticos para *P. aeruginosa*.

TABLA 13.- Puntos de corte recomendados por el CLSI (2013) a los diferentes antibióticos carbapenémicos para *P. aeruginosa*.

TABLA 14.- Reactivos utilizados en la técnica de PCR.

TABLA 15.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen 16S rDNA que nos permite identificar la especie bacteriana.

TABLA 16.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para la PCR múltiple de MBL y sus condiciones de amplificación.

TABLA 17.- Cantidades añadidas de los reactivos utilizados en la PCR múltiple de carbapenemasas de clase A.

TABLA 18.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para la PCR múltiple de carbapenemasas de clase A y sus condiciones de amplificación.

TABLA 19.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para el estudio de genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos y sus condiciones de amplificación.

TABLA 20.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para el estudio de *oprD* y sus condiciones de amplificación.

TABLA 21.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las PCR de integrones de tipo 1, 2 y 3 y sus condiciones de amplificación.

TABLA 22.- Reactivos utilizados en la técnica de PCR.

TABLA 23.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las PCR de transposones y sus condiciones de amplificación.

TABLA 24.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las PCRs de los 7 genes “housekeeping” para la tipificación molecular.

TABLA 25.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para la secuenciación de los 7 genes “housekeeping” en la determinación de la secuencia tipo.

TABLA 26.- Condiciones de amplificación para los 7 genes “housekeeping”.

TABLA 27.- Condiciones de las diferentes polimerasas usadas en la amplificación de los 7 genes “housekeeping”.

TABLA 28.- Composición de las mezclas de restricción y temperatura de incubación para las enzimas nucleasa S1 e *I-Ceu-I*.

TABLA 29.- Reactivos utilizados en la técnica de PCR.

TABLA 30.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las sondas específicas de hibridación y sus condiciones de amplificación.

RESULTADOS

TABLA 31.- Características principales de los individuos sanos portadores de *P. aeruginosa* y valores de CMI para los antibióticos carbapenémicos en los 10 aislados de muestras fecales de individuos sanos.

TABLA 32.- Alteraciones encontradas en la porina OprD de las 10 cepas de *P. aeruginosa* analizadas.

TABLA 33.- Características principales de las 20 cepas aisladas de alimentos y valores de CMI para los antibióticos carbapenémicos.

TABLA 34.- Alteraciones encontradas en la porina OprD de las 5 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de alimentos.

TABLA 35.- Características principales de las 30 cepas de *Pseudomonas* spp. no clínicas analizadas.

TABLA 36.- Tipo de integrón de clase 1 detectado en las 41 cepas de *P. aeruginosa* del HSP *intI1*-positivas y su tipificación molecular.

TABLA 37.- Alteraciones de la porina OprD encontradas en las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP analizadas.

TABLA 38.- Características principales de las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP incluidas en esta tesis.

TABLA 39.- Promotores encontrados en los integrones de clase 1 de las 65 cepas del HCULB de Zaragoza.

TABLA 40.- Asociación de la secuencia tipo con los integrones en las 65 cepas del HCULB de Zaragoza.

TABLA 41.- Alteraciones de la porina OprD encontradas en las 82 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB analizadas.

TABLA 42.- Características principales de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB incluidas en esta tesis.

TABLA 43.- Resumen de las muestras estudiadas en esta tesis.

TABLA 44.- Características principales de las 13 cepas seleccionadas para el estudio de localización cromosómica o plasmídica del gen *bla_{VIM-2}*.

DISCUSIÓN

TABLA 45.- Porcentajes de resistencia a carbapenémicos en cepas de *P. aeruginosa* en España desde 2008 a 2012 (<http://ecdc.europa.eu>).

TABLA 46.- Porcentajes de resistencia a amikacina y a la familia de antibióticos aminoglucósidos en cepas de *P. aeruginosa* en España desde 2008 a 2012 (<http://ecdc.europa.eu>).

ANEXOS

TABLA S1.- Datos proporcionados por los voluntarios sanos en el momento del muestreo.

TABLA S2.- Cepas clínicas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP de Logroño incluidas en esta tesis y características de los pacientes de los que fueron aisladas.

TABLA S3.- Tabla ampliada con las características analizadas de las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP incluidas en esta tesis.

TABLA S4.- Cepas clínicas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB de Zaragoza incluidas en esta tesis y características de los pacientes de los que fueron aisladas.

TABLA S5.- Tabla ampliada con las características analizadas de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB incluidas en esta tesis.

RESUMEN

El primer informe de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 30 de abril de 2014) sobre la resistencia microbiana a los antibióticos pone de manifiesto la grave amenaza que supone este hecho para la salud pública en todo el mundo. Este problema no se limita al ámbito hospitalario sino que el uso e, incluso, el abuso de antibióticos en producción animal y en agricultura también ha ocasionado el incremento de la prevalencia de microorganismos resistentes a antibióticos en los distintos nichos ecológicos. Por ello, la actividad científica propuesta en esta tesis se centra en la especie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*, que es un importante patógeno oportunista causante de infecciones nosocomiales hospitalarias, que desarrolla fenotipos de multirresistencia a los antibióticos y que dada su gran versatilidad metabólica, presenta una extraordinaria habilidad para adaptarse a gran variedad de ambientes y nichos ecológicos (como suelos, aguas o alimentos).

El primer objetivo de esta tesis fue estudiar la prevalencia de *Pseudomonas* spp. en muestras fecales de personas sanas y de caballos sanos y en alimentos, así como analizar el fenotipo de resistencia a antibióticos en dichos aislados. Entre las muestras de personas sanas se detectó un 8,2% de *P. aeruginosa* totalmente sensibles a los antibióticos anti-pseudomónicos testados; mientras que en ninguna de las muestras de caballos sanos se detectó esta bacteria. Se aislaron 8 especies diferentes de *Pseudomonas* spp. en el 12,4% de las muestras de alimentos, predominando las especies *P. aeruginosa* (25% de los aislados) y *P. putida* (25%). Cabe destacar entre los aislados de alimentos, la elevada resistencia a ticarcilina (85%) y el hallazgo de dos cepas resistentes a imipenem en una misma muestra de pimiento.

El análisis de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos, la presencia de integrones y la tipificación molecular de los aislados fueron también objetivos de esta tesis. Se observó la ausencia de metalo-beta-lactamasas y un gran polimorfismo en la porina OprD de los aislados de *P. aeruginosa* no clínicos. La diversidad de mutaciones no se asoció con la resistencia a carbapenémicos; sin embargo, la presencia de una nueva secuencia de inserción, ISPa47, truncando el gen *oprD* de una cepa alimentaria justificó su resistencia a imipenem. Se detectó una alta variedad de secuencias tipo en las cepas de *P. aeruginosa* no clínicas, siendo tres de ellas nuevas (ST1059, ST1455 y ST1456), y

en algunos casos, asociadas a líneas genéticas de amplia diseminación hospitalaria (como ST253).

El segundo objetivo de esta tesis fue caracterizar los mecanismos de resistencia y la tipificación molecular en 214 aislados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos recogidos en el Hospital San Pedro de Logroño (HSP, 2008-2011) y el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (HCULB, 2008-2010). Tras seleccionar una cepa por paciente y con perfil de bandas de PFGE diferente, las 148 cepas incluidas, pertenecientes a 140 pacientes, mostraban fenotipos de multirresistencia y se apreciaba una asociación de resistencia entre carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. No se detectaron cepas portadoras de metalo-beta-lactamasas (MBL) en el HSP; sin embargo, el 49% de las cepas de *P. aeruginosa* del HCULB mostraron fenotipo MBL.

En las cepas de ambos hospitales se observó una elevada presencia de integrones de clase 1 (67% en HSP y 75% en HCULB); aunque se encontró una mayor diversidad y variabilidad de estructuras en los aislados de HCULB. Entre las 14 estructuras diferentes detectadas, todas excepto una, portaban genes de resistencia a aminoglucósidos. El gen *bla_{VIM-2}* se detectó en todas las cepas MBL-positivas localizado dentro de cuatro estructuras diferentes de integrón de clase 1. Respecto al análisis de la proteína OprD en las cepas clínicas, también se observó un gran polimorfismo; pero destaca que más del 50% de las cepas presentaban un codon de finalización prematuro, y en cuatro cepas el gen *oprD* estaba truncado por diferentes secuencias de inserción (*ISPa1328*, *ISPsp4*, *ISPpu21* e *ISPa45*, siendo esta última descrita por primera vez en este trabajo). El estudio de MLST realizado en las cepas clínicas integrón-positivas, revela su agrupación en pocas secuencias tipo donde los clones de alto riesgo ST175 y ST235 son predominantes.

El tercer objetivo fue analizar la localización cromosómica o plasmídica del gen *bla_{VIM-2}* y determinar la estabilidad de la resistencia a carbapenémicos. Aunque en 11 cepas se pudo determinar la asociación del integrón portador del gen *bla_{VIM-2}* en la estructura del transposón Tn21, todas ellas mostraron una localización cromosómica del gen. Por último, los integrones portadores del gen *bla_{VIM-2}* y la proteína OprD de cuatro cepas *P. aeruginosa* seleccionadas (3 cepas portadoras del gen *bla_{VIM-2}* y una con el gen *oprD* truncado por *ISPa45*), presentaron alta estabilidad tras crecimiento de 100 días en ausencia de presión antibiótica.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1.- El género *Pseudomonas*

Pseudomonas es un género complejo y amplio de bacterias de gran importancia ya que incluye tanto especies ambientales como especies con implicaciones clínicas. Se incluye dentro de la clase γ -proteobacteria, el orden pseudomonadales y la familia *Pseudomonadaceae*, siendo Migula en 1894 el primero en proponer este género (Henry & Speert, 2011).

El nombre de *Pseudomonas* proviene del griego y literalmente significa “falsa unidad”. Entre las principales características del género *Pseudomonas* destaca que son bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvados que no forman esporas, no fermentadores de azúcares, normalmente móviles debido a que poseen uno o más flagelos polares, catalasa positivos y aerobios estrictos; aunque, en ocasiones, pueden utilizar los nitratos como fuente alternativa de electrones, lo que les permite crecer también en anaerobiosis. Por otro lado, las bacterias de este género son capaces de metabolizar una amplia variedad de sustratos en un gran rango de temperaturas (desde menos de 25°C hasta 42°C). Esta adaptabilidad para vivir bajo muy diversas condiciones ambientales y con escasos requerimientos nutritivos, explica su gran ubicuidad tanto en ambientes terrestres como acuáticos. Este género sobrevive en ambientes tan variados y cotidianos como suelos, aguas (tanto dulces como saladas), artículos de limpieza, combustible, alimentos, tejidos animales, plantas, etc., y desde estos reservorios son fácilmente transmisibles de forma cruzada (Hardalo & Edberg, 1997; Palleroni, 2005; Silby *et al.*, 2011).

Además, las especies de este género son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados, y solventes orgánicos (Lanini *et al.*, 2011; Teitzel & Parsek, 2003). Con excepción de *P. luteola* y *P. oryzihibitans*, las especies de *Pseudomonas* de implicación clínica son oxidasa positivas (Henry & Speert, 2011).

Este género bacteriano es de gran interés por su importancia en enfermedades (tanto en plantas como en animales o en seres humanos) y por su potencial en aplicaciones biotecnológicas. En la **Figura 1** se puede observar la gran versatilidad descrita hasta el momento del género *Pseudomonas*.

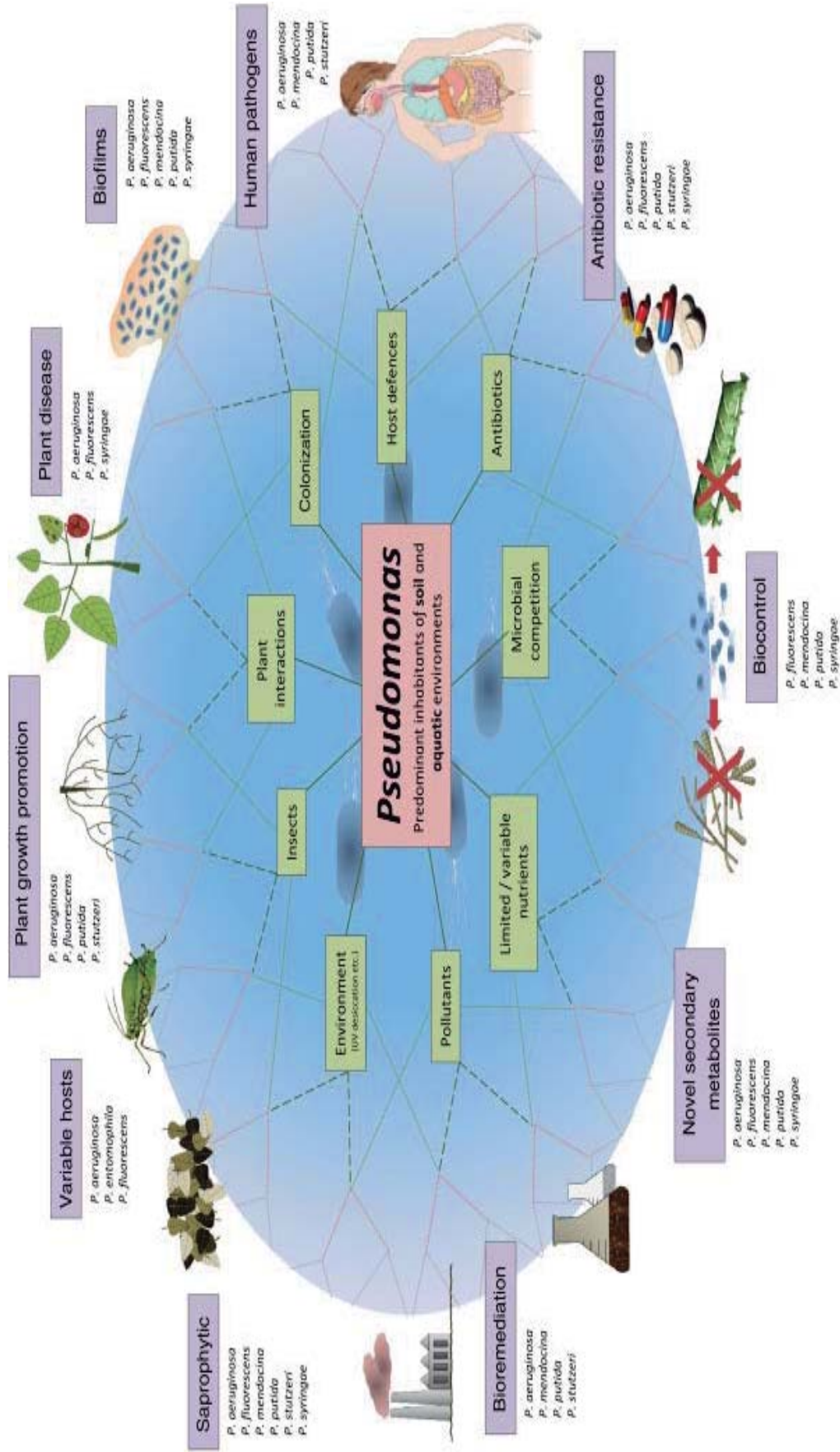


Figura 1.- Rango funcional y ambiental de *Pseudomonas* spp. (Silby et al., 2011).

Entre las características de las especies de este género también se encuentra la capacidad de producir colonias con morfologías distintivas y pigmentadas. Por ejemplo, en el caso de aislados de muestras de pacientes con fibrosis quística, la adquisición de la morfología mucoide y la capacidad de formar biopelículas en la mayoría de las superficies biológicas y abióticas le proporcionan ventajas para incrementar sus niveles de resistencia a los antibióticos y protegerse de presiones medioambientales y de la acción del sistema inmune del hospedador (Bonomo & Szabo, 2006; Quinn, 1998).

Por otro lado, la característica de producir pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta, a baja longitud de onda, sobre todo cuando crece en medios con limitación de hierro, también es común entre las especies de *Pseudomonas*. El pigmento fluorescente encontrado principalmente entre estas especies es la pioverdina, que proporciona un pigmento amarillo-verdoso, aunque no es el único. También se observa un pigmento no fluorescente de color azul-verdoso denominado piocianina (producido por la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*), o un color rojo-óxido con la producción de piorrubina (también común de la especie *P. aeruginosa*), color naranja del pigmento oxiclorafina (encontrado en *P. aureofaciens* o *P. chlororaphis*), color verde de la clorafina (descrito en *P. chlororaphis*), etc. (**Figura 2**) (Meyer *et al.*, 2002).

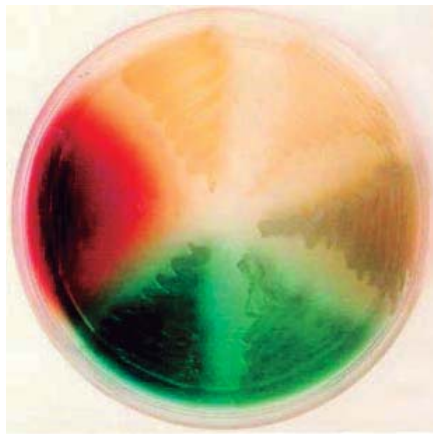


Figura 2.- Visualización de los diferentes pigmentos secretados por distintos aislados de *Pseudomonas*.

Introducción

Este género incluye un amplio abanico de especies diferentes y aún siendo su hábitat primario el ambiental, cabe destacar la especie *P. aeruginosa*, que ha sido la más estudiada por su gran trascendencia clínica al estar implicada en múltiples procesos infecciosos (Lister *et al.*, 2009), pero no es la única especie presente en infecciones humanas. Se han descrito distintos casos en la bibliografía donde la infección no era producida por *P. aeruginosa*, sino por otras especies como por ejemplo, *P. putida* (Treviño *et al.*, 2010), *P. fluorescens* (Benito *et al.*, 2012), *P. stutzeri* (Ceri *et al.*, 2010), *P. fulva* (Almuzara *et al.*, 2010; Seok *et al.*, 2010), *P. monteilii* (Bogaerts *et al.*, 2011), *P. mendocina* (Nseir *et al.*, 2011) o *P. mosselii* (Giani *et al.*, 2012), entre otras, aunque estos casos son menos frecuentes.

Estas mismas especies son encontradas en el medioambiente (Remold *et al.*, 2011), incluso han sido empleadas como promotores de crecimiento en plantas (Mehri *et al.*, 2011; Vives-Flórez & Garnica, 2006), aunque no siempre son beneficiosas para ellas. Un ejemplo es la especie *P. syringae*, conocida como uno de los patógenos más severos en plantas (Arrebola *et al.*, 2011). Otra aplicación en la cual se emplea *Pseudomonas* spp. de forma viable es la biorremediación. Es una técnica de descontaminación por medio de la degradación microbiana, cuando se ha producido un desequilibrio en el ecosistema que impacta negativamente en el entorno ecológico. Normalmente se emplean estas especies en suelos contaminados con petróleo ya que poseen enzimas capaces de degradar los hidrocarburos poliaromáticos. Muchos son los factores, tanto físicos como químicos, a tener en cuenta antes de aplicar esta técnica así como la elección del microorganismo, ya que va a interactuar con la población nativa (Gómez-Romero *et al.*, 2008; Vives-Flórez & Garnica, 2006).

1.1.- La especie *Pseudomonas aeruginosa*

La especie más destacada dentro de este género es *P. aeruginosa*, debido a su gran implicación clínica. Su nombre deriva del latín *Aerugo* (“óxido de cobre”) y *osus* (adjetivo que indica una abundancia), que representa el color característico de las colonias de esta especie debido a la producción de pigmentos (Viedma *et al.*, 2012).

Es un bacilo Gram negativo aerobio, catalasa y oxidasa positivo, no fermentador de lactosa y metabólicamente versátil, pudiendo crecer a temperaturas superiores a 40°C. *P. aeruginosa* es una bacteria altamente adaptable pudiendo colonizar varios nichos ambientales, como suelos, hábitats marinos y plantas (Tashiro *et al.*, 2013). Por esta habilidad para sobrevivir en ambientes húmedos con mínimos requerimientos nutritivos, puede suponer un importante problema de salud en el ámbito hospitalario y en el ámbito alimentario. Puede ser causa de infecciones relacionadas con instrumental (como por ejemplo catéteres, estetoscopios, drenajes, implantes, soluciones acuosas, desinfectantes, jabones, etc.), al que se adhiere y adapta (Lanini *et al.*, 2011; Lister *et al.*, 2009; Souli *et al.*, 2008). Pero también es encontrada fuera del hospital, en lugares tan cotidianos como piscinas, tubos de agua caliente, soluciones limpiadoras de lentillas, cremas cosméticas o el interior de zapatillas deportivas (Abidi *et al.*, 2013; Gnanasundaran *et al.*, 2013; Lister *et al.*, 2009; Thorolfsdottir & Marteinson, 2013).

La colonia típica es alargada y plana con el centro algo elevado pero, en general, existe una heterogeneidad respecto a morfología, pigmentación y movilidad dentro de la especie *P. aeruginosa*. Además, presenta un olor característico a “uva” que se transforma en olor a “palomita de maíz” cuando son cultivos viejos (Henry & Speert, 2011). No es uno de los microorganismos más frecuentes de la microbiota bacteriana de individuos sanos o de animales, pero el tracto gastrointestinal es el lugar más común de colonización en los seres humanos (detectado entre el 2,6 y el 24% en muestras fecales); dejando en segundo plano a la piel, faringe, fosas nasales o axilas (Lister *et al.*, 2009; Paterson, 2006).

Otras características como la producción de biofilm, las propiedades de adherencia, expresión de genes de virulencia o de resistencia a antibióticos contribuyen a la persistencia y éxito de *P. aeruginosa* como patógeno (Morales-

Introducción

Espinosa *et al.*, 2012). Raramente ocasiona infección en hospedadores inmunocompetentes; aunque en huéspedes inmunodeprimidos (pacientes con cáncer, quemados u hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos -UCI-), puede causar infecciones muy severas, que incluso, pueden llegar a ser mortales. Por esta razón, es considerado un patógeno oportunista y uno de los mayores responsables de infecciones nosocomiales (Shimada & Matsumura, 2014). Causa infecciones principalmente en zonas anatómicas húmedas como ojos, oídos, piel, tracto urinario o tracto respiratorio, teniendo una alta prevalencia en pacientes con fibrosis quística causando infecciones respiratorias crónicas (Tashiro *et al.*, 2013; Uttley *et al.*, 2013). Este patógeno oportunista es responsable de aproximadamente el 10-15% de las infecciones nosocomiales en humanos (Strateva & Yordanov, 2009), y es especialmente problemática para los pacientes severos en las UCIs. Entre 1992 y 1997, los datos recogidos por el Sistema de Control de Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos, mostraban que esta bacteria había provocado el 21% de las neumonías, el 10% de las infecciones del tracto urinario, el 3% de las infecciones en sangre y el 13% de las infecciones de ojos, oídos, nariz y garganta de pacientes ubicados en estas unidades del hospital. Por otro lado, un estudio similar llevado a cabo en Europa, identificaba a *P. aeruginosa* como el segundo microorganismo más frecuente en las infecciones adquiridas en las UCIs. Este estudio revelaba que en Europa esta bacteria era responsable del 30% de las neumonías, el 19% de las infecciones del tracto urinario y el 10% de las infecciones en sangre (Lister *et al.*, 2009). Además, la especie *P. aeruginosa* es identificada también como patógeno animal responsable de otitis externa, infecciones respiratorias y problemas oculares en perros y gatos (Bugden, 2013; Kidd *et al.*, 2012; Ledbetter *et al.*, 2009), infecciones genitales como la endometritis en yeguas (Allen *et al.*, 2011; Kidd *et al.*, 2012) y, de manera ocasional, en mastitis bovina (Daly *et al.*, 1999).

Esta especie presenta una alta resistencia intrínseca a varias familias de antibióticos y una extraordinaria capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, tanto por mutaciones en el cromosoma como por transferencia horizontal de determinantes de resistencia, lo que hace muy complicado encontrar alternativas terapéuticas (Juan & Oliver, 2010).

Resumiendo, la especie *P. aeruginosa* tiende a desarrollar fenotipos de multirresistencia que junto a la adquisición de la morfología mucoide y la capacidad de formar biopelículas en la mayoría de las superficies biológicas y abióticas, le proporciona ventajas para incrementar sus niveles de resistencia a los antibióticos y protegerse de presiones medioambientales y de la acción del sistema inmune del hospedador (Bonomo & Szabo, 2006; Quinn, 1998), dando lugar a grandes problemas clínicos (Juan & Oliver, 2010). Además, en la última década, se ha detectado una alta prevalencia de aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Esta familia de antibióticos beta-lactámicos de última generación es utilizada en el tratamiento empírico de infecciones en las que se sospecha la presencia de microorganismos multirresistentes o en las que los pacientes no han respondido previamente a otros antibióticos de amplio espectro (Fresnadillo-Martínez *et al.*, 2010). Sin embargo, existen autores que proponen que todos los microorganismos patógenos con diferentes genes de resistencia a antibióticos no están exclusivamente ubicados en el ambiente hospitalario sino que se pueden localizar en la naturaleza, en animales de compañía, en animales salvajes, en acuicultura e, incluso, en alimentos de origen animal o vegetal (Guerra *et al.*, 2014; Rolain, 2013). Pero los trabajos realizados sobre resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* en aislados no clínicos son, por el momento, bastante escasos; aunque se empieza a ver la importante necesidad de llevarlos a cabo (Guerra *et al.*, 2014).

2.- Resistencia a los antibióticos¹

“La resistencia a los antibióticos es un fenómeno evolutivo biológico natural que puede ser acelerado por diversos factores, sobre todo por las prácticas humanas” (Campos & Baquero, 2002). Con esta frase se concientiza a la población del grave problema al que estamos expuestos tras el uso y abuso de los antibióticos en las últimas décadas, siendo un factor clave en la selección de resistencias desarrolladas por las bacterias.


Las enfermedades infecciosas son una causa importante de mortalidad a nivel mundial y, desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming hasta la actualidad, se han desarrollado multitud de antibióticos, tanto sintéticos como naturales, que representan una de las principales herramientas terapéuticas utilizadas para tratar estas infecciones. Pero el amplio y excesivo uso de los mismos, no solo en medicina sino también en agricultura y veterinaria, tanto con fines terapéuticos como profilácticos, e incluso como promotores del crecimiento en animales (esta última práctica está totalmente prohibida en la Unión Europea desde 2006, aunque se sigue usando en otros países extracomunitarios), ha provocado que la resistencia a los antibióticos se haya convertido en un problema emergente en salud humana a nivel mundial.

Todo esto se traduce en importantes fracasos terapéuticos en medicina, contribuye al aumento de morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados, reduce las alternativas terapéuticas disponibles para combatir estas infecciones bacterianas e implica que se requieran nuevas prácticas (Torres *et al.*, 2010). Por esta razón diferentes organismos, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), han desarrollado medidas educativas, dirigidas tanto a profesionales de la salud como al público en general, para reducir el uso inapropiado de los antibióticos así como para fomentar la investigación coordinada de estas resistencias con el desarrollo de nuevos antibióticos (Baquero & Garau, 2010).

¹ **Antibiótico** es una sustancia natural producida por microorganismos como mecanismo de defensa frente a otros. **Agente antimicrobiano** es un compuesto modificado por síntesis química para dar lugar a compuestos análogos con notables mejoras en su actividad. En esta tesis se utilizará el término “antibiótico” para hacer referencia a ambos conceptos.

Por ejemplo, en la página oficial del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (<http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>) se pueden ver los datos de sensibilidad a los antibióticos más efectivos contra las diferentes especies a lo largo de los años, para así poder tener una visión general del incremento de resistencia a dichos fármacos que se está produciendo a nivel global. En **Tabla 1** y **Figura 3**, se presentan algunos de estos datos en la especie *P. aeruginosa*.

TABLA 1.- Datos de sensibilidad a carbapenémicos (a) y a aminoglucósidos (b) en la especie *P. aeruginosa* durante el período 2005-2012 en España (<http://ecdc.europa.eu>).

a)  **Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Carbapenems in Spain, 2005 - 2012**

Year	S	I	R	Total N	%S	%I	%R
2005	57	1	12	70	81.4 %	1.4 %	17.1 %
2006	333	11	45	389	85.6 %	2.8 %	11.6 %
2007	360	14	67	441	81.6 %	3.2 %	15.2 %
2008	462	13	72	547	84.5 %	2.4 %	13.2 %
2009	435	18	87	540	80.6 %	3.3 %	16.1 %
2010	595	21	133	749	79.4 %	2.8 %	17.8 %
2011	677	25	137	839	80.7 %	3.0 %	16.3 %
2012	678	35	140	853	79.5 %	4.1 %	16.4 %

b)  **Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Aminoglycosides in Spain, 2005 - 2012**

Year	S	I	R	Total N	%S	%I	%R
2005	63	4	3	70	90.0 %	5.7 %	4.3 %
2006	330	31	44	405	81.5 %	7.7 %	10.9 %
2007	340	40	67	447	76.1 %	8.9 %	15.0 %
2008	412	38	96	546	75.5 %	7.0 %	17.6 %
2009	409	30	104	543	75.3 %	5.5 %	19.2 %
2010	555	58	136	749	74.1 %	7.7 %	18.2 %
2011	638	44	157	839	76.0 %	5.2 %	18.7 %
2012	670	44	139	853	78.5 %	5.2 %	16.3 %

Introducción

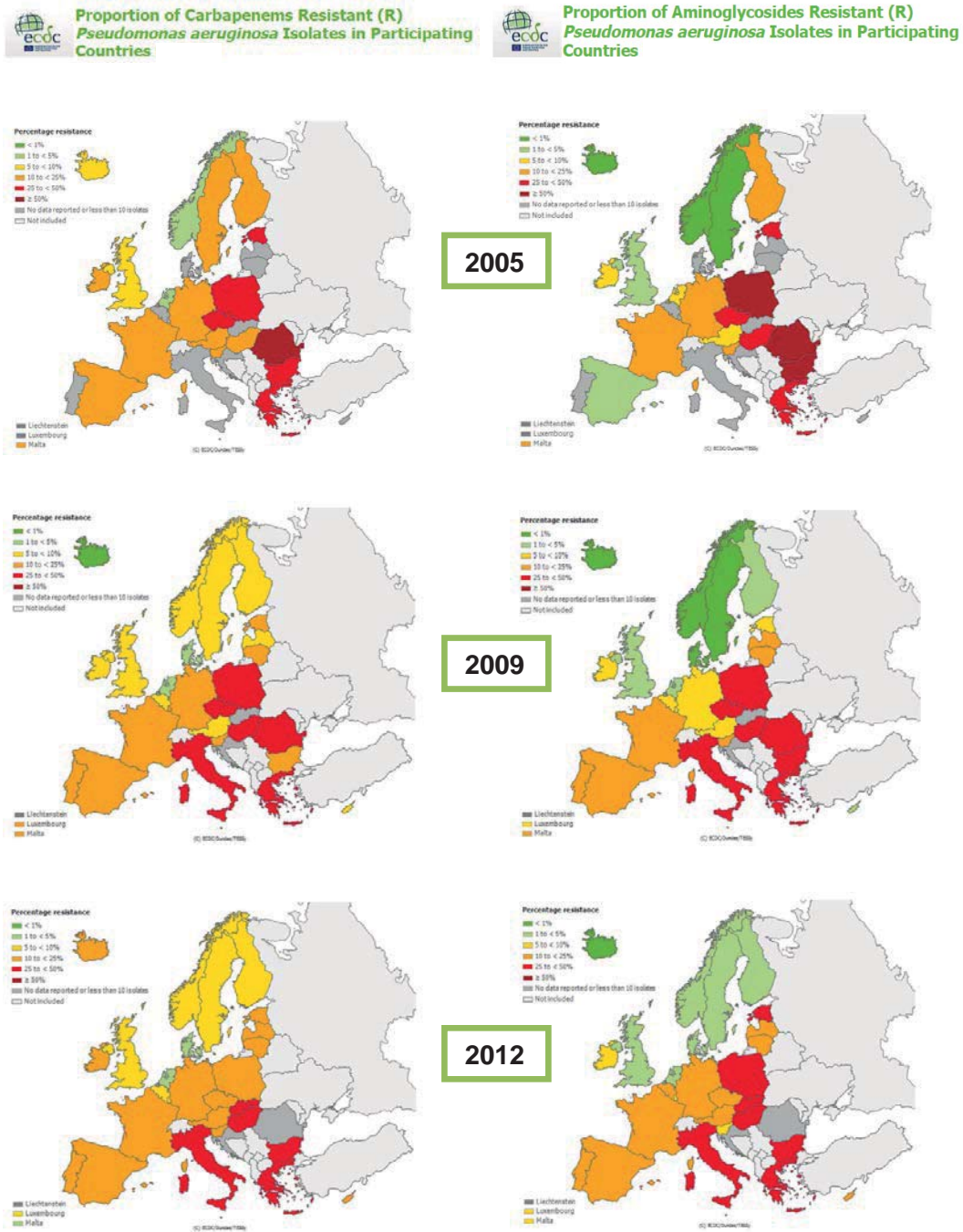


Figura 3.- Evolución de la resistencia a carbapenémicos y a aminoglucósidos en la especie *P. aeruginosa* desde 2005 hasta 2012 en Europa (<http://ecdc.europa.eu>).

Por otro lado, en el ambiente hospitalario y más concretamente en las UCIs se deben tomar medidas de control estrictas, ya que existe una elevada proporción de infecciones adquiridas causadas por microorganismos denominados "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) resistentes a los antibióticos (Boucher *et al.*, 2009).

Se han definido categorías dentro del nivel de resistencia presentado por algunas de estas bacterias y se han clasificado como organismos “multirresistentes” (MDR), organismos “extensivamente resistentes” (XDR) y organismos “panresistentes” (PDR). Sin embargo, hasta llegar a un consenso, en la bibliografía se encontraron diferentes interpretaciones de esta clasificación (Paterson, 2006). Finalmente, un grupo de expertos internacionales del ECDC se reunieron para estandarizar esta terminología. Comprendieron que no era sencillo y observaron la necesidad de crear unas “categorías antimicrobianas” que fueran epidemiológicamente significativas, seleccionar los antibióticos de estas categorías a emplear en cada tipo de bacteria implicada y, por último, definir la resistencia con respecto a estas categorías (Magiorakos *et al.*, 2012).

En la **Tabla 2** se observan las categorías antimicrobianas descritas y los antibióticos utilizados para definir los microorganismos MDR, XDR y PDR en la especie *P. aeruginosa*; quedando definidas 8 categorías con entre 1 y 4 antibióticos cada una, que nos sirven para definir el criterio del siguiente modo:

- **MDR** = organismo que no presenta sensibilidad a 1 o más antibióticos dentro de 3 o más categorías antimicrobianas.
- **XDR** = organismo que no presenta sensibilidad a 1 o más antibióticos en todas excepto en 2 o menos categorías antimicrobianas.
- **PDR** = organismo que no presenta sensibilidad a ninguno de los antibióticos del listado.

TABLA 2.- Categorías antimicrobianas y antibióticos utilizados para definir los microorganismos MDR, XDR y PDR en la especie *P. aeruginosa* (Magiorakos *et al.*, 2012).

Categoría antimicrobiana	Antibiótico
Aminoglucósidos	Gentamicina
	Tobramicina
	Amikacina
	Netilmicina
Carbapenémicos anti-pseudomónicos	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Cefalosporinas anti-pseudomónicas	Ceftazidima
	Cefepime
Fluoroquinolonas anti-pseudomónicas	Ciprofloxacina
	Levofloxacina
Penicilinas anti-pseudomónicas + inhibidores de beta-lactamasas	Ticarcilina-ácido clavulánico
	Piperacilina-tazobactam
Monobactámicos	Aztreonam
Ácidos fosfónicos	Fosfomicina
Polimixinas	Colistina
	Polimixina B

Como ya hemos mencionado, las bacterias han desarrollado mecanismos por los cuales pueden resistir a la acción de los antibióticos, pero además son capaces de diseminar y adquirir tal resistencia empleando elementos genéticos móviles o movilizables como son los plásmidos, los transposones o los integrones (transferencia horizontal) (Poole, 2011). Por lo tanto, abordar la cuestión de la resistencia a los antibióticos analizando los mecanismos implicados es considerada una de las prioridades más urgentes en el ámbito clínico (El Salabi *et al.*, 2013). Pero en los últimos años, se está demostrando también que las bacterias de origen ambiental portan estos mecanismos de resistencia y desempeñan un papel importante en su transferencia. Por ello, este problema no se limita al ámbito hospitalario sino que el uso de antibióticos en veterinaria o agricultura también ha ocasionado el incremento de la prevalencia de microorganismos resistentes a antibióticos en los distintos nichos ecológicos (Heuer *et al.*, 2011), siendo la cadena alimentaria una de

las posibles rutas de introducción de estos genes de resistencia en el hombre (Rolain, 2013).

2.1.- Mecanismos de acción de los antibióticos

Los mecanismos por los cuales los compuestos con actividad antibacteriana inhiben el crecimiento o causan la muerte de las bacterias son muy variados, y dependen de las dianas afectadas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Los principales puntos de acción de los antibióticos en las bacterias son: inhibición de síntesis de la pared bacteriana, alteración de la membrana citoplasmática, inhibición de la síntesis proteica, alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos, bloqueo de la síntesis de factores metabólicos y bloqueo de mecanismos de resistencia (como son los inhibidores de beta-lactamasas) (Figura 4).

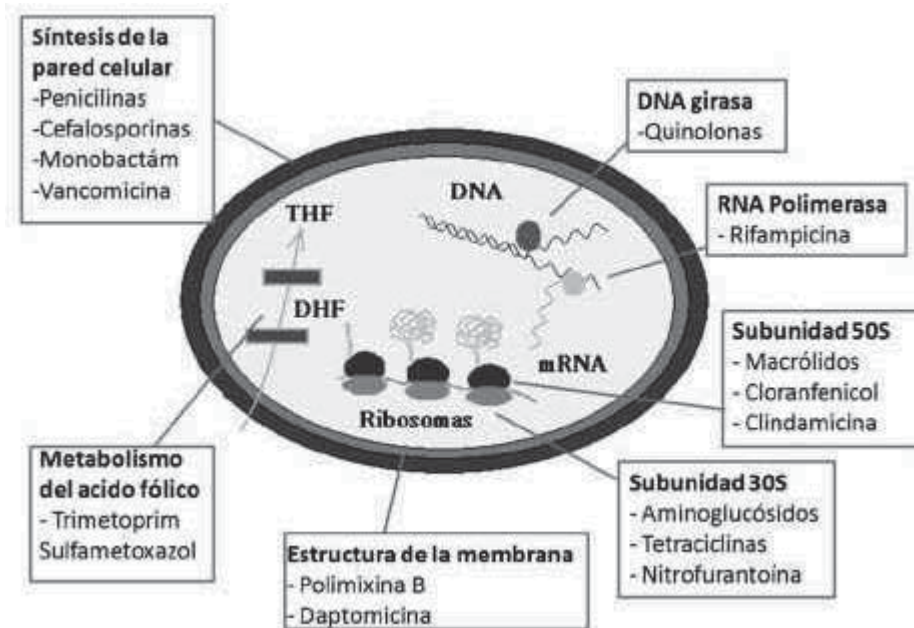


Figura 4.- Mecanismos de acción de los antibióticos.

Las bacterias Gram negativas presentan una mayor resistencia a la entrada de antibióticos que las Gram positivas, porque poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de peptidoglicano. Esta membrana proporciona una importante barrera frente a determinados antibióticos; pero, además, en ella se encuentran una gran cantidad de proteínas, como las porinas, que permiten la difusión pasiva de

pequeñas moléculas hidrofílicas y el acceso a la capa de peptidoglicano. Una vez en el interior, los antibióticos deben evitar su hidrólisis o transformación en un producto inactivo y alcanzar la diana efectiva antes de que un sistema de expulsión activa lo lleve de nuevo fuera de la bacteria (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

2.2.- Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Por otro lado, las bacterias han desarrollado unos mecanismos de defensa frente a estos antibióticos. Estos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos, como nuevo material genético procedente de bacterias de la misma especie o incluso de diferente género, o alcanzarse por mutaciones cromosómicas en el DNA de la bacteria (Peleg & Hooper, 2010).

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos empleados por las bacterias son: inactivación enzimática del antibiótico, hiperproducción o modificación de la diana de acción, síntesis de una diana alternativa, expulsión activa del antibiótico o alteración de la permeabilidad de la membrana (**Figura 5**).

Normalmente estos mecanismos no suelen darse de forma aislada; se combinan dos o más pudiendo proporcionar a la bacteria un nivel mayor de resistencia a los antibióticos. Además, es muy importante remarcar que este fenómeno de resistencia, en múltiples ocasiones, no se crea tras la aparición de un nuevo antibiótico (ya sea natural o sintético), sino que la propia bacteria tiene almacenado en su interior un determinado mecanismo que puede no expresarse o se adapta hasta que lo necesita como respuesta al ataque que está sufriendo (Rice & Bonomo, 2011).

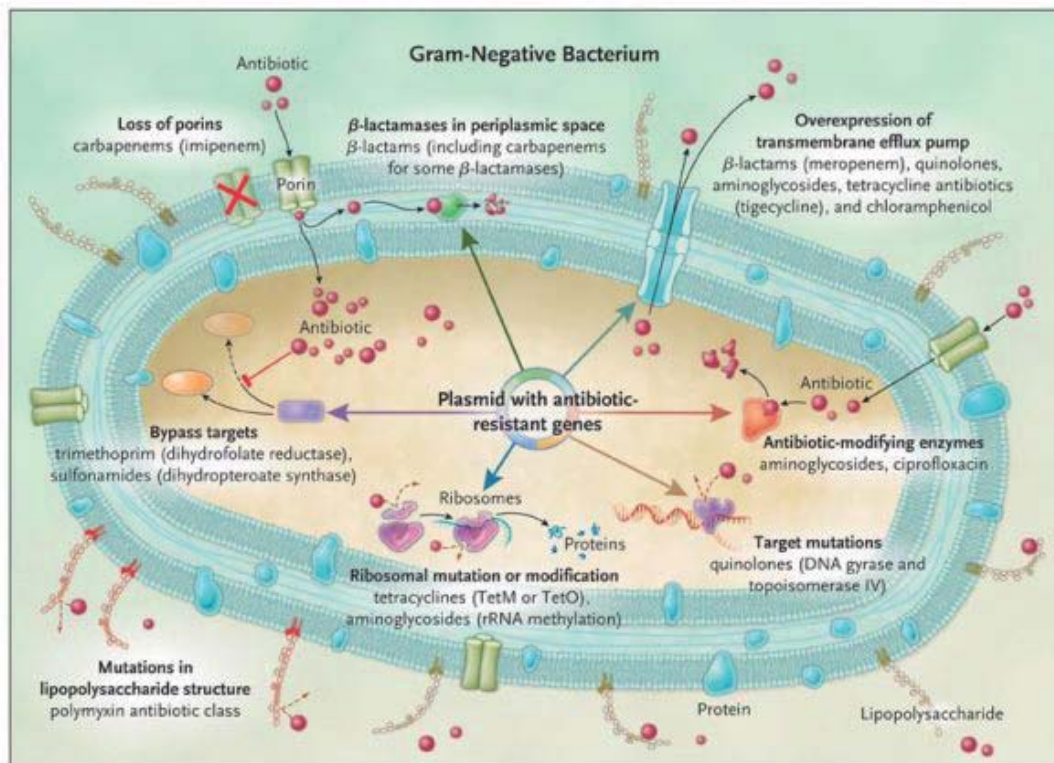


Figura 5.- Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas (Peleg & Hooper, 2010).

Como veremos más adelante (**Apartado 2.5** de esta sección), dos de las principales familias de antibióticos efectivas contra la especie *P. aeruginosa* son los beta-lactámicos y los aminoglucósidos. Por esta razón, se va a realizar una pequeña profundización en sus mecanismos de acción y de resistencia.

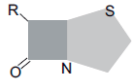
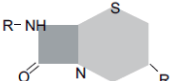
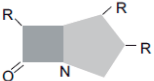
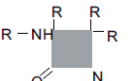
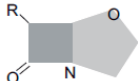
2.3.- Mecanismos de acción y resistencia a beta-lactámicos

Los antibióticos beta-lactámicos se caracterizan por poseer una estructura química en forma de anillo (conocido como anillo beta-lactámico), al cual se añaden diferentes radicales dando lugar a los distintos grupos existentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos e inhibidores de beta-lactamasas (**Tabla 3**). Estos antibióticos presentan una baja toxicidad debido a que actúan sobre la pared celular bacteriana, inhibiendo su síntesis e induciendo un efecto autolítico (Suárez & Gudiol, 2009).

Introducción

La resistencia a los antibióticos beta-lactámicos se puede producir por diferentes mecanismos: reducción de la permeabilidad de la membrana, expulsión activa del antibiótico, modificación de la diana de acción o inactivación enzimática del antibiótico, siendo este último el mecanismo más importante en bacterias Gram negativas. Estas enzimas, denominadas beta-lactamasas, son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo beta-lactámico (**Figura 6**) dando lugar a compuestos sin actividad (Palzkill, 2013).

TABLA 3.- Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos (adaptada Suárez & Gudiol, 2009).

Estructura química		Grupo beta-lactámico (antibiótico representativo)
Anillo beta-lactámico + anillo tiazolidínico		PENICILINAS (Ticarcilina)
Anillo beta-lactámico + anillo dihidrotiacínico		CEFALOSPORINAS (Ceftazidima)
Anillo beta-lactámico + anillo pirrolínico		CARBAPÉNEMICOS (Imipenem)
Anillo beta-lactámico		MONOBACTÁMICOS (Aztreonam)
Anillo beta-lactámico + anillo oxazolidínico		INHIBIDORES (Ácido clavulánico)

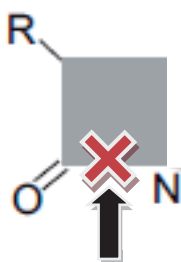


Figura 6.- Lugar de ataque de las beta-lactamasas sobre el anillo beta-lactámico.

La clasificación de las beta-lactamasas, se describe según dos aproximaciones (Tabla 4):

- 1) **Clasificación molecular.** En función de su estructura proteica (Ambler, 1980): se dividen en 4 clases (A-D).
- 2) **Clasificación funcional.** En función de sus características bioquímicas y funcionales (Bush *et al.*, 1995): establece 3 grupos diferentes, que a su vez se subdividen en función del sustrato y perfil de inhibición.

TABLA 4.- Clasificación de las beta-lactamasas (adaptada Bush & Jacoby, 2010).

Grupo Bush	Clase Ambler	Sustratos preferidos	Inhibidos por:		Enzimas representativas
			AC ^a	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	No	No	AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sí	No	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	Sí	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Sí	No	TEM-3, SHV-2, PER-1, CTX-M-15, VEB-1
2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	No	No	TEM-50
2c	A	Carbencilinas	Sí	No	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbencilinas, cefepime	Sí	No	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Sí	No	CepA
2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenémicos	No	Sí	IMP-1, VIM-1, CrA, IND-1
3b	B	Carbapenémicos	No	Sí	CphA, Sfh-1

^aAC = ácido clavulánico

Introducción

Centrándonos ahora en los antibióticos carbapenémicos, éstos constituyen el grupo de beta-lactámicos con mayor espectro de actividad por lo que deberían utilizarse exclusivamente en infecciones producidas por microorganismos resistentes al resto de beta-lactámicos, limitándose su uso al ámbito hospitalario (Rodrigo, 2010). Los carbapenémicos se clasifican en 3 grupos, aunque algunos de ellos no están comercializados puesto que todavía están en diferentes fases de desarrollo (**Tabla 5**).

TABLA 5.- Clasificación de los carbapenémicos (Bassetti *et al.*, 2013).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Carbapenémicos	Ertapenem Panipenem Tebipenem	Imipenem Meropenem Doripenem Biapenem	Tomopenem Razupenem
Actividad frente a bacterias no fermentadoras (<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>)	No	Sí	Sí
Actividad frente a SARM ^a	No	No	Sí

^aSARM = *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Los carbapenémicos más empleados son: ertapenem, imipenem, meropenem y doripenem (**Figura 7**).

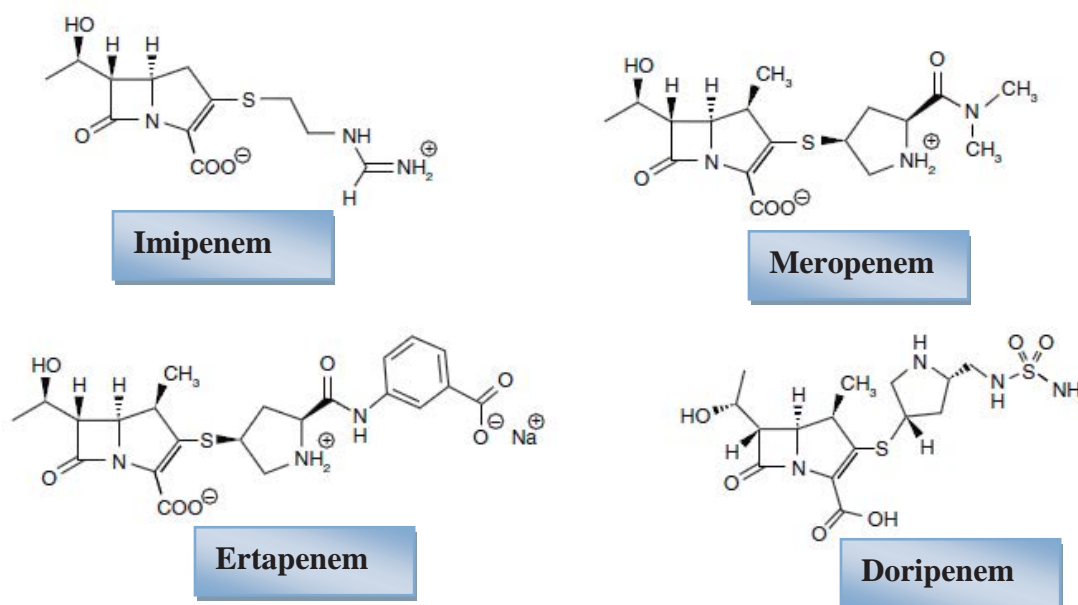


Figura 7.- Estructura química de los 4 carbapenémicos más utilizados.

El ertapenem tiene un espectro algo más reducido y presenta escasa actividad frente a *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp, mientras que sí es efectivo frente a enterobacterias (Suárez & Gudiol, 2009). El carácter aniónico, la lipofilia y el elevado peso molecular podrían dificultar su penetración a través de las porinas o facilitar su expulsión por bombas de eflujo, no alcanzando unas concentraciones adecuadas en el espacio periplásmico (Fresnadillo-Martínez *et al.*, 2010). Por el contrario, imipenem, meropenem y doripenem tienen un menor peso molecular, son hidrofílicos y de estructura compacta y zwitteriónica, lo que permite una penetración rápida a través de las porinas (OMPs) de los microorganismos Gram negativos (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción de estos antibióticos es la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, así la pared celular se debilita y, normalmente, se produce la lisis de la bacteria. Los carbapenémicos deben atravesar la pared celular para ejercer su acción, ésto sucede a través de las porinas de la membrana externa en las bacterias Gram negativas. Por ejemplo, en *P. aeruginosa* el imipenem emplea exclusivamente la vía de la porina OprD; mientras que meropenem y doripenem emplean ésta y, además, otras porinas (Fresnadillo-Martínez *et al.*, 2010).

En bacterias Gram negativas, los mecanismos de resistencia a carbapenémicos son tres: (1) alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa (porinas), (2) bombas de expulsión activa, y (3) producción de enzimas beta-lactamasas (Papp-Wallace *et al.*, 2011). Este último mecanismo, puede deberse bien a la hiperproducción de la beta-lactamasa cromosómica e inducible AmpC, o, más recientemente, a la producción de carbapenemasas. Entre ellas, se pueden encontrar las metalo-beta-lactamasas (MBL, grupo 3 o clase B), las carbapenemasas de clase A (o grupo 2f) o algunas variantes de oxacilinasas (grupo 2df o clase D) (Oliver, 2009; Queenan & Bush, 2007). Además, en bacterias Gram negativas la resistencia suele ser consecuencia de la asociación de varios de estos mecanismos (Fresnadillo-Martínez *et al.*, 2010).

2.3.1- Carbapenemasas

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de beta-lactamasas capaces de hidrolizar el anillo carbapenémico además de otros anillos beta-lactámicos hidrolizables. Dentro de ellas encontramos las carbapenemasas de clase A y D, que son serina dependientes, y las de clase B o metalo-beta-lactamasas (MBL), que son dependientes de la presencia de iones Zn^{2+} en el medio (Fresnadillo-Martínez *et al.*, 2010) (**Figura 8**).

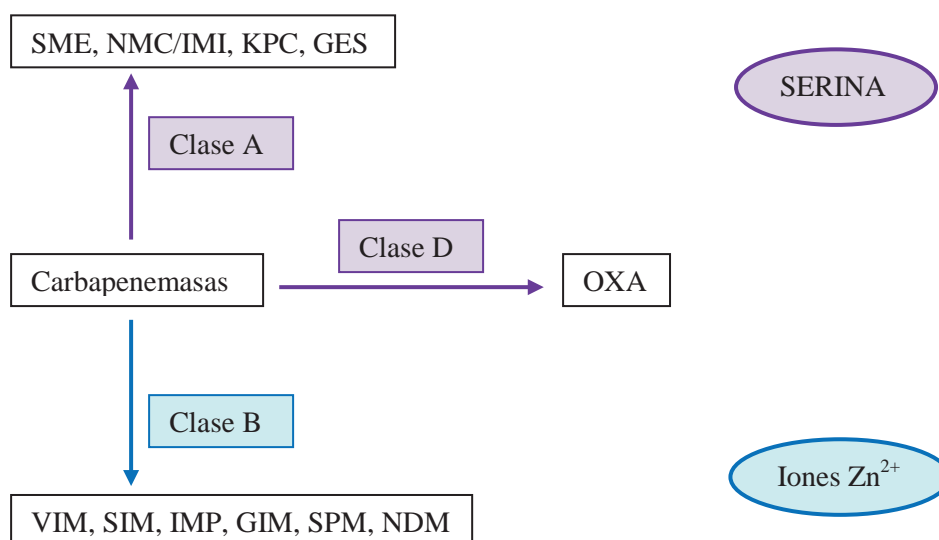


Figura 8.- Clasificación de las carbapenemasas (adaptada Opazo *et al.*, 2012).

Mientras que las carbapenemasas de clase A son inhibidas por ácido clavulánico, esta inhibición es variable en las de clase D y las MBL son exclusivamente inhibidas por EDTA. En general, actúan sobre todos los antibióticos beta-lactámicos, a excepción del aztreonam que no puede ser hidrolizado ni por MBL ni por algunas de las carbapenemasas de clase A (Bonomo & Szabo, 2006; Queenan & Bush, 2007). En la **Tabla 6** se puede observar la distribución de las carbapenemasas adquiridas de relevancia clínica en las principales especies bacterianas.

TABLA 6.- Distribución de las carbapenemasas adquiridas de relevancia clínica en las principales especies bacterianas (adaptada Miriagou *et al.*, 2010).

Microorganismo	Clase B (MBLs)	Clase A (KPC, GES)	Clase D (OXA)
No fermentadores			
<i>P. aeruginosa</i>	++	+	+
<i>P. putida</i>	+	+	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+ ^a		++
<i>Acinetobacter</i> spp.	+		+
Enterobacterias			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+ ^a	++	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+		+
<i>Providencia</i> spp.	+		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	
<i>Serratia marcescens</i>	+ ^a	+	
<i>Enterobacter</i> spp.	+ ^a	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	
<i>Morganella morganii</i>	+		
<i>Salmonella enterica</i>		+	
<i>Raoultella</i> spp.		+	

Combinación enzima-especie: ++ es prevalente y + es ocasional. Las cruces en **negrita** marcan una mayor prevalencia en las respectivas especies. ^aEndémica en ciertas regiones.

Dentro de las carbapenemasas de clase A se encuentran las proteínas de tipo SME, IMI/NMC-A, SFC, BIC, KPC y algunas de la familia GES; siendo las más estudiadas las dos últimas debido a su codificación plasmídica y rápida expansión en los hospitales (Hong *et al.*, 2012). El grupo KPC debe su nombre a la especie *Klebsiella pneumoniae*, bacteria en la que fue descubierta aunque, a posteriori, también se ha detectado en otras especies como *K. oxytoca*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Enterobacter* spp. o *Pseudomonas* spp. (Miriagou *et al.*, 2010). Las carbapenemasas de clase D pertenecen al grupo OXA; las más destacadas dentro del género *Acinetobacter* son OXA-23, 24/40, 51, 58 y 143 (Opazo *et al.*, 2012), mientras que en los últimos años se está detectando una elevada diseminación de OXA-48 entre enterobacterias (como en *K. pneumoniae*, donde fue descrita por primera vez en Estambul) (Poirel *et al.*, 2012). Los grupos de metalo-beta-lactamasas

Introducción

más predominantes y de los cuales se han detectado más variantes, aunque no los únicos (**Tabla 7**), son IMP y VIM y, más recientemente, NDM.

TABLA 7.- Principales metalo-beta-lactamasas descritas (adaptada Palzkill, 2013).

Enzima	Microorganismo	Número de acceso en GenBank
BcII	<i>Bacillus cereus</i>	M11189
CcrA	<i>Bacteroides fragilis</i>	M63556
IMP-1	<i>Serratia marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	S71932
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	T18050
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	AF191564
VIM-4	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	AY135661
VIM-7	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	AM778842
BlaB	<i>Chryseobacterium meningoseptica</i>	AF189298
SPM-1	<i>P. aeruginosa</i>	AY341249
NDM-1	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>	JN420336
GIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	AJ620678
SIM-1	<i>A. baumannii</i>	AY887066
DIM-1	<i>P. stutzeri</i>	GU323019
TMB-1	<i>Achromobacter xylobacter</i>	FR771847
Bla2	<i>Bacillus anthracis</i>	CP001598
KHM-1	<i>Citrobacter freundii</i>	AB364006
CphA	<i>Aeromonas hydrophila</i>	X57102
Sfh-1	<i>Serratia fonticola</i>	AF197943
ImiS	<i>Aeromonas veronii</i>	Y01415
L1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AB294542
FEZ-1	<i>Legionella gormanii</i>	Y17896
BJP-1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NP772870
AIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	AM998375
THIN-B	<i>Janthinobacterium lividum</i>	CAC33832
GOB-1	<i>Chryseobacterium meningoseptica</i>	ABO21417
CAU-1	<i>Caulobacter crescentus</i>	CAC87665
CAR-1	<i>Erwinia caratovora</i>	Q6D395
SMB-1	<i>Serratia marcescens</i>	AB636283
POM-1	<i>P. otitidis</i>	ADC79555
CRB11	“Uncultured bacterium”	ACS83724

Profundizando un poco más en la historia de las beta-lactamasas de clase B (MBLs), fueron descubiertas hace unos 40 años pero no se consideraron un problema grave para la terapia antibiótica porque se habían localizado en cromosomas y en microorganismos no patógenos. Sin embargo, la situación cambió en la década de los 90, cuando se produjo su “diseminación” al adquirirse por transferencia horizontal entre patógenos Gram negativos (Palzkill, 2013). Inicialmente, las MBLs se encontraban diseminadas en las especies *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. pero, recientemente, se está observando una rápida emergencia hacia algunas especies de enterobacterias (como *K. pneumoniae* o *E. coli*) (Kali *et al.*, 2013; Miriagou *et al.*, 2010; Walsh, 2010; Yong *et al.*, 2009).

Por ejemplo, la primera MBL descubierta fue IMP-1; que se detectó en una cepa de *P. aeruginosa* en Japón en el año 1990 (Watanabe *et al.*, 1991). Seguidamente se produjo una avalancha de enterobacterias con IMP-1 hacia finales de esa misma década y, hoy día, continúa siendo un determinante de resistencia dominante en Japón. Aunque en el resto del mundo, las variantes de IMP (48 asignadas a día 2 de julio de 2014, según la página web de “Lahey Clinic”: <http://www.lahey.org/Studies/>) no han sido predominantes a nivel global; tan sólo se han descrito casos esporádicos (Walsh, 2010).

Por otro lado, la variante VIM-2 es la más extendida de todas las VIM descritas (41 asignadas a día 2 de julio de 2014, según la página web de “Lahey Clinic”: <http://www.lahey.org/Studies/>), localizándose principalmente en cromosoma más que en plásmidos (Walsh, 2010). Lo más destacable de todas estas variantes VIM es que siempre se han descrito como casetes génicos insertados en integrones de clase 1 o asociados con elementos movilizables que, además, portan otros genes de resistencia a otras familias de antibióticos provocando el fenómeno de co-resistencia (Palzkill, 2013). Por ejemplo, VIM-2 está altamente asociado con transposones tipo Tn402 o Tn5090 (Walsh, 2010). Desde una perspectiva global, la emergencia y diseminación de las variantes VIM (sobre todo, 1 y 4) entre las enterobacterias se centra en dos regiones concretas del mundo: la zona mediterránea (en particular, Grecia y Turquía) y el subcontinente de la India y Pakistan (Walsh, 2010; Yong *et al.*, 2009).

Además, la aparición de un nuevo tipo de MBL (NDM-1, con tan sólo un 32,4% de identidad con VIM-2) en una cepa de *K. pneumoniae* y otra de *E. coli* a principios del año 2008 en Suecia en un paciente que había sido hospitalizado e intervenido en la India unos meses antes (Yong *et al.*, 2009), no fue una noticia de primer impacto entre la comunidad científica, en un principio. Hasta que se observó su gran diseminación a nivel mundial en un período de tiempo muy corto (Walsh, 2010). Este gen se asocia con plásmidos de tamaño variable y, normalmente, las cepas que lo portan suelen ser extremadamente resistentes a los antibióticos (Kumarasamy *et al.*, 2010)

En la **Figura 9** se puede ver la distribución geográfica a nivel mundial (A) y en Europa (B) de las enterobacterias productoras tanto de los genes IMP como VIM, mientras que en la **Figura 10** se representa la distribución geográfica de los productores de NDM.

Por tanto, sabemos que existen MBL intrínsecas y adquiridas. Las MBL intrínsecas son las responsables de la resistencia natural a los carbapenémicos en algunas bacterias, como *Stenotrophomonas maltophilia*, mientras que las adquiridas, se han detectado en un gran número de especies bacterianas (como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. o un amplio número de enterobacterias). Los genes que las codifican pueden estar localizados en casetes génicos dentro de integrones o transposones que, a su vez, pueden ser transferibles o no (Fresnadillo-Martínez *et al.*, 2010); también pueden coexistir con genes que proporcionan resistencia a otras familias de antibióticos y estas estructuras completas pueden insertarse en cromosomas bacterianos o en plásmidos siendo ésta una fórmula de movilización y dispersión, provocando una alarmante emergencia de bacterias multirresistentes (Palzkill, 2013).

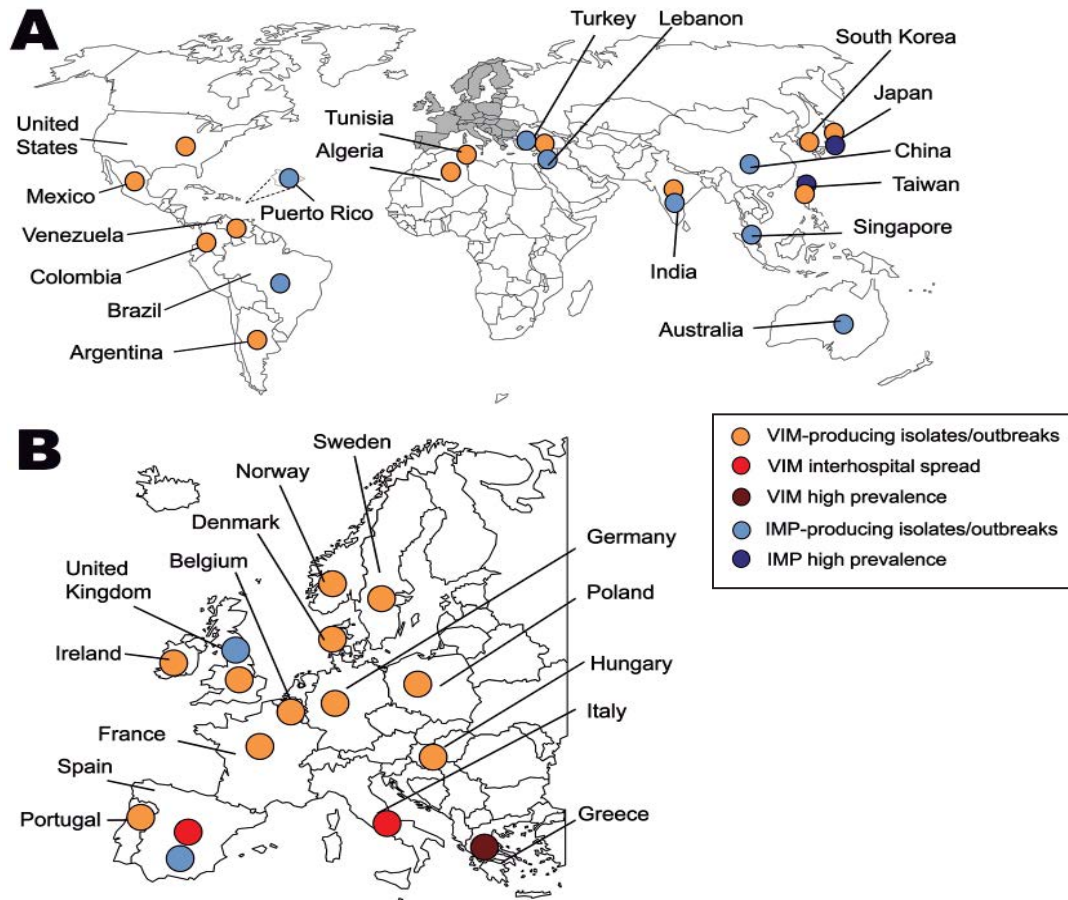


Figura 9.- Distribución geográfica a nivel mundial (A) y en Europa (B) de las enterobacterias productoras de los genes IMP y VIM (Nordmann *et al.*, 2011).

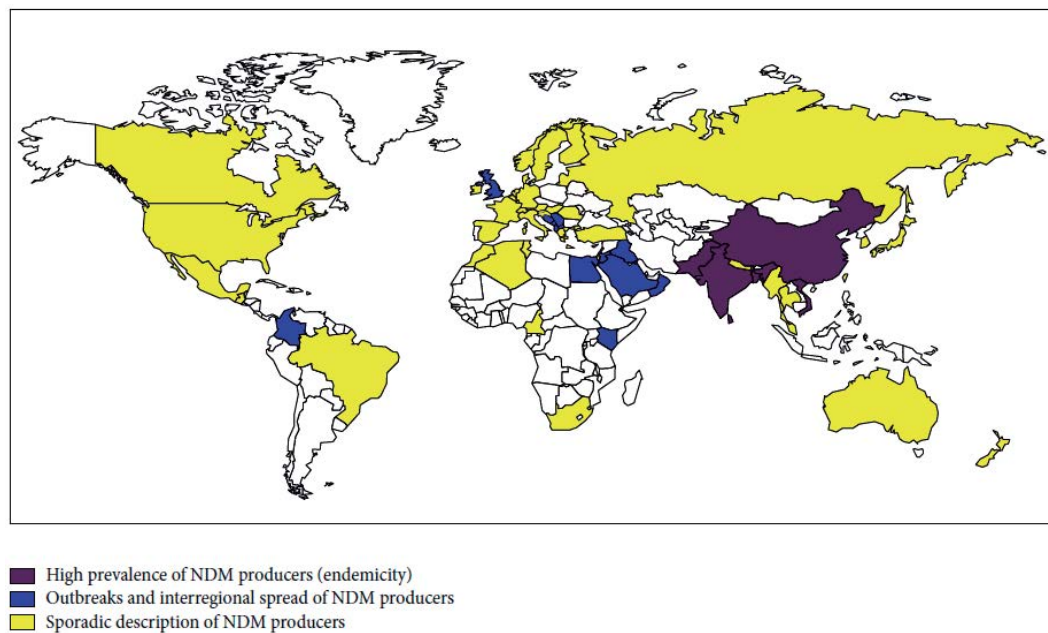


Figura 10.- Distribución geográfica a nivel mundial de las enterobacterias productoras de NDM (Dortet *et al.*, 2014).

2.4.- Mecanismos de acción y resistencia a aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan a nivel de la subunidad 30S ribosomal bacteriana, y por ende, a nivel de síntesis de proteínas, creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana. Tienen actividad especialmente frente a bacterias Gram negativas aeróbicas y actúan sinérgicamente con beta-lactámicos en microorganismos Gram positivos (Bassetti *et al.*, 2013; Van Hoek *et al.*, 2011; Yao & Moellering, 2011).

Nueve de estos antibióticos [gentamicina, tobramicina, amikacina, estreptomicina, neomicina, kanamicina, paromomicina, netilmicina y espectinomomicina] están aprobados para uso clínico (humano y/o veterinario) tanto en Estados Unidos como en Europa (Bassetti *et al.*, 2013). Gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina están incluidos como aminoglucósidos anti-pseudomónicos (**Figura 11**) (Young *et al.*, 2013).

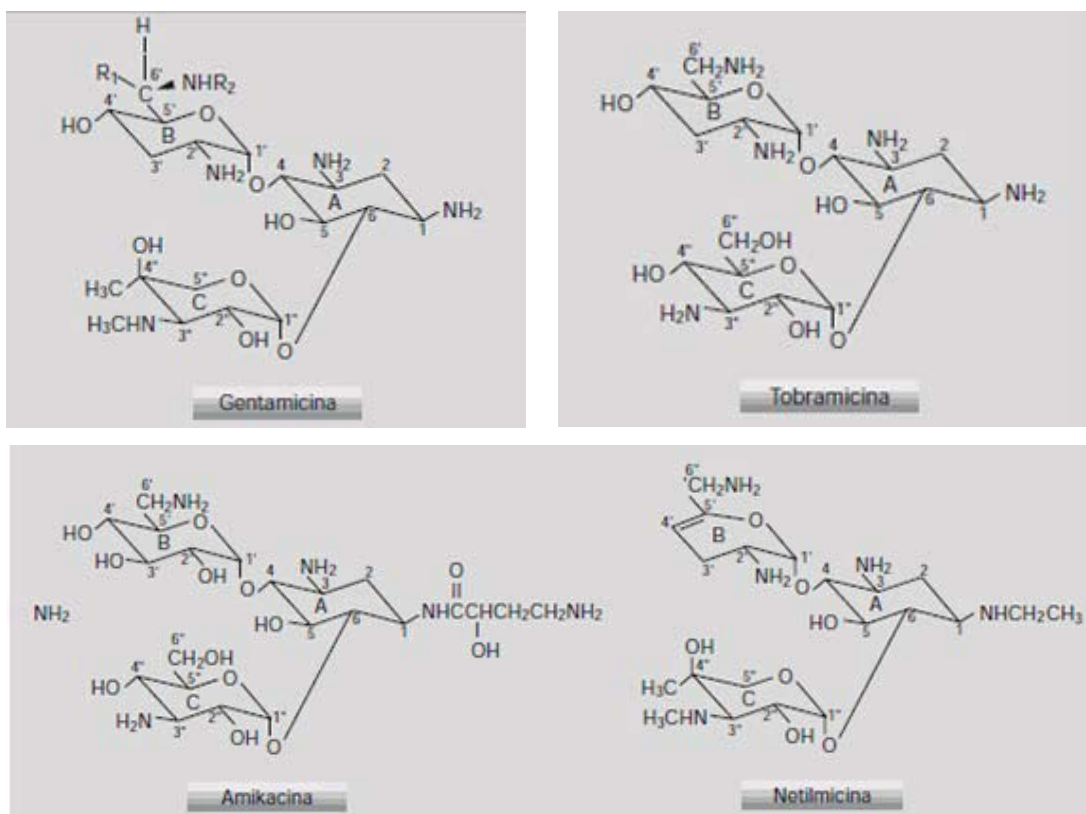


Figura 11.- Estructura química de los 4 aminoglucósidos anti-pseudomónicos.

Gentamicina y tobramicina son antibióticos naturales, mientras que amikacina y netilmicina son derivados semi-sintéticos de kanamicina y sisomicina, respectivamente (Yao & Moellering, 2011). La gentamicina es el antibiótico más utilizado, sin embargo, la amikacina tiende a ser especialmente efectiva en microorganismos resistentes. En relación con otras familias de antibióticos, se ha demostrado la estabilidad relativa de los aminoglucósidos frente a la aparición de resistencia durante el tratamiento (especialmente cuando se utiliza en combinación con otros antibióticos; frecuentemente con beta-lactámicos) (Bassetti *et al.*, 2013; Yao & Moellering, 2011).

Los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos pueden ser de tres tipos: defectos en la entrada del aminoglucósido a la bacteria (bien por una disminución de la permeabilidad de la membrana o bien por un incremento de la actividad de las bombas de expulsión activa), alteraciones en el ribosoma que compromete la unión del antibiótico a su diana y modificación enzimática del aminoglucósido con pérdida de su afinidad por el ribosoma (Yao & Moellering, 2011). Este último mecanismo es el más frecuentemente descrito y se conocen tres grupos de enzimas modificantes de aminoglucósidos: N-acetiltransferasas (AAC), O-adeniltransferasas (ANT) y O-fosfotransferasas (APH). Cada grupo, a su vez, se subdivide en clases en función de su sitio de modificación (Van Hoek *et al.*, 2011). En la **Tabla 8** se pueden ver algunos fenotipos de resistencia asociados a estas enzimas modificantes de aminoglucósidos.

TABLA 8.- Fenotipos de resistencia asociados a enzimas modificantes de aminoglucósidos (adaptada Martínez-Martínez & Ruiz de Alegría, 2009).

Fenotipo de resistencia	Enzima modificante
Estreptomina	APH(3')
Gentamicina	AAC(3)-I
Kanamicina + Amikacina	APH(3')-IV
Estreptomina + Espectinomicina	ANT(3')
Kanamicina + Neomicina	APH(3')-I o APH(3')-II
Kanamicina + Tobramicina + Amikacina	ANT(4')-II
Kanamicina + Gentamicina + Tobramicina	ANT(2')-I
Kanamicina + Gentamicina + Tobramicina + Netilmicina	AAC(3)-II o AAC(3)-IV
Kanamicina + Tobramicina + Amikacina + Netilmicina	AAC(6')-I
Gentamicina + Tobramicina + Netilmicina + Neomicina	AAC(2')

Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en plásmidos, transposones o como casetes génicos en integrones. Incluso un mismo plásmido puede presentar diversos genes codificantes de enzimas modificantes de aminoglucósidos y de resistencia a otras familias de antibióticos como los beta-lactámicos (Palzkill, 2013).

2.5.- Resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es, por un lado, naturalmente resistente a una gran cantidad de antibióticos y, por otro, tiene la capacidad de desarrollar resistencia por mutaciones en diferentes partes del cromosoma o bien adquirir por transferencia horizontal genes de resistencia albergados en plásmidos, transposones o integrones (Henry & Speert, 2011). La resistencia natural o intrínseca es debida que *P. aeruginosa* presenta una membrana externa poco permeable, una beta-lactamasa AmpC cromosómica e inducible y un complejo sistema de bombas de expulsión activa de antibióticos (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009).

La beta-lactamasa AmpC (o cefalosporinasa) permite que *P. aeruginosa* sea resistente a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de 1^a y 2^a generación e, incluso, a cefotaxima y ceftriaxona. Además, esta bacteria puede adquirir resistencia a cefalosporinas de 3^a generación cuando existe una hiperproducción de dicha enzima (Strateva & Yordanov, 2009).

Por otro lado, la sobreexpresión de los múltiples sistemas de expulsión activa presentes en esta bacteria es considerada, en la actualidad, el mecanismo de resistencia intrínseca más prevalente en ella (por delante de la baja permeabilidad de la membrana externa) (Strateva & Yordanov, 2009). Tienen una amplia especificidad de sustrato por lo que permiten la salida de una gran cantidad de antibióticos como beta-lactámicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim. Además, estas bombas de expulsión también exportan determinantes de virulencia aumentando así su toxicidad sobre el hospedador (Henry & Speert, 2011). Se han detectado varios sistemas de expulsión activa dentro de *P. aeruginosa*, pero cuatro de ellos son los que principalmente han sido caracterizados: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM

(Lister *et al.*, 2009). Pertenecen a la familia RND (resistance-nodulation-division) y están formados por tres componentes (**Figura 12**) (Strateva & Yordanov, 2009).

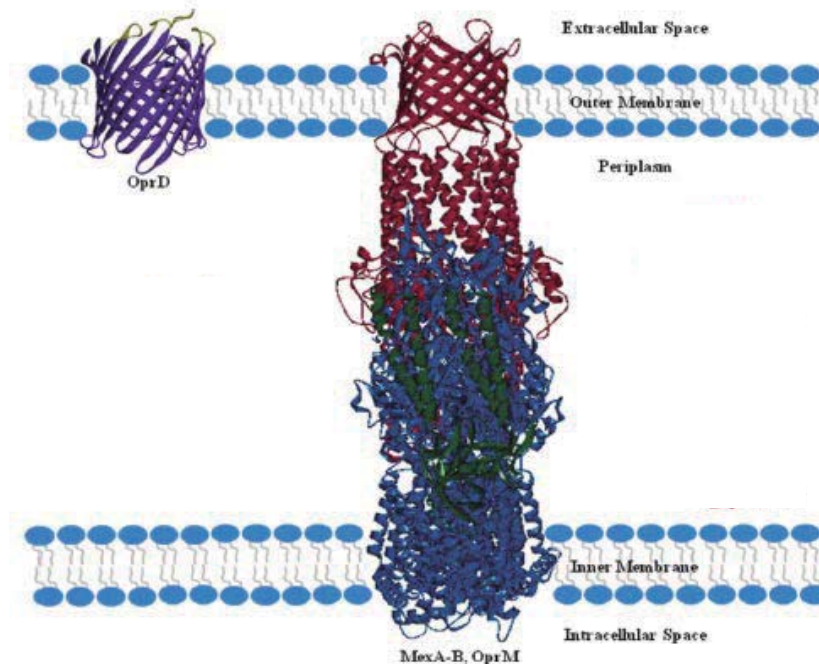


Figura 12.- Representación del sistema de expulsión activa MexAB-OprM y de la porina OprD en una cepa de *P. aeruginosa* (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

Por tanto, entre los antibióticos que han demostrado actividad frente a este microorganismo, denominados anti-pseudomónicos, se incluyen: aminoglucósidos (como gentamicina, tobramicina y amikacina), fluoroquinolonas (como ciprofloxacina y levofloxacina), algunas cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (como ceftazidima y cefepime), algunas ureidopenicilinas (como piperacilina o ticarcilina, aunque *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a todas las demás penicilinas), carbapenémicos (excepto ertapenem), monobactámicos (como aztreonam) y colistina.

Sin embargo, además de todos los mecanismos intrínsecos, *P. aeruginosa* puede adquirir resistencia a estos antibióticos anti-pseudomónicos. Los principales genes de resistencia que suele capturar por transferencia horizontal son los relacionados con enzimas modificantes de aminoglucósidos y con beta-lactamasas, destacando entre ellas las carbapenemasas (**Tabla 9**) (Strateva & Yordanov, 2009). Estos genes, normalmente, están albergados en las mismas estructuras (como, por

Introducción

ejemplo, integrones) pudiendo transferirse de forma conjunta y provocando el fenómeno de bacteria multirresistente (Poole, 2011).

TABLA 9.- Genes de resistencia adquiridos más frecuentemente detectados en *P. aeruginosa*.

Familia de antibiótico	Genes
Aminoglucósidos	AAC(6')-II, AAC(3)-I, AAC(3)-II, AAC(6')-I, ANT(2')-I
Beta-lactámicos	PSE-1, PSE-4, CARB-3, CARB-4. SHV-2a, SHV-5, SHV-12, TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42, TEM-116, VEB-1, VEB-2, PER-1, GES-1, GES-2*, GES-5*, GES-8, GES-9, BEL-1 (BLEEs de clase A). KPC-2, KPC-5 (carbapenemasas de clase A). OXA-10, OXA-2, OXA-1, OXA-9, LCR-1, OXA-18, OXA-45 (oxacilinasas). IMP-1, IMP-7, IMP-9, IMP-13, IMP-16, IMP-18, VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-5, VIM-7, VIM-8, VIM-11, VIM-13, VIM-15, VIM-16, SPM-1, GIM-1, AIM-1 (metalo-beta-lactamasas).

BLEE: beta-lactamasa de espectro extendido.

*Tiene también actividad carbapenemasa.

Pero, desgraciadamente, en ningún caso debe descartarse la posibilidad de desarrollar resistencia frente a agentes anti-pseudomónicos por medio de mutaciones en el cromosoma (Henry & Speert, 2011; Livermore, 2001). La frecuencia de adquisición de resistencia antibiótica por parte de esta bacteria, limita la utilidad de patrones de sensibilidad a los antibióticos como una herramienta en la tipificación epidemiológica (Henry & Speert, 2011).

Globalmente hablando, las carbapenemasas transferibles todavía tienen un peso moderado en el panorama epidemiológico actual de la multirresistencia en *P. aeruginosa*, siendo todavía más relevante, cuantitativamente, la combinación de mecanismos de resistencia cromosómicos, como la expresión reducida de la porina OprD, la desrepresión de la beta-lactamasa AmpC o la hiperproducción de los múltiples sistemas de expulsión activa (Oliver, 2009).

En la membrana externa de *P. aeruginosa* también se encuentran otras proteínas (**Figura 12**) como las porinas OprD que forman canales específicos que permiten la entrada de determinados aminoácidos pequeños y de carbapenémicos, aunque no la de otros antibióticos beta-lactámicos (Strateva & Yordanov, 2009).

Otro de los mecanismos de resistencia frente a los carbapenémicos en *P. aeruginosa* es la alteración o pérdida de la porina OprD debido a que es la principal vía de entrada del imipenem (aunque también permite el paso meropenem y doripenem); y, no debemos olvidar que estos antibióticos deben atravesar la pared celular para ejercer su acción (Fresnadillo-Martínez *et al.*, 2010). Al contrario que en la membrana externa de otras bacterias Gram negativas, como por ejemplo *E. coli*, el género *Pseudomonas* posee una gran cantidad de porinas específicas. En *P. aeruginosa*, OprF es la porina general (o no específica) mayoritaria mientras que, hasta la fecha, se han caracterizado hasta tres familias de porinas específicas: OprB (específica de glucosa), OprP y OprO (específica de fosfato y polifosfato, respectivamente), y OprD (específica de aminoácidos básicos) (Tamber *et al.*, 2006). Así, la porina OprD se define como una proteína de la membrana externa de *P. aeruginosa* que actúa como canal específico permitiendo la difusión de aminoácidos básicos y pequeños péptidos, entre los que se encuentran los antibióticos carbapenémicos (Farra *et al.*, 2008; Wolter *et al.*, 2004).

Las porinas tienen dos características muy diferentes del resto de las proteínas de membrana. En primer lugar, tienen una composición de aminoácidos más polar y, en segundo, son ricas en estructuras de láminas β (Nikaido & Saier, 1992). Las porinas de *P. aeruginosa* contienen entre 8 y 22 láminas β antiparalelas que adoptan una configuración de barril anclado en la membrana externa. Las láminas β están interconectadas por secuencias que forman curvas cortas en la cara periplasmática y curvas largas (*loops*) en la cara externa de la membrana. El área central contiene un tramo de aminoácidos que se puede plegar dentro de la región interior del canal, formando una zona de constricción.

En concreto, la estructura de monómeros de OprD consta de 16 láminas β antiparalelas que forman un cilindro con cortos giros en la cara periplásmica (que presentan de 2 a 9 residuos) y ocho largos *loops* en la cara externa de la célula siendo el *loop* 3 (L3) el más largo de todos y el que se pliega dentro del poro formando la constricción (**Figura 13**) (Ochs *et al.*, 2000).

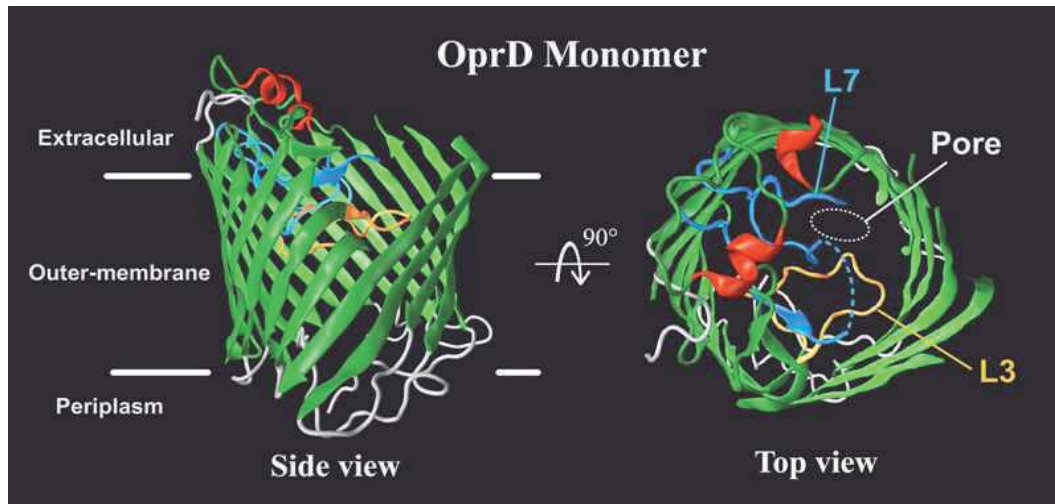


Figura 13.- Estructura de la porina OprD (imagen tomada del Banco de Datos de Proteínas de Japón: http://pdj.org/eprts/index_en.cgi?PDB%3A2ODJ).

En la **Figura 14** se puede observar la secuencia de 443 aminoácidos y 1332 nucleótidos de la porina OprD de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1 (número de acceso en GenBank: AE004091) sensible a los antibióticos carbapenémicos y, además, se ven remarcados los 8 *loops* (representados por cuadrados de diferentes colores).

Las causas más frecuentes de inactivación mutacional del gen *oprD* son la presencia de inserciones/deleciones de un único nucleótido o las mutaciones puntuales que conllevan la formación de un codon de finalización prematuro (Gutiérrez *et al.*, 2007). Aunque existen multitud de alteraciones descritas en la secuencia de la proteína OprD (**Tabla 10**), en la bibliografía se relacionan las modificaciones encontradas en los *loops* L2 y L3 con el incremento de resistencia a imipenem (debido a que no se produce la unión entre el antibiótico y la porina) mientras que las alteraciones en el *loop* L7 se asocian con la sensibilidad a meropenem (ya que el acortamiento de este *loop*, permite un canal más abierto) (Li *et al.*, 2012). Por otro lado, la presencia de secuencias de inserción (IS) interrumpiendo la secuencia nucleotídica, ya sea de la proteína como del promotor, proporcionando de esta manera resistencia a los carbapenémicos, también ha sido descrita por diferentes autores (ISPa1328 e ISPa1635 en Wolter *et al.*, 2004; ISPa26 en Evans & Segal, 2007; ISPa133 en Ruiz-Martínez *et al.*, 2011a; ISPa46 en Diene *et al.*, 2013).

```

1   M K V M K W S A I A L A V S A G S T Q F A V A
1   ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCATTGCACTGGCGGTTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTCGCCGTGGCC
24  D A F V S D Q A E A K G F I E D S S L D L L L
70  GACGCATTTCGTCAGCGATCAGGCCGAAGCGAAGGGTTCATCGAAGACAGCAGCCTCGACCTGCTGCTC
47  R N Y Y F N R D G K S G S G D R V D W T Q G F
139 CGCAACTACTATTTCAACCGTGACGGCAAGAGCGGCAGCGGGGACCGCGTCGACTGGACCCAAGGCTTC
70  L T T Y E S G F T Q G T V G F G V D A F G Y L
208 CTCACCACCTATGAATCCGGCTTCACCCAAGGCACTGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTCGGCTACCTG
93  G L K L D G T S D K T G T G N L P V M N D G K
277 GGCCTGAAGCTCGACGGCACCTCCGACAAGACCGGCACCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACGGCAAG
116 P R D D Y S R A G G A V K V R I S K T M L K W
346 CCGCGCGATGACTACAGCCGCGCCGGCGCGCCGTGAAGGTGCGCATCTCCAAGACCATGCTGAAGTGG
139 G E M Q P T A P V F A A G G S R L F P Q T A T
415 GGCGAGATGCAACCGACCGCCCGGTCTTCGCCGTGGCGGCAGCCGCCTGTTCCCGCAGACCGCGACC
162 G F Q L Q S S E F E G L D L E A G H F T E G K
484 GGCTTCCAGCTGCAGAGCAGCGAATTCGAAGGGCTCGACCTCGAGGCAGGCCACTTCACCGAGGGCAAG
185 E P T T V K S R G E L Y A T Y A G E T A K S A
553 GAGCCGACCACCGTCAAATCGCGTGGCGAACTCTATGCCACTACGCAGGCGAGACCGCCAAGAGCGCC
208 D F I G G R Y A I T D N L S A S L Y G A E L E
622 GATTTTCATTGGGGCCGCTACGCAATCACCGATAACCTCAGCGCCTCCCTGTACGGCGCCGAATCGAA
231 D I Y R Q Y Y L N S N Y T I P L A S D Q S L G
691 GACATCTATCGCCAGTATTACCTGAACAGCAACTACACCATCCCACTGGCATCCGACCAATCGTGGGG
254 F D F N I Y R T N D E G K A K A G D I S N T T
760 TTCGATTTCAACATCTACCGCACAACGATGAAGGCAAGGCCAAGGCCGGCGACATCAGCAACACCACT
277 W S L A A A Y T L D A H T F T L A Y Q K V H G
829 TGGTCCCTGGCGGCAGCCTACACTCTGGATGCGCACACTTTCACCTTGGCCTACCAGAAGGTCCATGGC
300 D Q P F D Y I G F G R N G S G A G G D S I F L
898 GATCAGCCGTTTGATTATATCGGCTTCGGCCGCAACGGCTCTGGCGCAGGTGGCGACTCGATTTTCCTC
323 A N S V Q Y S D F N G P G E K S W Q A R Y D L
967 GCCAACTCTGTCCAGTACTCCGACTTCAACGGCCCTGGCGAGAAATCCTGGCAGGCTCGCTACGACCTG
346 N L A S Y G V P G L T F M V R Y I N G K D I D
1036 AACCTAGCCTCCTATGGCGTTCCCGGCTGACTTTTCATGGTCCGCTATATCAATGGCAAGGACATCGAT
369 G T K M S D N N V G Y K N Y G Y G E D G K H H
1105 GGCACCAAGATGTCTGACAACAACGTCCGGCTATAAGAATACTACGGCTACGGCGAGGATGGCAAGCACCAC
392 E T N L E A K Y V V Q S G P A K D L S F R I R
1174 GAAACCAACCTCGAAGCCAAGTACGTGGTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTGTTCCGCATCCGC
415 Q A W H R A N A D Q G E G D Q N E F R L I V D
1243 CAGGCCTGGCACCGTGCCAACGCCGACCAGGGCGAAGGCGACCAGAACGAGTTCGCCTGATCGTCGAC
438 Y P L S I L *
1312 TATCCGCTGTCGATCCTGTAA

```

Figura 14.- Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la porina OprD de la cepa control PAO1 (GenBank: AE004091). Se marcan en cuadrados de colores los diferentes *loops*: L1 azul; L2 verde; L3 rojo; L4 morado; L5 amarillo; L6 naranja; L7 rosa y L8 gris.

TABLA 10.- Mutaciones detectadas en la porina OprD de cepas clínicas resistentes y sensibles a los antibióticos carbapenémicos de *P. aeruginosa*.

Mutaciones	Loop	Sensibilidad a carbapenémicos ^a	Referencia ^b
F26I	—	IPM ^R + MEM ^R	7
D43N	—	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 3, 7
S57E, S59R	L1	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 3, 5
D61A, V82L	—	IPM ^S + MEM ^{S/R}	1, 3
T103S, G106C/T, K115T, V127L	L2	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 3, 4, 5, 6, 7
F170L, E185Q, P186G, V189T, E202Q	L3	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
K205Q, I210A	—	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 3, 5, 6, 7
E230K	L4	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 2, 6
S240T	—	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 3, 5, 6
N262T, A267S	L5	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 3, 5, 6
T276A, A281G, K296Q, Q301E	—	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 2, 3, 5, 6
R310E/G, G312R, A315G	L6	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
L347M	—	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 3, 5, 6
V359L, 372(VDSSSS-YAGL)383*	L7	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 2, 3, 5, 6
S403A	—	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 6
Q424E, G425A	L8	IPM ^{S/R} + MEM ^{S/R}	1, 2, 3, 4, 6
D437E, Y438L/S, P439S, L440A/P, S441V/K, I442D, L443P	—	IPM ^S + MEM ^{S/I}	1

^aIPM: imipenem, MEM: meropenem, ^S: sensible, ^I: intermedio, ^R: resistente.

^b1: Ocampo-Sosa *et al.*, 2012; 2: Epp *et al.*, 2001; 3: El Amin *et al.*, 2005; 4: Gutiérrez *et al.*, 2007; 5: Farra *et al.*, 2008; 6: Hammami *et al.*, 2009; 7: Wang *et al.*, 2010

*Conocido como *loop* L7corto (Epp *et al.*, 2001).

3.- Elementos genéticos de diseminación de resistencia

Existen dos tipos de resistencia bacteriana a los antibióticos: la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida. La primera de ellas, la presentan de forma natural las bacterias, asociada a genes cromosómicos tales como los codificantes de ciertos sistemas de expulsión activos. Por otro lado, la resistencia adquirida es la que presentan de forma no natural como consecuencia de mutaciones en genes propios de la bacteria o como adquisición de material genético procedente de otra bacteria (bien sea del mismo género bacteriano o de otro) (Van Hoek *et al.*, 2011).

La localización de genes de resistencia específicos en elementos genéticos móviles o movilizables (plásmidos, transposones o casetes génicos en integrones) hace posible esta transmisión, conocida con el nombre de transferencia horizontal. Los elementos genéticos móviles son segmentos de DNA que codifican las proteínas necesarias para mediar el movimiento de DNA entre genomas, desempeñando así un papel muy importante en la evolución de las especies (Wagner, 2006). Tres son los principales procesos por los que se produce este intercambio de resistencia: conjugación (plásmidos y transposones conjugativos), transformación (DNA cromosómico desnudo o plásmidos) o transducción (bacteriófagos) (Van Hoek *et al.*, 2011).

La especie *P. aeruginosa* es capaz de adquirir nuevos determinantes de resistencia por transferencia horizontal. Entre los determinantes adquiridos por esta bacteria destacan los genes codificantes de beta-lactamasas (incluyendo beta-lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas) y, también, los genes de enzimas modificantes de los aminoglucósidos, normalmente en forma de casetes génicos situados en integrones, a su vez están localizados en transposones o plásmidos que permiten su movilidad (Juan & Oliver, 2010).

A continuación, se definirán los tres elementos genéticos móviles más prevalentes entre las especies bacterianas:

- 1) Plásmidos,
- 2) Elementos genéticos transponibles,
- 3) Casetes génicos e integrones.

3.1.- Plásmidos

Un plásmido puede definirse como una molécula de DNA extracromosómico, de doble cadena, circular covalentemente cerrada y capaz de replicarse de forma autónoma de la bacteria hospedadora. No codifica funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria que lo porta pero sí le da ventajas a ésta, ya que puede proporcionarle genes de resistencia a antibióticos, de resistencia a metales pesados o, incluso, genes de virulencia (Rodríguez *et al.*, 2011). Se pueden encontrar en casi todas las especies bacterianas y su tamaño varía desde 2 a 400 Kb. Algunos de ellos son transferibles por conjugación (plásmidos conjugativos) y otros necesitan la acción de un plásmido conjugativo coexistente en la misma bacteria (plásmidos no-conjugativos móviles) (Carattoli, 2009).

Todos los plásmidos contienen una parte conservada (“plasmid backbone”), característica de cada tipo de plásmido, formada por el conjunto de genes que sirven para el mantenimiento, la replicación y la dispersión del propio plásmido; mientras que la bacteria hospedadora aportará las enzimas DNA polimerasa, ligasas y helicasas (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

3.2.- Elementos genéticos transponibles

Los elementos genéticos transponibles son secuencias de DNA que tienen la propiedad de cambiar de posición dentro del genoma, es decir, son elementos genéticos móviles con la maquinaria necesaria para traslocarse desde un sitio dador a otro receptor dentro del propio genoma (Wagner, 2006). En el proceso de movilización de estos elementos se pueden desplazar genes de resistencia que estaban en su interior o, incluso, se puede producir una inactivación de los mismos ya que en el proceso de intercambio de posición se puede crear una delección o pérdida de bases (Van Hoek *et al.*, 2011). Existen dos grandes grupos de elementos genéticos transponibles (**Figura 15**):

a) Secuencias de inserción (IS): están compuestas por una secuencia central codificante de una transposasa y unos extremos formados por una secuencia repetida en orden inverso. Además, cuando una secuencia de inserción se integra en un determinado punto del genoma, generalmente aparece una repetición directa de la

secuencia diana. En la base de datos “ISFinder” (<https://www-is.biotoul.fr/>) se encuentran recogidas todas las secuencias de inserción descritas y sus propiedades.

b) Transposones compuestos (Tn): están formados por una región central que puede contener diferente información (como, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos) flanqueada por una IS en cada extremo, bien en orden directo o inverso. Como en el caso anterior, existe una web oficial que recoge los transposones descritos: <http://www.ucl.ac.uk/eastman/research/departments/microbial-diseases/tn>

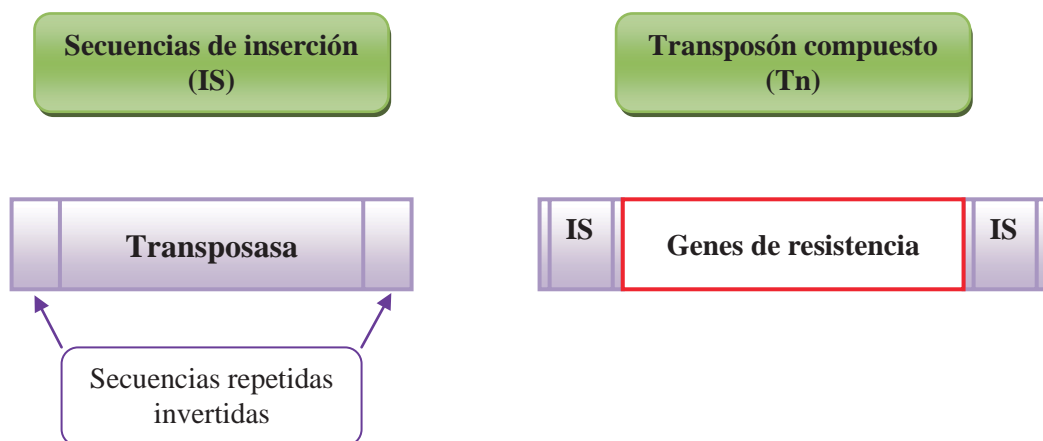


Figura 15.- Estructura de los elementos genéticos transponibles.

Se conocen dos mecanismos de transposición: conservativo y replicativo (**Figura 16**). En el primero de ellos, el transposón sale de un lugar del genoma que queda vacío y se incorpora en la nueva localización. De esta manera, no aumenta el número de copias del transposón dentro de la célula. Mientras que en la transposición replicativa, por el contrario, el transposón se queda en su lugar de origen y mediante un mecanismo de replicación-recombinación aparece una nueva copia del mismo en otro lugar del genoma bacteriano; aumentando, de este modo, el número de copias de dicho transposón en el interior de la bacteria (Bennet *et al.*, 2004).

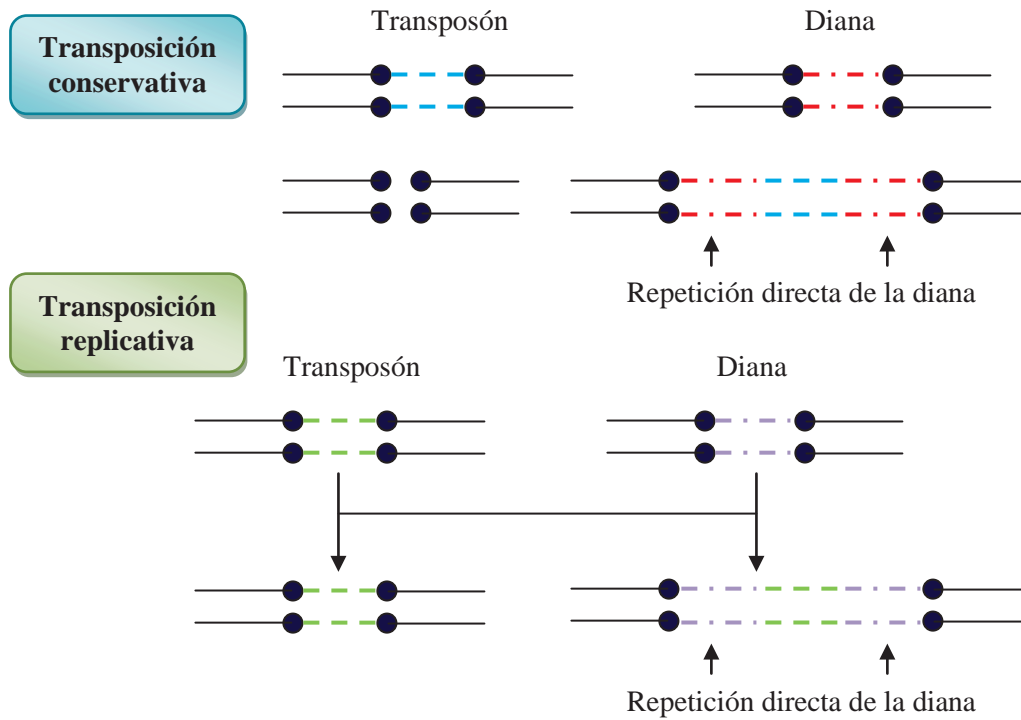


Figura 16.- Mecanismos de transposición.

3.3.- Casetes génicos e integrones

Un integrón es un elemento genético que por un mecanismo de recombinación sitio-específico es capaz de capturar, integrar, acumular, escindir, organizar y expresar casetes génicos. A su vez, los casetes génicos son elementos genéticos carentes de promotor (aunque existen excepciones) que contienen una pauta de lectura abierta (denominado *orf*) (Rowe-Magnus *et al.*, 2001), y un sitio de recombinación específico denominado *attC*, en posición 3' a través del cual se efectúa su reconocimiento por la integrasa (Coque-González, 2005).

Todos los integrones están formados por 3 elementos claves necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (Mazel, 2008):

- El gen codificante de una integrasa de la familia tirosin-recombinasa (*intI*), implicada en la integración de casetes génicos.
- Un sitio de recombinación primario sitio-específico (*attI*).
- Un promotor (Pc) responsable de la expresión de los casetes génicos integrados (Partridge *et al.*, 2009).

Los casetes génicos pueden existir de manera transitoria en forma circular, pero no incluyen las funciones necesarias para su expresión y movimiento por lo que son captados por las integrasas a través de su *attI* (Partridge *et al.*, 2009). En la **Figura 17** se puede ver el modelo de integración y escisión de casetes génicos en un integrón de clase 1.

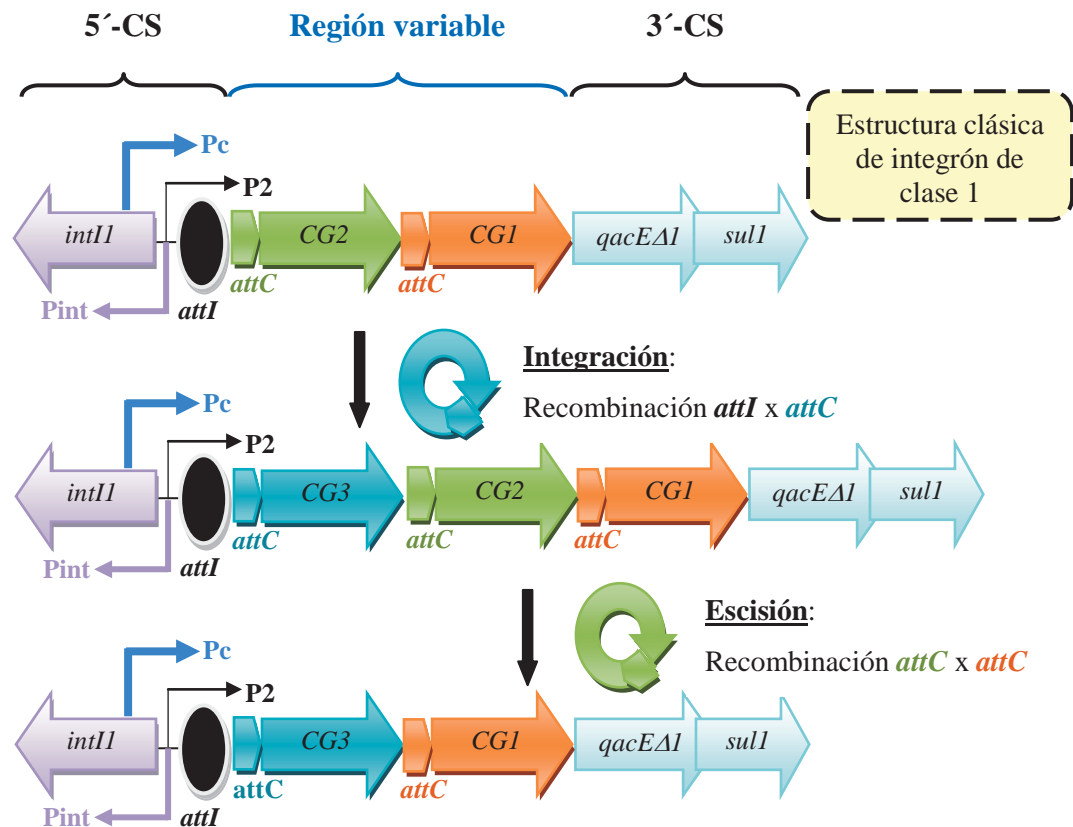


Figura 17. Modelo de integración y escisión de casetes génicos en un integrón de clase 1 (adaptada Cambray *et al.*, 2011). [Abreviaturas: CS = segmento conservado; CG = casete génico]

Los integrones son considerados herramientas naturales para la evolución genómica bacteriana (Rowe-Magnus & Mazel, 2001) y se han dividido operativamente en dos subconjuntos: integrones de resistencia o móviles (MI) y superintegrones (SI). Las diferencias entre los dos están en la localización, en el número y clase de casetes génicos que contienen, y en el tamaño y diversidad de las secuencias *attC*. Por un lado, la estructura de SI es cromosómica y los sitios de recombinación *attC* asociados con ellos son altamente homogéneos; mientras que,

Introducción

por el contrario, la estructura MI está comúnmente asociada con elementos de DNA móviles y sus *attC* son variables tanto en longitud como en secuencia (Biskri *et al.*, 2005). Más de 100 casetes génicos pueden estar presentes en un SI, al contrario que en un MI donde lo que se observa, normalmente, es un número inferior a 10 (Fluit & Schmitz, 2004). Los MI se encuentran habitualmente formando parte de transposones y/o plásmidos y contienen mayoritariamente genes de resistencia a antibióticos, mientras que los SI se localizan en el cromosoma de ciertas especies bacterianas (*Shewanella*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Geobacter* y *Vibrio*) y contienen genes asociados a múltiples funciones adaptativas (Coque-González, 2005; Fluit & Schmitz, 2004).

Por sus características nos vamos a centrar en los MI. Se han descrito 5 clases de integrones según la secuencia de su integrasa, aunque los más frecuentemente implicados en resistencia a antibióticos y, por tanto, más estudiados son los de clase 1, 2 y 3; habiéndose detectado mayoritariamente en enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (Fluit & Schmitz, 2004). A pesar de su nombre, los MI no son móviles por sí mismos aunque sí pueden ser movilizables debido a que frecuentemente se encuentran localizados en transposones (**Figura 18**) que, a su vez, están en el cromosoma de algunas bacterias o en plásmidos conjugativos permitiendo así la transmisión de genes de resistencia a antibióticos tanto intra como interespecie (Stokes *et al.*, 2006).

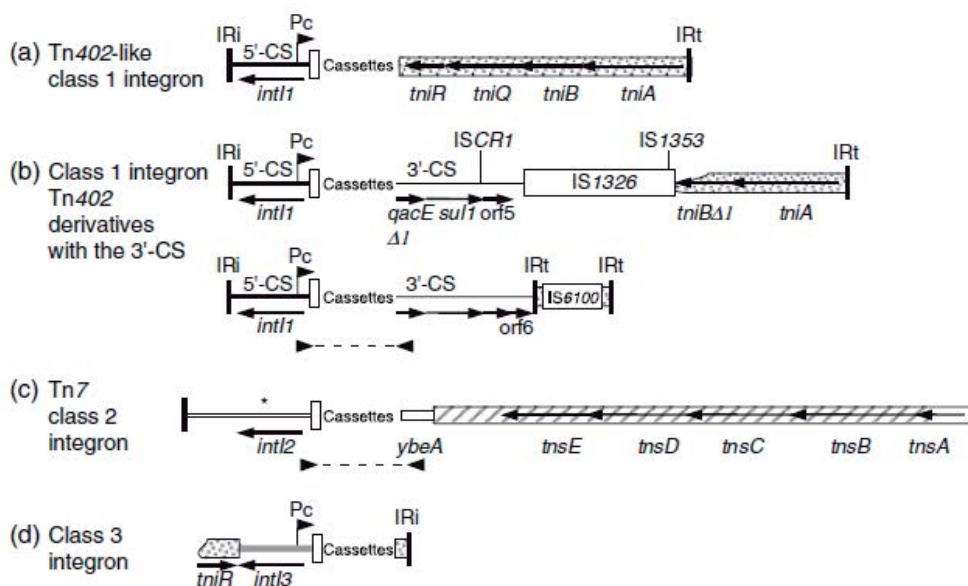


Figura 18.- Estructura de los integrones móviles o MI (Partridge *et al.*, 2009).

Los integrones de clase 1 son los que se encuentran con mayor frecuencia entre bacterias Gram negativas de interés clínico. Su estructura posee dos segmentos conservados (en posiciones 5' y 3') que flanquean una región variable donde se incluyen los casetes génicos (**Figura 17**). En el segmento conservado 5' se encuentra el gen de la integrasa (*intII*) con su promotor (Pint), los promotores implicados en la expresión de los casetes génicos (Pc y P2) y su sitio de recombinación primario (*attI*). En el segmento conservado 3' se haya un gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*) truncado con un gen de resistencia a sulfamidas (*sulI*) (Sabaté & Prats, 2002). La mayoría de los integrones de clase 1 tienen la estructura descrita, aunque se han descubierto integrones carentes del segmento 3' conservado (Sabaté & Prats, 2002; Vinué *et al.*, 2010).

En 5'-CS, algunos integrones de clase 1 presentan un promotor P2 activo localizado 90 pb debajo del promotor Pc. A su vez, se han descrito (Jové *et al.*, 2010) diferentes variantes del promotor Pc en base a sus secuencias -35, -10 y -10 extendida. La fortaleza de este promotor y la combinación de Pc y P2, relaciona los niveles de expresión de los casetes génicos y la actividad de la integrasa. Cuanto más fuerte es el promotor, mayor expresión de los casetes génicos, pero menor capacidad de escisión e incorporación de casetes génicos de la integrasa (Jové *et al.*, 2010). En la **Tabla 11** se exponen las variantes de Pc y P2 más usuales en los integrones de clase 1.

TABLA 11.- Variantes más frecuentes de los promotores Pc y P2 (adaptada Jové *et al.*, 2010).

	Variantes de promotor	Secuencia hexámero -35	Separación entre hexámeros	Secuencia hexámero -10
Pc	PcS "strong"	TTGACA	taagcctgttcggttcg	TAAACT
	PcW "weak"	TGGACA	taagcctgttcggttcg	TAAGCT
	PcH1 "hybrid 1"	TGGACA	taagcctgttcggttcg	TAAACT
	PcH2 "hybrid 2"	TTGACA	taagcctgttcggttcg	TAAGCT
P2	P2 inactivo	TTGTTA	tgactgttttttg	TACAGT
	P2 activo	TTGTTA	tgactgttttttgggg	TACAGT

Estos integrones suelen estar asociados con transposones funcionales como Tn402 (o Tn5090), conocido como el ancestro de los integrones de clase 1, u otros más complejos como Tn21 (**Figura 19**) (Liebert *et al.*, 1999; Stokes *et al.*, 2006).

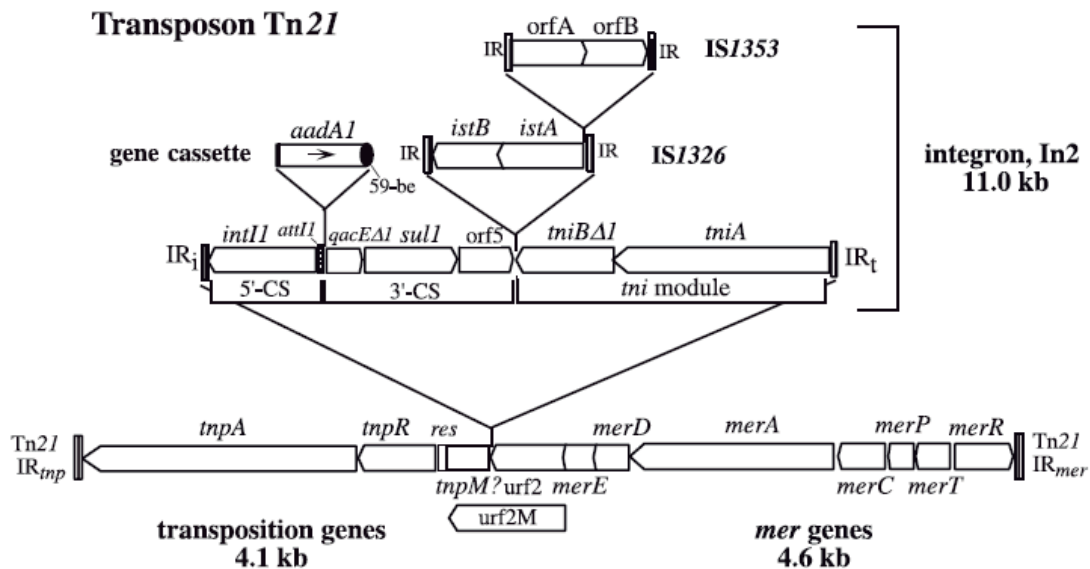


Figura 19.- Estructura completa del transposón Tn21 que alberga un integrón de clase 1 (In2) en su interior (Liebert *et al.*, 1999).

Existe un modelo hipotético de la evolución de estos integrones de clase 1 a partir del transposón Tn402 que describiremos a continuación. Partiendo de un integrón de clase 1 integrado en un transposón Tn402 a partir del cromosoma de una betaproteobacteria ambiental se obtuvo una estructura híbrida que combinaba la capacidad de los integrones de capturar casetes génicos ambientales con las propiedades de movilidad de los transposones (**Figura 20**) (Sajjad *et al.*, 2011).

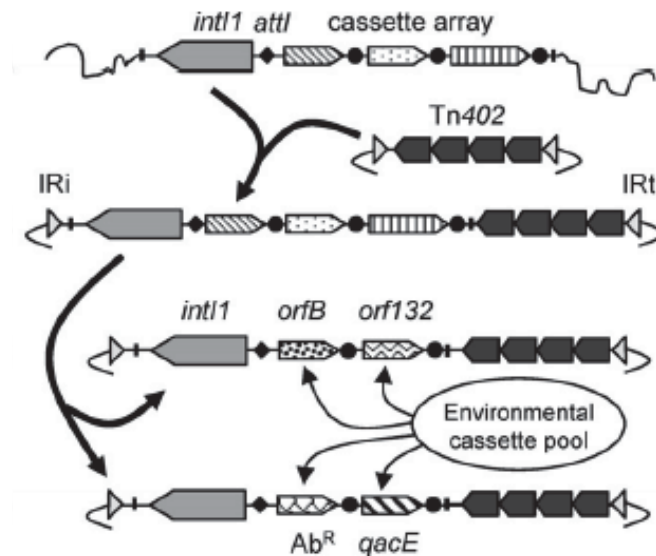


Figura 20.- Modelo del origen de los integrones de clase 1 derivados del transposón Tn402 (Sajjad *et al.*, 2011).

A partir de esta estructura (Tn5090/Tn402), caracterizada por la presencia de un módulo completo de transposición compuesto por cuatro genes (*tniR/C*, *tniQ*, *tniB* y *tniA*), varias son las opciones de integración, cambio o escisión de genes dentro de ella hasta obtener los integrones de clase 1 característicos con su segmento conservado en la posición 3' (**Figura 21**) (Tato *et al.*, 2010; Toleman *et al.*, 2007).

En los integrones de clase 2, la integrasa tipo 2 (IntI2) muestra un 40% de homología con la de tipo 1 (IntI1) (Sabaté & Prats, 2002). La mayoría de las IntI2 presentan un codón de finalización interno (IntI2*) en el aminoácido 179 que produce la inactivación del gen e imposibilita la recombinación (Mokracka *et al.*, 2012). De hecho, los casetes genéticos que normalmente se encuentran adyacentes a esta región, suelen estar conservados y, a menudo, codifican resistencia a trimetoprim, estreptomicina y espectinomicina (Fonseca *et al.*, 2011). Finalmente, existe un segmento que contiene cinco genes implicados en la transposición (*tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD* y *tnsE*) (Partridge *et al.*, 2009). Estos integrones están asociados exclusivamente con derivados del transposón Tn7 (Mazel, 2008; Partridge *et al.*, 2009).

Introducción

En los integrones de clase 3, la integrasa de tipo 3 (IntI3) presenta el 61% de identidad con la secuencia aminoacídica de IntI1; mientras que el extremo 3' no ha sido caracterizado (Sabaté & Prats, 2002). El primer integrón de clase 3 descrito en la bibliografía (Arakawa *et al.*, 1995) se encontraba en una cepa de *Serratia marcescens* resistente a los antibióticos carbapénemicos debido a la presencia del gen *bla_{IMP-1}* como primer casete génico (Collis *et al.*, 2002). Además, este primer integrón de clase 3 caracterizado está asociado con la familia de transposones Tn5053 (Partridge *et al.*, 2009).

Todos los integrones descritos (tanto de clase 1 como de clase 2 y 3), se han clasificado y nombrado encontrándose disponibles en la base de datos INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>).

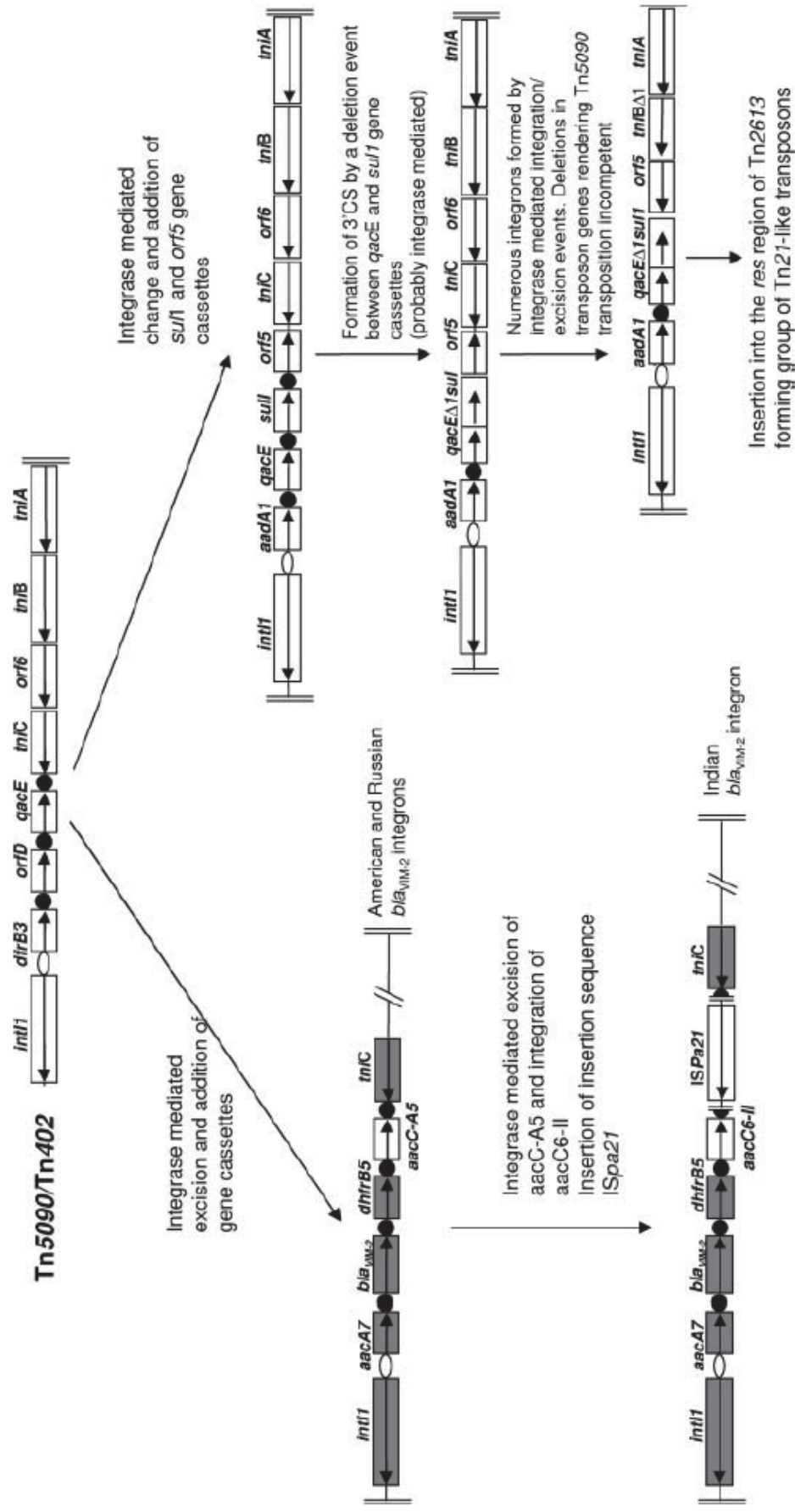


Figura 21.- Modelo hipotético de evolución de los integrones de clase 1 (Toleman *et al.*, 2007).

3.4.- Elementos genéticos móviles en *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es naturalmente resistente a un amplio número de antibióticos no relacionados estructuralmente, y tanto su matriz cromosómica como su propensión dinámica para adquirir genes de resistencia de otros géneros tales como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp. le ayudan a convertirse en uno de los patógenos más relevantes y difíciles de tratar. Los elementos genéticos móviles o movilizables tales como plásmidos, transposones e integrones son medios para adquirir los mecanismos de resistencia que contribuyen a la gran resistencia en la especie *P. aeruginosa*. Estos elementos genéticos móviles desempeñan un papel importante en la diseminación de genes de resistencia entre las bacterias, y han estado implicados en la evolución y difusión de bacterias resistentes a múltiples antibióticos (Odumosu *et al.*, 2013).

El genoma de cualquier patógeno bacteriano está compuesto por una zona “conservada” que contiene la información genética que requiere para las funciones esenciales y otra zona “flexible” (o accesoria) que incluye extensas inserciones de genes adquiridos por transferencia horizontal y que proporcionan a la bacteria ciertos beneficios para su crecimiento y adaptación al entorno que le rodea. En *P. aeruginosa* se han descrito tanto adquisiciones como pérdidas de grandes fragmentos de DNA, lo que contribuye a variaciones en el tamaño del genoma que van desde 5,2 a 7 Mb (Morales-Espinosa *et al.*, 2012).

Varios estudios han relacionado la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* con la presencia de uno o más elementos genéticos. Existen autores que afirman que los genes de resistencia que son transferidos en *P. aeruginosa* y cuya diseminación contribuye a la expansión global de dicho mecanismo de resistencia, frecuentemente están localizados en integrones que pertenecen a plásmidos o transposones (Juan *et al.*, 2010; Mokracka *et al.*, 2012; Tada *et al.*, 2013; Viedma *et al.*, 2012). Numerosos trabajos refieren estructuras de integrones en la especie *P. aeruginosa*; portadores de casetes génicos implicados en resistencia a varias familias de antibióticos. La principal asociación encontrada en esta especie suele ser la resistencia a beta-lactámicos y a aminoglucósidos. En los últimos años destaca la descripción de integrones que portan genes de MBL de las familias VIM e

IMP (**Figura 22**) (Juan *et al.*, 2010; Liakopoulos *et al.*, 2013; Patzer *et al.*, 2009; Samuelsen *et al.*, 2010; Viedma *et al.*, 2012;)

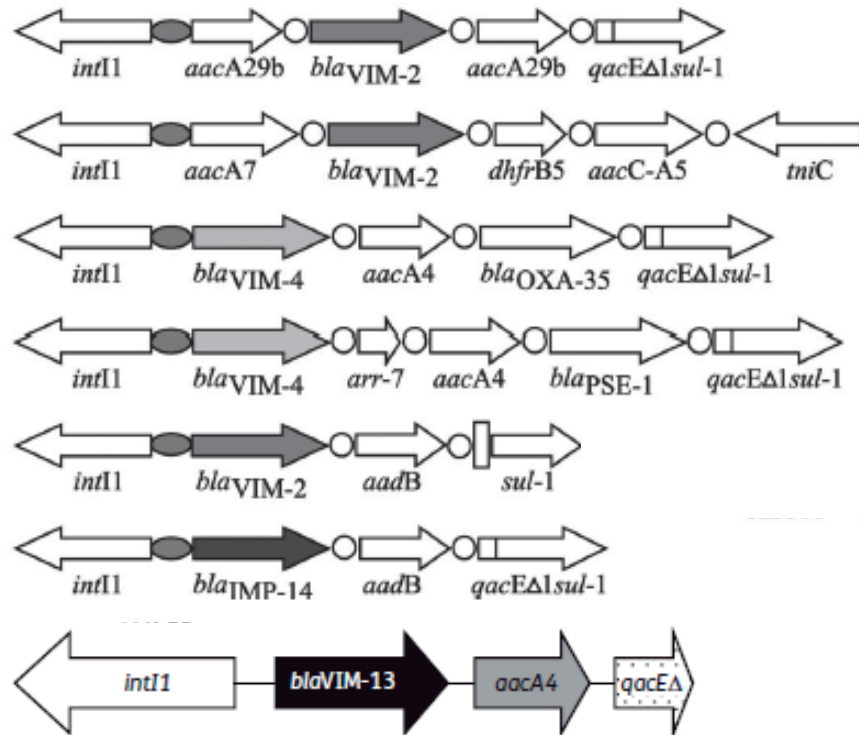


Figura 22.- Ejemplos de integrones de clase 1 que albergan en su región variable genes de resistencia a carbapenémicos y aminoglucósidos (Juan *et al.*, 2010; Samuelsen *et al.*, 2010).

La mayoría de los autores hablan de una localización cromosómica de los genes MBL dentro del genoma de *P. aeruginosa*, reafirmando de este modo la diseminación clonal de cepas portadoras de estos genes en esta especie bacteriana (Juan *et al.*, 2010; Patzer *et al.*, 2009; Samuelsen *et al.*, 2010; Stokes *et al.*, 2012).

Sin embargo, muy recientemente, Xiong y colaboradores (2013) han conseguido secuenciar completamente un plásmido de 500 Kb (pOZ176) en una cepa de *P. aeruginosa* productora del gen *bla*_{IMP-9}. En él se localizan dos integrones de clase 1 asociados a dos transposones diferentes: Tn6016 y Tn6217 (**Figura 23**).

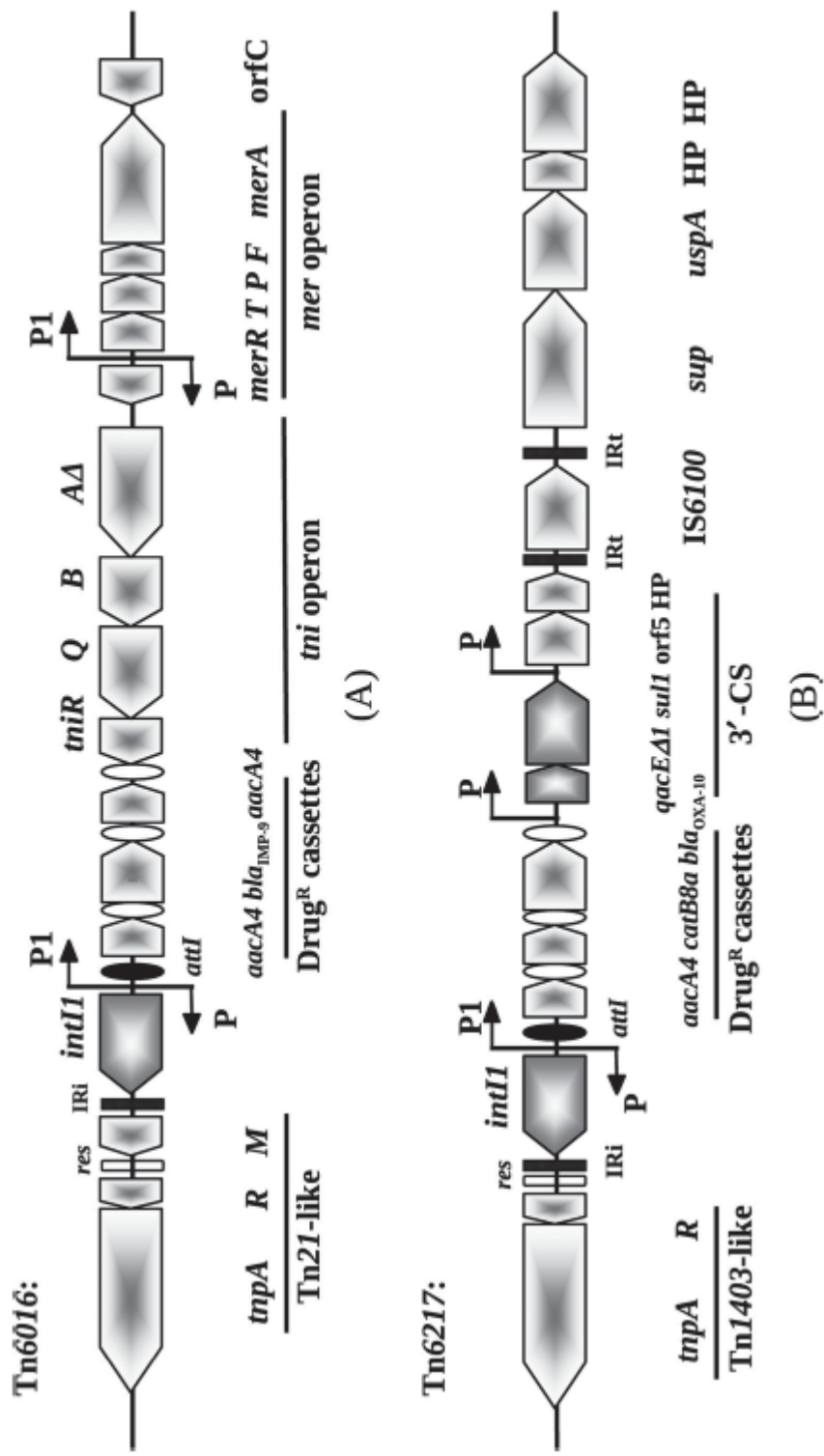


Figura 23.- Estructura de los dos integrones de clase 1 localizados en sendos transposones en el plásmido pOZ176 (Xiong *et al.*, 2013).

4.- Tipificación Molecular

Los estudios sobre la estructura genética de las poblaciones microbianas son fundamentales para comprender la evolución, la ecología y la epidemiología de las enfermedades infecciosas producidas por un microorganismo (Kidd *et al.*, 2012; Vernez *et al.*, 2005). Además, permiten el análisis de la estructura y dinámica de una población determinada, y el impacto de la recombinación genética en la estructura de dicha población (Vernez *et al.*, 2005). No obstante, la mayor parte de los estudios se realizan sobre cepas clínicas lo cual puede llevar a un conocimiento parcial y generar conclusiones erróneas con respecto a la estructura poblacional y evolutiva de este microorganismo (Ballarini *et al.*, 2012; Boers *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2012).

Con la tipificación molecular se pueden identificar cepas idénticas o estrechamente relacionadas, detectar fuentes de infección o, incluso, localizar posibles transmisiones cruzadas en el ámbito hospitalario o alimentario. De hecho, las técnicas de tipificación molecular se han convertido en una herramienta importante para identificar las vías de transmisión, controlar la propagación y determinar la diversidad genética de patógenos nosocomiales como *P. aeruginosa*, principalmente, en enfermos con fibrosis quística (Ballarini *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2011).

La elección de la metodología de tipificación molecular puede estar influenciada por muchos factores, entre ellos el poder de discriminación, la estabilidad y la reproducibilidad. Además, otros factores que se podrían considerar son la facilidad de uso (tanto en técnica como en tiempo), coste y aplicabilidad para comparar los resultados entre laboratorios (Boers *et al.* 2012; Kidd *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2012).

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas de tipificación molecular para comparar los genotipos de especies bacterianas. Estos métodos de caracterización han evolucionado a partir de los métodos fenotípicos tradicionales que eran inestables y no ofrecían un poder de discriminación satisfactorio para las cepas estudiadas. Por esta razón, el principal factor de éxito de un sistema de tipificación radica en la capacidad de discriminación, es decir, la capacidad de distinguir entre las cepas epidemiológicamente relacionadas y no relacionadas. Cada

Introducción

técnica tiene sus características y su aplicabilidad aunque también se distinguen sus limitaciones. De ese modo, los distintos métodos pueden ser complementarios (Maâtallah *et al.*, 2013).

Algunas de las técnicas de tipificación se basan en el análisis del tamaño de los fragmentos de DNA producidos tras el empleo de enzimas de restricción (perfiles/patrones de bandas) y otras en el análisis de las secuencias de determinados genes amplificados. Entre los métodos más destacados, se encuentran: (i) AFLP (amplified fragment length polymorphism analysis), (ii) la electroforesis en campo pulsado (PFGE, pulsed-field gel electrophoresis), (iii) rep-PCR (repetitive element palindromic PCR), (iv) ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus), (v) RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA), (vi) MLVA (multiple-locus VNTR analysis), (vii) SLST (single-locus sequence typing) y (viii) el estudio de las secuencias de varios genes internos de la bacteria, denominados “housekeeping” (MLST, multilocus sequence typing) (Ballarini *et al.*, 2012; Boers *et al.*, 2012; Gerner-Smidt *et al.*, 2011; Kidd *et al.*, 2011).

Son varios los estudios que se encuentran en la bibliografía donde se comparan las diferentes técnicas de tipificación desarrolladas (Kidd *et al.*, 2011; Maâtallah *et al.*, 2013; Waters *et al.*, 2012). Pero durante más de 20 años, el perfil de bandas del genoma ha sido una herramienta de importancia fundamental para el seguimiento de las rutas de transmisión de patógenos. Es una estrategia muy útil para la vigilancia y la investigación de brotes de infecciones humanas y su análisis evolutivo (Maâtallah *et al.*, 2013). El método PFGE ha sido considerado como la “regla de oro” para muchos investigadores por su gran poder discriminatorio y porque proporciona una visión completa del genoma ya que los patrones de bandas son únicos para cada cepa o clon; además, esta técnica ha sido tomada como referencia para comparar los diferentes métodos nuevos (Ballarini *et al.*, 2012; Curran *et al.*, 2004; Henry & Speert, 2011; Maâtallah *et al.*, 2013). Pero su baja reproducibilidad intra e interlaboratorios (Basset & Blanc, 2013), la necesidad de desarrollar técnicas estandarizables y los estrictos requisitos para la construcción de bases de datos, han dado un empuje al desarrollo de métodos basados en el análisis de secuencias. Estos últimos métodos que son altamente robustos debido al carácter ambiguo del DNA y que los datos obtenidos se pueden comparar de forma fiable

entre diferentes laboratorios. El método más ampliamente utilizado es el MLST, capaz de detectar variaciones genéticas dentro de los genes conservados estudiados. Esta técnica es elegida especialmente en los estudios epidemiológicos, geográficos y/o evolutivos de determinados patógenos (Boers *et al.*, 2012; Maâtallah *et al.*, 2013). A pesar del gran poder discriminatorio de esta herramienta genética, tiene la desventaja de su alto coste tanto en tiempo como económico (Boers *et al.*, 2012; Henry & Speert, 2011).

4.1.- Tipificación molecular de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es, como ya sabemos, un bacilo Gram negativo ubicuo en el medioambiente, los seres humanos y los animales. Crece en condiciones húmedas y es capaz de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como alimento. Puede causar infecciones graves que pueden estar asociados con altas tasas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y es una causa frecuente de infecciones adquiridas por los pacientes durante la hospitalización. Además, casi cualquier tipo de equipo de hospital o utensilio ha sido implicado como un reservorio para *P. aeruginosa*, sirviendo estas fuentes como focos de difusión del organismo en brotes epidémicos (Curran *et al.*, 2004). Esta especie es una de las causantes de infecciones nosocomiales y el estudio de control de infecciones por la propagación clonal de *P. aeruginosa* en el hospital es considerada una prioridad; por lo que la tipificación molecular de estas cepas y la capacidad de comparación de los resultados por distintos laboratorios es una de las primeras medidas (Waters *et al.*, 2012).

El tamaño del genoma de *P. aeruginosa* varía desde 5,2 hasta 7,1 Mb. En él se incluyen genes básicos, necesarios para la supervivencia, y un amplio conjunto de genes accesorios que confieren peculiaridades funcionales a las distintas cepas. Esta variabilidad genómica se deriva de la amplia capacidad de esta especie para adquirir o descartar segmentos genómicos a través de la transferencia horizontal de genes y la recombinación. Además, tiene importantes implicaciones en los métodos utilizados para estudiar la evolución y la epidemiología de este microorganismo (Ballarini *et al.*, 2012; Curran *et al.*, 2004).

Históricamente y por razones epidemiológicas, la tipificación de *P. aeruginosa* se realizaba por sus características fenotípicas. Pero la capacidad de

Introducción

esta especie para desarrollar resistencia bajo la presión de una terapia antibiótica, obligó a desarrollar otros métodos basados en la tipificación genotípica. Entre los más destacados, se encuentran la electroforesis en campo pulsado (PFGE) y la determinación de la secuencia tipo (MLST) (Henry & Speert, 2011).

Mientras PFGE estudia el genoma completo por macrorrestricción, MLST examina secuencias de DNA en 7 genes conservados. Por tanto, PFGE es más sensible a polimorfismos causados por inserciones y deleciones de material genético (como por ejemplo, elementos de inserción) que se producen en los sitios de restricción, mientras que MLST detecta polimorfismos de nucleótidos únicos que se acumulan por error en la replicación durante el proceso evolutivo (Ballarini *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2012). Por otro lado, PFGE se puede utilizar para confirmar clonalidad entre las cepas, dada su capacidad para detectar cambios genéticos sutiles que ocurren en el tiempo entre cepas de *P. aeruginosa* a partir de, por ejemplo, una población con fibrosis quística dada. Pero MLST era el mejor método para predecir las cepas únicas y, por lo tanto, tiene el potencial de ser una prueba de detección de alto rendimiento para identificar posibles cepas clonales en los pacientes con esta enfermedad (Waters *et al.*, 2012).

El desarrollo de un esquema de MLST para *P. aeruginosa* ha estimulado el uso de esta técnica molecular de alta potencia para examinar la relación de las cepas clínicas y ambientales de esta especie (Waters *et al.*, 2012). Vernez y colaboradores (2005) desarrollaron un esquema de MLST basado en los siguientes genes: *aph*, *adhA*, *aroE*, *bdhA*, *mtlD*, *nucP* y *xdhB* pero fue el trabajo de Curran y colaboradores (2004), donde se analizan otros 7 genes diferentes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*), que junto con su página web (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) ha conseguido el dominio en este campo.

La biología de la población de *P. aeruginosa* ha sido ampliamente investigada. Existe un consenso de que la estructura de la población se puede definir como no-clonal, incluyendo varios clones heterogéneos pero salpicada por algunos de los principales clones epidémicos (como ST111, ST175, ST235 o ST179) o complejos clonales (como PA14) (Maâtallah *et al.*, 2013).

Objetivos

OBJETIVOS

1.- Caracterizar cepas de *Pseudomonas* spp. no clínicas

- 1.1.- Estudiar la prevalencia de *Pseudomonas* spp. en muestras fecales de personas sanas, animales sanos y en alimentos
- 1.2.- Analizar el fenotipo de resistencia a diferentes antibióticos
- 1.3.- Caracterizar el mecanismo de resistencia a carbapenémicos
- 1.4.- Realizar la tipificación molecular de las cepas
- 1.5.- Detectar y caracterizar integrones

2.- Caracterizar cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en muestras clínicas de dos hospitales de distintas comunidades autónomas

- 2.1.- Estudiar los mecanismos de resistencia implicados
- 2.2.- Tipificar molecularmente las cepas
- 2.3.- Detectar y caracterizar integrones

3.- Detectar la localización cromosómica/plasmídica del gen *bla*_{VIM-2} en cepas de *P. aeruginosa* portadoras de metalo-beta-lactamasas, y analizar la estabilidad de la resistencia a imipenem en ausencia de presión antibiótica en cepas de *P. aeruginosa*.

Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Aislados de *Pseudomonas* spp. estudiados y muestras analizadas

1.1.- Muestras no clínicas analizadas

Para la realización de este trabajo, se recogieron y procesaron muestras fecales de individuos y animales sanos, así como muestras de alimentos, para el aislamiento de *Pseudomonas* spp.

1.1.1.- Muestras fecales de individuos sanos

Se tomaron un total de 98 muestras fecales de voluntarios sanos que no habían tomado antibióticos en los tres meses previos a la recogida de muestras. El período de estudio comprendió desde septiembre 2010 a enero 2011. Todos los individuos, o sus tutores legales, dieron su consentimiento para la participación en este estudio. Se les solicitaron datos de edad, sexo, contacto con animales, presencia de alergias y/o enfermedades crónicas, medicamentos tomados de manera continuada y hábitos alimentarios (vegetariano o no).

En agosto de 2011, se repitió el proceso únicamente con los individuos de los que se había aislado *Pseudomonas* en el primer muestreo.

1.1.2.- Muestras fecales de caballos sanos

Se recogieron 73 muestras fecales de caballos durante el proceso de su sacrificio en el matadero de Logroño, en el mes de febrero de 2012. Todos estos animales estaban destinados para carne de consumo (46 hembras y 27 machos). Las muestras se tomaron, empleando torundas estériles, de la zona anal del animal en el momento de su letargo y se transportaron hasta el laboratorio para su procesamiento.

1.1.3.- Muestras de alimentos de origen cárnico

Se procesaron 62 muestras de productos cárnicos de diferentes orígenes: pollo/pavo (29), cerdo (19), ternera (11), cordero (2) y carne picada mixta de ternera y cerdo (1). Los alimentos se adquirieron, entre junio de 2011 y julio de 2012, en diversos establecimientos de Logroño y pueblos cercanos distribuidos del siguiente modo: carnicerías/pollerías (10, de las cuales se obtuvieron 24 muestras), supermercados (7, de los cuales se obtuvieron 29 muestras) y tiendas de barrio (una,

de la que se obtuvieron 9 muestras). Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su manipulación en el laboratorio.

1.1.4.- Muestras de alimentos de origen vegetal

Se analizaron 59 muestras de productos vegetales correspondientes a plantas solanáceas (35 tomates y 24 pimientos). Los alimentos se obtuvieron de supermercados (13 muestras), fruterías/tiendas de barrio (23 muestras) y huertas particulares (23 muestras) de la Comunidad Autónoma de La Rioja durante el mes de julio de 2012.

1.2.- Aislados clínicos de *P. aeruginosa*

En este trabajo se han estudiado 216 aislados clínicos de *P. aeruginosa* obtenidos y remitidos desde los Servicios de Microbiología de dos hospitales españoles de distintas comunidades autónomas con los que se mantiene una estrecha colaboración: Hospital San Pedro de Logroño (Dr. José Manuel Azcona) y Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (Dr. Javier Castillo y Dra. Cristina Seral).

1.2.1.- Hospital San Pedro de Logroño

Se incluyeron en esta tesis 91 aislados de *P. aeruginosa* con resistencia o sensibilidad reducida al menos a uno de los antibióticos carbapenémicos testados (imipenem, meropenem y/o doripenem), procedentes de muestras clínicas del Hospital San Pedro (HSP) de Logroño durante el período de septiembre 2008 a diciembre 2011.

Los aislados se obtuvieron de muestras de herida (19), orina (18), frotis de distintas localizaciones (18), úlcera (16), exudado (8), esputo (3) y otros orígenes (9). Las muestras procedían de 66 pacientes hospitalizados (52 hombres, 14 mujeres), cuyo rango de edad oscilaba entre 16 y 99 años (12 pacientes tenían menos de 50 años).

1.2.2.- Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza

Se obtuvieron 123 aislados de *P. aeruginosa* con resistencia o sensibilidad reducida al menos a uno de los antibióticos carbapenémicos testados, procedentes de

muestras clínicas del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) de Zaragoza, durante el período de junio 2008 a octubre 2010.

Los aislados se obtuvieron de muestras de herida (33), orina (28), broncoaspirado (22), lesión cutánea (18), sangre (9), esputo (3), y otros orígenes (10), de 80 pacientes hospitalizados (55 hombres, 25 mujeres), cuyo rango de edad oscilaba entre 21 y 92 años siendo la media de 64 años.

1.2.3.- Aislados de casos clínicos particulares

Se estudiaron dos casos clínicos procedentes de sus respectivos Servicios de Microbiología, que suscitaron un interés especial en el trabajo rutinario del hospital.

1^{er} caso: **Cepa W37** procedente del HSP de Logroño.

En 2007 se aisló una cepa de *P. aeruginosa* (W37) de una muestra de orina en el HSP que presentaba un probable fenotipo MBL. Como era el primer aislado clínico con este fenotipo en el hospital, se remitió a nuestro laboratorio para un estudio completo de caracterización fenotípica y genotípica.

2^o caso: **Cepa Ps121** procedente del HCULB de Zaragoza.

En 2012 se detectó una coinfección por *P. aeruginosa* (Ps121) y *Citrobacter freundii* (CIT30), ambas cepas presumiblemente productoras de MBL. Las dos fueron aisladas de una herida quirúrgica de un paciente, receptor de transplante hepático, que sufrió una hemorragia digestiva y tuvo que ser intervenido con una resección gástrica y que había sido tratado con diversos antibióticos, entre los que se encontraba IPM. Las cepas se enviaron a nuestro laboratorio para el análisis de la posible transferencia de los genes relacionados con la resistencia a carbapenémicos entre dos géneros diferentes.

2.- Medios de cultivo y pruebas de identificación empleadas

2.1.- Medios de cultivo

- Brain Heart Infusion (BHI, Difco): utilizado para el crecimiento de *Pseudomonas* spp. Se empleó tanto caldo como agar.
- Agar cetrimida (Oxoid): empleado como medio selectivo de *Pseudomonas* spp.
- Agua de peptona tamponada (Scharlau): medio líquido para enriquecimiento. Tras la incubación de este medio, se inocula una alícuota en el medio selectivo adecuado.
- Müeller-Hinton agar (MH, Difco): utilizado para los estudios de sensibilidad a antibióticos.
- Leche deshidratada (Difco): utilizada para la conservación de las cepas congeladas.

2.2.- Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana

- Tinción de Gram: prueba bioquímica basada en las características de la pared celular de las bacterias. En ella se diferencian las bacterias Gram positivas, que retienen el cristal violeta y se observan al microscopio de un color violeta oscuro, de las Gram negativas, que pierden el cristal violeta y por contraste de la safranina presentan un color rosa. Además podemos distinguir las diferentes morfologías (cocos, bacilos, etc). En nuestro caso, se buscaban bacilos Gram negativos.
- Agar triple azúcar y hierro (TSI) (Difco): prueba de identificación, con la que se pueden diferenciar géneros bacterianos, basada en la capacidad del microorganismo de fermentar fructosa, lactosa o/y glucosa, y de producir gas o/y sulfuro de hierro. Se realiza en tubos en slant, sembrando en superficie (zona aerobia) y en profundidad (zona relativamente anaerobia) y se incuban a 37°C durante 24h. Los microorganismos incapaces de fermentar la glucosa o la lactosa, no presentan cambio de color en el medio como es el caso de *Pseudomonas* spp.

- Prueba de la Oxidasa (Cultimed): prueba de identificación donde se deposita una colonia bacteriana sobre la superficie de la tira comercial impregnada con el reactivo. La reacción se considera positiva cuando transcurridos aproximadamente 10-20s vira a un color morado. Las bacterias del género *Pseudomonas* son positivas para esta prueba.
- Prueba de la Catalasa: prueba de identificación consistente en añadir una gota de disolución acuosa de agua oxigenada (H₂O₂) al 3% sobre un frotis bacteriano. La presencia de la enzima catalasa provoca la formación de burbujas en el portaobjetos. Todas las *Pseudomonas* spp. son catalasa positiva.

3.- Procesamiento de las muestras para el aislamiento bacteriano

3.1.- Muestras fecales de individuos y caballos sanos

Las muestras fecales recogidas con torundas se suspendieron y homogeneizaron en 3 ml solución salina estéril (0,9%). Una alícuota de 100 µl de esta suspensión se inoculó sobre 2 ml de agua peptonada tamponada y se incubó a 37°C durante 48h. Transcurrido este tiempo, una alícuota de 100 µl fue sembrada homogéneamente sobre placas de agar cetrimida sin suplemento de antibiótico para analizar la presencia o ausencia de aislados de *Pseudomonas* spp. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24-48h.

Las placas con crecimiento bacteriano fueron expuestas en un intervalo corto de tiempo a luz UV para comprobar su fluorescencia. Se tomó una colonia por muestra y se reisló en BHI agar para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas: tinción de Gram, TSI, oxidasa y catalasa. Los bacilos Gram negativos no fermentadores de azúcar con reacciones oxidasa y catalasa positivas, se identificaron como potenciales *Pseudomonas* spp. La identificación definitiva se realizó molecularmente mediante la PCR del gen 16S rDNA (que se explicará con detalle posteriormente), secuenciación y comparación con la base de datos <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.2.- Muestras de alimentos de origen cárnico

El procesamiento de las muestras consistió en pesar 0,3 g de carne y resuspenderlos en 3 ml de solución salina estéril. Como en los casos anteriores, una alícuota de 100 μ l de la suspensión se añadió sobre 2 ml de agua peptonada tamponada y se incubó a 37°C durante 48h. A continuación, 100 μ l fueron sembrados sobre placas de agar cetrimida sin suplemento de antibiótico. Se incubaron durante 24-48h a 37°C.

El análisis de las placas con crecimiento bacteriano se llevó a cabo a través de las pruebas bioquímicas y moleculares descritas en el **apartado 3.1**.

3.3.- Muestras de alimentos de origen vegetal

Se trituraron y homogeneizaron 25-30 g de muestra en 100 ml de agua peptonada tamponada durante 30-60s con ayuda de un homogeneizador “Masticator” y bolsas estériles con filtro lateral “BagFilter® S” (Interscience, **Figura 24**). Una alícuota de 100 μ l de la suspensión fue sembrada directamente sobre placas de agar cetrimida; mientras que el resto de la suspensión se dejó incubando en un frasco de cristal estéril durante 48h a 37°C y tras este período de tiempo, se sembraron nuevamente 100 μ l sobre placas de agar cetrimida. Todas las placas se incubaron a 37°C durante 24-48h.

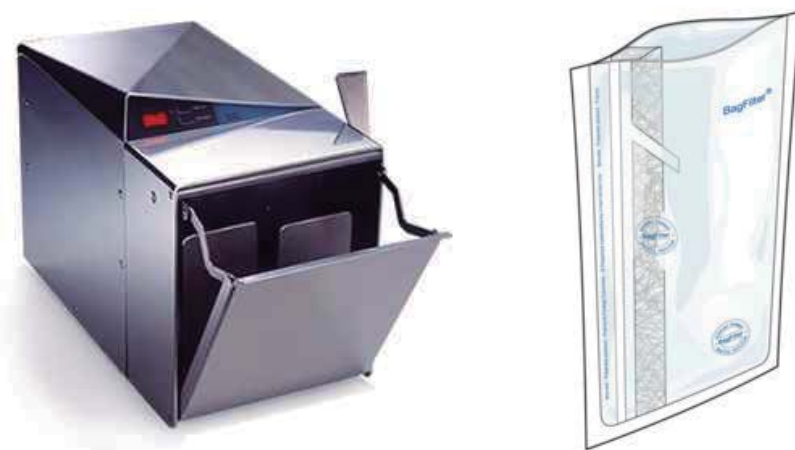


Figura 24.- Homogeneizador y bolsa estéril con filtro lateral para la homogeneización y vertido de la muestra vegetal con agua peptonada tamponada.

Las placas con crecimiento bacteriano fueron expuestas en un intervalo corto de tiempo a luz UV para comprobar su fluorescencia. Se tomó una colonia por placa. En este caso, además de identificar las posibles *Pseudomonas* spp., queríamos analizar si el preenriquecimiento en agua peptonada tamponada durante 48h permitía el crecimiento de las mismas especies o, por el contrario, facilitaba la presencia de otras.

A continuación, se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas de tinción de Gram, TSI, oxidasa y catalasa; y se confirmaron las especies bacterianas presentes por amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA; al igual que habíamos hecho con el resto de muestras no clínicas analizadas.

4.- Determinación de la sensibilidad a antibióticos

Para los estudios de sensibilidad a los antibióticos se utilizaron las cepas control *E. coli* ATCC25922 y *P. aeruginosa* ATCC27853.

4.1.- Difusión por disco

Se estudió la sensibilidad a diferentes antibióticos mediante el método de difusión por disco, también conocido como antibiograma, siguiendo las recomendaciones del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2013).

El método recomendado para *P. aeruginosa* (así como para otras especies no fastidiosas) consistió en preparar una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland en solución salina estéril partiendo de las cepas crecidas durante 24h a 37°C en placas de BHI agar. Posteriormente se sembró en forma de césped, con ayuda de un hisopo estéril, sobre placas de MH agar. Los discos de antibiótico comerciales (Oxoid, **Tabla 12**) se colocaron con una separación aproximada de 2 cm. A continuación, las placas se incubaron a 37°C durante 20-22h. Transcurrido este tiempo, se midieron los diámetros de los halos de inhibición producidos y según los puntos de corte propuestos por CLSI (2013) se pudo determinar la resistencia o sensibilidad de las cepas a los antibióticos utilizados en este estudio.

Se emplearon los puntos de corte de *P. aeruginosa* propuestos por CLSI (2013) para todas las especies de *Pseudomonas* aisladas en este trabajo.

TABLA 12.- Carga de antibiótico de los discos y diámetro de los puntos de corte recomendados por el CLSI (2013) de diferentes antibióticos para *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Carga por disco	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Ticarcilina (TIC)	75 µg	≤ 15	16 – 23	≥ 24
Piperacilina (PRL)	100 µg	≤ 14	15 – 20	≥ 21
Piperacilina-Tazobactam (TZP)	100/10 µg	≤ 14	15 – 20	≥ 21
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Cefepime (FEP)	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Aztreonam (ATM)	30 µg	≤ 15	16 – 21	≥ 22
Imipenem (IPM)	10 µg	≤ 15	16 – 18	≥ 19
Meropenem (MEM)	10 µg	≤ 15	16 – 18	≥ 19
Doripenem (DOR)	10 µg	≤ 15	16 – 18	≥ 19
Gentamicina (GEN)	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15
Tobramicina (TOB)	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15
Amikacina (AMK)	30 µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21
Norfloxacina (NOR)	10 µg	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Colistina (CT)	10 µg	≤ 10	–	≥ 11

4.2.- Dilución en agar y Etest

Se define como concentración mínima inhibitoria (CMI) a la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de una población estándar microbiana.

Siguiendo las recomendaciones del CLSI (2013), se determinó la CMI de los antibióticos imipenem y meropenem (Sigma) por el método de dilución en agar, tanto en las cepas clínicas del HSP de Logroño como en todos los aislados no clínicos obtenidos. Para las cepas clínicas del HCULB de Zaragoza se utilizó el sistema automático de microdilución WIDER (estos datos fueron cedidos amablemente por el hospital).

Para el desarrollo de esta técnica se prepararon placas de MH agar con diluciones seriadas (1:2) de antibiótico en un rango de concentración de 256 a 0,008 µg/ml. A su vez, se prepararon placas sin antibiótico para utilizarlas como control de crecimiento. El inóculo bacteriano se preparó suspendiendo el microorganismo en solución salina estéril hasta alcanzar la turbidez equivalente a

0,5 McFarland. A continuación se realizó una dilución 1/10 y se llenaron los pocillos del replicador de Steers (**Figura 25**) que permite sembrar los inóculos equivalentes a 10^4 UFC/gota de 32 cepas diferentes al mismo tiempo en una misma placa. Se incluyeron las placas control al comienzo y al final de la replicación así como las 2 cepas de referencia.

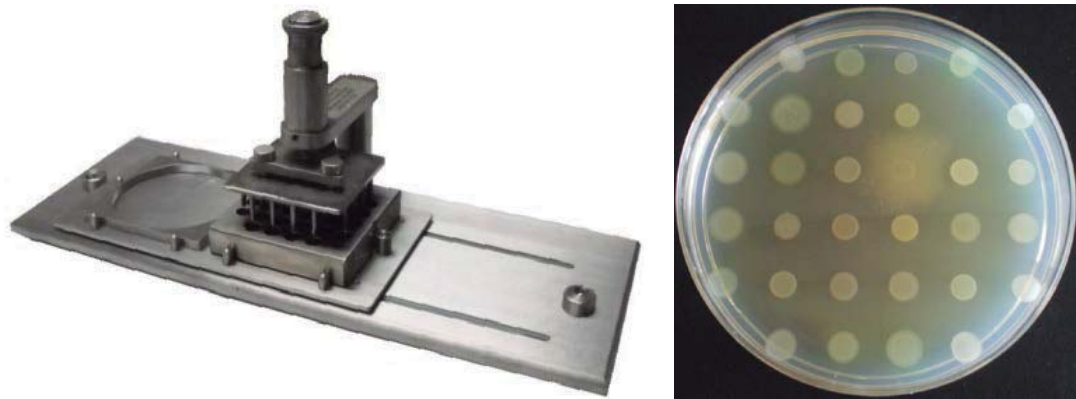


Figura 25.- Replicador de Steers y placa sembrada con él.

Después de 24 h de incubación a 37°C, se procedió a la lectura de las mismas. La CMI de cada cepa se determinó como la menor concentración de antibiótico que provoca la inhibición del microorganismo y con los valores recomendados por CLSI (2013) se pudo determinar la resistencia o sensibilidad de nuestras cepas a los antibióticos carbapenémicos utilizados (**Tabla 13**).

TABLA 13.- Puntos de corte recomendados por el CLSI (2013) a los diferentes antibióticos carbapenémicos para *P. aeruginosa*.

Antibiótico carbapenémico	Punto de corte CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
Imipenem (IPM)	≥ 8	4	≤ 2
Meropenem (MEM)	≥ 8	4	≤ 2
Doripenem (DOR)	≥ 8	4	≤ 2

En el caso de las cepas no clínicas, se determinó la CMI del antibiótico doripenem por medio de las tiras comerciales Etest® (bioMérieux) con gradiente de concentración entre 0,002 y 32 $\mu\text{g/ml}$. Siguiendo las recomendaciones del

fabricante, se prepararon placas de MH agar con un grosor aproximado de 4 mm y suspensiones de las cepas objeto de estudio de concentración 0,5 McFarland. Se sembraron las placas cuidadosamente desplazando el hisopo por toda la superficie en 3 direcciones diferentes (girando la placa 60° cada vez) y dejándolas en una superficie plana durante 15 minutos para que el propio medio absorba el exceso de inóculo y se consiga una perfecta distribución. A continuación, se colocan las tiras de antibiótico de manera que estén completamente en contacto con la superficie del agar y se incuban a 37°C durante 16-20h. Transcurrido este tiempo, se procede a la lectura de la CMI y con los valores recomendados por CLSI (2013), se determinó la resistencia o sensibilidad a este carbapenémico en las cepas no clínicas (**Tabla 13**).

4.3.- Test sinérgico de doble disco

Tanto la actividad MBL como la producción de BLEE o carbapenemasas de clase A se determinaron mediante la técnica del test sinérgico de doble disco.

Para la detección de MBL se realizó un antibiograma con una distribución concreta de los discos: IPM (10 µg) + disco blanco con 6µl de ácido etilendiaminotetraacético 0,5M pH=8,0 (EDTA, Panreac) + MEM (10 µg). Se observa el fenotipo MBL cuando se produce una deformación del halo de inhibición de los carbapenémicos en las proximidades del disco de EDTA (**Figura 26**). Este estudio nos da una idea previa de la presencia de algún tipo de MBL en la cepa correspondiente, aunque deberá ser confirmado por técnicas moleculares.

Para la detección de BLEE también se empleó la técnica de doble disco pero utilizando otros antibióticos: cefepime (30 µg) + amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg) + ceftazidima (30 µg). El disco central contiene al inhibidor de beta-lactamasas (ácido clavulánico) y la deformación del halo de dichos beta-lactámicos en las proximidades de este disco nos da idea de la presencia de una posible cepa productora de una BLEE (**Figura 26**). Como en el caso anterior, es necesaria una confirmación y determinación del gen por la técnica de PCR y secuenciación.

Por último, la detección fenotípica de carbapenemasas de clase A se llevó a cabo del mismo modo que las dos anteriores pero con la siguiente distribución de discos: IPM (10 µg) + disco blanco con 6 µl de ácido 3-aminofenilborónico (APB

50 mg/ml, Sigma) + MEM (10 µg). El aumento y deformación del halo en las proximidades del disco central nos permite intuir la presencia de una carbapenemasa de clase A, pero de la misma manera que en los casos anteriores, se necesita la confirmación por técnicas moleculares.

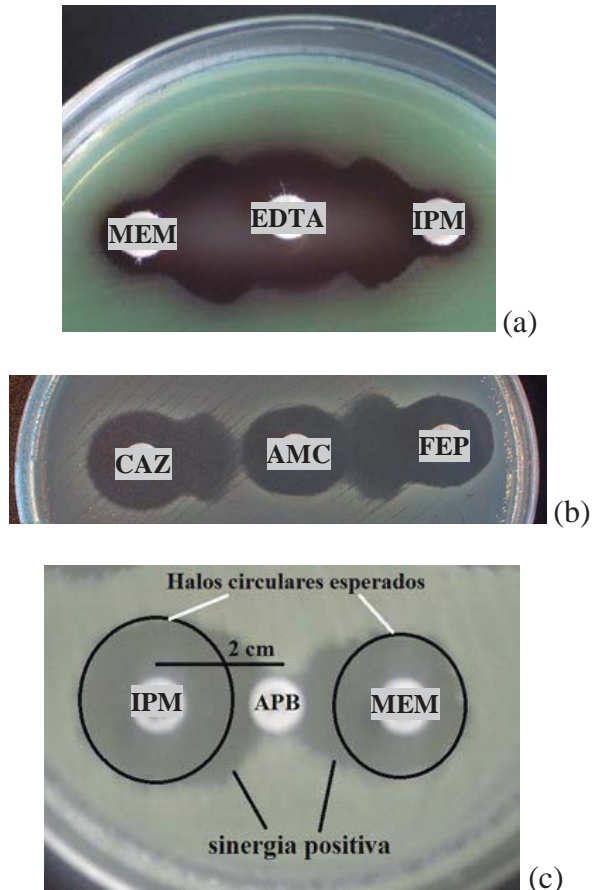


Figura 26.- Test sinérgico de doble disco para la detección de MBL (a), BLEE (b) y carbapenemasa de clase A (c). Todas las imágenes presentan resultados positivos.

5.- Extracción del DNA

5.1.- Métodos de extracción del DNA

5.1.1.- Resina (InstaGene™ Matrix, BioRad)

Para la extracción del DNA en *P. aeruginosa* se utilizó el sistema InstaGene™ Purification Matrix (BioRad), una matriz que absorbe los productos de la lisis celular que interfieren en la PCR, facilitando la preparación de DNA válido para la amplificación por esta técnica molecular.

El protocolo llevado a cabo fue: a partir de un cultivo bacteriano puro se resuspendió una colonia aislada en 1 ml de agua destilada estéril. Se centrifugó durante 4 min a 13000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 200 µl de resina de extracción InstaGene y se incubó durante 25 min en un baño a 56°C. Tras esta incubación, se agitó en vortex a alta velocidad durante 10s. Se hirvió la mezcla a 100°C durante 8 min y se agitó nuevamente en vortex durante 10s. Por último, se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm y se almacenó a 4°C.

5.1.2.- “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche)

Este método de extracción de DNA se empleó en el estudio de transposones y en la preparación de las sondas específicas utilizadas para la hibridación. Para ello, a partir de un cultivo puro en placa de 24h, se recogieron con el asa de siembra 2 ó 3 colonias y se resuspendieron en 200 µl de tampón fosfato salino (PBS, pH=7,4) con ayuda de un vortex. Se añadieron 5 µl de lisozima (10 mg/ml en tris(hidroximetil)aminometano (Tris)-HCl 10 mM, pH=8,0) y se incubó a 37°C durante 15 min. Se añadieron 200 µl de la solución “Binding buffer” + 40 µl de proteinasa K reconstituida, se mezcló inmediatamente invirtiendo varias veces el tubo eppendorf y se incubaron durante 10 min a 70°C. A continuación, se añadieron 100 µl de isopropanol que se mezclaron con ayuda de la micropipeta, se transfirió todo el volumen a una columna del kit, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min y se eliminó el filtrado. Se añadieron 500 µl de la solución “Inhibitor Removal buffer” y se centrifugó 1 min a 13000 rpm. Seguidamente se añadieron 500 µl de la solución “Wash buffer” y se centrifugó de igual modo. Se repitió este último paso. Por último, se eluyó el DNA extraído con 200 µl de agua destilada centrifugándose a continuación durante 1 min a 13000 rpm y se guardó a 4°C para próximos usos.

5.2.- Cuantificación del DNA

La concentración y pureza del DNA extraído se comprobó con el espectrofotómetro Nanodrop® ND-100 que nos permite realizar lecturas de volúmenes muy pequeños de muestra (1-3 μ l) de manera rápida y sencilla.

Es posible conocer la concentración de DNA gracias a la lectura de la absorbancia a 260 nm, para lo que se considera que una unidad de absorbancia ($A_{260}=1$) corresponde aproximadamente a una concentración de 50 μ g/ml de DNA de doble hebra y a 20 μ g/ml de DNA de cadena única. La pureza del DNA extraído se determina con el cociente entre las lecturas a 260 y 280 nm. Una cantidad de DNA pura presentará un cociente entre 1,8 y 2,0; mientras que la contaminación con proteínas disminuye la relación por debajo de 1,8 y la presencia de RNA da un cociente superior a 2,0. Los valores óptimos de concentración para las PCR realizadas en *Pseudomonas* spp. son 300-600 ng/ μ l. En aquellos casos en los que la concentración de DNA extraída fue superior a la deseada se realizaron las diluciones oportunas con agua destilada estéril.

6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) es una técnica de biología molecular descrita por Kary Mullis cuyo objetivo es amplificar un fragmento de DNA particular delimitado por un par de cebadores. La PCR se basa en la síntesis de DNA a través de la enzima DNA polimerasa con ayuda de dos 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 (las dos hebras de DNA se separan), hibridación (los cebadores se unen a los extremos 3') y elongación (tiene lugar la síntesis de la cadena por acción de la enzima DNA polimerasa). Estos tres pasos se repiten un número determinado de veces con el fin de conseguir millones de copias de la secuencia original. Una PCR múltiple consiste en la amplificación de distintos genes con diferentes pares de cebadores en una misma reacción.

Para llevar a cabo la técnica de PCR se utilizaron los siguientes termocicladores: T3 y T3000 Thermocycler (Biometra) y GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50 μl para cada tubo de reacción, utilizando los componentes y las cantidades indicados en la **Tabla 14**.

TABLA 14.- Reactivos utilizados en la técnica de PCR.

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebador <i>directo</i> (Sigma) ^a	25 μM	1 μl	0,5 μM
Cebador <i>reverso</i> (Sigma) ^a	25 μM	1 μl	0,5 μM
Tampón de reacción “NH ₄ buffer” (Bioline)	10X	5 μl	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1,5 μl	1,5 mM
dNTP’s mix (Sigma)	10 mM	1 μl	0,2 mM
BioTaq DNA polimerasa (Bioline)	5 U/ μl	0,3 μl ^b	1,5 U
DNA	—	10 μl	—
Agua miliQ estéril	—	Hasta 50 μl ^c	—

^aLos cebadores fueron sintetizados por Sigma Aldrich. El cebador *directo* se conoce como F (forward) y el cebador *reverso* como R (reverse).

^bSe empleó 0,5 μl de BioTaq DNA polimerasa en aquellas PCR con fragmentos superiores a 1500 pb

^cEste volumen varía en función de que la PCR sea simple (una única pareja de cebadores) o PCR múltiple (con más de un par de cebadores).

En todas las reacciones se incluyeron un control positivo y dos controles negativos. El control positivo contenía DNA de un organismo del que se había confirmado por secuenciación la presencia del gen deseado para amplificar. Y en cuanto a los controles negativos uno de ellos contenía todos los componentes excepto el DNA (que fue sustituido por agua miliQ estéril hasta un volumen final de 50 μl) y el otro contenía también toda la mezcla excepto los cebadores (que de igual modo fueron sustituidos por agua miliQ estéril hasta un volumen final de 50 μl).

Las secuencias de los cebadores, las condiciones de amplificación y los tamaños de los fragmentos de DNA amplificados en cada caso se describen en los siguientes apartados.

6.1.- Identificación molecular de especie

En la siguiente tabla se indican las condiciones de amplificación y los cebadores utilizados en la PCR llevada a cabo para la confirmación de especie.

TABLA 15.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen 16S rDNA que nos permite identificar la especie bacteriana.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
16S rDNA: 1585 pb F: AGAGTTTGATYMTGGCTCAG ^a R: GGYTACCTTGTTACGACTT ^a	95°C 5min 1 ciclo	Lane, 1991
	95°C 1min	
	52°C 1min 32 ciclos	
	72°C 2min	
	72°C 7min 1 ciclo	

^aY = C+T; M = A+C

6.2.- Detección de genes de resistencia mediante PCR múltiple

6.2.1.- Detección de genes codificantes de MBL

Se empleó una PCR múltiple para la detección de genes que codifican MBL, enzimas que confieren resistencia a los carbapenémicos.

La mezcla de reacción se preparó siguiendo las directrices del artículo original (Ellington *et al.*, 2007) y las condiciones específicas de esta PCR se ven en la **Tabla 16**.

Cuando se obtenían resultados positivos, se repetía la PCR en su versión simple (empleando únicamente la pareja de cebadores que había amplificado) y se enviaban a secuenciar para determinar la variante específica del gen detectado.

TABLA 16.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para la PCR múltiple de MBL y sus condiciones de amplificación.

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

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

6.2.2.- Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A

Se utilizó una PCR múltiple para detectar los genes codificantes para las carbapenemasas de clase A (Hong *et al.*, 2012).

En esta ocasión la mezcla de reacción varía puesto que el volumen final fue de 25 μl y se empleó otro tipo de polimerasa “KAPA Taq HotStart DNA Polymerase” (KAPABIOSYSTEMS) con condiciones específicas, como podemos ver en la **Tabla 17**.

A continuación, vemos las condiciones específicas de esta PCR y las variantes de los genes que es capaz de amplificar (**Tabla 18**).

TABLA 17.- Cantidades añadidas de los reactivos utilizados en la PCR múltiple de carbapenemasas de clase A.

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebador <i>directo</i> 1 (Sigma)	25 μM	0,5 μl	0,5 μM
Cebador <i>reverso</i> 1 (Sigma)	25 μM	0,5 μl	0,5 μM
Cebador <i>directo</i> 2 (Sigma)	25 μM	0,5 μl	0,5 μM
Cebador <i>reverso</i> 2 (Sigma)	25 μM	0,5 μl	0,5 μM
Cebador <i>directo</i> 3 (Sigma)	25 μM	0,5 μl	0,5 μM
Cebador <i>reverso</i> 3 (Sigma)	25 μM	0,5 μl	0,5 μM
Cebador <i>directo</i> 4 (Sigma)	25 μM	0,5 μl	0,5 μM
Cebador <i>reverso</i> 4 (Sigma)	25 μM	0,5 μl	0,5 μM
Tampón de reacción “KAPA Taq HotStart buffer” (KAPABIOSYSTEMS)	5X	2,5 μl	0,5X
MgCl ₂ (KAPABIOSYSTEMS)	25 mM	0,75 μl	0,75 mM
dNTP´s mix (Sigma)	10 mM	0,5 μl	0,2 mM
KAPA Taq HotStart (KAPABIOSYSTEMS)	5 U/ μl	0,1 μl	0,5 U
DNA	—	5 μl	—
Agua miliQ estéril	—	Hasta 25 μl	—

TABLA 18.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para la PCR múltiple de carbapenemasas de clase A y sus condiciones de amplificación.

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

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

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

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

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

6.3.- Detección de genes de resistencia a aminoglucósidos

Para el análisis de estas PCRs, se llevaron a cabo las siguientes condiciones de amplificación (**Tabla 19**):

TABLA 19.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para el estudio de genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos y sus condiciones de amplificación.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
<i>aac(6')-Ib</i>: 482 pb (confiere resistencia a tobramicina, kanamicina y amikacina) F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT ^a Seq: CGTCACTCCATACATTGCAA	94°C 5min 1 ciclo 94°C 45s 55°C 45s 34 ciclos 72°C 45s 72°C 8min 1 ciclo	Park <i>et al.</i> , 2006
<i>aadB [=ant(2'')]</i>: 187 pb (confiere resistencia a gentamicina) F: ATGTTACGCAGCAGGGCAGTCG R: CGTCAGATCAATATCATCGTGC	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 60°C 45s 32 ciclos 72°C 2min 72°C 8min 1 ciclo	Vanhoof <i>et al.</i> , 1992
<i>aadA</i>: 282 pb (confiere resistencia a estreptomicina) F: GCAGCGCAATGACATTCTTG R: ATCCTTCGGCGCGATTTTG	94°C 5min 1 ciclo 94°C 1min 60°C 1min 35 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Madsen <i>et al.</i> , 2000
<i>aac(3)-I</i>: 169 pb (confiere resistencia a gentamicina) F: ACCTACTCCCAACATCAGCC R: ATATAGATCTCACTACGCGC	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 60°C 45s 32 ciclos 72°C 2min 72°C 8min 1 ciclo	Van de Klundert & Vliegthart, 1993

^aEste cebador se utilizó únicamente para secuenciar.

6.4.- Estudio de la porina OprD

Para analizar las modificaciones en la porina OprD, se amplificó por PCR el gen *oprD* y posteriormente se secuenció. Se emplearon las condiciones de amplificación mostradas en la siguiente tabla:

TABLA 20.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para el estudio de *oprD* y sus condiciones de amplificación.

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

Se produjeron situaciones concretas en que la secuenciación de este gen no fue completa y tuvimos que utilizar/diseñar los cebadores que se presentan a continuación:

- OprD-F2: GCCGACCACCGTCAAATCG (Gutiérrez *et al.*, 2007)
- OprD-F3: GGGCACCACCACCAAGTCG (diseñado en este trabajo)
- OprD-F3-rev: CGACTTGGTGGTGGTGCCC (diseñado en este trabajo)
- OprDIS-R: GGACCGTTGAAGTCGGAGTA (diseñado en este trabajo)
- OprDIS-R-rev: TACTCCGACTTCAACGGTCC (diseñado en este trabajo)
- OprDIS-R2: GGATTCGTAGGTGGTGAGGA (diseñado en este trabajo)
- ISPs61-F: GAATGGATGTTTCGACCTTGG (diseñado en este trabajo)
- ISPs33-F: GGGTGCTGCTTGTCTTAGC (diseñado en este trabajo)
- ISPs33-F2: CGTCGTAGAGCATGGACAGA (diseñado en este trabajo)
- ISPs159-F: TCAGCACTGGCTGGATAATG (diseñado en este trabajo)
- ISPs159-R: GTGGATGCCGAAATAAGAA (diseñado en este trabajo)
- ISPs92-F: TCTTGCTGATGTTGCGTAGC (diseñado en este trabajo)
- ISPs92-R: CGCTGAGGTTATCGGTGATT (diseñado en este trabajo)
- ISW64-F: GGCAGATTCCAGAGATGGTC (diseñado en este trabajo)
- ISW64-R: AGCGGGATTGTGTAGTTGGT (diseñado en este trabajo)

6.5.- Análisis de integrones y promotores

En la **Tabla 21** 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, 2 ó 3, el segmento 3' conservado característico del integrón de clase 1 y las regiones variables de los integrones de clase 1 ó 2.

Cuando las regiones variables de los integrones tenían un tamaño elevado (> 1500 pb) fue necesario recurrir a la técnica de mapeo por PCR donde, combinando diferentes cebadores tanto para amplificar como para secuenciar, se sucedían los fragmentos de manera solapante permitiendo obtener el integrón completo. Además, en todos los casos en que la amplificación de la integrasa de tipo 1 fue positiva, se analizó el polimorfismo de los promotores (Pc y P2), estudiando el fragmento presente entre el gen *intI1* y el primer casete génico de la región variable.

Para analizar dichos promotores, se realizó una PCR empleando como cebador *directo* (o forward, F) *intI1-centro*, cuya secuencia es: 5'-CGAAATCCAGATCCTTGACCC-3', y como cebador *reverso* (o reverse, R) el correspondiente al casete génico encontrado. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que empleamos para la región variable de integrón de clase 1 y el amplicón se envió a secuenciar únicamente con el cebador *intI1-centro*.

A continuación, podemos ver la secuencia nucleotídica que recoge la zona de amplificación de la PCR anterior, donde los nucleótidos marcados en verde corresponden al cebador *intI1-centro* y los subrayados indican la región que codifica para la proteína ORF11:

```
CGAAATCCAGATCCTTGACCCGCAGTTGCAAACCCCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATA
CAGAAGCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCA
TCCGGGGTCAGCACCACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGCC
AGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCAATGCCTGACG
ATGCGTGGAGACCGAAACCTTGCCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCG
CTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGT
GGACAaTAAGCCTGTTTCGGTTGGTAAGCTaGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACT
GGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATbGGCTT
GTTAcTGACTGTTTTTTTGTACAGTcCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACG
CCGTGGGTTCGATGTTTATGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCC
TAAACAAAGTTAGCCAT
```

^aRegiones -10 y -35 del promotor Pc (tipo PcW); ^bCodón de inicio del gen *intI1*; ^cRegiones -10 y -35 del promotor P2 (inactivo).

TABLA 21.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las PCR de integrones de tipo 1, 2 y 3 y sus condiciones de amplificación.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
<i>intI1</i>: 483 pb F:GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG R:ACATGCGTGTAATCATCGTCG	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 62°C 30s 30 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000
Región variable de integrón clase 1 F: GGCATCCAAGCAGCAAG R: AAGCAGACTTGACCTGA	94°C 5min 1 ciclo 94°C 1min 55°C 1min 35 ciclos 65°C 8min 72°C 8min 1 ciclo	Lévesque & Roy, 1993
<i>qacEΔI</i> + <i>sulI</i>: 1125 pb F: GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG R: GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 63°C 30s 30 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000
<i>intI2</i>: 788 pb F:CACGGATATGCGACAAAAAGGT R:GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 62°C 30s 30 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000
Región variable de integrón clase 2 F:CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA R: GATGCCATCGCAAGTACGAG	94°C 5min 1 ciclo 94°C 1min 60°C 1min 35 ciclos 72°C 6min 72°C 8min 1 ciclo	White <i>et al.</i> , 2001
<i>intI3</i>: 979 pb F: GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R: ACGGATCTGCCAAACCTGACT	94°C 5min 1 ciclo 94°C 30s 62°C 30s 30 ciclos 72°C 1min 72°C 8min 1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000

6.6.- Estudio de transposones

El estudio de los entornos de los integrones que albergaban el gen *bla_{VIM-2}* se realizó con la técnica de mapeo por PCR que, como hemos referido anteriormente, se basa en la secuenciación de fragmentos de DNA solapados, normalmente de estructuras previamente descritas en la bibliografía, que nos permite determinar una estructura genética de mayor tamaño. Se llevó a cabo durante una estancia de 4 meses en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Son Espases (HUSE) de Palma de Mallorca bajo la supervisión de los Dres. Antonio Oliver y Carlos Juan.

Se seleccionaron 13 cepas del HCULB de Zaragoza con fenotipo de multirresistencia y portadoras de integrones de clase 1 que albergaban el gen *bla_{VIM-2}*.

La técnica de PCR se realizó con una polimerasa diferente denominada “AmpliTaq Gold DNA polymerase” (Roche) y en un termociclador “Arktik Thermal Cycler” (Thermo Scientific) con las condiciones que se observan en la siguiente tabla:

TABLA 22.- Reactivos utilizados en la técnica de PCR.

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebador <i>directo</i> (Sigma)	100 µM	0,5 µl	1 µM
Cebador <i>reverso</i> (Sigma)	100 µM	0,5 µl	1 µM
Tampón de reacción “Gold buffer” (Roche)	10X	5 µl	1X
MgCl ₂ (Roche)	25 mM	3 µl	1,5 mM
dNTP’s mix (Bioline)	10 mM	1 µl	0,2 mM
AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Roche)	5 U/µl	0,5 µl	1,5 U
DNA	—	1 µl	—
Agua miliQ estéril	—	Hasta 50 µl	—

Los cebadores utilizados en esta técnica y las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 23.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las PCR de transposones y sus condiciones de amplificación.

Cebadores		Secuencia 5' → 3'	T ^a hib. ^a	Referencia
1	tnpA-final-F	GGGGCTGGAGCTGGGATG	62°C	Samuelson <i>et al.</i> , 2010
2	tnpA-V13-F	GGATGAACAGCGTGCGCTC	62°C	Juan <i>et al.</i> , 2008
3	tnpA-V13-F2	GGCAGAGCTGCACGGCG	60°C	Juan <i>et al.</i> , 2008
4	tnpA-intFI-R	TGGACTTGCTTCGCCACCC	62°C	Este trabajo
5	tnpR-intFI	TGGCCCACAACCTCGATGA	62°C	Juan <i>et al.</i> , 2008
6	tnpR-intFI-R	TCATCGAGGTTGCGGGCCA	62°C	Este trabajo
7	intFI	CCCTCACTAGTGAGAGGTAG	62°C	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007
8	intFI2	GCTCACCGCTTGATGCGC	56°C	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007
9	vim2-F-inv	CTTACTCAAAAGTTTGAACAT	56°C	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007
10	vim2-R-inv	CGCTCAGTCGTTGAGTAG	56°C	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007
11	sul1-final-F	TCGCAGTCGCGACGCCAG	62°C	Juan <i>et al.</i> , 2008
12	sul1-final-R	CTGGCGTCGCGACTGCGA	62°C	Juan <i>et al.</i> , 2008
13	tniB-R-m	GACGATTGCTGCTCACTGCT	62°C	Marchiaro <i>et al.</i> , 2010
14	tniB-R-m-inv	AGCAGTGAGCAGCAATCGTC	62°C	Marchiaro <i>et al.</i> , 2010
15	tniB-R1	ATCCGTTCCGGACGATCAGTT	60°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
16	tniB-R2	GGACGAATATCCCGTCATTG	60°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
17	tniA-R-m	CTTTCACCGCGAAGTCACTC	62°C	Marchiaro <i>et al.</i> , 2010
18	tniA-R-m-inv	GAGTGACTTCGCGGTGAAAG	62°C	Marchiaro <i>et al.</i> , 2010
19	tniA-R1	GCACAACGGCCTGCTCCA	60°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
20	tniA-R2	GGCATTCCGCCCGAAGTC	60°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
21	tniA-R3	CGTGGCCACCCTGCCCCG	60°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
22	tniA-R4	TGGATATACGCTCCACGATGA	62°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
23	tniC-R	TGACCGGTCACGGTGCG	58°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
24	IS1326-F	TACCGGGTCTTATGACCGAGT	64°C	Tato <i>et al.</i> , 2010
25	IS1326-R	ACTGTCATAGCGGTTACGTT	62°C	Tato <i>et al.</i> , 2010
26	IS1353-F	ACACTACGGCAGCTGGGATA	62°C	Tato <i>et al.</i> , 2010

Cebadores		Secuencia 5' → 3'	T ^a hib. ^a	Referencia
27	IS1353-R	TGCAGCATTGTCTTGCGAGCA	64°C	Tato <i>et al.</i> , 2010
28	tniB-F-m	CAGTGAGCAGCAATCGTCGT	62°C	Marchiaro <i>et al.</i> , 2010
29	tniB-F-m-inv	ACGACGATTGCTGCTCACTG	62°C	Marchiaro <i>et al.</i> , 2010
30	tniA-F2	GACTTCGGGCGGAATGCC	60°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
31	tniA-F3	CTTGC GCGGCAATCGGTG	60°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
32	tniA-F4	TCATCGTGGAGCGTATATCCA	62°C	Juan <i>et al.</i> , 2010
33	<i>merE</i> -final-F	TTCGTCCTGTCTGTGACACG	62°C	AM157767 ^b
34	<i>merD</i> -final-F	GGTGCAGTTGGCCACCATG	62°C	AM157767 ^b
35	<i>merA</i> -final-F	TGATCCAGACGGCGGTGC	60°C	EU306744 ^b

^aT^a hib. = temperatura de hibridación. Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 12 min.); 35 ciclos (94°C, 1 min.; X, 1 min. y 72°C, 3 min.) y elongación final (72°C, 10 min.).

^bDiseñados en Mallorca a partir de la secuencia nucleotídica con este número de acceso en la base de datos de GenBank.

En la **Figura 27** se presentan las combinaciones de cebadores empleadas en las PCR para estudiar el entorno del gen *bla*_{VIM-2}.

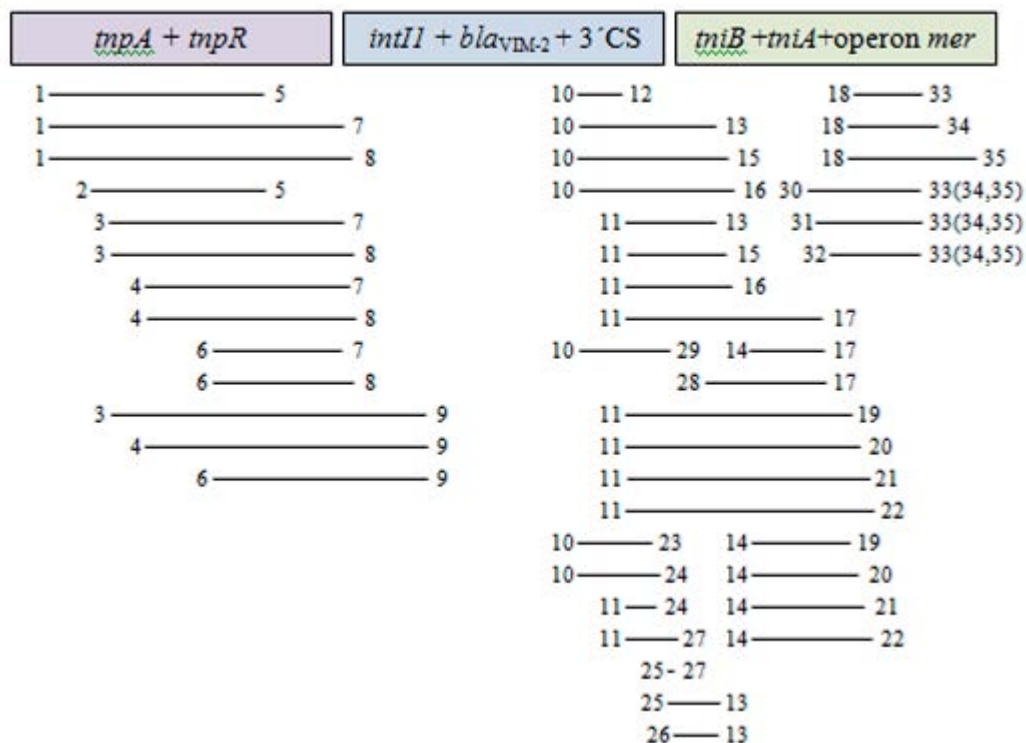


Figura 27.- Combinaciones de cebadores utilizadas en las PCR en busca del entorno del gen *bla*_{VIM-2}. [3'CS = segmento 3'conservado]

7.- Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los fragmentos amplificados por PCR se utilizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa, que nos permite separar fragmentos de DNA de distinto tamaño, gracias a la acción de un campo eléctrico.

Para la preparación del gel se utilizó una concentración de agarosa (Agarose D1 low EEO, Pronadisa) en un rango entre 1 y 2% (m/v) en tampón TBE 1X. Este buffer se prepara a partir de un stock concentrado TBE 5X compuesto por: 54 g/l tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Panreac), 27,5 g/l ácido bórico (Panreac) y 20 ml EDTA 0,5M pH=8,0 (Panreac). El porcentaje de agarosa depende del tamaño de las bandas esperadas, a mayor tamaño de banda menor porcentaje de agarosa. Una vez preparada la mezcla, se calentó hasta su total disolución. Para poder visualizar los fragmentos de DNA, se añadió a la mezcla el producto “Midori Green Advanced DNA Stain” (Nippon Genetics Europe GmbH), como sustituto del bromuro de etidio, en una cantidad de 5 µl/100 ml de agarosa y se vertió en el molde preparado. Se dejó solidificar dentro de la campana y, a continuación, se cargó cada uno de los pocillos con 10 µl del producto de PCR mezclados con 2 µl de tampón de carga [(10% (m/v) sacarosa + 0,0025% (m/v) azul de bromofenol + 0,0025% (m/v) xileno cianol]. Uno de los pocillos siempre se carga con 2 µl de marcador de tamaño. Según los tamaños de los amplicones esperados se pueden utilizar diferentes marcadores (Bioline): Hyperladder IV (100 pb); Hyperladder I (200 pb) o Hyperladder III (500 pb).

Posteriormente el gel cargado se sumergió en una cubeta de electroforesis llena de tampón TBE 1X y fue sometido a un campo eléctrico de 96 V durante 0,75 - 2h en función del tamaño del amplicón esperado. Por último, el gel se visualizó en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con un captador de imágenes (Image Store 5000, UVP) gracias al programa informático ChemiGenius (GenSnap from SynGene).

8.- Tipificación molecular

8.1.- Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

Se empleó esta técnica para conocer la relación clonal entre los diferentes grupos de aislados que teníamos. Se utilizó la enzima de restricción *SpeI* (10000U/ml, BioLabs, New England) y el protocolo propuesto por Rojo-Bezales y colaboradores (2011):

➤ Preparación de insertos:

A partir de un cultivo puro de 24h en placa de BHI agar, se inocularon varias colonias en 3 ml de BHI líquido y se incubaron o/n a 37°C con agitación (105 rpm). Se centrifugó 1 ml del cultivo a 13000 rpm durante 3 min (repetiendo la centrifugación en caso necesario) y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA pH=8,0) y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Se eliminó de nuevo el sobrenadante y se volvió a resuspender en 1 ml de TE. Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) al 1,5% en buffer TE y se mantuvo a 56°C. Se mezclaron 0,5 ml de la suspensión bacteriana con 0,5 ml de agarosa y se distribuyó en los moldes, preparando 3 insertos por cepa. A continuación, se dejó solidificar unos minutos en la nevera.

➤ Lisis bacteriana:

Se añadieron 10 ml de buffer de lisis 1 (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM EDTA pH=8,0, 1% sarcosil, 2 mg/ml proteinasa K) en cada tubo que albergaba los 3 insertos de la cepa correspondiente y se dejó incubar en un baño de agua a 56°C con agitación durante 6h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el buffer de lisis 1 y se añadieron 10 ml del buffer de lisis 2 (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM EDTA pH=8,0, 1% sarcosil, 0,1 mg/ml proteinasa K) y se dejaron nuevamente incubando durante toda la noche en el baño de agua a 56°C con agitación.

➤ Lavado de insertos:

Tras eliminar el buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados: 1) 10 ml de agua destilada estéril durante 10 min en un baño de agua a 56°C con agitación; 2) 10 ml de buffer TE durante 30 min en un baño de agua a 56°C con

agitación (se repite tres veces); y 3) 10 ml de buffer TE durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Después del último lavado, se cambió por última vez el buffer TE y los insertos pueden ser guardados a 4°C (tienen una caducidad aproximada de un año).

➤ Digestión enzimática:

Para la digestión se utilizó la mitad de un inserto de cada cepa y un volumen final de 100 µl de la mezcla de digestión compuesta por: 2 µl de enzima *SpeI* (10U) + 1 µl BSA (100X) + 10 µl NE Buffer 4 (10X) + 87 µl agua destilada estéril. Se incubaron durante 6h en un baño de agua a 37°C.

➤ Preparación del gel de agarosa:

Se disolvió agarosa (Agarosa D5, Pronadisa) al 1% en TBE 0,5X, se vertió sobre el molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se rellenaron con los insertos digeridos, dejando el primero y el último de los mismos para el marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker, BioLabs), y se sellaron con agarosa de la misma concentración atemperada a 50°C.

➤ Electroforesis:

Se realizó en una cubeta de electroforesis CHEF-DR II (BioRad) con 2 l de TBE 0,5X suplementado con tiourea 75 µM, lo que evita la degradación del DNA. Las condiciones de electroforesis empleadas fueron: 1) una rampa lineal pulsada de 5 a 15s con un gradiente de voltaje de 6V/cm a 14°C durante 10h; seguida de 2) una rampa lineal pulsada de 15 a 45s con un gradiente de voltaje de 6V/cm a 14°C durante 10h.

➤ Tinción del gel y visualización:

Se tiñó el gel en una solución acuosa de bromuro de etidio (20 µl/200 ml) durante 15 min. Se visualizó después en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con un captador de imágenes (Image Store 5000, UVP) gracias al programa informático ChemiGenius (GenSnap from SynGene). Posteriormente se destiñó el gel con agua destilada.

➤ Análisis de los patrones de PFGE:

Los perfiles obtenidos se compararon y clasificaron en indistinguibles, estrechamente relacionados, posiblemente relacionados o diferentes según las directrices propuestas por Tenover y colaboradores (1995). Asimismo, las similitudes entre los perfiles fueron calculadas usando el coeficiente de Dice y los patrones de PFGE se clasificaron por el método UPGMA determinado con el programa informático GelCompare 2.5 (Applied Maths, Bélgica).

8.2.- Determinación de la secuencia tipo

En la tipificación molecular se empleó la técnica de “MultiLocus Sequence Typing” (MLST) basada en el estudio de las secuencias nucleotídicas de 7 genes internos que codifican fragmentos estables en cada género bacteriano. Estos genes se denominan “housekeeping” y la combinación de los 7 alelos determina la secuencia tipo (ST).

Curran y colaboradores (2004) desarrollaron esta técnica para *P. aeruginosa* y con objeto de optimizar el proceso, describieron unos cebadores para amplificar el DNA mediante PCR y otros cebadores para ser utilizados en la secuenciación. En las **Tablas 24** y **25** vemos las secuencias nucleotídicas de todos estos cebadores.

TABLA 24.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las PCRs de los 7 genes “housekeeping” para la tipificación molecular.

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

TABLA 25.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para la secuenciación de los 7 genes “housekeeping” en la determinación de la secuencia tipo.

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

Respecto a las condiciones de amplificación debemos destacar que para cada gen se emplearon unas condiciones concretas tanto en cuestión de polimerasa como en temperatura de hibridación. En las **Tablas 26** y **27** se presentan las diferentes condiciones utilizadas para los distintos genes.

TABLA 26.- Condiciones de amplificación para los 7 genes “housekeeping”.

Gen “housekeeping”	Tipo de polimerasa empleada (Distribuidor)	Temperatura de hibridación ^a
<i>acsA</i>	“Immolase DNA Polymerase” (Bioline)	54°C
<i>aroE</i>	“KAPA Taq HotStart DNA Polymerase” (KAPABIOSYSTEMS)	55°C
<i>guaA</i>	“Immolase DNA Polymerase” (Bioline)	56°C
<i>mutL</i>	“BioTaq DNA Polymerase” (Bioline)	58°C
<i>nuoD</i>	“Immolase DNA Polymerase” (Bioline)	55,5°C ^b
<i>ppsA</i>	“Immolase DNA Polymerase” (Bioline)	56°C
<i>trpE</i>	“Immolase DNA Polymerase” (Bioline)	56°C

^aEl programa de amplificación fue: desnaturalización inicial a 95°C durante 3min, seguido de 30 ciclos de 95°C, 1min + X°C, 1min + 72°C, 1min y elongación final a 72°C durante 10min.

^bEste gen necesita que el programa de amplificación realice 35 ciclos en lugar de 30.

TABLA 27.- Condiciones de las diferentes polimerasas usadas en la amplificación de los 7 genes “housekeeping”.

Componentes	“Immolase DNA Polymerase” (Bioline) ^a	“BioTaq DNA Polymerase” (Bioline) ^a	“KAPA Taq HotStart DNA Polymerase” (KAPABIOSYSTEMS) ^b
Cebador <i>directo</i> 1 (25µM)	1 µl	1 µl	0,5 µl
Cebador <i>reverso</i> 1 (25µM)	1 µl	1 µl	0,5 µl
Tampón de reacción	5 µl (Immobuffer 10X)	5 µl (NH ₄ buffer 10X)	5 µl (KAPA Taq HotStart buffer 5X)
MgCl ₂	1,5 µl (50mM)	1,5 µl (50mM)	1,5 µl (25mM)
dNTP's mix (10mM)	1 µl	1 µl	0,5 µl
Polimerasa (5U/µl)	0,3 µl	0,3 µl	0,5 µl
DNA	10 µl	10 µl	5 µl
Agua miliQ estéril	Hasta 50 µl	Hasta 50 µl	Hasta 25 µl

^aCuando empleamos esta polimerasa, la reacción se prepara para un volumen total de 50 µl.

^bCuando empleamos esta polimerasa, la reacción se prepara para un volumen final de 25 µl.

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

9.- Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo en el estudio de identificación de especie, en la discriminación de diferentes variantes de genes de resistencia a antibióticos, en la detección de mutaciones del gen *oprD*, en la caracterización de los integrones, promotores y transposones, en el estudio de MLST y en todos aquellos casos en los que no se dispusiese de una cepa control positiva.

En los casos en que al visualizar el producto de PCR en un gel de agarosa se detectó más de una banda, se cortó el fragmento de gel del tamaño esperado y se purificó la muestra de DNA mediante el kit “QIAquick GEL Extraction” (Qiagen).

Tras el proceso de purificación, se comprobó en un nuevo gel de agarosa que se había obtenido una sola banda apta para la posterior secuenciación.

9.1.- Reacción de secuenciación

Como cebadores de secuenciación se emplearon los mismos que se han utilizado en las diferentes PCRs y algunos específicos diseñados para secuenciar completamente el fragmento de DNA amplificado. La secuenciación se realizó de manera automática en un sistema ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) por la empresa de secuenciación Beckman Coulter Genomics (Reino Unido) y por el servicio de secuenciación del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) con el secuenciador ABI 3130 XL (Applied Biosystems).

9.2.- Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas y comprobadas con sus respectivos cromatogramas, se analizaron con ayuda de diversas herramientas informáticas a través de diferentes páginas web:

- Tratamiento de las secuencias: Extended Nucleic Acid Sequence Massager (<http://www.cmbn.no/tonjum/seqMassager-saf.htm>)
- Determinación de secuencias consenso: The European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)
- Comparación con la base de datos GenBank: Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Obtención de variantes de genes asociados a MBL, BLEE o carbapenemasas de clase A: Lahey Clinic beta-lactamase classification and amino acid sequences (<http://www.lahey.org/Studies/>)
- Análisis de secuencia tipo: *Pseudomonas aeruginosa* MLST database (<http://www.pubmlst.org/paeruginosa/>)
- Estudio de secuencias de inserción: ISFinder (<https://www-is.biotoul.fr/>)

En aquellos casos en los que se detectaron mutaciones, se procedió al análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas para comprobar si se trataba de mutaciones silentes o realmente daban lugar a cambios aminoacídicos.

Para el análisis de las secuencias del gen *oprD* se realizó una comparación directa con la cepa control *P. aeruginosa* PAO1 (número de acceso en GenBank: AE004091).

10.- Localización cromosómica y/o plasmídica del gen *bla*_{VIM-2}

Para determinar la localización bien cromosómica bien plasmídica del gen *bla*_{VIM-2} se seleccionaron 13 cepas del HCULB de Zaragoza portadoras de dicho gen y con fenotipo de multirresistencia (las mismas en las que se estudiaron los transposones, **apartado 6.6**). El protocolo utilizado fue “ECL direct nucleic acid labelling and detection systems” (Amersham, GE Healthcare) brevemente modificado y se llevó a cabo durante la estancia en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación del HUSE de Palma de Mallorca.

Para la realización de este estudio se añadieron como controles dos cepas del HUSE de Palma de Mallorca: PPV2-2 (*P. putida* con localización plasmídica del gen *bla*_{VIM-2}) y PAV2-1 (*P. aeruginosa* con localización cromosómica del gen *bla*_{VIM-2}).

10.1.- Digestión enzimática

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de los insertos siguiendo el protocolo normalizado de trabajo implementado en el HUSE y que se detalla a continuación:

A partir de un cultivo líquido (5 ml de BHI caldo, o/n a 37°C y agitación 180 rpm), se colocaron 250 µl en un eppendorf y se centrifugaron durante 2 min a 10000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet fue resuspendido con 500 µl de la solución PIV (10 mM Tris-HCl pH=7,6, 1M NaCl) y se repitió la centrifugación. El pellet se disolvió en 200 µl de la solución PIV. Por otro lado, se preparó agarosa (Certified Low Melt Agarose, BioRad) al 1,6% y se dejó atemperar en un baño de agua a 42°C. A continuación, se mezclaron 200 µl de agarosa con 200 µl de suspensión bacteriana preparados y se distribuyeron en los moldes correspondientes, dejándolos posteriormente solidificar en la nevera al menos durante 15 min. Transcurrido este tiempo, los insertos fueron depositados en sus correspondientes tubos y se les añadió 1 ml de la solución de lisis EC (6 mM Tris-

HCl pH=7,6, 1M NaCl, 100 mM EDTA pH=7,6, 0,5% Brij58, 0,2% desoxicolato, 1% sarcosil, 20 µg/ml RNasa, 100 µg/ml lisozima) dejándolos incubar a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se sustituyó la solución de lisis EC por 1 ml de la solución ESP (50 µg/ml proteinasa K, 1% sarcosil en EDTA pH=9-9,5) y se dejaron incubando toda la noche a 50°C en un baño de agua. Pasado este período, se procedió a los lavados de los insertos. Para ello, se eliminó la solución ESP y se añadieron 5 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH=7,6, 1 mM EDTA pH=7,6) dejando los tubos a temperatura ambiente durante 30 min. Esta operación se repitió 4 veces más y después se guardaron los insertos en TE en la nevera para los siguientes usos.

En paralelo, se realizaron dos restricciones del DNA con dos enzimas diferentes: nucleasa S1 (180U/µl, Takara Bio Inc.) e *I-Ceu-I* (5U/µl, New England BioLabs Inc.). La primera de ellas linealiza los plásmidos, permitiendo ver en un gel de electroforesis tanto el tamaño como la cantidad de ellos, y degrada el cromosoma. Por otro lado, la enzima *I-Ceu-I* corta el cromosoma de *P. aeruginosa* en pocos fragmentos (2-3) dejando intactos los posibles plásmidos, que probablemente no se distingan en el gel ya que migrarán junto con alguna de las grandes bandas del cromosoma digerido por la enzima.

Primeramente, se cortó un fragmento de aproximadamente 1 mm de espesor del inserto correspondiente, se colocó dentro de un eppendorf y se le añadió 1 ml de agua destilada; se incubaron a 37°C durante 10 min. A continuación, se sustituyó el agua por 200 µl de la mezcla de restricción correspondiente y se incubó a la temperatura adecuada durante 16-20h. En la **Tabla 28** mostramos la composición de cada mezcla de restricción para las dos enzimas utilizadas y la temperatura de incubación idónea para cada una de ellas.

TABLA 28.- Composición de las mezclas de restricción y temperatura de incubación para las enzimas nucleasa S1 e *I-Ceu-I*.

Componentes	Nucleasa S1 (18U totales)	<i>I-Ceu-I</i> (20U totales)
Enzima correspondiente	1 μ l ^a	4 μ l
Buffer de reacción ^b	20 μ l	20 μ l
BSA 100X	—	2 μ l
H ₂ O	179 μ l	174 μ l
Temperatura de incubación	37°C	37°C

^aComo la enzima nucleasa S1 viene muy concentrada, primero hacemos una dilución 1:10 de la misma en agua destilada.

^bEl buffer de reacción para la enzima nucleasa S1 está compuesto por: 10 mM acetato sódico pH=4,6, 150 mM NaCl, 50 μ M ZnSO₄, 50% glicerol; y el buffer de reacción para la enzima *I-Ceu-I* es NEBuffer4 y está compuesto por: 50 mM acetato potásico, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato magnésico, 1 mM ditioneitol pH=7,9.

Tras la digestión, se eliminó la mezcla de restricción y se puso 1 ml de TE y, en el caso de los tubos digeridos con S1, se añadió también 20 μ l de EDTA 0,5M para estar seguros de la completa inactivación de la nucleasa. Se incubaron a 37°C durante 1h. Se preparó el gel de agarosa (Certified Megabase Agarose, BioRad) al 1% en TBE 0,5X y, una vez solidificado, se procedió a la introducción y sellado de los insertos. Se colocó en ambos extremos un marcador de tamaño (λ DNA/HindIII Fragment 0,5 μ g/ μ l, Invitrogen). Seguidamente se realizó una electroforesis en campo pulsado con las siguientes condiciones: una única rampa lineal pulsada de 5 a 40s con un gradiente de voltaje de 6V/cm a 14°C durante 20h en una cubeta CHEF-DR III (BioRad) con 2 l de TBE 0,5X preparado a partir de TBE 10X comercial (BioRad).

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la tinción del gel con una solución acuosa de bromuro de etidio (20 μ l/400 ml), posterior desteñido (dos veces de 15 min con 400 ml de agua) y visualización con un captador de imágenes.

10.2.- Preparación del Southern Blot

Se realizó entonces el gel para la transferencia a membrana, para ello se llevó a cabo la siguiente serie de lavados, todos ellos de 15 min a temperatura ambiente y con agitación:

- Solución de depurinación (250 mM HCl). Repetir dos veces.
- Solución de desnaturalización (1,5M NaCl, 0,5M NaOH, preparar en el momento). Repetir dos veces.
- Solución de neutralización (1,5M NaCl, 1M Tris-base, tamponar a pH=8,0). Repetir dos veces.

Se preparó el montaje de transferencia a dos membranas de nylon simultáneamente mediante la siguiente disposición: se colocó una bandeja limpia y seca como fondo de montaje; se pusieron encima 6-8 servilletas de papel secas y, sobre éstas, 4 capas secas y 2 humedecidas en solución SSC 20X (3M NaCl, 0,3M citrato sódico a pH=7,0) de papel de cromatografía especial (Chromatography paper 3MM CHR Whatman, Schleider and Schuell) que sirve de conductor para que se produzca la transferencia del DNA del gel a la membrana; después se puso la membrana de nylon (Positively Charged Nylon Transfer membrane, Amersham, GE Healthcare) empapada en SSC 2X teniendo en cuenta que debe tener un tamaño algo superior a la superficie del gel y que hay que marcar la cara en contacto con él porque es la que tendrá posteriormente el DNA. Se colocó el gel tratado evitando cualquier burbuja y delimitándolo con parafilm para prevenir posibles contaminaciones en la transferencia. A continuación, se repitió el proceso a la inversa para obtener la segunda membrana y en la cumbre del montaje se colocó peso para que la transferencia fuera efectiva (**Figura 28**). Se dejó toda la noche a temperatura ambiente.

Tras desmontar el montaje del Southern, la membrana se colocó con el DNA hacia arriba sobre una superficie limpia y encima pero sin tocar se puso una lámpara de luz ultravioleta que se mantuvo encendida durante 2 min. Después se dejó la membrana sobre papel de filtro.

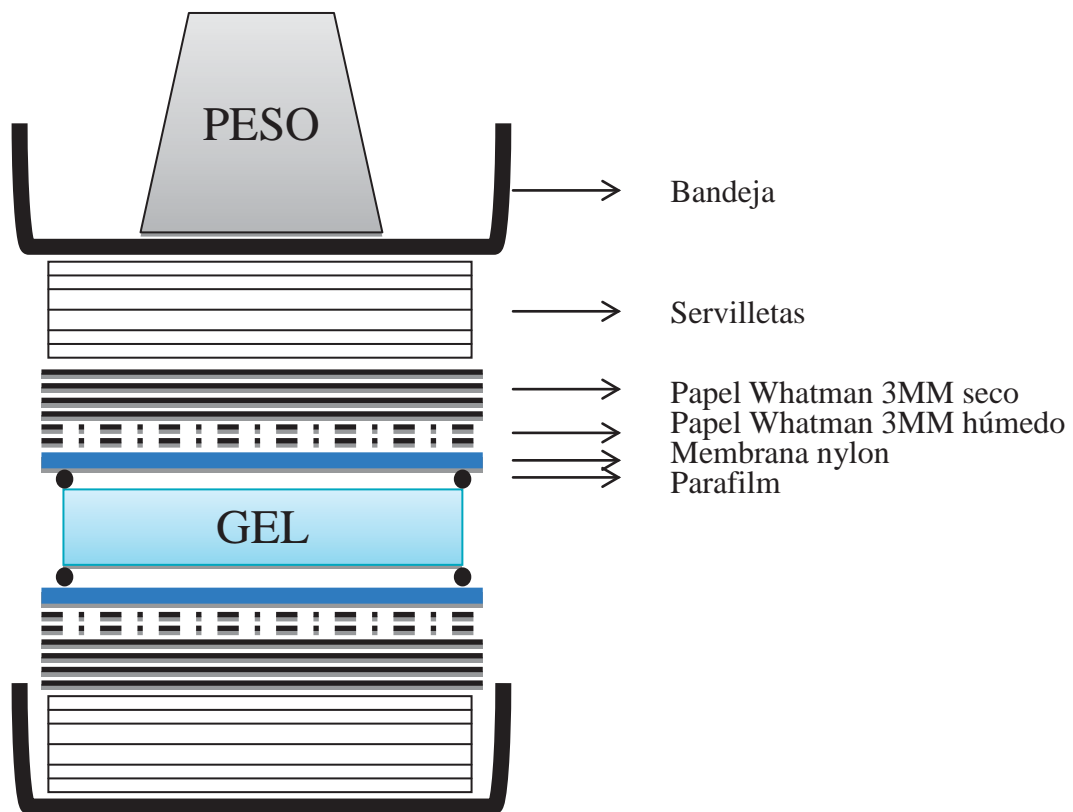


Figura 28.- Montaje de transferencia por el método Southern Blot.

10.3.- Hibridación con sondas específicas

En primer lugar, se prepararon las sondas que íbamos a emplear en la hibridación. En nuestro caso eran dos: la sonda para el gen *bla_{VIM-2}* y la del 16S rDNA. Para ello, realizamos una PCR convencional en un termociclador “Arktik Thermal Cycler” (Thermo Scientific) con las condiciones y los cebadores que aparecen en las **Tablas 29 y 30**.

Tras obtener el amplicón deseado, los productos fueron purificados con un kit comercial “QIAquick PCR purification” (QiaGen) cuyos pasos consistían en: añadir 5 volúmenes de buffer PB por cada volumen de producto de PCR y mezclar; colocar todo el volumen en una columna del kit y centrifugar a 13000 rpm durante 1 min; para lavar, añadir 750 µl de buffer PE y centrifugar durante 1 min a 13000 rpm; repetir la centrifugación 1 min extra para asegurarnos de quitar el exceso de buffer PE que hubiera podido quedar retenido en la columna; por último, eluir con

30 µl de agua destilada centrifugando, en esta ocasión, durante 2 min a 13000 rpm y guardar en la nevera para posteriores usos.

TABLA 29.- Reactivos utilizados en la técnica de PCR.

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebador <i>directo</i> (Sigma)	100 µM	0,5 µl	1 µM
Cebador <i>reverso</i> (Sigma)	100 µM	0,5 µl	1 µM
Tampón de reacción “Gold buffer” (Roche)	10X	5 µl	1X
Dimetilsulfóxido (Sigma)	—	5 µl	—
MgCl ₂ (Roche)	25 mM	3 µl	1,5 mM
dNTP’s mix (Bioline)	10 mM	1 µl	0,2 mM
AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Roche)	5 U/µl	0,5 µl	1,5 U
DNA	—	1 µl	—
Agua miliQ estéril	—	Hasta 50 µl	—

TABLA 30.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para las sondas específicas de hibridación y sus condiciones de amplificación.

Cebadores y tamaño del amplicón (secuencia 5' → 3')	Condiciones de amplificación	Referencia
<i>Vim-2</i>: 801 pb F: ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG R: CTACTCAACGACTGAGCG	94°C 12min 1 ciclo 94°C 30 s 56°C 30 s 35 ciclos 72°C 30 s 72°C 10min 1 ciclo	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007
<i>16S rDNA</i>: 371 pb F: AACTGGAGGAAGGTGGGGAT R: AGGAGGTGATCCAACCGCA	94°C 12min 1 ciclo 94°C 30 s 60°C 30 s 35 ciclos 72°C 30 s 72°C 10min 1 ciclo	Greisen <i>et al.</i> , 1994

Se procedió con la etapa de prehibridación: se colocó la membrana sobre una malla de nylon y se hidrataron ambas con SSC 2X; se pusieron dentro del tubo de hibridación con 40 ml de la mezcla de hibridación compuesta por 1,2 g NaCl y 2 g Blocking reagent (Amersham, GE Healthcare) en Gold hybridization buffer

(Amersham, GE Healthcare); y, por último, se metieron en el horno, precalentado a 42°C, durante 2h.

Por otro lado, se marcó la sonda con peroxidasa justo antes de hibridar. Se colocaron 15 µl del producto de PCR purificado con el kit comercial “QIAquick PCR purification” (QiaGen) en un eppendorf y se añadieron 32 µl de agua destilada y 3 µl de DNA control que venía en el kit de hibridación (Amersham, GE Healthcare). Se hirvió la mezcla durante 5 min y, seguidamente, se enfrió en hielo durante 5 min más. Se dio un pulso con la centrífuga, se añadieron sin agitar y en este orden, 40 µl de Labelling reagent (Amersham, GE Healthcare) + 40 µl de glutaraldehído (Amersham, GE Healthcare) y se incubaron a 37°C durante 10 min. Pasado este tiempo, se añadió todo el volumen de marcaje a la mezcla de hibridación sin que tocara la membrana y se dejó en el horno a 42°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se realizaron los lavados de la membrana hibridada antes de revelar. Se retiró la mezcla del tubo de hibridación y se sustituyó por la solución “Primary wash buffer” (360 g urea (Sigma) + 25 ml SSC 20X + 4 g SDS (Sigma) en 1 l de agua). Se lavó la membrana a 42°C durante 20 min dentro del horno de hibridación. Se repitió el proceso una vez más. A continuación, se colocó la membrana en una bandeja limpia y se hicieron dos lavados de 10 min a temperatura ambiente y con agitación con la solución “Secondary wash buffer” (SSC 2X).

Se procedió entonces al revelado. Se eliminó la solución anterior y se echó sobre la membrana la mezcla de detección compuesta por 10 ml del reactivo 1 + 10 ml del reactivo 2 del kit de hibridación (Amersham, GE Healthcare). Se dejó a temperatura ambiente y con agitación durante 2 min. Se introdujo la membrana dentro de un casete de revelado y la llevamos a una habitación con completa oscuridad. Se expuso durante 5 min una radiografía dentro del casete y se reveló, empleando tanto el revelador como el fijador de la marca Kodak y siguiendo las instrucciones del fabricante.

11.- Estudio de la estabilidad del gen *bla*_{VIM-2} y de las alteraciones adquiridas en *OprD* en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem

Se realizó un estudio sobre la estabilidad de la resistencia a imipenem en ausencia de presión antibiótica. Para ello, se seleccionaron 4 cepas del HCULB de Zaragoza (Ps12, Ps33, Ps56 y W336) y se hicieron, a partir de un cultivo puro, pases consecutivos en placas de BHI agar sin antibiótico durante 100 días seguidos. Las placas se incubaban a 37°C durante 24h. Todos los días se realizó un antibiograma con una distribución de antibióticos específica, como muestra la figura siguiente:

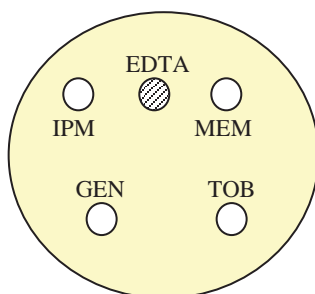


Figura 29.- Distribución de los antibióticos en el antibiograma diario del estudio de estabilidad.

Además, cada 5 pases se hacía una extracción del DNA total y se preparaban tanto la PCR múltiple de MBL como la PCR de *oprD* (utilizando los cebadores *OprD*_{long}), siguiendo las condiciones explicadas anteriormente en el **apartado 6**. Una vez llegados al pase 50, se realizó un antibiograma completo de cada cepa (empleando los 15 antibióticos descritos en el **apartado 4.1**) y se envió a secuenciar el producto de amplificación del gen *oprD*. De esta manera, se comprobaba si las mutaciones encontradas inicialmente se mantenían o, por el contrario, se revertían o cambiaban. Cuando llegamos al pase 100, se realizó nuevamente el antibiograma completo, se envió a secuenciar el gen *oprD* y, además, se comprobó por PCR la estructura de los integrones presentes en la mayoría de estas cepas.

Resultados

RESULTADOS

1.- Prevalencia y caracterización de *Pseudomonas* spp. en muestras no clínicas

1.1- Muestras fecales de individuos sanos

Se recogieron 98 muestras fecales de voluntarios sanos cuyo rango de edad oscilaba entre los 9 días y los 86 años. En la **Tabla S1** (ver Anexo I) se observan los datos proporcionados por los participantes en el momento del muestreo: edad, sexo, contacto con animales, presencia de alergias y/o enfermedades crónicas, medicamentos tomados de manera continuada y hábitos alimentarios (vegetariano o no).

De las 98 muestras fecales analizadas, únicamente en 8 se obtuvieron aislados de la especie *P. aeruginosa*. De estos 8 voluntarios, sólo dos tenían animales de compañía (una tortuga y un gato) y ninguno presentaba enfermedades crónicas de relevancia o una alimentación especial. Se debe destacar que de los 8 individuos portadores de esta bacteria (**Tabla 31**), había dos parejas de muestras pertenecientes a personas emparentadas que convivían en el mismo hogar:

- un hijo (individuo 33) y su padre (individuo 34)
- un hombre (individuo 96) y su esposa (individuo 97)

En dos de los 8 individuos con aislamiento positivo de *P. aeruginosa* en la primera toma, se volvió a aislar este microorganismo en una nueva recogida de muestra fecal realizada 7 meses después. Por tanto, se dispuso de una colección de 10 cepas de *P. aeruginosa* obtenida de 8 individuos sanos en dos períodos diferentes y que fue caracterizada posteriormente (**Tabla 31**).

Los 10 aislados obtenidos fueron sensibles a todos los antibióticos testados y los valores de CMI para los antibióticos carbapenémicos pueden verse en la **Tabla 31**.

Mediante PFGE se detectaron 6 perfiles diferentes de bandas (**Figura 30**). Las cepas pertenecientes a miembros de la misma familia (Ps5-Ps6 y Ps87-Ps88) presentaron el mismo perfil de bandas (**Tabla 31**). Sin embargo, cuando hablamos de dos aislados del mismo individuo en distinto período de tiempo, esta relación no se mantiene en todos los casos: las cepas Ps88-1 y Ps88-2 sí mantienen el mismo

perfil de bandas de PFGE; mientras que los de las cepas Ps4-1 y Ps4-2 son totalmente diferentes (**Figura 30** y **Tabla 31**).

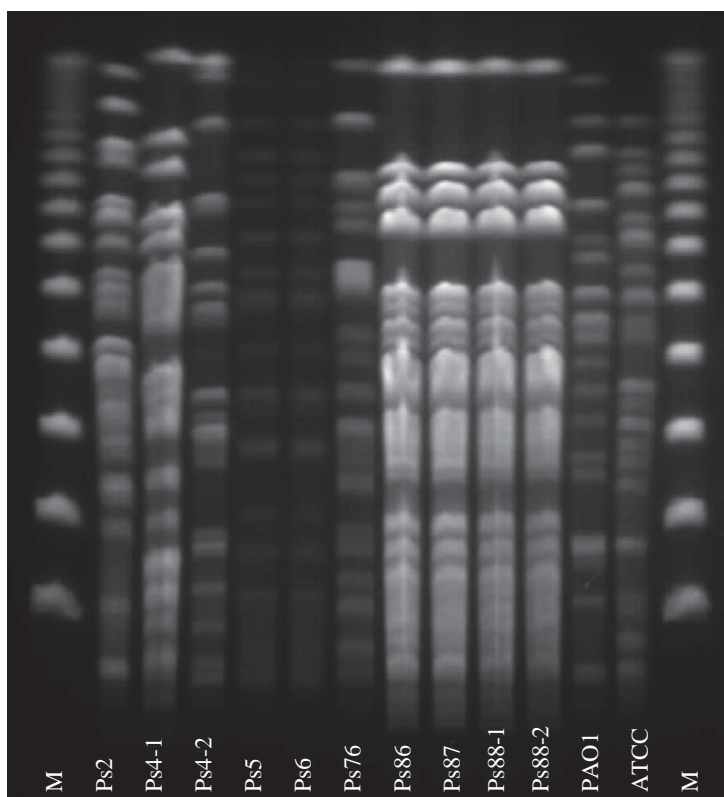


Figura 30.- Foto de PFGE con los 10 aislados de voluntarios sanos junto a las dos cepas control (PAO1 y ATCC27853). [M = marcador de tamaño Lambda Ladder PFG]

Mediante MLST se obtuvieron las siguientes 6 secuencias tipo (nº de cepas): ST245 (1), ST253 (4), ST254 (1), ST274 (1), ST663 (1) y ST1059 (2) (**Tabla 31**). Cabe destacar que ST1059 se trataba de una nueva combinación alélica, compuesta por los siguientes alelos: *acsA17*, *aroE5*, *guaA37*, *mutL62*, *nuoD1*, *ppsA7* y *trpE25*, descrita por primera vez en este estudio y que fue depositada en la página web de MLST de *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Además, esta secuencia tipo fue compartida por las cepas obtenidas en la pareja compuesta por padre e hijo que vivían en la misma casa. De igual modo, el matrimonio portador de *P. aeruginosa* también compartía ST; pero, en este caso, se trataba de ST253, perteneciente al complejo clonal PA14. Esta secuencia tipo fue encontrada además en otras 2 cepas de dos voluntarios que

no tenían contacto ni parentesco alguno entre ellos ni con el matrimonio mencionado.

TABLA 31.- Características principales de los individuos sanos portadores de *P. aeruginosa* y valores de CMI para los antibióticos carbapenémicos en los 10 aislados de muestras fecales de individuos sanos.

Individuo	Sexo	Edad (años)	Aislado	PFGE	MLST	CMI (µg/ml)		
						IPM	MEM	DOR
18	Mujer	25	Ps2	P1	ST254	1	0,25	0,125
27	Hombre	58	Ps4-1	P2	ST274	4	2	0,38
			Ps4-2 ^c	P3	ST663	4	0,5	0,19
33 ^a	Hombre	3	Ps5	P4	ST1059	2	0,125	0,094
34 ^a	Hombre	33	Ps6	P4	ST1059	4	0,25	0,094
46	Mujer	3	Ps76	P5	ST245	4	1	0,75
95	Hombre	26	Ps86	P6	ST253	1	0,5	0,5
96 ^b	Hombre	66	Ps87	P6	ST253	1	0,5	0,5
97 ^b	Mujer	50	Ps88-1	P6	ST253	2	1	0,38
			Ps88-2 ^c	P6	ST253	1	1	0,5

^aIndividuos que vivían en la misma casa (padre e hijo).

^bIndividuos que convivían en el mismo hogar (matrimonio).

^cAislados obtenidos en el muestreo realizado 7 meses después de la primera toma de muestra fecal.

Por otro lado, se analizó la presencia de integrones en estas 10 cepas obteniendo un resultado negativo para todas ellas. Respecto a las posibles alteraciones genéticas de la porina OprD podemos destacar que detectamos 4 patrones diferentes (**Tabla 32**) pero que en ninguno de ellos se observó un codon de finalización prematuro o inserciones/delecciones que alteraran la secuencia de lectura de la proteína. En todos los casos se trataba de sustituciones puntuales que no correspondían con la pérdida de función de la proteína y que no estaban implicadas en la resistencia a carbapenémicos.

TABLA 32.- Alteraciones encontradas en la porina OprD de las 10 cepas de *P. aeruginosa* analizadas.

Patrón OprD	Cepas asociadas al patrón	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Alteraciones ^a
A	Ps2, Ps4-1, Ps4-2	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto
B	Ps5, Ps6	441	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, L7-corto, S403A, Q424E
C	Ps76	443	T103S, K115T, F170L
D	Ps86, Ps87, Ps88-1, Ps88-2	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A

^aL7-corto: 372-VDSSSSYAGL-383

1.2.- Muestras fecales de caballos sanos

Al igual que hemos estudiado la microbiota intestinal de individuos sanos, se llevó a cabo un estudio similar en muestras fecales de animales sanos. Para ello se analizaron 73 muestras de caballos sacrificados en el matadero de Logroño, pero no se identificaron aislados del género *Pseudomonas* spp. en ninguna de las muestras.

1.3.- Muestras de alimentos

Respecto a otras muestras no clínicas y pensando en los posibles reservorios de resistencia a antibióticos, se decidió estudiar la prevalencia del género *Pseudomonas* spp. en alimentos tanto de origen animal como vegetal.

Por un lado, se recogieron 62 muestras de alimentos cárnicos en distintas carnicerías/pollerías, tiendas de barrio y supermercados de La Rioja como se muestra en la **Figura 31**.

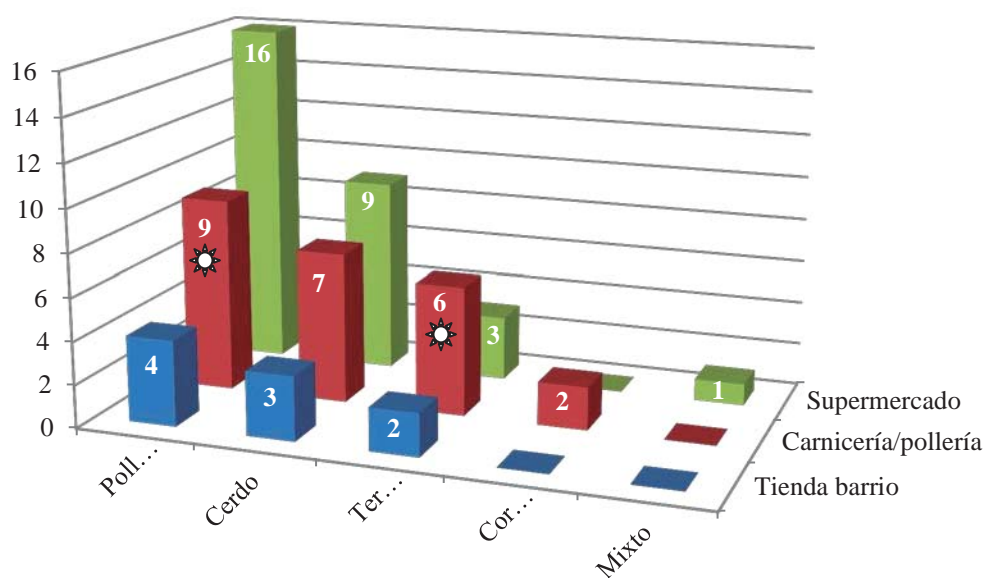


Figura 31.- Distribución de las muestras de origen cárnico analizadas por lugar de compra y tipo de carne. [☼ en estas muestras se encontró *Pseudomonas* spp.]

Solamente en dos de las 62 muestras de carne analizadas (3,2%) se detectó *Pseudomonas*. En este sentido, se aisló *P. aeruginosa* en una muestra de pavo comprada en una pollería, y *P. putida* en una muestra de ternera comprada en una carnicería (Tabla 33).

En paralelo, se comenzó un estudio similar en alimentos de origen vegetal de plantas solanáceas (tomates y pimientos). Se tomaron un total de 59 muestras recogidas en diferentes supermercados, fruterías y huertas particulares de La Rioja como se ven en la Figura 32.

En este caso, se identificaron *Pseudomonas* spp. en 13 muestras (22%, 7 pimientos y 6 tomates) de las que se aislaron 18 *Pseudomonas* que pertenecían a 8 especies diferentes (nº de aislados): *P. aeruginosa* (4), *P. putida* (4), *P. nitroreducens* (4), *P. fulva* (2), *P. mendocina* (1), *P. mosselii* (1), *P. montelii* (1) y *Pseudomonas* sp. (1).

De esta manera dispusimos de una colección de 20 aislados de *Pseudomonas* de origen alimentario (animal y vegetal) y se procedió al estudio de sensibilidad antibiótica, tipificación molecular e identificación genotípica.

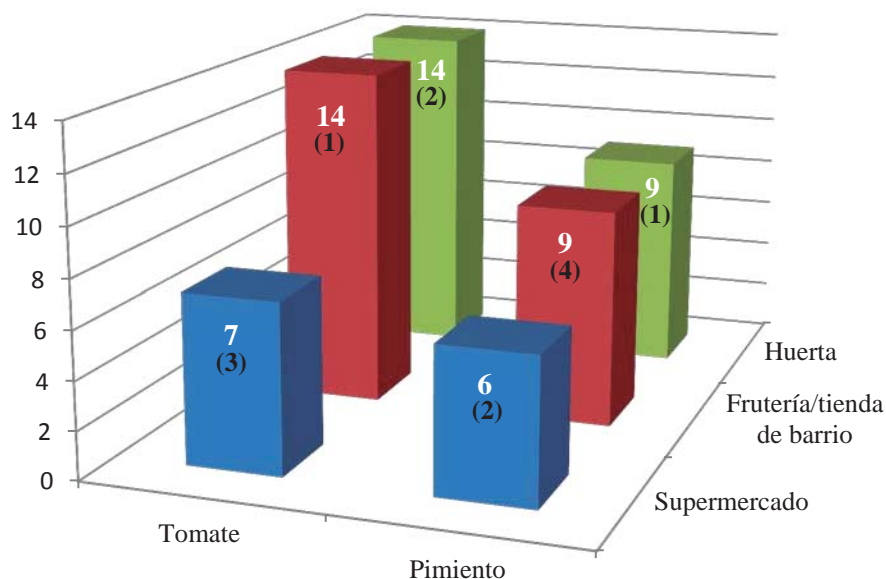


Figura 32.- Distribución de las muestras de origen vegetal analizadas por tipo de fruto y por lugar de recogida/compra. [Entre paréntesis aparece el número de muestras que dieron positivo para *Pseudomonas spp.*]

Se determinaron los valores de resistencia a 15 antibióticos anti-pseudomónicos en las 20 cepas alimentarias, observándose que el 85% de ellas mostraron resistencia a ticarcilina; mientras que los porcentajes de resistencia a otros antibióticos fueron menores: aztreonam (30%), cefepime (10%), IPM (10%), MEM (5%) y DOR (5%). Para el resto de antibióticos analizados, todas las cepas fueron sensibles. Una única cepa (Ps149, *P. aeruginosa* de origen cárnico) fue sensible a los 15 antibióticos testados. Es importante remarcar que ninguna de ellas presentó los fenotipos BLEE, MBL o carbapenemasas de clase A. En la **Tabla 33** se muestran los valores de CMI para los 3 antibióticos carbapenémicos analizados; observándose en ella que los dos únicos aislados resistentes a imipenem provenían de una misma muestra de pimiento.

TABLA 33.- Características principales de las 20 cepas aisladas de alimentos y valores de CMI para los antibióticos carbapenémicos.

Cepa	Origen	Lugar recogida	Especie	CMI ($\mu\text{g/ml}$) ^a		
				IPM	MEM	DOR
Ps149	Pavo	Pollería 1	<i>P. aeruginosa</i>	4	0,5	0,125
Ps153	Tomate	Tienda de barrio 1	<i>P. aeruginosa</i>	4	1	0,125
Ps158	Pimiento	Tienda de barrio 2	<i>P. aeruginosa</i>	8	4	0,75
Ps159			<i>P. aeruginosa</i>	> 32	4	0,38
Ps160	Pimiento	Tienda de barrio 3	<i>P. aeruginosa</i>	4	2	0,25
Ps161			<i>P. nitroreducens</i>	0,25	1	0,064
Ps166	Tomate	Supermercado 1	<i>P. nitroreducens</i>	0,25	0,5	0,094
Ps167			<i>P. nitroreducens</i>	0,25	1	0,19
Ps169	Pimiento	Supermercado 2	<i>P. nitroreducens</i>	1	0,06	0,125
Ps168			<i>P. monteilii</i>	0,25	0,25	0,094
Ps150	Ternera	Carnicería 1	<i>P. putida</i>	1	2	0,38
Ps152	Tomate	Huerta 1	<i>P. putida</i>	1	4	0,25
Ps154	Tomate	Supermercado 3	<i>P. putida</i>	0,5	2	0,25
Ps155	Tomate	Supermercado 4	<i>P. putida</i>	1	2	0,25
Ps164	Pimiento	Huerta 2	<i>P. putida</i>	1	2	0,38
Ps165			<i>Pseudomonas sp.</i>	2	8	0,38
Ps156	Pimiento	Frutería 1 ^b	<i>P. fulva</i>	4	2	0,25
Ps157	Pimiento	Frutería 1 ^b	<i>P. fulva</i>	2	2	0,25
Ps151	Pimiento	Supermercado 5	<i>P. mendocina</i>	2	0,25	0,125
Ps162	Tomate	Huerta 3	<i>P. mosselii</i>	2	4	0,75

^aSe han marcado en negrita los valores de CMI que corresponden con valores de resistencia.

^bAunque fueron compradas en la misma frutería y el mismo día, pertenecían a muestras diferentes.

Se observó una gran diversidad clonal determinada por PFGE entre los aislados, mostrando una similitud inferior al 75% en todos los casos; detectándose de este modo, 20 perfiles de bandas diferentes (**Figura 33**).

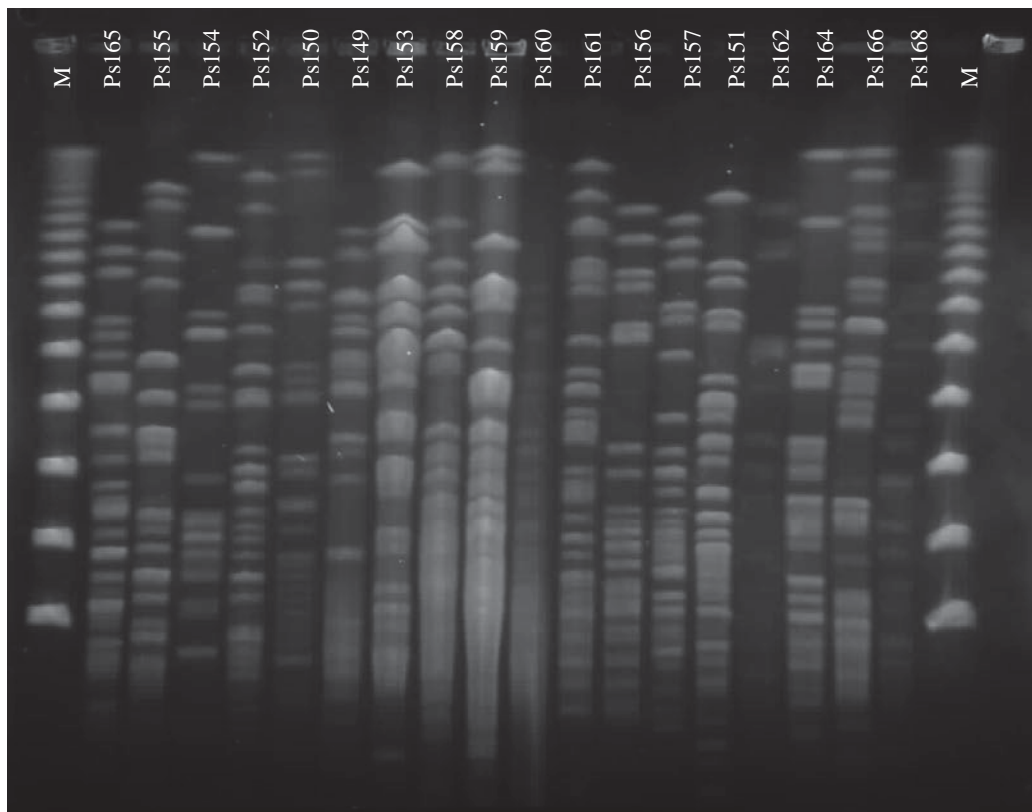


Figura 33.- Foto de PFGE con 18 aislados de origen alimentario obtenidos. [M = marcador de tamaño Lambda Ladder PFG]

Tras el estudio de integrones en las 20 cepas aisladas, únicamente la cepa de *P. aeruginosa* Ps158 (que, además, era resistente a IPM) amplificó el gen codificante de las integrasa de tipo 1 careciendo, a su vez, del segmento 3' conservado. Todas las PCRs con combinaciones de distintos cebadores resultaron negativas para determinar los casetes génicos que albergaba este integrón defectivo con un promotor débil (PcW) y P2 inactivo.

La técnica de MLST está descrita para la especie *P. aeruginosa* que, además, porta la porina OprD; por lo que exclusivamente se analizó la secuencia tipo y las alteraciones en OprD de las 5 cepas de *P. aeruginosa* encontradas en alimentos. Se detectaron 5 ST diferentes: ST17, ST270, ST800, ST1455 y ST1456. Las dos últimas combinaciones alélicas fueron nuevas y se depositaron en la página web de MLST de *P. aeruginosa* correspondiendo con los siguientes alelos:

- ST1455 → *acsA15, aroE5, guaA11, mutL3, nuoD58, ppsA42, trpE9*
- ST1456 → *acsA11, aroE13, guaA109, mutL5, nuoD1, ppsA1, trpE47*

Se encontraron alteraciones en la porina OprD en las 5 cepas (**Tabla 34**) pero hay que destacar que una de ellas (Ps159) tenía este gen truncado por una nueva secuencia de inserción ISPa47, asociada con la familia IS630, que fue depositada en la base de datos de secuencias de inserción “ISFinder” (<http://www-is.biotoul.fr/>). Además, la secuencia completa del gen *oprD* truncado con ISPa47 fue introducida en la base de genes GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) con el número de acceso KC502912 (**Figuras 34 y 35**).

TABLA 34.- Alteraciones encontradas en la porina OprD de las 5 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de alimentos.

Patrón OprD	Cepas asociadas al patrón	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Alteraciones ^a
A	Ps153, Ps158, Ps160	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto
B	Ps149	441	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, L7-corto, S403A, Q424E
E	Ps159	—	ISPa47 en nucleótido 144 (KC502912)

^aL7-corto: 372-VDSSSSYAGL-383

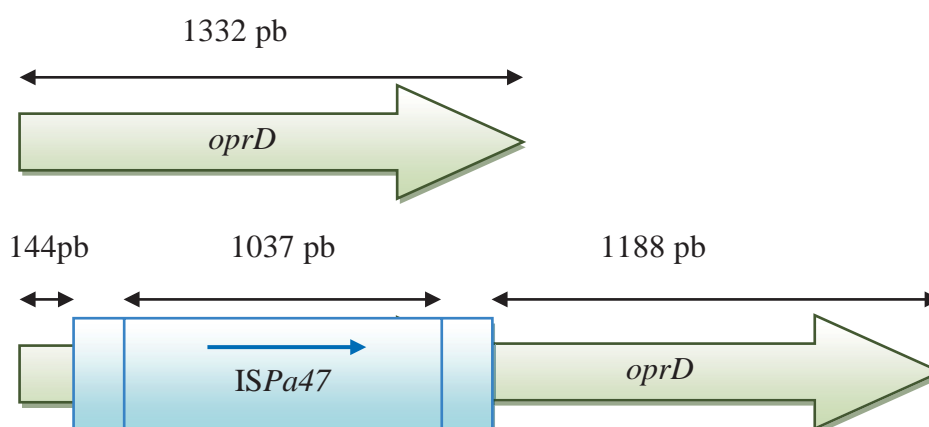


Figura 34.- Comparación entre el gen *oprD* completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank: AE004091) con el gen *oprD* truncado por la nueva secuencia de inserción ISPa47 de la cepa Ps159 (GenBank: KC502912).

ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCATTGCACTGGCGGTTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTCGCCGTGGC
 CGACGCATTCGTACGCATCAGGCCGAAGCGAAGGGTTTCATCGAAGACAGCAGCCTCGACCTGCTGC
 TCCGCAAC **TATTAACCTGGCAAATAAATA**GGGCATATTAGATAATCTGTCTCCATGAAAATAGATGCC
CGTAAACTCAGCCCCAAGAACAACGTGAAAAGCGTCCACGGCCCTACGCATGCGTGAGCAGGGTTA
CACCTATAAGGCTATTGGCGAAGCGTTGGTGTTCACCCCGCACTATTGCTCACTGGGCGCAGGTCG
CAGAACATAAAGGCGAAAAGGCTGCCATTGCCGGCGGCCAGCGTGGTGTGCGCCAGGGTGATCGCCGC
AGTTTGAGCTCCAGCCAGGAAGTGCTGATTCCGCACCTTGATGACCGATAAGATGCCCGACCAACTCAA
GCTCGGCTTTGCGCTCTGGACCGTGATGCGGTGCGGAACTGATCCGCCAGCGCTGTGGTTTTCTCA
TGCCGGTTCGAACGGTTGGTGAATACCTCAAGCGTTGGGGCTACACCCCGCAGCGCCACTGCATCGG
GCTTATCAGCAGAAACCTGAAGTGGTTCAGCACTGGCTGGATAATGAATATCCACGCATCGCACAGCG
GGCCAGGGCTGAGAATGGTGAGATTAGTGGGGCGACGAAACCGGTATGCGCAGTGACAGCCATGCTG
GCCGCAGCTACGCCCTATTGGCGAAACGCCGGTGCGCCTGGTCAGCGGCAGTCGTTTTTCCACCAAC
ATGATTTCCACCGTGACCAATCGGGGCAAACCTGCGCTTCATGCTGTATCGGGAACCGCTGACAGCC
AGTCTGATTCCGTTCTCCTGAGTCGCTGATTTCGCGATGCTCAGGGCCGCAAGGTGTTTTGATTCTCG
ACAACCTGCGCGTACACCACAGCAAAAAGGTGAGCGCCTGGGTTGGCGACC GCAAAGAGCAAATCGAA
CTGTTCTTCTTGCCGGCTACGCCCGGAGTTGAACCTGACGAGTATTTGAATTGTGATTTGAAACA
TCAGGTTTCGCACGGGCTTGCCGGCGGTAATCAGGACGAACTGGAAAGGCGTGTTCGCTCGGTCATGA
GACGATTGCAATTACGCCCTCAAAGAATCCGTTCTTATTTCCGGCATCCACGTATCGCCTACGCAGCA
TGATTTGGTG **TATTTGATTGCCGGTTAATA**CTATTTCAACCGTGACGGCAAGAGCGGCAGCGGGAC
 CGCGTCGACTGGACCCAAGGCTTCCTCACCCTATGAATCCGGCTTCACCCAAGGCACTGTGGGCTT
 CGGCGTCGATGCCTTCGGCTACCTCGGCCTGAAGCTCGACGGTACCTCTGACAAGAGCGGCACCGGCA
 ACCTGCCAGTAATGAACGACGGAACGCCCGTGACGACTACAGCCGCGCCGGTGGCGCCGTGAAGGTA
 CGCATCTCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAGATGCAGCCGACCCTCCGGTCTTCGCCGCTGGGGG
 CAGCCGCTGTTCCCCAGACCGCGACCGGCTTCCAGCTGCAGAGCAGCGAACTCGAAGGGCTCGACC
 TCGAGGCAGGCCACTTCACCGAGGGCAAGGAGCCGACCACCGTCAAATCGCGTGGCGAACTCTATGCC
 ACCTACGCAGGCGAGACCGCCAAGAGCGCCGATTTCAATGGGGGCGCTACGCAATCACCGATAACCT
 CAGCGCCTCCCTGTACGGCGCCGAACTCGAAGACATCTATCGCCAGTATTACCTGAACAGCAACTACA
 CCATCCCCTGGCATCCGACCAATCGCTGGGCTTCGATTTCAACATCTACCGCACAAACGATGAAGGC
 AAGGCCAAGGCCGGCGACATCAGCAACACCACTTGGTCCCTGGCGGCAGCCTACACTCTGGATGCGCA
 CACTTTACCTTGGCCTACCAGAAGGTCCATGGCGATCAGCCGTTTGATTATATCGGCTTCGGCCGCA
 ACGGCTCTGGCGCAGGTGGGCACTCGATTTTCTCGCCAACTCTGTCCAGTACTCCGACTTCAACGGC
 CCTGGCGGAAAATCCTGGCAGGCTCGCTACGACCTGAACCTAGCCTCCTATGGCGTTCGCCGCTGAC
 TTTCAATGGTCCGCTATATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACCAAGATGTCTGACAACAACGTCGGCT
 ATAAGAACTACGGCTACGGCGAGGACGGCAAGCACCAAGGACCAACCTCGAAGCCAAGTACGTGGTTC
 CAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTCGTTCCGCATCCGCCAGGCTGGCACCGTGGCAACGCCGACCA
 GGGCGAAGGCGACCAAGGAGTTCCGCCTGATCGTTCGACTATCCGCTGTGATCCTGTAA

Figura 35.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción IS*Pa47* de la cepa Ps159 (número de acceso en GenBank: **KC502912**). [En blanco, secuencia de *oprD*; en gris, nueva secuencia de inserción IS*Pa47*; en verde, las regiones repetidas; en letra amarilla, “target site duplication”; y, en **negrita**, la transposasa].

1.4- Comparativa entre las cepas de *Pseudomonas* aisladas de muestras no clínicas

Al comparar la prevalencia de aislados del género *Pseudomonas* provenientes de las muestras de individuos sanos y alimentos, destaca la diferencia existente entre el porcentaje y la diversidad de especies presentes entre los individuos sanos, donde únicamente encontramos la especie *P. aeruginosa* en un 8,2% de las muestras, frente

a las muestras de alimentos vegetales, donde además de obtener mayor presencia de *Pseudomonas* (22%) se observó una mayor diversidad de especies detectando hasta 8 diferentes (el 22% de los aislados eran *P. aeruginosa*).

Cuando se estudió la relación clonal entre los 30 aislados de *Pseudomonas* no clínicas, en la mayoría de los casos, se obtuvieron patrones de bandas de PFGE diferentes, con similitudes por debajo del 75% (**Figura 36**). Y al analizar la tipificación molecular de las 15 cepas de *P. aeruginosa* por MLST, se encontraron 11 ST diferentes. Debemos destacar que ninguna de las secuencias tipo halladas en las cepas de individuos sanos fue localizada en las de alimentos. Por otro lado, las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de los voluntarios sanos que presentaban el mismo perfil de bandas en PFGE también tuvieron la misma secuencia tipo (**Figura 36**).

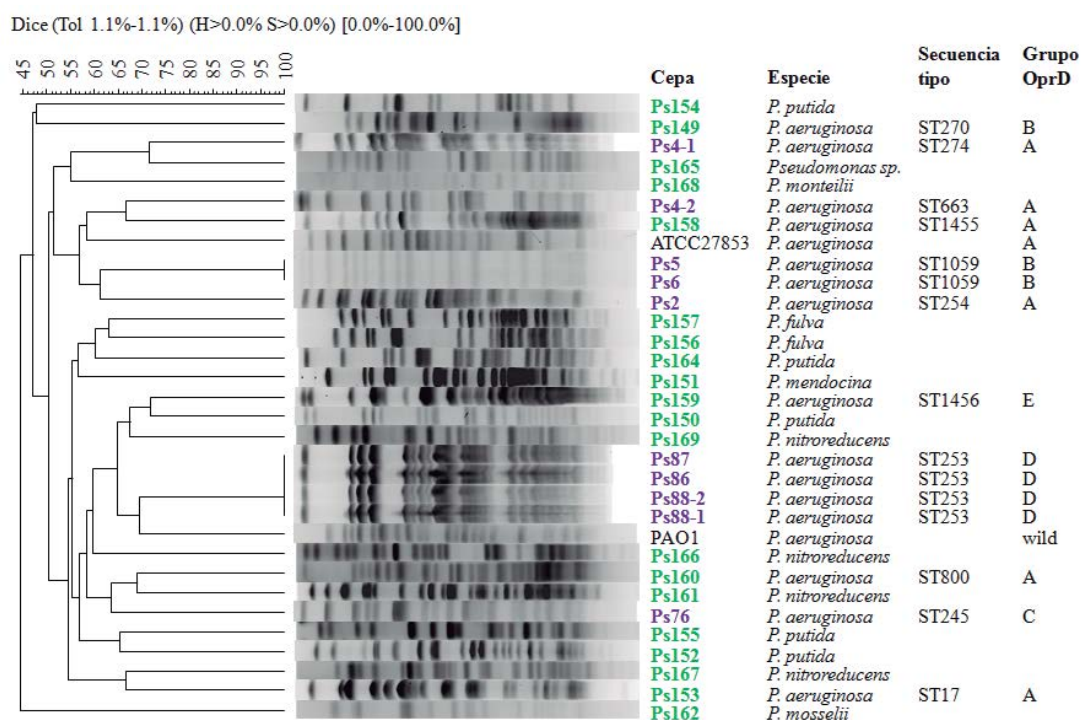


Figura 36.- Dendrograma de los 30 aislados de *Pseudomonas* de muestras no clínicas obtenidas. Se han incluido también dos de las cepas control utilizadas en diferentes experimentos (*P. aeruginosa* PAO1 y ATCC27853). [En color **verde** = cepas de alimentos, en color **morado** = cepas de individuos sanos, en color negro = cepas control]

Es importante remarcar, de igual modo, la diferencia de sensibilidad frente a los antibióticos estudiados. Mientras que las cepas aisladas de individuos sanos eran totalmente sensibles a los 15 anti-pseudomónicos analizados, en el caso de los vegetales se encontraron cepas resistentes a antibióticos relativamente nuevos y que actualmente son una de las pocas alternativas eficaces contra *P. aeruginosa* en clínica, como son los carbapenémicos.

Otro aspecto relevante es la ausencia de integrones tanto en cepas de origen humano como de origen alimentario, a excepción de una de ellas (Ps158) aislada de un pimiento.

Las alteraciones en OprD son un mecanismo de resistencia a carbapenémicos, como ya hemos comentado. En las 15 cepas de *P. aeruginosa* de muestras no clínicas analizadas se observó una gran cantidad de alteraciones en la porina OprD y, en este caso, sí eran compartidas por las cepas aisladas de los diferentes orígenes. De hecho, las 15 cepas han sido clasificadas en 5 grupos, siendo los grupos A y B los compartidos entre las cepas aisladas de individuos sanos y las de alimentos y los que más cantidad de mutaciones presentaban, aunque no mostraban resistencia a ningún carbapenémico. En la cepa de *P. aeruginosa* Ps159 (aislada del mismo pimiento en el que encontramos la otra cepa (Ps158) resistente a imipenem y portadora de un integrón de clase 1) se asocia su resistencia a imipenem con la interrupción de la porina OprD por una nueva secuencia de inserción (ISPa47).

Para finalizar este apartado y con el fin de tener una visión más clara de las características de todas las cepas no clínicas analizadas se presenta a continuación una tabla resumen (**Tabla 35**):

TABLA 35.- Características principales de las 30 cepas de *Pseudomonas* spp. no clínicas analizadas.

Cepa	Origen	Especie	Fenotipo ^a	PFGE	ST	Integrón	Patrón OprD ^b
Ps2	Sano 18	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P1	ST254	No	A
Ps4-1 ^c	Sano 27	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P2	ST274	No	A
Ps4-2 ^c	Sano 27	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P3	ST663	No	A
Ps5 ^d	Sano 33	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P4	ST1059 ^f	No	B
Ps6 ^d	Sano 34	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P4	ST1059 ^f	No	B
Ps76	Sano 46	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P5	ST245	No	C
Ps86	Sano 95	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P6	ST253	No	D
Ps87 ^c	Sano 96	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P6	ST253	No	D
Ps88-1 ^{c,e}	Sano 97	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P6	ST253	No	D
Ps88-2 ^{c,e}	Sano 97	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P6	ST253	No	D
Ps149	Pavo	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	P7	ST270	No	B
Ps153	Tomate 1	<i>P. aeruginosa</i>	TIC	P8	ST17	No	A
Ps158	Pimiento 1	<i>P. aeruginosa</i>	TIC,FEP, IPM,DOR	P9	ST1455 ^f	Sí	A
Ps159	Pimiento 1	<i>P. aeruginosa</i>	IPM	P10	ST1456 ^f	No	E
Ps160	Pimiento 2	<i>P. aeruginosa</i>	TIC	P11	ST800	No	A
Ps150	Ternera	<i>P. putida</i>	TIC,ATM	P12	—	No	—
Ps152	Tomate 2	<i>P. putida</i>	TIC	P13	—	No	—
Ps154	Tomate 3	<i>P. putida</i>	TIC	P14	—	No	—
Ps155	Tomate 4	<i>P. putida</i>	TIC	P15	—	No	—
Ps164	Pimiento 3	<i>P. putida</i>	TIC	P16	—	No	—
Ps161	Pimiento 2	<i>P. nitroreducens</i>	TIC,ATM	P17	—	No	—
Ps166	Tomate 5	<i>P. nitroreducens</i>	TIC,ATM	P18	—	No	—
Ps167	Tomate 5	<i>P. nitroreducens</i>	TIC,ATM	P19	—	No	—
Ps169	Pimiento 4	<i>P. nitroreducens</i>	TIC,ATM	P20	—	No	—
Ps156	Pimiento 5	<i>P. fulva</i>	TIC	P21	—	No	—
Ps157	Pimiento 6	<i>P. fulva</i>	TIC	P22	—	No	—
Ps151	Pimiento 7	<i>P. mendocina</i>	ATM	P23	—	No	—
Ps162	Tomate 6	<i>P. mosselii</i>	TIC,FEP	P24	—	No	—
Ps168	Pimiento 4	<i>P. monteilii</i>	TIC	P25	—	No	—
Ps165	Pimiento 3	<i>Pseudomonas</i> sp.	TIC,MEM	P26	—	No	—

^aFenotipo sensible significa que eran sensibles a todos los antibióticos testados; TIC: ticarcilina; ATM: aztreonam; FEP: cefepime; IPM: imipenem; MEM: meropenem; DOR: doripenem.

^bClasificación acorde a **Tablas 32 y 34**.

^cCepas aisladas del mismo individuo sano pero en diferente toma de muestra.

^dCepas de individuos que vivían en la misma casa (padre e hijo).

^eCepas de individuos que convivían en el mismo hogar (matrimonio).

^fCombinaciones alélicas nuevas descritas por primera vez en este trabajo.

2.- Caracterización de mecanismos de resistencia y tipificación molecular de cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos

Se analizaron un total de 214 cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (Carb-R) procedentes de dos hospitales españoles de diferentes comunidades autónomas (La Rioja y Aragón).

2.1.- Hospital San Pedro (HSP) de Logroño

Durante el período septiembre 2008 a diciembre 2011 se obtuvieron en el HSP de Logroño 91 aislados clínicos de *P. aeruginosa* con resistencia o sensibilidad reducida al menos a uno de los antibióticos carbapenémicos.

Se realizó un primer cribado por PFGE y antibiograma seleccionando 61 cepas pertenecientes a 60 pacientes, según el criterio “una cepa por paciente y con perfil de bandas PFGE diferente, a menos que dos cepas de un mismo paciente con el mismo perfil de PFGE tuvieran distinto fenotipo de resistencia”, las cuales fueron posteriormente caracterizadas e incluidas en esta tesis. En la **Figura S1** (ver Anexo I), se muestra el dendograma obtenido con los perfiles de bandas de PFGE de las 61 cepas incluidas en este trabajo; y que tras analizar, se clasifican en un total de 35 patrones de bandas diferentes. En la **Tabla S2** (ver Anexo I), se indican las principales características de los pacientes (sexo, edad y tratamiento) de los que se aislaron las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R seleccionadas.

De los 60 pacientes de los que se seleccionaron las 61 cepas, tan sólo 14 eran mujeres frente a 46 hombres y en un rango de edad entre 16 y 99 años (destacando un único paciente por debajo de los 30 años de edad).

En las siguientes figuras se pueden observar los diferentes orígenes de las muestras seleccionadas y los servicios de los cuales procedían:

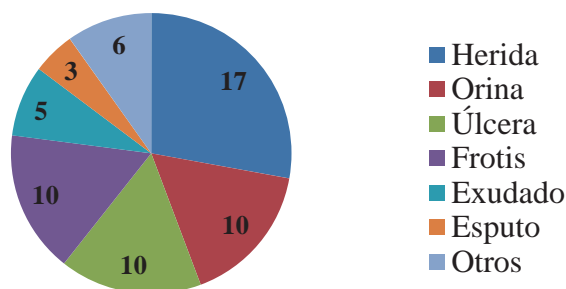


Figura 37.- Distribución de las 61 cepas por origen de muestra.

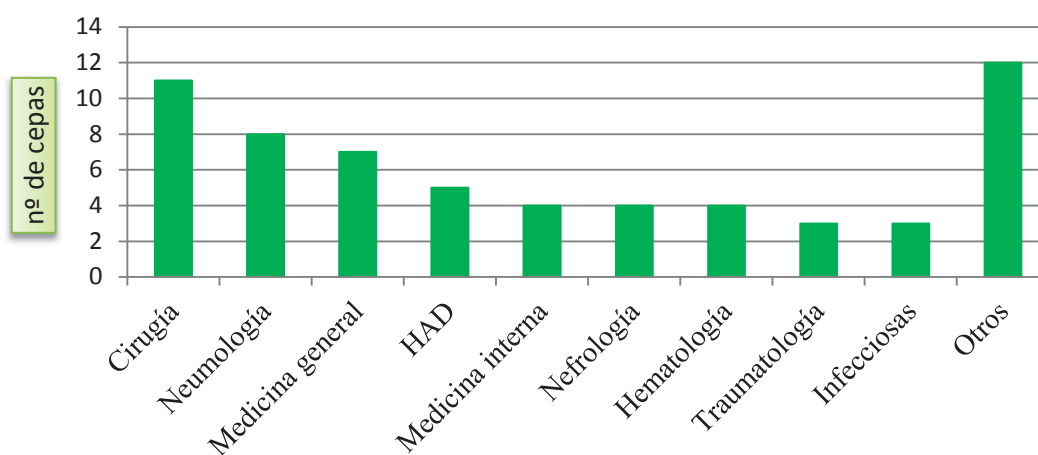


Figura 38- Distribución de las 61 cepas por servicio del hospital. [Abreviatura: HAD: hospitalización a domicilio]

2.1.1.- Estudio de sensibilidad a antibióticos en las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R

Ninguna de las cepas presentó el fenotipo BLEE, MBL o carbapenemasa de clase A, pero sí se observó una alta resistencia a diferentes familias de antibióticos. En la **Figura 39**, se muestran los porcentajes de resistencia y sensibilidad de nuestras cepas a los antibióticos testados.

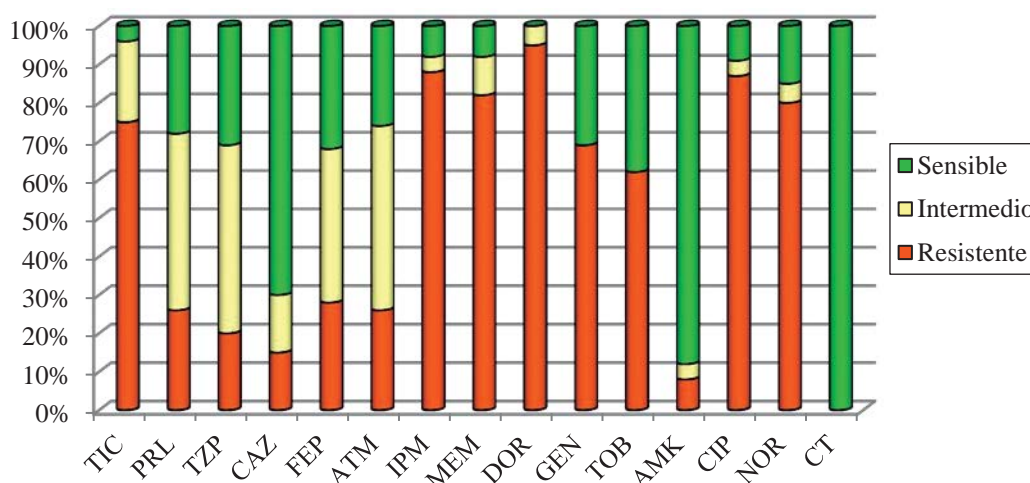


Figura 39.- Porcentajes de resistencia y sensibilidad de las 61 cepas del HSP frente a los 15 antibióticos testados. [Abreviaturas: TIC: ticarcilina; PRL: piperacilina; TZP: piperacilina-tazobactam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; IPM: imipenem; MEM: meropenem; DOR: doripenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMK: amikacina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; CT: colistina].

Se observa una clara asociación entre la resistencia a los carbapenémicos (nuestro criterio de selección) con los aminoglucósidos (gentamicina y tobramicina) y las fluoroquinolonas (ciprofloxacina y norfloxacina). Las 61 cepas mostraban un fenotipo de multiresistencia; entendiendo bacteria multiresistente como aquella que no presenta sensibilidad a uno o más antibióticos dentro de 3 o más categorías antimicrobianas específicas en *P. aeruginosa* (Magiorakos *et al.*, 2012).

2.1.2.- Detección y caracterización de integrones en las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R

El 67% (41/61) de las cepas estudiadas fueron positivas para la amplificación del gen codificante de la integrasa de tipo 1 (*intI1*) mientras que todas ellas fueron negativas para las integrasas de tipo 2 y 3. Todas las cepas *intI1*-positivas incluían el segmento 3' conservado y genes codificantes de enzimas modificantes de aminoglucósidos en las regiones variables de los integrones de clase 1.

El casete génico más prevalente entre nuestras cepas fue *aadB-2*, presente en 35 cepas. Este casete génico coincide totalmente con el descrito en la base de datos GenBank con el número de acceso AJ871915. La proteína AadB-2 presenta los siguientes 4 cambios aminoacídicos respecto a la proteína AadB (n° acceso GenBank: AAA92745): K11Q, I60M, M69T y V142M (**Figura 40**).

```

AadB      MDTTQVTLIHKILAAADERNLPLWIGGGWAIDARLGRVTRKHDDIDLTFPGERRGELEAI 60
AadB-2    MDTTQVTLIHQILAAADERNLPLWIGGGWAIDARLGRVTRKHDDIDLTFPGERRGELEAM 60
          *****:*****:
AadB      VEMLGGRVMEELDYGFLAEIGDELLDCEPAWWADEAYEIAEAPQGSCPEAAEGVIAGRPV 120
AadB-2    VEMLGGRVTEELDYGFLAEIGDELLDCEPAWWADEAYEIAEAPQGSCPEAAEGVIAGRPV 120
          ***** *****
AadB      RCNSWEAI IWDYFYYADEVPPVDWPTKHIESYRLACTSLGAEKVEVLRAAFRSRYAA 177
AadB-2    RCNSWEAI IWDYFYYADEVPPMDWPTKHIESYRLACTSLGAEKVEVLRAAFRSRYAA 177
          *****:*****:

```

Figura 40.- Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas AadB y AadB-2.

Se encontraron, además, los siguientes casetes génicos (n° de cepas): *aac(6')*-Ib-3 (2), *aac(6')*-Ib'-3 (2) y la combinación *aac(3)*-Ia+*aadA-1h* (2) (**Tabla 36**). Las proteínas *Aac(6')*-Ib-3 y *Aac(6')*-Ib'-3 se diferencian en una sustitución en la posición 102 (L102S); mientras que ambas presentan el cambio aminoacídico N5T respecto de la proteína *Aac(6')*-Ib (n° acceso GenBank: AAD22142). Por último, la

combinación *aac(3)-Ia+aadA-1h* fue descrita por primera vez en nuestro grupo y depositada en la base de datos GenBank con el número de acceso: GQ144317. Ninguna de estas cepas presentó dos o más integrones simultáneamente.

También se estudiaron los promotores asociados a estos integrones. En ningún caso se encontró un P2 activo o que alguno de ellos estuviera regulado por un promotor fuerte (PcS). El integrón más prevalente (*aadB-2*) estaba regulado por un promotor híbrido tipo 1 (PcH1) mientras que el integrón compuesto por dos casetes génicos en su región variable presentaba un promotor híbrido pero de tipo 2 (PcH2). Por último, los integrones compuestos por *aac(6')-Ib-3* estaban regulados por un promotor débil (PcW) mientras que los compuestos por *aac(6')-Ib'-3* lo estaban por PcH1.

2.1.2.1.- Tipificación molecular de las cepas de *P. aeruginosa* portadoras de integrones

Se analizó la secuencia tipo en todas las cepas portadoras de integrón. Entre las 41 cepas se detectaron 4 secuencias tipo diferentes: ST175, ST235, ST308 y ST639 (Tabla 36).

TABLA 36.- Tipo de integrón de clase 1 detectado en las 41 cepas de *P. aeruginosa* del HSP *intI1*-positivas y su tipificación molecular.

Integrón de clase 1		Cepas	Secuencia tipo
Combinaciones génicas	Promotor		
<i>intI1+aadB-2+qacEΔ1/sulI</i>	PcH1	(35 cepas) ^a	ST175
<i>intI1+aac(6')-Ib-3+qacEΔ1/sulI</i>	PcW	W25, W163	ST308
<i>intI1+aac(6')-Ib'-3+qacEΔ1/sulI</i>	PcH1	Ps103	
<i>intI1+aac(3)-Ia+aadA-1h+qacEΔ1/sulI</i>	PcH2	W30, W406	ST235
<i>intI1+aac(6')-Ib'-3+qacEΔ1/sulI</i>	PcH1	Ps94	ST639

^aCepas correspondientes a ST175: W26, W53, W56, W59, Ps74, W96, W104, W105, W110, W121, W129, W166, W188, W251, W391, W638, W439, W400, W430, W487, W518, W524, W528, W633, W632, W639, W654, W655, Ps72, Ps73, Ps93, Ps102, Ps104, Ps105, Ps107.

2.1.3.- Alteraciones en la porina OprD en las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R

Como fenotípicamente no se encontraron evidencias de posibles enzimas MBL, ni genes de este tipo en las regiones variables de los integrones, se decidió estudiar las posibles alteraciones en la porina OprD que justificaran su resistencia a los antibióticos carbapenémicos. En las 61 cepas seleccionadas se detectaron una gran variedad de cambios aminoacídicos así como la presencia de inserciones, deleciones y codones de finalización prematuros que sugerían la pérdida de función de dicha proteína. En la **Tabla 37** se pueden observar las principales alteraciones de la porina OprD encontradas en nuestras cepas.

Cabe destacar que prácticamente el 50 % de las cepas analizadas presentaban el codon de finalización prematuro en el aminoácido 142 mientras que el tamaño de la proteína de referencia es de 443 aminoácidos. Además, debemos reseñar las diferentes inserciones/deleciones, tanto en tamaño como en posición, que se han detectado; destacando las cepas Ps92 y W64 que presentaban la porina OprD interrumpida por secuencias de inserción completas (*ISPa1328* e *ISPsp4*, respectivamente), con tamaños superiores a 1000 pb y que, por tanto, afectarían a la funcionalidad de esta proteína (**Figura 41**). Aunque, en este caso, las secuencias de inserción ya estaban descritas en la bibliografía (*ISPa1328* pertenece a la familia de *IS256* e *ISPsp4* pertenece a la familia de *IS30*), era la primera vez que se observaban truncando así la proteína OprD. Por ello, las secuencias completas de OprD de las cepas Ps92 y W64 truncadas con sendas IS fueron introducidas en la base de genes GenBank cuyos números de acceso son KF517097 y KF517098, respectivamente (**Figuras 42 y 43**). Por esta razón, correlacionamos el polimorfismo de la proteína OprD con los niveles de resistencia a los carbapenémicos; aunque hay que tener claro que la resistencia a los carbapenémicos no puede explicarse aisladamente ya que suele venir dada por una combinación de mecanismos de resistencia cromosómicos: expresión reducida de la porina OprD, sobreexpresión de bombas de expulsión activa e hiperproducción de la beta-lactamasa cromosómica AmpC.

TABLA 37.- Alteraciones de la porina OprD encontradas en las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP analizadas.

Patrón OprD	Cepas asociadas al patrón	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Alteraciones ^a
A	W391, W516, Ps77, Ps106	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto
F	(31 cepas) ^b	142	D43N, S57E, S59R, Q142stop
G	W500	236	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, Q236stop
H	W105	259	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, Y259stop
I	W407	305	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, Y305stop
J	W32	415	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto, W417stop
K	Ps98	195	D43N, S57E, S59R, inserción 7 pb (nt 538)
L	W639	345	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, inserción 2 pb (nt 847)
M	Ps107	431	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, delección 1 pb (nt 1094)
N	W120	> 443	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto, inserción 1 pb (nt 1205)
O	W501	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto, K398L, V401D
P	Ps70, Ps75	227	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, delección 4 pb (nt 638)
Q	Ps94	405	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, delección 108 pb (nt 1000), L7-corto, S403A, Q424E

Resultados

Patrón OprD	Cepas asociadas al patrón	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Alteraciones ^a
R	W54	431	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, L7-corto, S403A, delección 1 pb (nt 1212)
S	W35	432	E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, delección 27 pb (nt 895), Q301E, R310G, G312R, A315G, L347M, L7-corto, Q424E
T	W154	339	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, W339stop
U	Ps92	—	T103S, K115T, <i>ISPa1328</i> en nucleótido 463 (GenBank no. KF517097)
V	W25, W163	364	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, inserción 59 pb (nt 905)
W	W28	> 443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, inserción 1 pb (nt 1206)
X	W64	—	<i>ISPsp4</i> en nucleótido 8 (GenBank no. KF517098)
Y	W30, W406	49	delección 11 pb (nt 55)
Z	Ps103	73	inserción 1 pb (nt 194)
a	W135, W483	218	inserción 1 pb (nt 635)
b	W443	344	delección 1 pb (nt 909)

^aAbreviaturas: pb = pares de bases; nt = nucleótido; L7-corto = 372-VDSSSSYAGL-383.

^bCepas correspondientes a patrón F: W26, W53, W56, W59, Ps74, W96, W104, W110, W121, W129, W166, W188, W251, W638, W439, W400, W430, W487, W518, W524, W528, W633, W632, W654, W655, Ps72, Ps73, Ps93, Ps102, Ps104, Ps105.

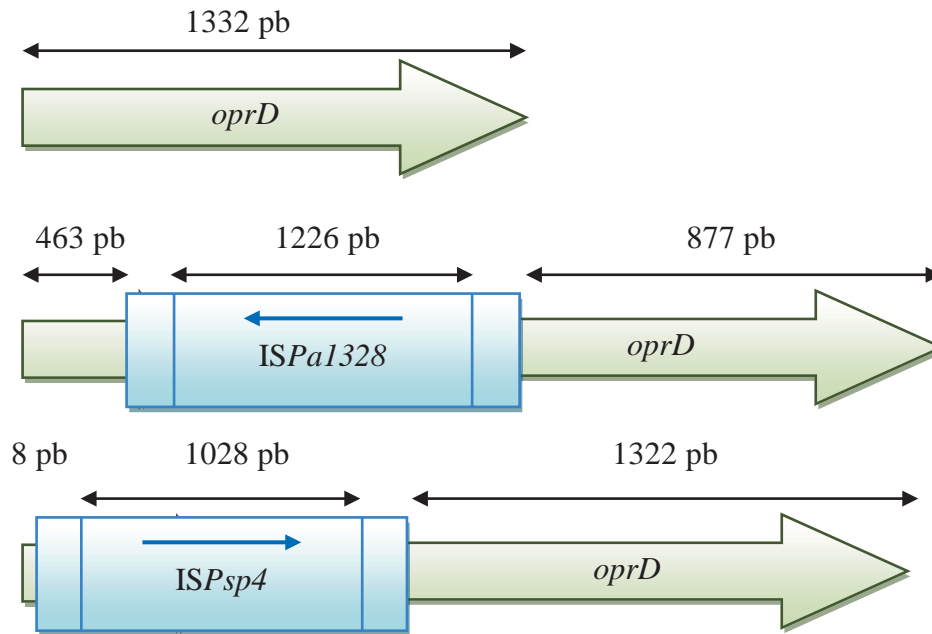


Figura 41.- Comparación entre el gen *oprD* completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank: AE004091) con los genes *oprD* truncados por la presencia de las secuencias de inserción ISPa1328 e ISPsp4 en las cepas Ps92 (GenBank: KF517097) y W64 (GenBank: KF517098), respectivamente.

Resultados

ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCATTGCACTGGCGGTTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTCGCCGTGGC
CGACGCATTTCGTACGCATCAGGCCGAAGCGAAGGGTTTCATCGAAGACAGCAGCCTCGACCTGCTGC
TCCGCAACTACTATTTCAACCGTGACGGCAAGAGCGGCAGCGGGACC CGCTCGACTGGACCCAAGGC
TTCTCACCACCTATGAATCCGGCTTCACCCAAGGCACCGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTCGGCTA
CCTCGGTCTGAAGCTCGACGGCACCTCGGACAAGAGCGGTACCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACG
GCACGCCCCGTGACGACTACAGCCCGCGCGGTGGCGCCGTGAAGGTACGCATCTCCAAGACCATGTTG
AAGTGGGGCGAGATGCAGCCGACCGCTCCGGTCTTCGCCGCCGGCGG **CAGCCGC**CGAGGGTGTGCAGA
ATTTTGTGTAACCGGGTTAGGGTTACTGCTGCGGCAGGCGGTCTTCGTAGCTGATCGTAAAGCGAGT
CAGCGCCGCTTCAGTACGGATCGGCATCGTCCATTTCTTGCTGATGTTGCGTAGCGCCAGGTAGA
AGAGTTTCAGCAGCGCCTCGTCACTGGGGAACGAGCCGCGGTTCTTGGTAATCTTGCGCAGGCTCATG
TTACCGATTTCGATGGCGTTGGTGGTGTAGATCACCTTTCGGATCTCCGGCGGGAAGTCAAGAACGG
CGTGATCCTGGCCAGTTGCGTCGCCAGGACTGGCCAATCGGCAGGTAGTCGTCATCCCATTGGCCCT
CGAATTCACCGAGGCGCAGTTTCGGCTTCGTAGCGGTGCTGGACTGGTAAATCCGCTTCAGTTCGGCG
GCGACCTCCGCCCGCGCTTCAGGACACGTAGTTTCAGGCTGTGCCTGACCATGTGCATGCACAG
CTGCACGCTGGTGC CGGGAACACCGCTTCGATGGCTTCGGGGAAGCCCTTCAAGCCATCCACGCAGG
CGACGAAGATGTCTGAACGCCACGGTTGCGCAGTTCGGTCAACACCTGCAACCAGAACTTGCGCCCC
TCGTTCTGGGCGATCCACAGGCCGAGGATTTCTTCTCGCCGGCCAGGTTGATACCCAGCGCCAGATA
GACCGCCTTCACCCGCACGGCGCCCTCGCGCACCTTGCTGTGGATGCAGTCGAGGTAGACGATGGGAT
ACACCGTATCGAGCGGGCGGACTGCCAGGCCTTGACCTCATCGGCCACCGCGTCCGGTACCGAGGAG
ATCAGGCTGGGTGACACCTCGGCACCGTACATTTCTGCAAGTGCGCCTGGATCTCGCGCACCGTCAT
GCCGCGGCATACAGCGAAAGGATCTTGTCTGTCGAAGCCCGTCCAGCGGGTCTGGTGCCTTCGATGA
TCTGCGGATCGAAGGTGCCATGCCGTCGCGCGGTACCTCGATGGGCAGTTCACCGAACTCGCCCTTG
AGTTTCTTCTTGCTGAAACCGTTGCGGGTGTGCCCATCCAATTGCTGACAGGCTGATGCTTGTGTG
GCCCAGGTGGTGGGTGAGCTCGGCATCCAGCGCACGCTCGACCAACTTCTTGGTCACTTGTGAGGA
TGCCGTCGGTACCGATCAAGTCTTCAGGCTTCTGATAAATTGGCCAGAAGCTGATCCAGCAGTTCGTCG
GTAATGGTGTGGGGCGTCTTGTTTCATGGTGTCTCCAGTTCCTCAGCGACAGTGTGCTCATGAGCCGGT
TACACAAAATTTTCGGACACCCCTC **CAGCCGCCTGTTCCCGCAGACC GCGACCGGCTTCCAAC**TCAGAG
CAGCGAACTCGAAGGGCTCGATCTCGAAGCGGGCCACTTCACCGAAGGCAAGCAGGGCACCACCACCA
AGTCGCGCGGCGAACTCTACGCAACCTATGCAGGCGAGACCGCCAAGAGCGCCGATTTTCATTGGGGGC
CGCTACGCAATCACCGATAACCTCAGCGCTCCCTGTACGGTGTCTGAACTCGAAGACATCTATCGTCA
GTATTACCTGAACAGCAACTACCCATCCACTGGCATCCGACCAATCGCTGGGCTTCGATTTCAACA
TCTACCGCACAAACGATGAAGGCAAGGCCAAGGCCGGCGACATCAGCAACACCACCTTGGTCCCTGGCG
GCAGCCTACACTCTGGATGCGCACACTTTCACCTTGGCTACCAGAAGGTCCATGGCGATCAGCCGTT
TGATTATATCGGCTTCGGCGGAGAACGGTTCGGCGCGCGGCGGTGACTCGATTTTCTCGCCAACCTCCG
TGAGTACTCCGACTTCAACGGCCCCGGCGAGAAATCCTGGCAGGCCCGCTACGACCTGAACCTCGCC
TCCTATGGCGTTCCCGCCTGACTTTCATGGTCCGCTATATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACCAA
GATGTCTGACAACAACGTCGGCTATAAGAACTACGGCTACGGCGAGGACGGCAAGCACACGAGACCA
ACCTGGAAGCCAAGTACGTGGTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTGCTTCCGCATCCGCCAGGCC
TGGCACCGCGCAACGCCGACCAGGCCGAAGGCGACCAGAACGAGTTCGGCTGATCGTCACTATCC
GCTGTCGATCCTGTAA

Figura 42.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción IS*Pa1328* de la cepa Ps92 (número de acceso en GenBank: **KF517097**).

[En blanco, secuencia de *oprD*; en gris, secuencia de inserción IS*Pa1328*; en letra **amarilla**, “target site duplication”; y, en **negrita**, la transposasa].

ATGA**AAGGGCGGCGGCAAAAA**CTGAGTGCAACACCTGACCTTTCCGGTACGGTGCTGCCCTATGTCTT
ATTCCGAACTCAGCGTTGAAGAGCGTGCCACCATTCAAGTTAGTCATGCCCAAGGCCCTCAGCTTGCGC
AGGATTGCCTGCTTGATCAACCGATCCCCTTCGACGGTCAGCCGGGAGATGCGCCCAATCGAGATGC
AGCTGGCAGCTACTCGGCCCGTGTGGCTCAGCAGCGGATGAAGGCCCGCCAGGCTTGTGCGCCCA
TGCGAAAGCTGCTGCCAGGGAGTGAGCGCTTTGAACTGGTGATCCATATGCTGCGCCAGCGTTTGTCT
CCCCGAGCAGATTGCCGGCAAGCTGCGCAGTATGAACATAACCCAGCCTTAGAGATGCCCTACGTCTGTCTG
CGAGACGATCTACAACGCGATCTATGCCCTGCCCGTCCGGTGAGCTGCGCAAGGAGTTGATCCTTTGTT
TGCGCCAAGGCAAGACGACACGTAGACCACGCCTTGGCGGTGTGGATCGGCGCGGGCAGATTCCAGAG
ATGGTCAGCATTCACTTGCGCCCGCCGGAAGTTGAAGACCGGCTGATGCCGGGGCATTGGGAAGGCGA
CCTTATTAAAGGGTAAGGCTAACGCCTCGTCTGTAGGTACGCTGGTGGAGCGCACTAGTGGTTACCTGA
TGCTGGTGAAGATGAACGACGCGACGGCGACCTCGGCGATGGAGGGCTTCAGCGCCGCCCTCAATAAC
ATGCCGATGGCGATGCGCAAGAGCATGACCTACGACCAGGGCCGGGAAATGGCACAGCACGCCGAGAT
CACCCAGAGAACCGGTGTGGCGATCTACTTCTGCGACCCGCACAGCCCTTGGCAGCGCGGACGCAACG
AAAACATTAATGGCCTGATCCGCCAGTACCTGCCCAAGGGCACTGACTTGTGCGGTACATAGCCAAGAA
GAACTGGATGCCATTGCGTTTCAACTGAACATGCGTCCACGTAAGCGCTTCGATTTCAAATGTCCTAT
CGAAGTATGAGCGAAGTGATGCAGAAAGCCTTGGCTATGCAATATGATGCTCCTGCGTCAATTCAAT
AACCGTGTTGCACTCAG**CTCCTGCAACCGCC****AAG**TGATGAAGTGGAGCGCCATTGCACTGGCGGTTTC
 CGCAGGTAGCACTCAGTTTCGCCGTGGCCGACGCATTCGTGACGATCAGGCCGAAGCGAAGGGTTCA
 TCGAAGACAGCAGCCTCGACCTGCTGCTCCGCAACTACTATTTCAACCGTGACGGCAAGGAAGGTCGG
 GCGGATCGCGTCGATTGGACCCAGGGCTTCTCACCACCTACGAATCCGGCTTCACTCAAGGCACCGT
 GGGCTTCCGGCTCGATGCCTTCCGGCTACCTGGGCTGAAGCTCGACGGTACCTCGGACAAGACCGGCA
 CCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACGGCAAGCCGCGGACGACTACAGCCGCGTGGCGGCGCCCTG
 AAGGTGCGCATTTCCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAAATGCAACCTACCGCGCCGGTCTTCGCCG
 CGGCGGACGCCCTGTTCCCGCAGACCGGACCGGCTTCCAAGTGCAGAGCAGTGAATTCGAAGGGC
 TCGATCTCGAAGCGGGCCACTTCACCGAAGGCAAGCAGGGCACCACCACCAAGTCGCGCGGCGAACTC
 TACGCAACCTATGCAGGCCAGACCGCCAAGAGCGCGGACTTCGCCGGCGGCCGCTACCGGATCACC
 CAATCTCAGCGCCTCCCTGTATGGCGCCGAATTGAAAAGACATCTATCGCCAGTATTACCTGAACACCA
 ACTACACAATCCCCTGGCATCCGACCAGTTCGCTGGGCTTTCGACTTCAACATCTACCGCACCACCGAT
 GAAGGCAAAGCCAAGGCCGGCGACATCAGCAACACCGCCTGGTCCCTGGCCGGCGGTACACCCTGGA
 CGCGCACACCTTACCCTGGCCTACCAGCAGGTGCATGGCGACGAGCCGTTGACTACATCGGCTTCG
 GCGAGAACGGTTCGGGCGGCGGCGGTGACTCGATTTTCTCGCCAACTCCGTGCAGTACTCCGACTTC
 AACGGCCCCGGCGAGAAATCCTGGCAGGCCCGCTACGACCTGAACATGGCCTCCTACGGCGTTCCCG
 CCTGACCTTTCATGGTTTCGTTACATCAACGGTAAGGACATCGACGGCACCAAGGTGACTCCAGTTCCT
 CCTACGCGGGCCTGTACGGCGAGGACGGCAAGCACCACGAGACCAACCTGGAAGCCAAGTACGTCCTC
 CAGGCCGGCCCCGCAAGGACCTGTGCTTCCGTATCCGCCAGGCTGGCACCGGCCAATGCCGACGA
 GGGTGAAGGCGACCAGAACGAGTTCCGCTGATCGTTCGACTATCCGCTGTGATCCTGTAA

Figura 43.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción *ISPsp4* de la cepa W64 (número de acceso en GenBank: **KF517098**). [En blanco, secuencia de *oprD*; en gris, secuencia de inserción *ISPsp4*; en verde, las regiones repetidas; en letra amarilla, “target site duplication”; y, en **negrita**, la transposasa].

Para tener una visión más clara de las características de las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP seleccionadas para este estudio, se incluye también una tabla resumen (**Tabla 38**; se puede ver ampliada en **Tabla S3**, ver Anexo I).

TABLA 38.- Características principales de las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP incluidas en esta tesis.

Cepa	Fenotipo de resistencia ^a	PFGE	ST	Integrón	Patrón OprD ^b
W26, W56, W59, W104, W110, W400	IPM, MEM, DOR	S1a	175	<i>aadB-2</i>	F
W96, W121	IPM, MEM, DOR	S1b	175	<i>aadB-2</i>	F
W528	IPM, MEM, DOR	S1c	175	<i>aadB-2</i>	F
W524	IPM, MEM, DOR	S1d	175	<i>aadB-2</i>	F
W391	IPM, MEM, DOR	S2a	175	<i>aadB-2</i>	A
W53, W439	IPM, MEM, DOR	S2a	175	<i>aadB-2</i>	F
W487	IPM, MEM, DOR	S2b	175	<i>aadB-2</i>	F
W166, W188, W251	IPM, MEM, DOR	S2c	175	<i>aadB-2</i>	F
W518	IPM, MEM, DOR	S2d	175	<i>aadB-2</i>	F
W430	IPM, MEM, DOR	S2e	175	<i>aadB-2</i>	F
Ps104	IPM, MEM, DOR	S3a	175	<i>aadB-2</i>	F
Ps105	IPM, MEM, DOR	S3b	175	<i>aadB-2</i>	F
W632	MEM, DOR ⁱ	S4a	175	<i>aadB-2</i>	F
W633	IPM, MEM, DOR ⁱ	S4b	175	<i>aadB-2</i>	F
W638	IPM, MEM, DOR	S4c	175	<i>aadB-2</i>	F
Ps72, Ps73, Ps74	IPM, MEM, DOR	S5	175	<i>aadB-2</i>	F
W654	IPM, MEM, DOR	S6a	175	<i>aadB-2</i>	F
Ps102	IPM, MEM, DOR	S6b	175	<i>aadB-2</i>	F
Ps107	IPM, MEM, DOR	S6c	175	<i>aadB-2</i>	M
W129	IPM, MEM, DOR	S7	175	<i>aadB-2</i>	F
W655	IPM, MEM, DOR	S8	175	<i>aadB-2</i>	F
Ps93	IPM, MEM, DOR	S9	175	<i>aadB-2</i>	F
W105	IPM, MEM, DOR	S10	175	<i>aadB-2</i>	H
W639	IPM, MEM, DOR	S11	175	<i>aadB-2</i>	L
W25	IPM, MEM, DOR	S12	308	<i>aac(6')-Ib-3</i>	V
W163	IPM, MEM, DOR	S13	308	<i>aac(6')-Ib-3</i>	V
Ps103	IPM, MEM, DOR	S14	308	<i>aac(6')-Ib'-3</i>	Z
Ps94	IPM, MEM, DOR	S15	639	<i>aac(6')-Ib'-3</i>	Q
W30	IPM, MEM ⁱ , DOR	S16a	235	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h</i>	Y
W406	IPM ⁱ , DOR	S16b	235	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h</i>	Y
W516	MEM ⁱ , DOR	S17	—	—	A
Ps77	DOR	S18	—	—	A
Ps106	DOR	S19	—	—	A
W500	IPM, MEM, DOR	S20	—	—	G

Cepa	Fenotipo de resistencia ^a	PFGE	ST	Integrón	Patrón OprD ^b
W407	IPM ⁱ , MEM, DOR	S21	—	—	I
W32	IPM, DOR	S22	—	—	J
Ps98	IPM, MEM, DOR	S23	—	—	K
W120	IPM, DOR	S24	—	—	N
W501	IPM, MEM, DOR	S25	—	—	O
Ps70	IPM, MEM, DOR	S26a	—	—	P
Ps75	IPM, MEM, DOR	S26b	—	—	P
W54	IPM, MEM ⁱ , DOR	S27	—	—	R
W35	IPM, MEM ⁱ , DOR	S28	—	—	S
W154	IPM, MEM ⁱ , DOR	S29	—	—	T
Ps92	IPM, MEM, DOR ⁱ	S30	—	—	U
W28	MEM, DOR	S31	—	—	W
W64	IPM, MEM ⁱ , DOR	S32	—	—	X
W135	IPM, MEM, DOR	S33	—	—	a
W483	IPM, MEM, DOR	S34	—	—	a
W443	IPM, MEM, DOR	S35	—	—	b

^aÚnicamente a los 3 antibióticos carbapenémicos testados: IPM = imipenem, MEM = meropenem, DOR = doripenem; i: sensibilidad intermedia. Para ver el fenotipo de resistencia completo: **Tabla S3** (anexo I).

^bClasificación acorde a **Tabla 37**.

2.2- Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) de Zaragoza

De los 123 aislados de *P. aeruginosa* con resistencia o sensibilidad reducida al menos a uno de los antibióticos carbapenémicos (imipenem, meropenem o doripenem), recogidos en el HCULB de Zaragoza en el periodo junio 2008 a octubre 2010, se seleccionaron, llevando a cabo las mismas técnicas (PFGE y antibiograma) y según el mismo criterio (“una cepa por paciente y con perfil de bandas PFGE diferente, a menos que dos cepas de un mismo paciente con el mismo perfil de PFGE tuvieran distinto fenotipo de resistencia”) que en el caso de las cepas procedentes del HSP de Logroño, 87 cepas pertenecientes a 80 pacientes (**Figura S2** y **Tabla S4**, ver Anexo I).

De los 80 pacientes, 55 eran hombres y 25 mujeres; comprendiendo un rango de edad entre los 21 y 92 años, siendo la media de edad de 64 años. En las siguientes figuras se observan los diferentes orígenes de las muestras así como los servicios de los cuales procedían:

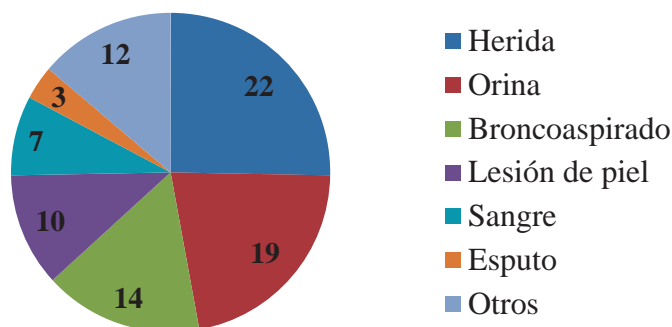


Figura 44.- Distribución de las 87 cepas por origen de muestra.

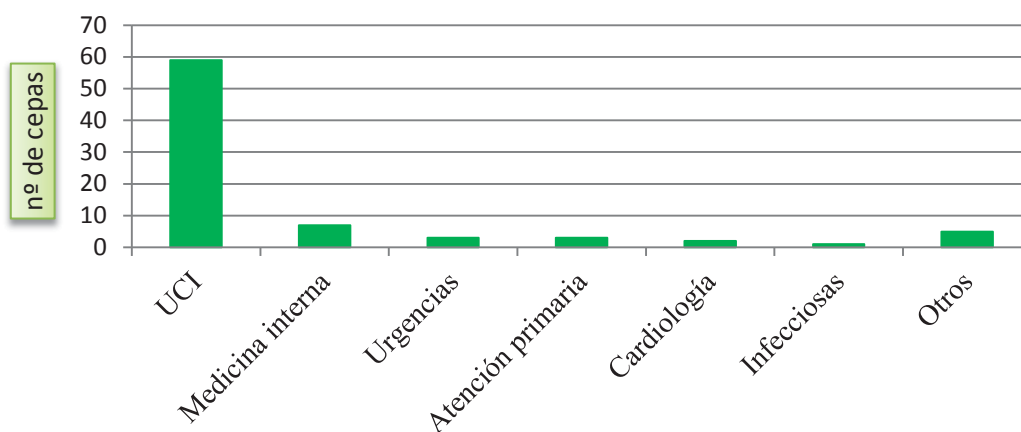


Figura 45.- Distribución de las 87 cepas por servicio del hospital.

2.2.1.-Estudio de sensibilidad a antibióticos en las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R

Según el criterio de selección es lógico que nuestras cepas fueran resistentes a los antibióticos beta-lactámicos y, en concreto, a los carbapenémicos; pero, lo más destacado es la asociación que parece existir entre la resistencia a carbapenémicos y a los aminoglucósidos junto con la alta resistencia a fluoroquinolonas (**Figura 46**). Aunque todas nuestras cepas presentaban un fenotipo de multirresistencia, ninguna de ellas fue resistente a colistina.

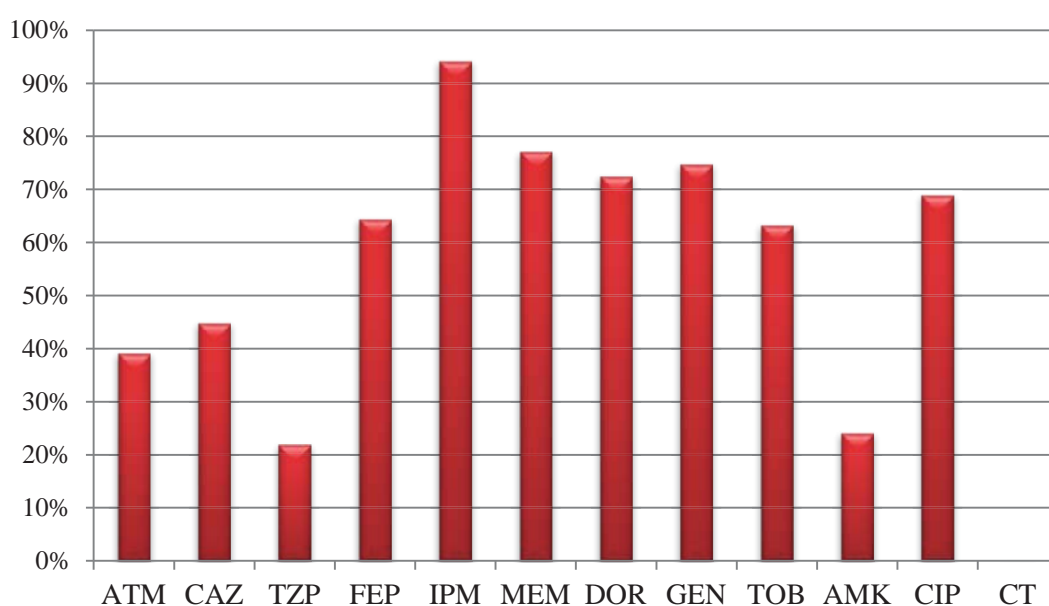


Figura 46.- Porcentaje de resistencia de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB de Zaragoza frente a 12 de los antibióticos testados.

A diferencia del HSP de Logroño, entre las cepas del HCULB se observó una alta prevalencia de cepas productoras de MBL (49%) (**Figura 47**).

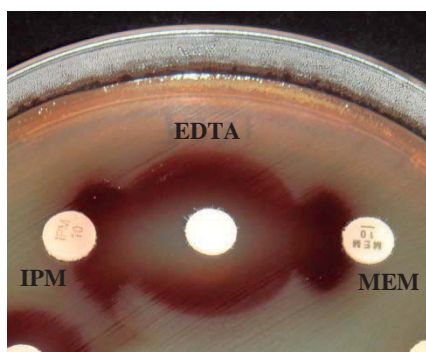


Figura 47.- Antibiograma confirmatorio de una cepa productora de MBL.

En general, se observa una mayor resistencia a los antibióticos en las cepas productoras de MBL, con excepción del aztreonam donde las cepas no productoras de MBL son más resistentes (**Figura 48**).

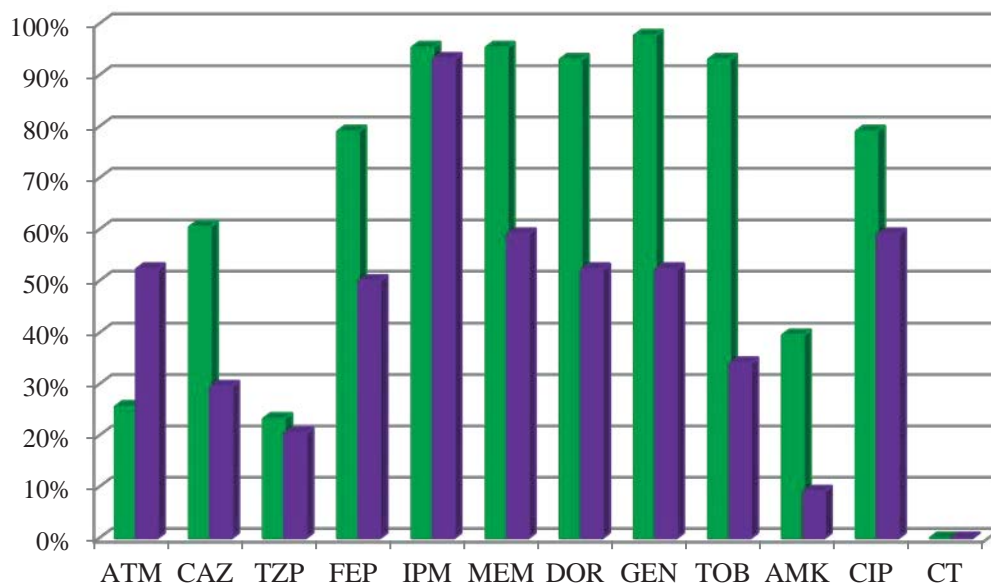


Figura 48.- Porcentajes de resistencia de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB a 12 de los antibióticos testados distinguiendo las cepas productoras de MBL (color verde) de las cepas no productoras (color morado).

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

2.2.2.- Detección y caracterización de integrones en las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R

Se detectaron integrones de clase 1 en 65 de las 87 cepas (75%), mientras que ninguna de ellas presentaba integrones de clase 2 ó 3. En estos elementos, además de encontrar casetes génicos relacionados con la resistencia a aminoglucósidos, también se localizaron otros genes implicados en la resistencia a otras familias de antibióticos como los carbapenémicos.

Se localizaron hasta 12 estructuras diferentes entre el gen codificante de la integrasa de tipo 1 y el segmento 3' conservado tanto en cepas productoras como no productoras de MBL (**Figura 49**).

Las 43 cepas productoras de MBL contenían el gen *bla_{VIM-2}* dentro de estos integrones; bien como único gen en la región variable (caso más prevalente), o bien en combinación con genes que confieren resistencia a aminoglucósidos. Además, hay que remarcar que 31 de las cepas portaban 2 integrones simultáneamente y otra cepa presentaba hasta tres integrones diferentes.

La estructura *aac(3)-Ia+ISPa34+aadA-1h* fue descubierta por primera vez en este estudio y depositada en las bases de datos INTEGRALL (denominada como In661) y GenBank (nº de acceso: JF265065). La secuencia de inserción *ISPa34* se describió en nuestro grupo en otra cepa (W37) como se explicará más adelante (**apartado 5.1** de la sección Resultados).

El promotor más frecuente entre las estructuras de integrón detectadas fue el promotor de tipo híbrido 1 (PcH1) seguido del promotor de tipo híbrido 2 (PcH2) mientras que tanto el promotor de tipo débil (PcW) como el promotor de tipo fuerte (PcS) fueron encontrados únicamente en una estructura cada uno (**Figura 49**). En la siguiente tabla se observa la relación que existe entre el tipo de promotor y la estructura génica del integrón de clase 1:

TABLA 39.- Promotores encontrados en los integrones de clase 1 de las 65 cepas del HCULB de Zaragoza.

Promotor	Estructura(s) del integrón asociada	
PcW	<i>aadA7</i>	
PcS	<i>aac(6')-Ib'+orfD</i>	
PcH2	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h</i>	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h+ISPa34</i>
	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA-1h</i>	<i>aac(6')-Ib'+bla_{VIM-2}</i>
PcH1	<i>aadB-2</i>	<i>bla_{VIM-2}</i>
	<i>aadA6</i>	<i>bla_{VIM-2}+aac(6')-Ib'+aadA1+ISPa34//</i>
	<i>aac(6')-Ib'+bla_{OXA-46}</i>	<i>bla_{VIM-2}+aac(6')-Ib'+aadA1+ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>

En todos los casos cuando el primer casete génico es igual, el tipo de promotor es el mismo; con excepción del casete génico *aac(6')-Ib'*, donde hemos encontrado hasta 3 tipos de promotores asociados.

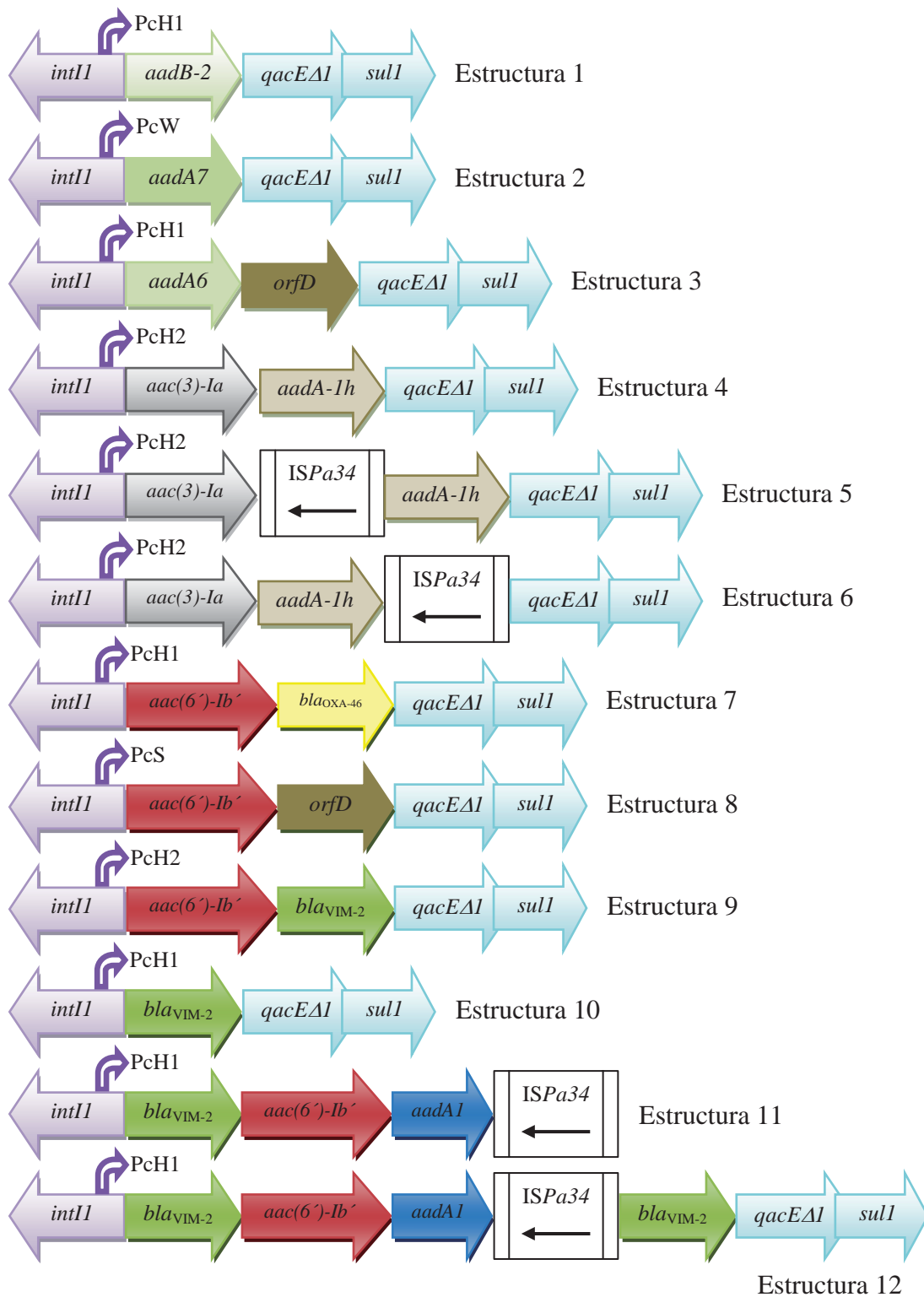


Figura 49.- Estructuras de los integrones de clase 1 presentes en las cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB.

2.2.2.1.- Tipificación molecular de las cepas de *P. aeruginosa* portadoras de integrones

Se determinó la secuencia tipo en las 65 cepas con al menos un integrón de clase 1 en su interior, y cinco fueron las combinaciones encontradas: ST111, ST175, ST235, ST253 y ST973. Siendo esta última combinación alélica descrita por primera vez en nuestro laboratorio en otra cepa clínica (W37), la cual describiremos más adelante (**apartado 5.1** de la sección Resultados).

En la tabla siguiente se puede ver la asociación de la secuencia tipo y los integrones encontrados en cada cepa:

TABLA 40.- Asociación de la secuencia tipo con los integrones en las 65 cepas del HCULB de Zaragoza.

Secuencia tipo	Integrón ^a	Cepas ^b
ST111	Estructura 5	Ps34, Ps62, Ps41
	Estructura 7	W354, Ps82
ST175	Estructura 1	W361, W382, Ps14, Ps16, Ps17, Ps20, Ps31, Ps44, Ps45, Ps46
	Estructuras 1 + 10	Ps56
ST235	Estructura 3	Ps50
	Estructuras 3 + 4	W342, W351, W367
	Estructura 4	Ps28, Ps30
	Estructura 9	Ps12, Ps29
	Estructuras 4 + 10	W335, W344, W352, W353, W376, W381, Ps32, Ps38, Ps40, Ps52, Ps55, Ps58, Ps64, Ps78
	Estructuras 5 + 10	W326, W334, W346, W350, W360, W365, W371, W379, Ps27, Ps79
	Estructuras 6 + 10	W343
	Estructuras 8 + 10	Ps60
	Estructuras 5 + 11	W378
	Estructuras 5 + 10 + 12	W336
ST253	Estructura 2	W355
ST973	Estructura 10	W330, W333, W340, W345, W363, W368, W374, Ps24, Ps57, Ps59, Ps61, Ps68

^aEstructuras correspondientes a **Figura 49**.

^bLas cepas marcadas en negrita corresponden con las cepas productoras de MBL.

2.2.3.- Alteraciones en la porina OprD en las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R

Otro de los mecanismos implicados en la resistencia a carbapenémicos es la presencia de alteraciones en la proteína de membrana OprD. Solamente se pudo amplificar el gen *oprD* en 82 de las 87 cepas seleccionadas, perteneciendo esas 5 cepas restantes al grupo de las no productoras de MBL (W332, W354, W369, Ps19 y Ps23). En la **Tabla 41** se pueden ver la gran variedad de cambios aminoacídicos, inserciones, deleciones y codones de finalización prematuros que se encontraron en ellas:

En este caso, 58 de las cepas presentaban un codon de finalización prematuro, en diferentes localizaciones, impidiendo tener una proteína completa en la cepa correspondiente. Además, dos de ellas (Ps33 y W368) tenían truncado el gen *oprD* por secuencias de inserción de gran tamaño, *ISPa45* e *ISPpu21* respectivamente, impidiendo su funcionalidad (**Figura 50**). En las cepas W340 y Ps61 se encontró la secuencia de inserción *ISPpu21* localizada justo delante del gen *oprD*, desconociendo si este hecho pudiera afectar a la función de la proteína.

Por otro lado, la secuencia de inserción *ISPa45*, que tiene una similitud del 90% con *ISPa1635* y pertenece a la familia *IS4*, fue descrita por primera vez en este estudio y depositada en la base de datos de secuencias de inserción “ISFinder”. Las secuencias completas de OprD truncadas con *ISPa45* e *ISPpu21* en las cepas Ps33 y W368 fueron introducidas en la base de genes GenBank cuyos números de acceso son JX440361 y JX440360, respectivamente (**Figuras 51 y 52**).

TABLA 41.- Alteraciones de la porina OprD encontradas en las 82 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB analizadas.

	Patrón OprD	Cepas asociadas al patrón	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Alteraciones ^a
Productoras de MBL (43 cepas)	A	W330, W333, W345, W363, W374, Ps24, Ps56, Ps57, Ps59, Ps61, Ps68	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto
	c	W334, W335, W376, W381, Ps32, Ps38, Ps52, Ps55, Ps58, Ps64, Ps78	—	Sin codon de inicio (MII) ^b
	d	W340	60	D43N, inserción 1 pb (nt 169)
	e	(17 cepas) ^c	67	Q67stop
	f	Ps12, Ps29	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G
	g	W368	—	<i>IS_{Ppu21}</i> en nucleótido 7 (GenBank no. JX440360)
No productoras de MBL (39 cepas)	A	Ps13, Ps22	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto
	B	Ps21	441	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, L7-corto, S403A, Q424E
	D	W355	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A
	F	W361, W382, Ps14, Ps16, Ps17, Ps20, Ps31, Ps44, Ps45, Ps46	142	D43N, S57E, S59R, Q142stop
	N	W370, Ps42	> 443	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto, inserción 1 pb (nt 1205)
	W	W367, W383	> 443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, inserción 1 pb (nt 1206)

Resultados

	Patrón OprD	Cepas asociadas al patrón	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Alteraciones ^a
No productoras de MBL (39 cepas)	c	Ps30	—	Sin codón de inicio (M11) ^b
	f	Ps25, Ps50	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G
	h	W362	67	D43N, S57E, S59R, Q67stop
	i	Ps15	277	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, W277stop
	j	W356	112	D43N, S57E, S59R, delección 17 pb (nt 207)
	k	Ps9	221	D43N, S57E, S59R, delección 22 pb (nt 540)
	l	W377	327	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, delección 52 pb (nt 702)
	m	W339	253	S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, inserción 1 pb (nt 708)
	n	Ps34, Ps41, Ps62, Ps82	224	V127L, delección 13 pb (nt 464)
	o	W380	218	T103S, K115T, inserción 1 pb (nt 495)
	p	Ps8	277	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, W277stop
	q	W351	65	W65stop
	r	W342	88	delección 16 pb (nt 55)
	s	Ps28	53	inserción 1 pb (nt 148)
	t	W341	93	delección 1 pb (nt 177)
u	Ps18	117	delección 2 pb (nt 250)	
v	Ps33	—	ISPa45 en nucleótido 26 (GenBank no. JX440361)	

^aAbreviaturas: pb = pares de bases; nt = nucleótido; L7-corto = 372-VDSSSSYAGL-383.

^bUna alteración M11 impide la traducción a proteínas por lo que no se incluyen el resto de sustituciones detectadas.

^cCepas correspondientes a patrón e: **W326,W336,W343,W344,W346,W350, W352,W353,W360, W365,W371,W378, W379, Ps27, Ps40, Ps60, Ps79**

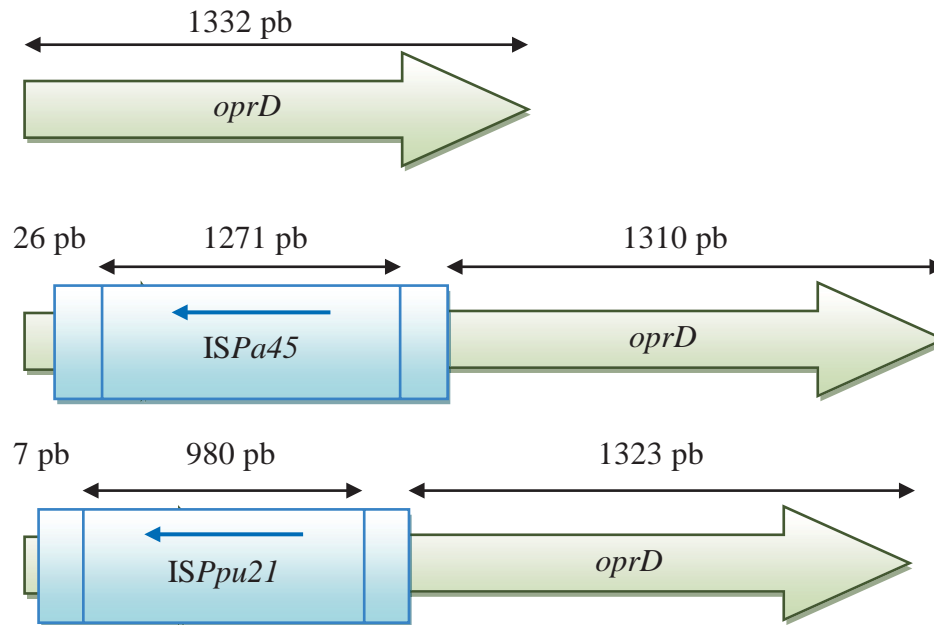


Figura 50.- Comparación entre el gen *oprD* completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank: AE004091) con los genes *oprD* truncados por las secuencias de inserción ISPa45 e ISPpu21 de las cepas Ps33 (GenBank: JX440361) y W368 (GenBank: JX440360), respectivamente.

ATGAAAGTGATGAAGT**GGAGCGCCAT**CAATGTCATCAACTTAAGCCCCAGCCCTGGCCGGGGCAAGA
 AATCCCGGGGCTTGGACGCGCGGTTGACAGTGCCTTCACTGGTTTTGCTCCCCAGTTCAGCGCATG
 TCGACCCAGACGCCAGCTTAATGGATGCCGTTTCCTCGCCGCGGGCGGGATTTCTCGTTTTCCGGGC
 GAGCGCGTGCCGGCCGCTGTCTGGCCAGCTTTTTTTCGGTGCAGTTCGGGTGCTGCTTGTCT**TAGCG**
CGTCCGGTTTTGTAGCCCTCGCAGCCGCGACTGGCCAGGCGCATACGCTGGCGCGGGAAGCTGCGGCCCG
GGCGCACAGCGCTGAGGCTGTTGGCCATCAACTCCATCACGTTGGCCAGCCCTGCACACCGGGGCGT
ACCAGCAGGTCGACCAGGGTGTCTTGGAGCGTGACACCCCTTGGGTGAAGTTGACCTTCCAGCGCAG
CTTGGCGCCTTTGTGGCGCTGCTCGATGACCGGTTGCAGCAGATGTTGCATCAGCAGCGCTAGGTTTT
TCAGCAGTTGCCCGCATGAAAAGTCTTGCTTACGGCCGTCACGCTACGGCCGCTAAAAGTTGTCGAGG
CAGAGGGTCTGCTTGGAGCGGCGGTAGTCCGTTTTCGATGCCCGAGCGGCGGTGGTAAAGATCCGCGAA
CACCTCGGCCGGGAaGGCCTGTGATCCAGCAGGGAGGTCAGCAGCACTTCGCTTTCACCGCTGGCTA
GCTCGACCCGGATCAGGCGCAATTCGACCCGGCCCGCGGGATCGACGCGGCCCTCGGTACAGAACAGG
CGCGCCTCGGGATGACTGGCAGAGAAGAAGCTGCGTGTCTTCTGTCTGCCCGAGCGGAGAAAAGTGT
GACCTGCGCGTGTAGCCACACGGCAGGCGCATCAGGAAATGTCGCCGGTGTGCTCGAACAGCGCAA
ACAGCCAGTGTCCGGGGTAGCCGCGATCAAACAACGTCAGGCTGTCAGCGGGCAGATGCTCGAGGTGC
AGATGGGCGCAATCGCGCTCGCCGACTGCGGATGGCACGATCAgGCTGTGTAGCGTCTGGCCGTGGC
GACGTCGTAGAGCATGGACAGACGGGCAACGGGAAAAGTTCGCTATGGCAGCCGAAAAGCGCGTCATGA
CCGACTCCAGCGGTAAGTGGACGGTCCAGCGGAGTACCCGTAACCCGCGCCACGTCGAG
CGCAGCCCGAGGCTGTGAGCTGTTGCTGAAGGGTTTTGGTTGAGGCTCTCGAAGACCTCGGGCTTGA
CTTGCCGCGCCTTGCTGAAGGCTGCGCGGTGACCACCTGGGCTCTCGGCCGAGGCCCTGGTTGAGCA
CGCGATAGAACTGATCGAGCTCGGTTTTGACAGGCGGTGCGTGGCTGATTGAGCAAAAACAGGACGAGG
TTCTTGAAGGTGAGTTGGCGTCCGCGGGTAAAGTGTGAGGGCGCTGGCGGTGGGTATCGATGAAGTC
GGGACAATCGAGCTGACTGGTTATTTTTTGTACAATTTTTCAAGCCAGGGTTTTGCTGGGCGGTGTCAA
CGGTGTGGAATGAGGGGCCAAAAGGGTTTTCTCTATGCGCTGAATTTAGCGCTAATTTATATGATATTT
ATAGGAAAAATTCTTAAGTTGATGACATTCGGAGCGCCAT**TGCACTGGCGGTTTTCCGCAGGTAGCAC**
 TCAGTTCCCGTGGCCGACGCATTCGTCAGCGATCAGGCCGAAGCGAAGGGTTTCATCGAAGACAGCA
 GCCTGAACCTGCTGCTCCGCAACTACTATTTCAACCCTGACGGCAAGGAAGGTCGGGGTGATCGCGTC
 GATTGGACCCAGGGCTTCTCACCACCTACGAATCCGGCTTCACTCAAGGCACCGTGGGCTTCGGCGT
 CGATGCCTTCGGCTACCTGGGCTGAAGCTCGACGGCACCTCCGACAAGACCGGCACCGGCAACCTGC
 CGGTGATGAACGACGGCAAGCCGCGCGATGACTACAGCCGCGCCGGCGGCGCGGTGAAGGTGCGCATC
 TCCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAGATGCAACCGACCGCCCGGCTTTCGCCGTGGCGGCAGCCG
 CCTGTTCCCGCAGACCGCGACCGGCTTCCAGCTGCAGAGCAGCGAATTCGAAGGGCTCGACCCTGAGG
 CAGGCCACTTCACCGAGGGCAAGGAGCCGACCACCGTCAAATCGCGCGGTGAGCTCTACGCCACTTAC
 GCCGGCCAGACAGCCAAGAGCGCCGACTTCGCTGGCGGCGCTACGCGATCACCGCAACCTCAGCGC
 CTCCCTCTATGGCGCAGAGCTGAAAGACATCTATCGCCAGTACTACCTGAACACCAACTACCCATCC
 CGCTGGCCTCCGATCAATCGCTGGGCTTCGACTTCAACATCTACCGCACCCAGCAGGAAGGCAAGTCC
 AAGGCTGGCGACATCAGCAACACCACCTGGTCCCTGGCGGGCGCGTATACCCCTGGACGCCACACCTT
 CACCCTGGCCTACCAGCAGGTGCATGGCGACGAGCCGTTTCGACTACATCGGCTTCGGCGGCAACGGTT
 CCGGCGCCGGCGGCGACTCGATCTTCTCGCCAACTCCGTCAGTACTCCGACTTCAACGGTCCCTGGC
 GAGAAATCCTGGCAGGCCCGCTACGACTGAACCTGGCCTCCTACGGCGTTCCTGGCCTGACCTTCAT
 GCTGCGTTACATCAATGGTAAGGACATCGACGTTACCAAGGTCGATTCCAGCTCCTCCTATGCAGGCC
 TGTACGGCGAGGATGGCAAGCACACGAGACCACTCGAAGCCAAGTACGTGGTCCAGTCCGTCGCG
 GCCAAGGACCTGTGCTTCCGCATCCGCCAGGCTGGCACCGTGCACCGCCGACAGGGCGAAGGCGA
 CCAGAACGAGTTCCGCCTGATCGTTCGACTATCCGCTGTGATCCTGTGA

Figura 51.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción *ISPa45* (número de acceso en GenBank: **JX440361**) de la cepa Ps33. [En blanco, secuencia de *oprD*; en gris, secuencia de inserción *ISPa45*; en letra amarilla, “target site duplication”; y, en **negrita**, la transposasa].

ATG**AAAG**GGATGGTCTGAAGTAGCCACGTATTTCTGGCCGACTACAGACCTCGCTGTTTTTTGAAGCG
 ATCCATCGATCAAAAAGCGCTCAGATCGTCGTCTTATGTAGGGTTTTTAGCCGCTACGCGTACCCCGT
 AGCGGCTATTTCGCCGT**GTTACAGGGCACCTCTCTGTGTTTCGCGAGTAAATGCCGCCGCCATCCA**
CAGATTGCAGACGCGAAACAGCGTAATCAGTTGTGCGGTGTTCTTGGCCAGGCCACGGAAGCGCACCT
TGGTGTAAACAAACTGGCGCTTGATCACCCGGAATGGATGTTTCGACCTTGGCAGTACCTGCGCCTTG
GCCTTCTCGATTTTGGCGTTGGCCTTGTACAGCGGGCTGCGCTTGGCTCAGTTGCTGGTAAGTGTGCG
CCGCGCCGCAATCTGCCAGATGACCGAGCGGCCTGCATGCTCGGCACGCTTCTCGACGCCGGTATAGC
CGGCATCGCCGCTGACCAGTTCTCTTCGCCGTGCAGCAGCTTGTCCACCTGGGTGACATCGGCCACG
TTGGCCGCCGTGCCACCACGCTGTGTACCAGGCCGGATTTCGTGTTCGGCGCCGATGTGCGCCTTCAT
GCCGAAGTAGTACTGGTTGCCCTTCTTGGTCTGGTGCATCTCGGGATCGCGCTTGGCGTCTTGTCT
TGGTTCGAGCTCGGCGCATGGATCAGCGTGGCGTGCAGCATGGTGCCTGGCGCAGCGACAGGCCACGG
TGCCCCAGGTAGCCATTGATCACCGCCAGAATCCCGGCCAGCTCGTGGCGCTCCAGCAGGCGACG
GAAGTTGAGGATGGTGGTTTTCGTCGGGATACGCTCCAGGCTCAGCCGGCGAACTGGCGCAGGATGG
TCGTCTCGTACAGCGCTTCTTCATCGCCGGTTCGTGACGCCGAACTTCGCAACAGATGCACG
CGCAGCATCGCCATCAGCGGATAGGCGGGACGACCGCCTTACCCTTCGGGTAGTGCGGCTCGATCAG
GGCGATCAGGCCCTGCCACGGCACCACTGTTCCATTTTCGATCAGGAACAGTTCTTTCGGGTCTGCT
TGCGCTTGGCCGGCTACTCGGCGTGGCGAAGGTTCATCTGCTTTCATCGGAAAAGCTTTCGGGTGAAAGT
 CGGCGGATTTTGCCAAATCAGGAAGTCTTTTTTTCAGAGTTTCC**AAAG**TGATGAAGTGGAGCGCCATTGC
 ACTGGCGTTTTCCGAGGTAGCACTCAGTTTCGCCGTGGCCGACGCATTTCGTTCAGCGATCAGGCCGAAG
 CGAAGGGTTTCATCGAAGACAGCAGCCTGAACCTGCTGCTCCGCAACTACTATTTCAACCGTGACGGC
 AAGGAAGGTTCGGGTGATCGCGTTCGATTGGACCCAGGGCTTCTCACCACcTACGAATCCGGCTTCAC
 TCAAGGCACCGTGGGCTTCGGCGTTCGATGCCTTCGGCTACCTGGGCTGAAGCTCGACGGCACCTCCG
 ACAAGACCGGCACCGGCAACCTGCCGGTTCGATGAACGACGGCAAGCCGCGGATGACTACAGCCGCGC
 GGCGGCGCCGTGAAGGTGCGCATCTCCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAGATGCAACCGACCGCCC
 GGTCTTCGCCGCTGGCGGCAGCCGCTGTTCCCGCAGACCGCGACCGCTTCCAGCTGCAGAGCAGCG
 AATTCGAAGGGCTCGACCTCGAGGCAGGCCACTTACCAGGGGCAAGGAGCCGACCACCGTCAAATCG
 CGCGGTGAGCTCTACGCCACCTACGCCGGCCAGACAGCCAAGAGCGCCGACTTCGCTGGCGGCCGCTA
 CGCGATCACCGACAACCTCAGCGCCTCCCTCTATGGCGCAGAGCTGAAAAGACATCTATCGCCAGTACT
 ACCTGAACACCAACTACACCATCCCGCTGGCCTCCGATCAATCGCTGGGCTTCGACTTCAACATCTAC
 CGCACCACCGACGAAGGCAAGTCCAAGGCTGGCGACATCAGCAACACCACCTGGTCCCTGGCGGGCGC
 GTATACCCTGGACGCCACACCTTACCCTGGCCTACCAGCAGGTGCATGGCGACGAGCCGTTTCGACT
 ACATCCGCTTCGGCGGCAACGGTTCCGGCGCCGCGGCGACTCGATCTTCTCGCCAACCTCCGTCCAG
 TACTCCGACTTCAACGGTCTGGCGAGAAATCCTGGCAGGCCCGCTACGACCTGAACCTGGCCTCCTA
 CGGCGTTCCTGGCCTGACCTTCATGCTGCGTTACATCAATGGTAAGGACATCGACGGTACCAAGGTCG
 ATTCCAGCTCCTCCTATGCAGGCCTGTACGGCGAGGATGGCAAGCACCACGAAACCAACCTCGAAGCC
 AAGTACGTGGTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTGCTTCCGCATCCGCCAGGCTGGCACCGTGC
 CAACGCCGACCAGGGCGAAGGCGACCAGAACGAGTTCCGCTGATCGTTCGACTATCCGCTGTTCGATCC
 TGTA

Figura 52.- Secuencia nucleotídica del gen *oprD* truncado con la secuencia de inserción *ISPpu21* (número de acceso en GenBank: **JX440360**) de la cepa W368.

[En blanco, secuencia de *oprD*; en gris, secuencia de inserción *ISPpu21*; en letra **amarilla**, “target site duplication”; y, en **negrita**, la transposasa].

Como en el caso anterior, para tener una perspectiva mejor de las características de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB seleccionadas para este estudio, se incluye también una tabla resumen (**Tabla 42**; se puede ver ampliada en **Tabla S5**, ver Anexo I).

TABLA 42.- Características principales de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB incluidas en esta tesis.

Cepa	Fenotipo de resistencia ^a	Fenotipo MBL	PFGE	ST	Estructura integrones ^b	Patrón OprD ^c
W330	IPM, MEM, DOR	Sí	R1	973	10	A
W333	IPM, MEM, DOR	Sí	R2	973	10	A
W345	IPM, MEM, DOR	Sí	R3a	973	10	A
W363	IPM, MEM, DOR	Sí	R3b	973	10	A
W368	IPM, MEM, DOR	Sí	R3c	973	10	g
W374	IPM, MEM, DOR ⁱ	Sí	R4	973	10	A
Ps24	IPM, MEM, DOR	Sí	R5	973	10	A
Ps57	IPM, MEM, DOR	Sí	R6	973	10	A
Ps59	IPM, MEM, DOR	Sí	R7	973	10	A
Ps61	IPM, MEM, DOR	Sí	R8	973	10	A
Ps68	IPM, MEM, DOR	Sí	R9	973	10	A
W340	IPM, MEM, DOR	Sí	R10	973	10	d
Ps32, Ps64	IPM, MEM, DOR	Sí	R11a	235	4 + 10	c
Ps38, Ps52, Ps78	IPM, MEM, DOR	Sí	R11b	235	4 + 10	c
Ps79	IPM, MEM, DOR	Sí	R11b	235	5 + 10	e
Ps55	IPM, MEM, DOR	Sí	R11c	235	4 + 10	c
Ps58	IPM, MEM ⁱ , DOR	Sí	R12	235	4 + 10	c
W335	IPM, MEM, DOR	Sí	R13	235	4 + 10	c
W334	IPM, MEM, DOR	Sí	R13	235	5 + 10	c
W376	IPM, MEM, DOR	Sí	R14	235	4 + 10	c
W381	IPM, MEM, DOR	Sí	R15	235	4 + 10	c
Ps40	IPM, MEM, DOR	Sí	R16	235	4 + 10	e
W344	IPM, MEM, DOR	Sí	R17a	235	4 + 10	e
W352	IPM, MEM, DOR	Sí	R17b	235	4 + 10	e
W353	IPM, MEM	Sí	R18	235	4 + 10	e
W326	IPM, MEM, DOR	Sí	R19	235	5 + 10	e
W346, W350	IPM, MEM, DOR	Sí	R20	235	5 + 10	e
W360	IPM, MEM, DOR	Sí	R21a	235	5 + 10	e
W371, W379	IPM, MEM, DOR	Sí	R21b	235	5 + 10	e
W365	IPM, MEM, DOR	Sí	R22	235	5 + 10	e
Ps27	IPM, MEM, DOR	Sí	R23	235	5 + 10	e
W343	IPM, MEM, DOR	Sí	R24	235	6 + 10	e
Ps60	IPM, MEM, DOR	Sí	R25	235	8 + 10	e
W378	IPM, MEM, DOR	Sí	R26	235	5 + 11	e

Cepa	Fenotipo de resistencia ^a	Fenotipo MBL	PFGE	ST	Estructura integrones ^b	Patrón OprD ^c
W336	IPM, MEM, DOR	Sí	R27	235	5 + 10 + 12	e
Ps12	IPM ⁱ , MEM, DOR	Sí	R28	235	9	f
Ps29	IPM, MEM, DOR	Sí	R29	235	9	f
Ps56	IPM ⁱ , MEM ⁱ	Sí	R30	175	1 + 10	A
W361	IPM, MEM ⁱ , DOR ⁱ	No	R31	175	1	F
W382	IPM, MEM, DOR	No	R31	175	1	F
Ps14	IPM, MEM, DOR	No	R32a	175	1	F
Ps16	IPM, MEM, DOR	No	R32b	175	1	F
Ps17, Ps20, Ps44, Ps45, Ps46	IPM, MEM, DOR	No	R32c	175	1	F
Ps31	IPM ⁱ , MEM ⁱ , DOR ⁱ	No	R33	175	1	F
Ps50	IPM, MEM, DOR	No	R34	235	3	f
W342	IPM, MEM	No	R35a	235	3 + 4	r
W351	IPM, DOR	No	R35b	235	3 + 4	q
W367	IPM	No	R36	235	3 + 4	W
Ps28	IPM, MEM ⁱ	No	R37	235	4	s
Ps30	IPM, MEM ⁱ	No	R38	235	4	c
Ps34	IPM, MEM, DOR	No	R39a	111	5	n
Ps82	IPM, MEM, DOR	No	R39a	111	7	n
Ps62	IPM, MEM, DOR	No	R39b	111	5	n
Ps41	IPM, MEM, DOR	No	R40	111	5	n
W354	IPM, MEM ⁱ	No	R41	111	7	N.A.
W355	IPM ⁱ , MEM	No	R42	253	2	D
Ps13	IPM, MEM, DOR	No	R43	—	—	A
Ps22	IPM	No	R44	—	—	A
W370	IPM, MEM	No	R45	—	—	N
Ps42	IPM	No	R46	—	—	N
Ps21	IPM, MEM	No	R47	—	—	B
W383	IPM, MEM, DOR	No	R48	—	—	W
W362	IPM, MEM, DOR	No	R49	—	—	h
Ps15	IPM, MEM ⁱ , DOR	No	R50	—	—	i
W356	IPM	No	R51	—	—	j
Ps9	IPM, MEM, DOR	No	R52	—	—	k
W377	IPM, MEM, DOR	No	R53	—	—	l
W339	IPM, MEM, DOR	No	R54	—	—	m
W380	IPM, MEM ⁱ	No	R55	—	—	o

Cepa	Fenotipo de resistencia ^a	Fenotipo MBL	PFGE	ST	Estructura integrones ^b	Patrón OprD ^c
Ps8	IPM	No	R56	—	—	p
Ps25	IPM ⁱ , MEM	No	R57	—	—	f
Ps33	IPM	No	R58	—	—	v
Ps18	IPM, MEM ⁱ	No	R59	—	—	u
W341	IPM	No	R60	—	—	t
W332	IPM	No	R61	—	—	N.A.
W369	IPM	No	R62	—	—	N.A.
Ps19	IPM, MEM, DOR	No	R63	—	—	N.A.
Ps23	IPM, MEM, DOR	No	R64	—	—	N.A.

^aÚnicamente a los 3 antibióticos carbapenémicos testados: IPM = imipenem, MEM = meropenem, DOR = doripenem; i: sensibilidad intermedia. Para ver el fenotipo de resistencia completo: **Tabla S5** (anexo I).

^bEstructuras correspondientes a **Figura 49**.

^cN.A. = no amplificado. Clasificación acorde a **Tabla 41**.

2.3- Comparativa entre las cepas clínicas de los dos hospitales

La principal diferencia entre las cepas de ambos hospitales es la presencia de determinantes de resistencia a carbapenémicos adquiridos. Mientras que en el HCULB de Zaragoza casi la mitad (49,4%) de las cepas seleccionadas presentaba el fenotipo MBL, en todos los casos asociado al gen *bla_{VIM-2}*, en el HSP de Logroño no encontramos ninguna cepa con estas características. Nuestro objetivo era realizar un estudio comparativo entre hospitales comprobando los mecanismos prevalentes en relación a la resistencia a carbapenémicos en cepas de *P. aeruginosa* y ver la evolución en diferentes zonas geográficas. Con el dato proporcionado, podríamos decir que en cada hospital predomina una característica aunque existen puntos comunes. En concreto, podemos generalizar que las cepas de ambos hospitales presentaban fenotipos de multirresistencia y una sensibilidad total a la colistina.

Además, aunque en ambos hospitales se encontró una amplia diversidad clonal caracterizada por una variedad de patrones de bandas de PFGE (35 en las 61 cepas del HSP y 64 en las 87 cepas del HCULB); cuando se realizó el estudio de MLST, todas las cepas se agruparon en pocas secuencias tipo (4 para las 61 cepas del HSP y 5 para las 87 cepas del HCULB).

Fijándonos en los estudios de integrones, podemos destacar la elevada presencia de integrones de clase I en todas las cepas clínicas (67% en HSP y 75% en HCULB). Además, la presencia de genes asociados con la resistencia a aminoglucósidos dentro de la región variable de estas estructuras se manifiesta por igual en ambos hospitales, encontrando los integrones formados por *aadB-2* y *aac(3)-Ia+aadA-1h* en los dos centros. Pero, la diferencia se observa en la cantidad y variabilidad de estructuras encontradas; mientras en el HSP de Logroño se apreciaban 4 estructuras diferentes y un único integrón por cepa positiva, en el HCULB de Zaragoza se observaron hasta 12 estructuras distintas y en 32 de las 65 cepas positivas se halló más de un integrón en su interior.

Por último, hablaremos de las alteraciones encontradas en la porina OprD de todas las cepas clínicas analizadas. Lo más destacable es el gran polimorfismo de esta proteína, manifestado en la gran cantidad de patrones encontrados: 24 para HSP y 26 para HCULB; donde, solamente 4 patrones fueron compartidos por ambos hospitales. En el HSP de Logroño pudimos amplificar por PCR la secuencia del gen *oprD* en las 61 cepas estudiadas mientras que en el HCULB de Zaragoza hubo 5 cepas (de 87) que no pudieron ser analizadas. Común en las colecciones de los dos hospitales es la aparición de codones de finalización prematuros en diferentes localizaciones de la proteína (59% y 70%, respectivamente). También es destacable que en ambos hospitales se encontraron cepas (dos en cada uno) con la secuencia de OprD interrumpida por distintas secuencias de inserción (IS) de gran tamaño (entre 1000 y 1500 pb), las cuales fueron descritas por primera vez en este estudio y depositadas en GenBank, como se ha comentado anteriormente.

Para finalizar, es importante remarcar la asociación: ST175/integrón *aadB-2* (PcH1)/patrón F (OprD), detectada en ambos hospitales y con una gran representación en el HSP de Logroño.

Con el fin de tener una visión más clara de las principales características de todas las cepas (clínicas y no clínicas) analizadas hasta el momento en esta tesis se presenta a continuación una tabla resumen (**Tabla 43**):

TABLA 43.- Resumen de las muestras estudiadas en esta tesis.

	Clínicas			No clínicas			
	Origen	HSP (Logroño)	HCULB (Zaragoza)	Sanos (fecales)	Caballos (fecales)	Carnes	Verduras (tomates y pimientos)
Período	Sept 2008-Dic 2011 (91 aislados)	Junio 2008-Oct 2010 (123 aislados)		Sept 2010-Enero 2011 Agosto 2011 (2ª toma)	Febrero 2012	Junio 2011 y Julio 2012	Julio 2012
Cepas / muestras	61 cepas (60 pacientes)	87 cepas (80 pacientes)		98 muestras (8 positivas)	73 muestras (0 positivas)	62 muestras (2 positivas)	59 muestras (13 positivas)
Especie	Todas <i>P. aeruginosa</i>	Todas <i>P. aeruginosa</i>		Todas <i>P. aeruginosa</i> (10 aislados)	No se encontraron <i>Pseudomonas</i> spp.	1 <i>P. aeruginosa</i> 1 <i>P. putida</i>	8 especies de <i>Pseudomonas</i> spp. (18 aislados)
Fenotipo	Multirresistencia (carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas)	Multirresistencia (carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas)		Sensibles a todos los antibióticos testados		<i>P. aeruginosa</i> sensible a todo <i>P. putida</i> resistente a TIC y ATM	TIC (89%), ATM (28%), FEP (11%), IPM (11%), MEM (6%), DOR (6%)
MBL	No	Sí (<i>bla_{VIM-2}</i>)		No		No	No
Integrón	Sí, clase I	Sí, clase I		No		No	Sí, clase I (Ps158)
MILST	ST175, ST235, ST308, ST639	ST111, ST175, ST235, ST253, ST973		ST245, ST253, ST254, ST274, ST663, ST1059		ST270	ST17, ST800, ST1455, ST1456
Patrones OprD	A, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, a, b	A, B, D, F, N, W, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v		A, B, C, D		B	A, E

3.-Localización cromosómica o plasmídica del gen *bla*_{VIM-2}

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, se consideró de interés estudiar la localización genética del gen *bla*_{VIM-2}, bien en cromosoma (normalmente asociada a transposones) o bien en elementos genéticos móviles (como son los plásmidos). Esta tarea se realizó gracias a una estancia breve de 4 meses en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Son Espases (HUSE) de Palma de Mallorca, bajo la dirección y supervisión de los Dres. Antonio Oliver y Carlos Juan. Para ello, se seleccionaron 13 cepas portadoras del gen *bla*_{VIM-2} del HCULB de Zaragoza (**Tabla 44**).

TABLA 44.- Características principales de las 13 cepas seleccionadas para el estudio de localización cromosómica o plasmídica del gen *bla*_{VIM-2}.

Cepa	PFGE	MLST	Integrones	Patrón OprD ^a
Ps12	R28	ST235	<i>aac(6′)-Ib′+bla</i> _{VIM-2}	f
Ps32	R11a	ST235	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h</i> <i>bla</i> _{VIM-2}	c
W335	R13	ST235	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h</i> <i>bla</i> _{VIM-2}	c
W334	R13	ST235	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA-1h</i> <i>bla</i> _{VIM-2}	c
Ps27	R23	ST235	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA-1h bla</i> _{VIM-2}	e
Ps60	R25	ST235	<i>aac(6′)-Ib′+orfD</i> <i>bla</i> _{VIM-2}	e
W343	R24	ST235	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h+ISPa34</i> <i>bla</i> _{VIM-2}	e
W378	R26	ST235	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA-1h</i> <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aac(6′)-Ib′+aadA1+ISPa34//</i>	e
W336	R27	ST235	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA-1h</i> <i>bla</i> _{VIM-2} <i>bla</i> _{VIM-2} + <i>aac(6′)-Ib′+aadA1+ISPa34+ bla</i> _{VIM-2}	e
Ps56	R30	ST175	<i>aadB-2</i> <i>bla</i> _{VIM-2}	A
Ps24	R5	ST973	<i>bla</i> _{VIM-2}	A
W340	R10	ST973	<i>bla</i> _{VIM-2}	d
W368	R3c	ST973	<i>bla</i> _{VIM-2}	g

^aClasificación acorde a **Tabla 41**.

En primer lugar, se llevó a cabo la discriminación cromosómica o plasmídica mediante los experimentos de digestión enzimática con las enzimas de restricción nucleasa S1 e *I-Ceu-I* y posterior PFGE. A continuación, se realizaron Southern blotting e hibridaciones con dos sondas específicas: 1) gen *bla_{VIM-2}* y 2) 16S rDNA. El resultado obtenido fue que las 13 cepas tenían una codificación cromosómica del gen *bla_{VIM-2}* ya que tanto las sondas de *bla_{VIM-2}* como 16S rDNA hibridaron en los fragmentos cromosómicos obtenidos con *I-Ceu-I*—PFGE.

A raíz de estos resultados y considerando que los genes *bla_{VIM-2}* de las cepas portadoras se encontraban dentro de integrones de clase 1, nos propusimos completar el entorno más cercano de este gen de resistencia adquirido. Se realizó el estudio de los transposones basándonos en descripciones encontradas en la bibliografía (Tato *et al.*, 2010). A excepción de dos cepas (Ps12 y W378) que no pudimos determinar, el resto de cepas albergaban el gen *bla_{VIM-2}* en diferentes variantes del transposón Tn21 (Figura 53) (Liebert *et al.*, 1999), que está compuesto por 3 regiones claramente diferenciadas: 1) genes de transposición (principalmente *tnpA* y *tnpR*), 2) integrón completo (integrasa, casetes génicos, segmento 3'conservado y módulo *tni*), y 3) operón *mer*.

En la Figura 54 se pueden ver las diferentes variantes del transposón Tn21 encontradas entre nuestras 11 cepas seleccionadas. En dicha figura se puede comprobar que no se obtuvieron resultados positivos para el operón *mer* entre nuestras cepas.

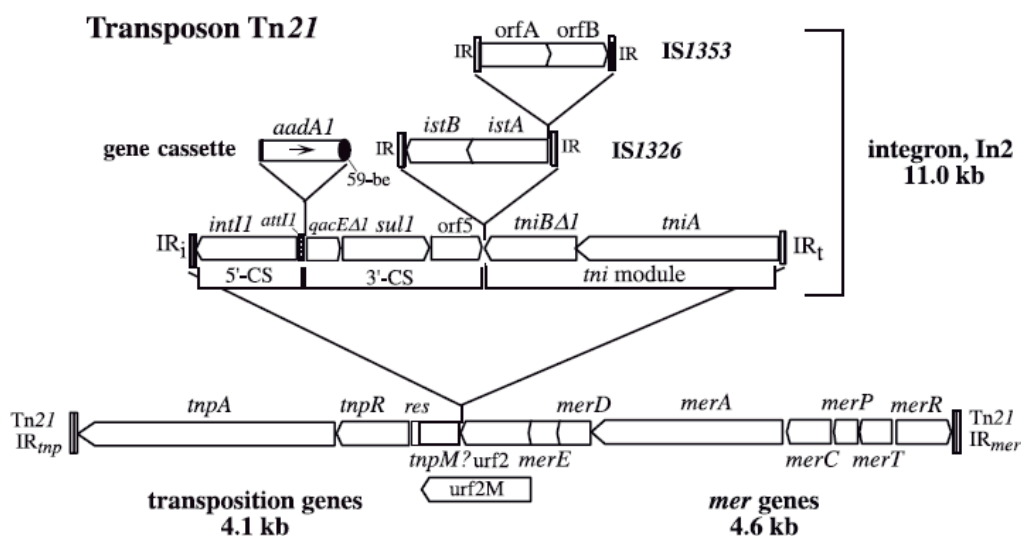
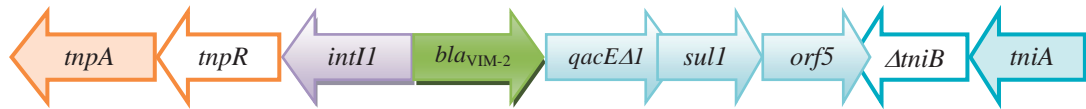


Figura 53.- Estructura del transposón Tn21 (imagen tomada de Liebert *et al.*, 1999).

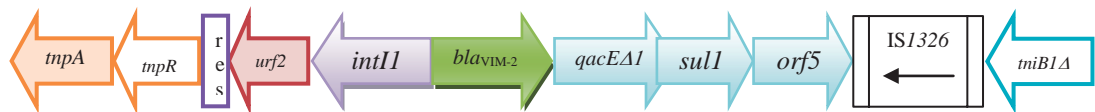
Estructura encontrada en las cepas: Ps24 y W368



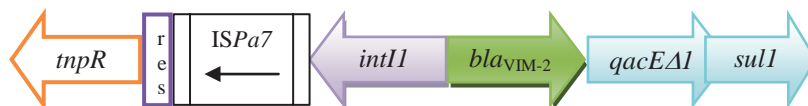
Estructura encontrada en la cepa: Ps27



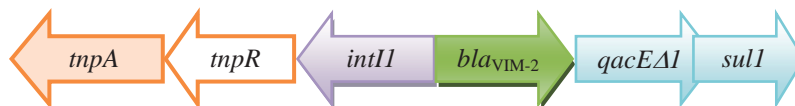
Estructura encontrada en la cepa: Ps56



Estructura encontrada en las cepas: Ps60 y W336



Estructura encontrada en las cepas: W340 y W343



Estructura encontrada en las cepas: Ps32, W334 y W335

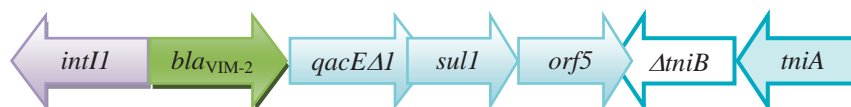


Figura 54.- Variantes del transposón Tn21 encontradas en nuestras 11 cepas.

4.- Análisis de la estabilidad de la resistencia a imipenem en ausencia de presión antibiótica

El último objetivo que nos planteamos, fue analizar la estabilidad de la resistencia a imipenem a lo largo del tiempo, en ausencia de cualquier presión selectiva de antibióticos, usando para ello cepas clínicas procedentes del HCULB de Zaragoza. Con este fin, se seleccionaron 3 cepas (Ps12, Ps56 y W336) que albergaban el gen *bla*_{VIM-2}, contenían diferentes integrones y, además, presentaban diferentes alteraciones en la proteína OprD. A ellas, se les sumó una cuarta cepa (Ps33), que aún careciendo del gen *bla*_{VIM-2} y de integrones, presentaba resistencia a imipenem porque tenía truncado el gen *oprD* por la nueva secuencia de inserción *ISPa45*.

Se dio pase a las 4 cepas en medio BHI agar sin antibiótico durante 100 días consecutivos. Tras realizar las pruebas precisas explicadas en el **apartado 11** de la sección Material y Métodos, no se observó ningún cambio entre el fenotipo y/o el genotipo detectados en el pase 0 y en el 100 de las 4 cepas analizadas (**Figuras 55 y 56**). Por tanto, las mutaciones cromosómicas y los determinantes adquiridos por *P. aeruginosa* respecto a la resistencia a imipenem permanecieron inalterables en el tiempo sin presión antibiótica.

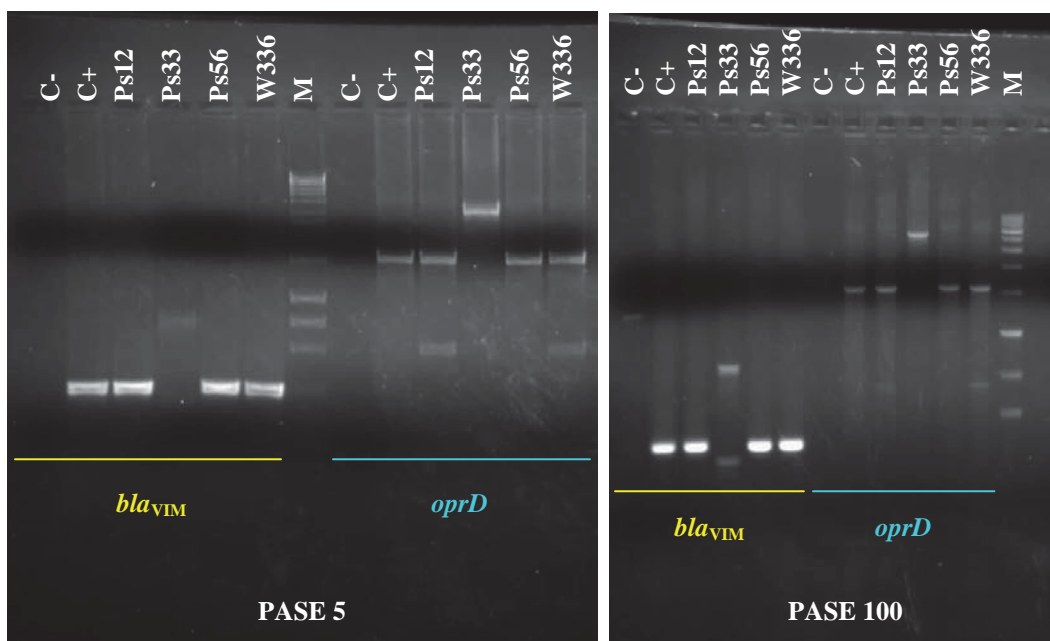


Figura 55.- Resultados de las PCR del gen *oprD* y el gen *bla*_{VIM} en el día 5 y el día 100 de las cuatro cepas seleccionadas.

PASE 1 vs PASE 100

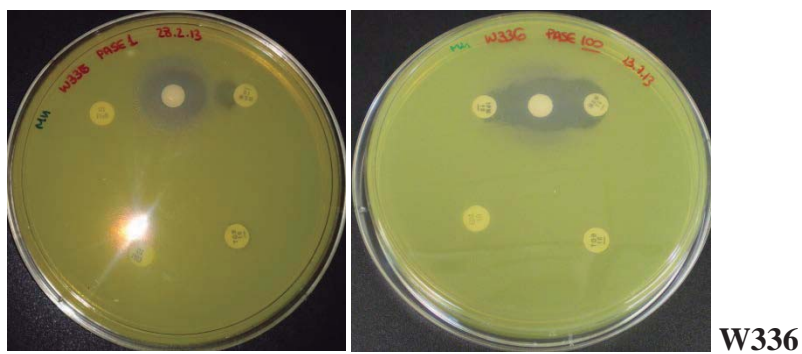
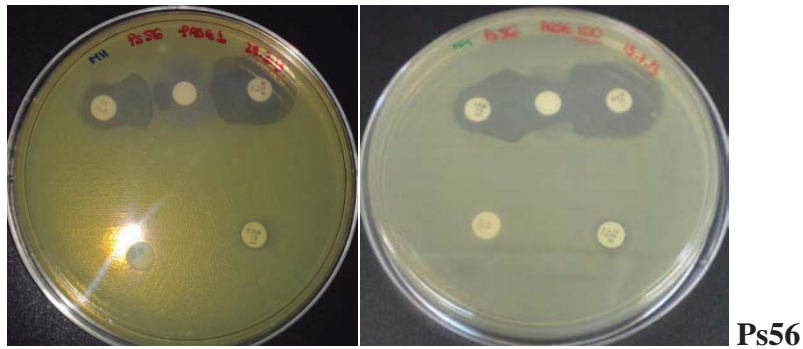
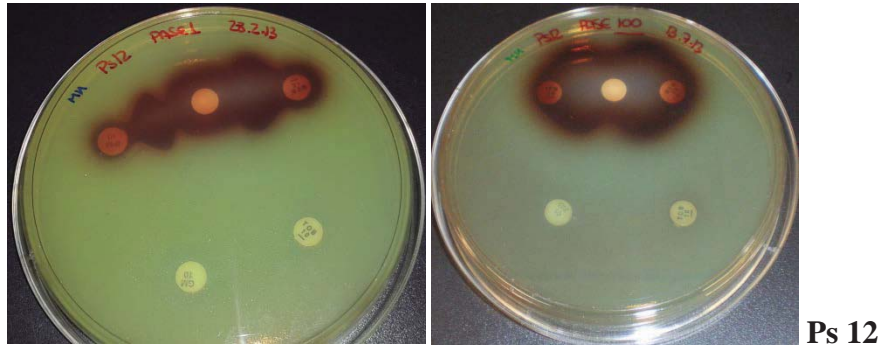


Figura 56.- Inalterabilidad de los resultados de los antibiogramas realizados a las 4 cepas seleccionadas durante los 100 días.

5.- Otros casos clínicos de interés

Se estudiaron también dos casos clínicos de interés. Estas cepas fueron detectadas en sus hospitales de procedencia durante el análisis de rutina y se enviaron a nuestro laboratorio para un estudio más exhaustivo.

5.1.- Cepa *P. aeruginosa* W37

Se analizó una cepa clínica de *P. aeruginosa* (W37) aislada de una muestra de orina de un hombre ingresado en el HSP de Logroño en el primer trimestre del 2007. Dicha cepa presentaba un probable fenotipo metalo-beta-lactamasa (MBL).

Por el método de difusión por disco, esta cepa presentó un fenotipo de multirresistencia siendo sensible únicamente a ceftazidima, amikacina y colistina, y mostrando sensibilidad intermedia a cefepime, aztreonam y ciprofloxacina. Por el método de dilución en agar, se determinaron los valores de CMI de los antibióticos IPM y MEM siendo >256 y $64 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Para confirmar el fenotipo MBL se realizaron dos pruebas: la tira comercial Etest y el test sinérgico de doble disco; en ambos casos se obtuvo un resultado positivo (**Figura 57**).

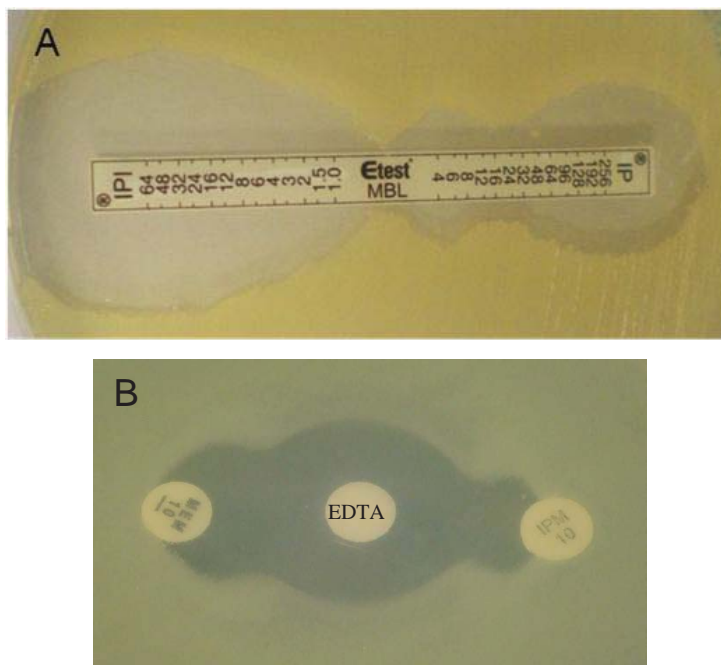


Figura 57.- Resultados de las pruebas de la tira comercial Etest (A) y el test sinérgico de doble disco (B) para la confirmación del fenotipo MBL en la cepa W37.

Los genes asociados a este fenotipo MBL así como la presencia de integrones de clase 1 y 2 fueron analizados por PCR y posterior secuenciación; justificando la alta resistencia encontrada a los antibióticos carbapenémicos con la detección de 3 copias del gen *bla_{VIM-2}* dentro del material genético de nuestra bacteria. Todas las copias estaban albergadas dentro de integrones de clase 1 y tenían una localización cromosómica; ésta fue estudiada por experimentos de digestión enzimática seguidos de Southern blotting e hibridaciones con sondas específicas: *bla_{VIM-2}* y 16S rDNA.

Hay que destacar que dos de las copias del gen *bla_{VIM-2}* estaban dentro de una misma estructura, mientras que la otra copia era el único casete génico presente en la región variable del otro integrón de clase 1 (**Figura 58**).

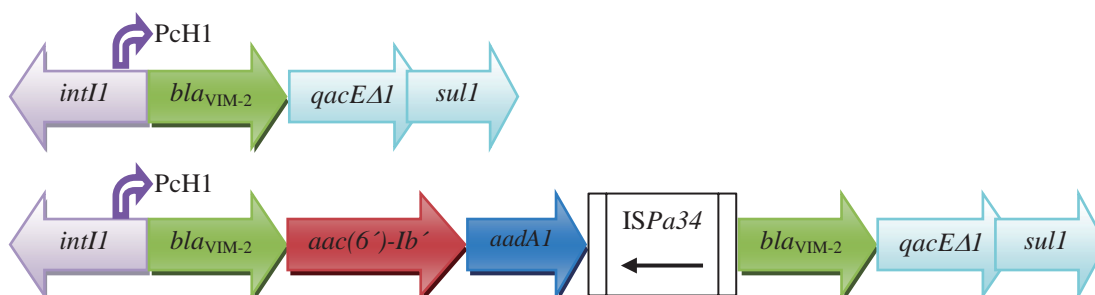


Figura 58.- Estructuras de los integrones de clase 1 que albergan las 3 copias del gen *bla_{VIM-2}* en la cepa clínica *P. aeruginosa* W37.

El tamaño del integrón que albergaba las dos copias del gen *bla_{VIM-2}* era de 5429 pb y contenía, además, una nueva secuencia de inserción *ISPa34*, perteneciente a la familia *IS110* cuya transposasa de 352 aa tenía una similitud del 62% con la transposasa de *IS1618*. Ésta fue depositada en la base de datos de secuencias de inserción “ISFinder” y, como hemos mencionado anteriormente, se localizó en otras cepas clínicas del HCULB de Zaragoza. La secuencia completa de este integrón fue introducida en GenBank cuyo número de acceso es GU354325.

Los dos integrones de clase 1 encontrados en esta cepa presentaban el mismo promotor: híbrido 1 (PcH1); caracterizado por las secuencias TGGACA y TAAACT en las posiciones -35 y -10, respectivamente. Esta variante de promotor está asociada con una débil expresión de los casetes génicos pero una fuerte eficacia en la escisión de los mismos; otorgando a la bacteria una ventaja de reorganización de los casetes génicos en función de las diferentes presiones antibióticas a las que pueda exponerse.

Molecularmente esta cepa fue adscrita a ST973, cuya combinación alélica (*acsA6*, *aroE5*, *guaA6*, *mutL5*, *nuoD4*, *ppsA94*, *trpE7*) fue descrita por primera vez en este estudio y depositada en la página de MLST de *P. aeruginosa*. Esta nueva secuencia tipo se asoció con otras cepas clínicas del HCULB de Zaragoza.

Se estudiaron las alteraciones en la porina OprD por PCR, secuenciación y comparación con la secuencia de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank: AE004091). Se obtuvieron una gran cantidad de alteraciones: D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L y L7-corto; el conjunto del cual hemos denominado patrón A de OprD a lo largo de esta tesis y que al parecer no son relevantes en cuanto a aumento de resistencia de los antibióticos carbapenémicos se refiere.

5.2.- Cepa *P. aeruginosa* Ps121

Por último, un caso clínico de 2012 procedente del HCULB de Zaragoza donde se detectó una coinfección por *P. aeruginosa* (Ps121) y *Citrobacter freundii* (W1052), ambas cepas presumiblemente productoras de MBL. Las dos fueron aisladas de una herida quirúrgica de un paciente, receptor de transplante hepático, que sufrió una hemorragia digestiva y tuvo que ser intervenido con una resección gástrica y que había sido tratado con diversos antibióticos, entre los que se encontraba imipenem. Se pensó en una posible transferencia “*in vivo*” de elementos genéticos que conferirían resistencia a los carbapenémicos entre especies de diferentes familias.

Tras el análisis fenotípico por el método de difusión por disco, ambas cepas se clasificaron como multirresistentes, siendo únicamente sensibles a cefepime, amikacina y colistina. Se detectaron los valores de CMI por el método de dilución en agar a 2 familias de antibióticos: beta-lactámicos y fluoroquinolonas. Ambas cepas presentaron similitudes en los valores de CMI de los antibióticos beta-lactámicos (≥ 256 $\mu\text{g/ml}$, tanto para ceftazidima como para imipenem) mientras que en el caso de las fluoroquinolonas no fue así. La cepa Ps121 era resistente tanto a ciprofloxacina como a norfloxacina (con valores de 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) pero en el caso de la cepa W1052 los valores fueron de 0,5 y 4 $\mu\text{g/ml}$, mostrando una clara sensibilidad para estos antibióticos.

Por test sinérgico de doble disco se estudiaron los fenotipos MBL, BLEE y carbapenemasas de clase A; obteniendo exclusivamente un resultado positivo para el fenotipo MBL en ambas cepas. Por PCR múltiple se determinó que las dos cepas contenían alguna variante del gen codificante del grupo VIM.

A la vez que se estudió por PCR y secuenciación la presencia de integrones (de clase 1, 2 y 3) en estas cepas, se localizó en el interior de ambas al menos una copia del gen *bla*_{VIM-2}. Para nuestra sorpresa, aunque todas estaban dentro de la región variable de un integrón de clase 1, la estructura era completamente diferente. En la cepa Ps121 se encontraron los dos mismos integrones descritos en el caso clínico anterior (cepa W37, **apartado 5.1** de la sección Resultados) albergando 3 copias del gen *bla*_{VIM-2} (**Figura 59**); mientras que en la cepa W1052 no se pudo completar la estructura porque carecía del segmento 3' conservado (**Figura 59**).

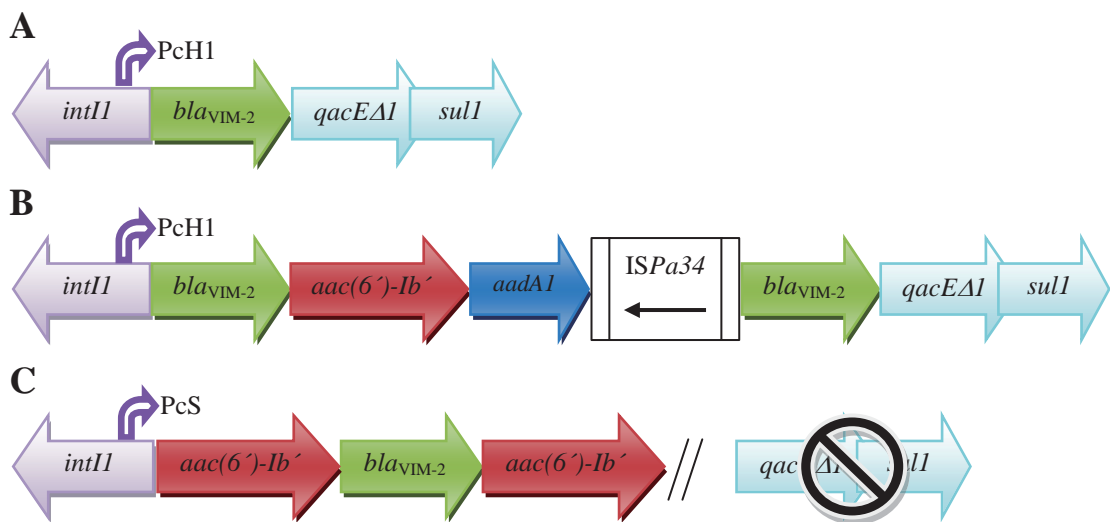


Figura 59.- Estructuras de los integrones de clase 1 que albergan los genes *bla*_{VIM-2} en la cepa de *P. aeruginosa* Ps121 (**A** y **B**) y en la cepa de *C. freundii* W1052 (**C**).

A través de experimentos de digestión enzimática seguidos de Southern blotting e hibridaciones con sondas específicas, se detectó una localización cromosómica del gen *bla*_{VIM-2} en el caso de la cepa Ps121. Mientras que en la cepa W1052 se observó una hibridación de *bla*_{VIM-2} de localización cromosómica, pero también plasmídica.

Resultados

Entonces se realizó un estudio molecular más profundo para la cepa de *P. aeruginosa* Ps121. Por MLST se descubrió que esta cepa también estaba adscrita a la ST973. Como presentaba tantas similitudes con la cepa W37, se decidió realizar un análisis del perfil de bandas conjunto de ambas cepas por la técnica de PFGE. El resultado obtenido (**Figura 60**) fue que eran diferentes entre sí (según los criterios de Tenover *et al.*, 1995).

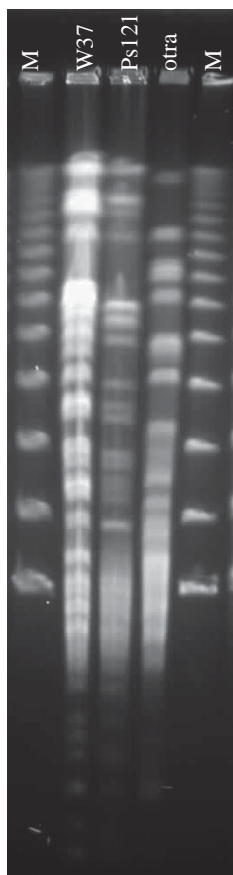


Figura 60.- Foto de PFGE con las cepas de *P. aeruginosa* W37 y Ps121 de los casos clínicos analizados.

El estudio de las alteraciones en la porina OprD por PCR seguida de secuenciación y comparación con la cepa control PAO1, mostró una proteína no funcional debido a un codon de finalización prematuro en el aminoácido 65; además de las sustituciones previas D43N, S57E y S59R. Este patrón de OprD no había sido descrito anteriormente en esta tesis.

Discusión

DISCUSIÓN

Pseudomonas es un género bacteriano amplio, ubicuo y con escasos requerimientos nutritivos para su crecimiento. El género *Pseudomonas* se encuentra ampliamente disperso por el medioambiente (Lister *et al.*, 2009) siendo, además, la especie *P. aeruginosa* uno de los patógenos oportunistas más frecuentes en infecciones nosocomiales (Mehri *et al.*, 2011; Shimada & Matsumura, 2014). *P. aeruginosa* tiene, por un lado, una alta resistencia intrínseca a varias familias de antibióticos y, por otro, una extraordinaria capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, incluso durante un tratamiento antibiótico, lo que hace complicado encontrar alternativas terapéuticas (Breidenstein *et al.*, 2011; Juan & Oliver, 2010).

Los seres humanos, los animales, los alimentos y el medioambiente han sido descritos como diferentes reservorios de bacterias que albergan genes de resistencia a antibióticos que pueden ser transferidos o movilizados a patógenos humanos. Además, el mal uso y el abuso de estos antibióticos tanto en clínica como en producción animal y en agricultura, han podido contribuir a la selección y difusión de estos patógenos humanos (Rolain, 2013).

El pasado 30 de abril de 2014 fue presentado en Ginebra el primer informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la resistencia microbiana a los antibióticos, donde se ponía de manifiesto la grave amenaza que supone para la salud pública a nivel global. Por tanto, el estudio de la resistencia a los antibióticos en bacterias que producen infecciones (tanto en humanos como en animales) se ha convertido en una prioridad para la población. Este problema de la resistencia a antibióticos en *Pseudomonas* spp., principalmente en *P. aeruginosa*, ya venía siendo un importante motivo de preocupación en salud pública, como comentó Livermore (2002) en uno de sus artículos cuyo título es muy sugerente: “Múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*: ¿Nuestra peor pesadilla?” (título original: “Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?”). Para conseguir unos resultados efectivos frente a esta problemática, se precisa evaluar y conocer en profundidad el fenómeno para buscar soluciones o, al menos, controlar su desarrollo.

Por ello, en esta tesis se ha realizado un estudio epidemiológico incluyendo cepas de *Pseudomonas* tanto de origen clínico como de muestras fecales de animales sanos, muestras fecales de personas sanas y muestras de alimentos, para conocer los fenotipos de resistencia a distintos antibióticos, caracterizar los mecanismos implicados, detectar los integrones y determinar las relaciones clonales de las cepas de los diferentes nichos ecológicos. De este modo, el punto de vista global empleado en la realización de esta tesis, nos permite comparar los fenotipos y genotipos de resistencia de los distintos nichos ecológicos y evaluar su clonalidad, diseminación y posible importancia en salud humana.

En la literatura existen estudios donde se analizan diferentes muestras ambientales y se detectan *Pseudomonas* spp. (Franzetti & Scarpellini, 2007; García-López *et al.*, 2004; Mehri *et al.*, 2011; Remold *et al.*, 2011; Wiedmann *et al.*, 2000). Sin embargo, escasos son aquellos estudios que además determinan la sensibilidad a los antibióticos que presentan los aislados obtenidos (Marathe *et al.*, 2013; Slekovec *et al.*, 2012); y, prácticamente nulos son los que comparan las líneas genéticas más relevantes (Kidd *et al.*, 2012; Slekovec *et al.*, 2012). Por todo esto, el primer objetivo de esta tesis fue analizar la prevalencia de *Pseudomonas* spp. aisladas de muestras de diferentes orígenes (personas y animales sanos o alimentos tanto de origen cárnico como vegetal), así como caracterizar el fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos y llevar a cabo la tipificación molecular de las cepas.

Durante el período de septiembre de 2010 a enero de 2011, se recogieron 98 muestras fecales de personas sanas, de las que se aislaron 8 cepas de *P. aeruginosa*. El porcentaje de *P. aeruginosa* (8,2%) encontrado en estas muestras está acorde con el rango descrito previamente en individuos sanos (2,6-24%) por otros autores (Kerckhoffs *et al.*, 2011; Lister *et al.*, 2009). Entre las 8 cepas de *P. aeruginosa* analizadas, se obtuvieron cinco perfiles clonales distintos por PFGE y cinco secuencias tipo diferentes. Por un lado, dos de las cepas (Ps5 y Ps6) mostraron patrones de bandas indistinguibles (P4 en PFGE) y compartieron una nueva secuencia tipo (ST1059). Ambas cepas fueron aisladas de dos voluntarios relacionados familiarmente (padre e hijo). Por otro lado, otras tres cepas compartieron el mismo patrón de bandas en PFGE (P6) y la misma secuencia tipo (ST253), donde dos de ellas (Ps87 y Ps88-1) pertenecían a un matrimonio que

compartía hogar; mientras que la tercera cepa (Ps86) no tenía relación alguna con ellos. Bien es cierto que esta secuencia tipo pertenece al complejo clonal PA14, que está muy diseminado tanto en el entorno hospitalario como en el medioambiente (Kidd *et al.*, 2012).

Una nueva muestra fecal tomada 7 meses después (agosto de 2011), en los 8 individuos sanos que habían dado positivo en *P. aeruginosa* en el estudio previo, mostró que únicamente dos de ellos continuaba siendo positiva para esta especie. Es importante remarcar que uno de los casos (Ps88-2) correspondía al mismo clon y la misma secuencia tipo que la aislada inicialmente, una característica que suele darse en pacientes crónicos colonizados con esta bacteria a los cuales se les toman muestras de forma continua en períodos de tiempo concretos (López-Causapé *et al.*, 2013); mientras que en el otro caso (Ps4-2) presentaba un patrón de bandas de PFGE y una secuencia tipo totalmente distintos de la cepa aislada en la primera toma de muestras de ese mismo individuo. Esto se podría interpretar como un caso de recolonización con diferente bacteria. Por otro lado, la ausencia de *P. aeruginosa* en la segunda toma de muestra fecal de los otros 6 individuos podría reflejar una colonización transitoria por este microorganismo.

En los últimos años, la diseminación de clones de alto riesgo en la especie *P. aeruginosa* ha desempeñado un papel primordial en la expansión de la resistencia a nivel mundial (Woodford *et al.*, 2011). El análisis de las secuencias tipo por la técnica de MLST permite conocer la tipificación molecular de nuestras cepas de individuos sanos y compararlas con esos clones epidémicos y ambientales distribuidos alrededor del mundo. Existen más de 1800 ST de *P. aeruginosa* registradas en la base de datos PubMLST (a fecha 27 de junio de 2014); y entre los clones de alto riesgo diseminados por los hospitales de todo el mundo, las secuencias tipo ST235, ST111 y ST175 son las más distribuidas, normalmente asociados con cepas multirresistentes, resistentes a carbapenémicos y/o productoras de MBL (Cabot *et al.*, 2012; García-Castillo *et al.*, 2011; Gomila *et al.*, 2013), pero ninguna de nuestras cepas procedentes de muestras fecales de individuos sanos estaba adscrita a estas secuencias tipo. Observando la diversidad de secuencias tipo detectadas entre las cepas sensibles de nuestros individuos sanos, ST245, ST253, ST254 y ST274 son encontradas en diferentes grupos BURST determinados por el análisis eBURST de

1070 ST de la base de datos PubMLST realizado por Kidd y colaboradores (2012). La ST1059 es un singleton, y la ST663 comparte un grupo BURST con ST131 (Kidd *et al.*, 2012). Tanto ST245 como ST253, ST254 o ST274 han sido descritas en la bibliografía en cepas de *P. aeruginosa* sensibles a carbapenémicos (Cabot *et al.*, 2012; Slekovec *et al.*, 2012), pero, además, ST245, ST253 y ST274 también han sido asociadas con cepas resistentes, incluso multirresistentes (Cabot *et al.*, 2012; García-Castillo *et al.*, 2011; Woodford *et al.*, 2011). Las cepas con ST274 y ST253 están asociadas con pacientes de fibrosis quística y otros muchos entornos ecológicos (Kidd *et al.*, 2012). De hecho, ST274, previamente descrita en aislados de pacientes de distintos países europeos y Australia (según la base de datos PubMLST), es un clon epidémico de fibrosis quística que circula por España (Cabot *et al.*, 2012; Fernández-Olmos *et al.*, 2013; García-Castillo *et al.*, 2011; López-Causapé *et al.*, 2013). Además, es importante remarcar que ST253 pertenece al complejo clonal PA14, como ya se comentó; y éste fue detectado con anterioridad en cepas de *P. aeruginosa* de origen humano (pacientes con fibrosis quística y otras enfermedades), animal y medioambiental (Kidd *et al.*, 2012; Wiehlmann *et al.*, 2007). Cabe destacar que fue la secuencia tipo más prevalente en nuestro estudio y la tercera en un estudio realizado en un hospital público español (Gomila *et al.*, 2013). En ambos casos, se incluyeron cepas no multirresistentes.

Las 10 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras fecales de individuos sanos fueron sensibles a los 15 antibióticos anti-pseudomónicos testados, lo que contrarresta los frecuentes artículos de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes aisladas de muestras clínicas. Es normal que la especie *P. aeruginosa* dificulte la selección adecuada de tratamiento antibiótico en el ámbito hospitalario debido a su gran habilidad para desarrollar fenotipos multirresistentes, incluso durante el transcurso de la infección (Lister *et al.*, 2009; Woodford *et al.*, 2011). Sin embargo, los aislados obtenidos de muestras fecales de personas sanas en esta tesis eran sensibles a los antibióticos analizados, aparentemente por la ausencia de presión antibiótica y probablemente porque provengan de fuentes ambientales.

Las estructuras de integrones son frecuentes entre las cepas clínicas. Éstas les permiten almacenar, como casetes génicos en su región variable, genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos. En *P. aeruginosa* se encuentran principalmente

genes de resistencia a aminoglucósidos; sin embargo, ninguna de nuestras 10 cepas albergaba estas estructuras, al igual que describen Ruiz-Martínez y colaboradores (2011b) en su trabajo sobre cepas de *P. aeruginosa* ambientales.

Por otro lado, la porina OprD es un canal específico de sustrato que sirve como entrada a la mayoría de las moléculas pequeñas, entre las que se encuentran los antibióticos carbapenémicos (Lister *et al.*, 2009; Wolter *et al.*, 2004). La pérdida de esta porina debida a codones de finalización prematuros, inserciones/delecciones de una o más pares de bases o, incluso, la presencia de secuencias de inserción truncando el gen *oprD* confieren resistencia a los carbapenémicos en la especie *P. aeruginosa* (Lister *et al.*, 2009; Wolter *et al.*, 2004). Como cabría esperar, ninguno de estos casos descritos ha sido observado entre las 10 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de individuos sanos. Sin embargo, sí se han detectado otras muchas alteraciones respecto de la cepa de referencia PAO1; aunque fueran sensibles o con sensibilidad reducida a los antibióticos carbapenémicos: imipenem (rango 1-4 µg/ml), meropenem (rango 0,125-2 µg/ml) y doripenem (rango 0,094-0,75 µg/ml). Las alteraciones detectadas en la OprD de las 10 cepas, se agruparon en 4 grupos (A-D). El grupo A detectado en 3 cepas (Ps2, Ps4-1 y Ps4-2) ya había sido detectado en cepas sensibles como la cepa control ATCC27853 y la cepa LESB58 (nº acceso en GenBank FM209186). Las delecciones de dos aminoácidos en el *loop7* (denominado como L7corto) se han encontrado en las cepas con OprD de los grupos A y B, englobando la mitad de nuestras cepas, y también han sido descritas anteriormente por otros autores en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Los cambios aminoacídicos de los grupos A y C se observaron en cepas clínicas sensibles a carbapenémicos en el estudio de Ocampo-Sosa y colaboradores (2012); mientras que las alteraciones del grupo D se detectaron tanto en cepas resistentes como sensibles a los carbapenémicos en los dos estudios mencionados (Ocampo-Sosa *et al.*, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Todas estas alteraciones en la proteína OprD no deberían ser causa de pérdida de la función de la misma y consecuentemente tampoco afectar a los niveles de sensibilidad a los antibióticos carbapenémicos, por lo que otras alteraciones o, incluso, otros mecanismos (como la sobre-expresión de las bombas de eflujo o la hiperproducción de AmpC) son los implicados en la resistencia a esta familia de antibióticos.

Como una primera conclusión y de acuerdo con todos los resultados obtenidos hasta el momento, las muestras fecales de individuos sanos se asemejan a cepas de entornos medioambientales/no clínicos, pero se podría considerar como una fuente de linajes genéticos relevantes en la especie *P. aeruginosa*. La mayoría de las secuencias tipo detectadas están relacionadas genéticamente con clones epidémicos españoles o globamente diseminados, como ST274 y ST253. Aunque se detectó el fenotipo sensible en todas nuestras cepas, podrían ser capaces de adquirir elementos genéticos que les permitieran adaptarse al ambiente clínico y dificultar el tratamiento terapéutico de éxito en pacientes inmunodeprimidos. Se puede decir que son necesarias más investigaciones en cepas medioambientales/no clínicas para comprender mejor la relación de *P. aeruginosa* con un perfil de sensibilidad a los antibióticos muy particular, y su diseminación clonal entre los entornos clínicos y otros ambientes diferentes.

Por otra parte, entre las 73 muestras fecales de caballos sanos analizadas en esta tesis no se encontró ningún aislado de *Pseudomonas* spp. En la bibliografía, se encuentran trabajos que describen las heces de mamíferos como una posible fuente de *P. aeruginosa* (Vives-Flórez & Garnica, 2006), pero siempre en un porcentaje muy bajo (Costa *et al.*, 2012); aunque, normalmente, esta especie está más presente en animales con algún tipo de enfermedad. Algunos ejemplos de estas enfermedades son otitis externa en perros (Bugden, 2013), mastitis bovina (Daly *et al.*, 1999) o endometritis en yeguas (Allen *et al.*, 2011). En relación a los caballos, *P. aeruginosa* puede estar presente en sus genitales en porcentajes que oscilan entre el 4% y 10% en la yeguas mientras que en los sementales puede llegar a alcanzar el 36% (Tiago *et al.*, 2012). Este género también ha sido estudiado en otros animales, obteniéndose datos realmente curiosos. Por ejemplo, Brittingham y colaboradores (1988) analizaron la prevalencia de seis géneros bacterianos en muestras cloacales de pájaros carpinteros y pájaros cantores en libertad, encontrando un 22% de *Pseudomonas* spp. entre ellas. En este sentido, el estudio de Dickinson y colaboradores (2001) en muestras fecales y nasales de tortugas, también libres, en un desierto de Arizona mostró una elevada prevalencia de *Pseudomonas* spp. entre animales enfermos (> 25%). Con todo esto, es posible que no se obtuviera ninguna

muestra positiva debido a que se trataban de animales sanos y que probablemente esta especie esté en mayor proporción en otros lugares, como la zona genital.

El género *Pseudomonas* contribuye al deterioro de diferentes clases de alimentos como productos lácteos (Wiedmann *et al.*, 2000), vegetales (es muy conocida la patogenicidad de *P. syringae* en vegetales) (Bao *et al.*, 2014) o pescado fresco (García-López *et al.*, 2004). El consumo de alimentos crudos contaminados con estas especies bacterianas podría producir serios problemas de salud humana. Además, la especie *P. aeruginosa* ha sido reconocida como un agente infeccioso transmitido por la comida y el agua (Wiedmann *et al.*, 2000) y que puede producir enfermedad tanto en humanos como en animales o plantas (Tashiro *et al.*, 2013). En nuestro caso, las muestras de origen alimentario estudiadas para esta tesis fueron adquiridas en establecimientos de venta o de producción propia para el consumo; ninguna de ellas presentaba deterioro alguno en su apariencia a simple vista.

Las muestras de alimentos (tanto de origen vegetal como cárnico) se diferencian principalmente de las muestras de individuos sanos analizadas en la prevalencia y diversidad de especies de *Pseudomonas* encontradas. Por ejemplo, en los individuos sanos únicamente encontramos la especie *P. aeruginosa* en un 8,2% de las muestras, mientras que en los vegetales se obtuvo un 22% de muestras positivas para el género *Pseudomonas* detectándose hasta 8 especies diferentes (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. nitroreducens*, *P. fulva*, *P. mosselii*, *P. mendocina*, *P. monteilii* y *Pseudomonas* sp). Esta presencia de otras especies del género *Pseudomonas* entre las muestras de alimentos está acorde con lo que describen otros autores (Franzetti & Scarpellini, 2007; Mehri *et al.*, 2011; Remold *et al.*, 2011).

Pero si nos fijamos exclusivamente en la especie *P. aeruginosa*, existen diferentes estudios en la literatura donde indican que esta especie se encuentra en productos vegetales frescos. Un primer ejemplo es el estudio realizado por Allydice-Francis & Brown (2012) donde analizan la contaminación con *P. aeruginosa* de diferentes productos vegetales frescos de distintos supermercados y tiendas de Jamaica, así como sus perfiles de sensibilidad a antibióticos y sus determinantes de virulencia. Por otro lado, Wright y colaboradores (1976) analizaron la presencia de *P. aeruginosa* y otras enterobacterias en ensaladas preparadas en el hospital (como comida para los pacientes) y en él se sugiere que, los que “contaminan” los productos

de consumo con estos microorganismos son el suelo de los campos, así como los fertilizantes o el agua de riego, donde se cultivan dichos vegetales. Aunque los porcentajes de *P. aeruginosa*, analizados en ensaladas y otros vegetales en estos estudios previos (Allydice-Francis & Brown, 2012; Wright *et al.*, 1976) son ligeramente más altos que los encontrados entre nuestros tomates y pimientos (tan sólo del 5%), debemos destacar que estos autores describen mayores frecuencias de aislamiento en otros vegetales, como lechugas, zanahorias o berros. Por el contrario, son escasos los artículos donde se estudia la presencia de este género en alimentos de origen cárnico (Lavilla-Lerma *et al.*, 2013; Rho *et al.*, 2012).

Respecto del estudio de la posible relación clonal, hay que recordar que la diseminación de clones de *P. aeruginosa* (y de otras especies), también favorece la expansión de la resistencia antibiótica. Pero entre nuestras cepas, se demostró que ninguno de los 20 aislados obtenidos de origen alimentario compartía perfil de bandas de PFGE. Y, además, el análisis de la secuencia tipo en las cinco cepas de *P. aeruginosa* encontradas, mostró cinco ST diferentes (ST17, ST270, ST800, ST1455 y ST1456), que a su vez eran distintas de las secuencias tipo encontradas en los individuos sanos y en las cepas clínicas de nuestra tesis y, por supuesto, de los clones de alto riesgo diseminados por los hospitales (ST235, ST175 y ST111, que ya hemos comentado anteriormente). ST1455 y ST1456 fueron descritas como nuevas combinaciones alélicas en este estudio mientras que las otras secuencias tipo ya se habían descrito anteriormente. De acuerdo con la base de datos de MLST, la ST270 se ha detectado tanto en cepas clínicas como en muestras de agua o de suelo y la ST800 únicamente en muestras de esputo de pacientes hospitalizados. Por otro lado, la ST17, conocida como “clon C” y detectada en nuestro estudio en la cepa Ps153 aislada de un tomate, ya había sido descrita previamente asociada a pacientes con fibrosis quística o con otras enfermedades (Kidd *et al.*, 2012).

En cuanto a sensibilidad a antibióticos se refiere, los perfiles de resistencia respecto de los 15 antibióticos anti-pseudomónicos analizados difieren con los hallados en las muestras de individuos sanos, a excepción de la cepa de *P. aeruginosa* Ps149 (aislada de una muestra de carne de pavo) que era totalmente sensible a todos ellos. La presión antibiótica es un fenómeno común en el entorno hospitalario y como consecuencia de ello, se encuentran en la bibliografía gran

cantidad de artículos científicos que hablan de cepas multirresistentes (Liakopoulos *et al.*, 2013; Maâtallah *et al.*, 2011; Paterson, 2006) o, incluso, panresistentes (Luna de Araújo-Jácome *et al.*, 2012). A pesar de la ausencia, supuesta, de esta presión antibiótica entre nuestras 20 cepas de origen alimentario se encuentra un porcentaje elevado de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos; destacando el 85% de resistencia a ticarcilina, así como la presencia de dos cepas (Ps158 y Ps159, aisladas de una misma muestra de pimiento verde comprado en una tienda de barrio) con resistencia a imipenem. También se debe apuntar que, por el contrario, las 20 cepas fueron sensibles a los antibióticos aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), a fluoroquinolonas (ciprofloxacina y norfloxacina) y a colistina. Sin embargo, las muestras clínicas suelen presentar una gran asociación de resistencia a diferentes familias de antibióticos; en el caso de *P. aeruginosa*, esta asociación se da entre beta-lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Palzkill, 2013; Poole, 2011). Por ejemplo, en el estudio multicéntrico llevado a cabo entre 10 hospitales españoles, coordinados por la Red Española de Investigación de Enfermedades Infecciosas (REIPI), donde se analizaron 190 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de hemocultivos, se observaron los siguientes porcentajes de resistencia: >15% para los antibióticos beta-lactámicos (incluidos los carbapenémicos imipenem y meropenem) y los aminoglucósidos gentamicina y tobramicina, >25% para ciprofloxacina y, únicamente, 1% para amikacina y colistina (Cabot *et al.*, 2011)

En la cepa Ps158 se detectó la presencia de un integrón de clase 1 aunque no se pudo completar la estructura, siendo la única cepa no clínica que presentaba integrones en nuestro trabajo. Muchos son los estudios que relacionan la resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa* con la presencia de elementos genéticos móviles porque albergan los genes de resistencia a distintas familias de antibióticos en ellos y de ese modo se produce su diseminación y adquisición (Poole, 2011). Por esta razón, es importante destacar la alta prevalencia de integrones de clase 1 entre los aislados clínicos de esta especie (Martínez *et al.*, 2012; Odumosu *et al.*, 2013; Ruiz-Martínez *et al.*, 2011b).

Por otro lado, en la cepa Ps159 se asoció la resistencia a imipenem con la pérdida de la porina OprD, debida a la inserción en el gen *oprD* de una nueva secuencia de inserción ISPa47 caracterizada en este trabajo (nº de acceso en

GenBank KC502912). Se sabe que la transposición aleatoria de secuencias de inserción es una forma de adaptación de las bacterias a los cambios ambientales; en particular, se ha demostrado que cuando se encuentran estos elementos de inserción en un alto número de copias, son un factor clave de la evolución del genoma bacteriano y, en concreto, en *P. aeruginosa* para la adaptación de esta bacteria en los pacientes con fibrosis quística (Diene *et al.*, 2013). Como ya se ha comentado, la inactivación de la expresión de este gen por elementos de inserción, incrementa la resistencia a carbapenémicos debido a que se impide la entrada de imipenem en la bacteria y no puede ejercer su acción (Evans & Segal, 2007). Hasta el momento únicamente se había detectado esta inactivación del gen *oprD* por secuencias de inserción en unas pocas cepas clínicas de *P. aeruginosa*; aunque hay que destacar que están distribuidas por todo el mundo: Estados Unidos (Wolter *et al.*, 2004), Sudáfrica (Evans & Segal, 2007), China (Wang *et al.*, 2010), España (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011a) o Francia (Diene *et al.*, 2013). En el artículo de Diene y colaboradores (2013) se muestra una figura comparativa (**Figura 61**) de cuatro secuencias de OprD truncadas por diferentes secuencias de inserción frente a la secuencia de OprD de la cepa de referencia PAO1. En ella, se puede apreciar que no existe un lugar concreto donde se introducen estas secuencias de inserción interrumpiendo la lectura del gen; así como tampoco su direccionalidad (por ejemplo, ISPa1328 o ISPa133 van en el mismo sentido que el gen *oprD* mientras que ISPa26 o ISPa46 se presentan en sentido opuesto). Por otro lado, en cuanto a la familia a la que pertenecen estas secuencias de inserción tampoco se encuentra una relación directa: ISPa46 e ISPa1328 (que también se encuentra truncando el gen *oprD* de una cepa de *P. aeruginosa* del HSP de Logroño) son parte de la familia de IS256; ISPa1635 (como ISPa45 que aparece interrumpiendo otra secuencia de *oprD* en una cepa de *P. aeruginosa* de nuestra colección del HCULB) pertenece a la familia IS4; ISPa26 es de la familia IS5; ISPa133 pertenece a la familia IS3 y nuestra secuencia ISPa47 pertenece a la familia IS630.

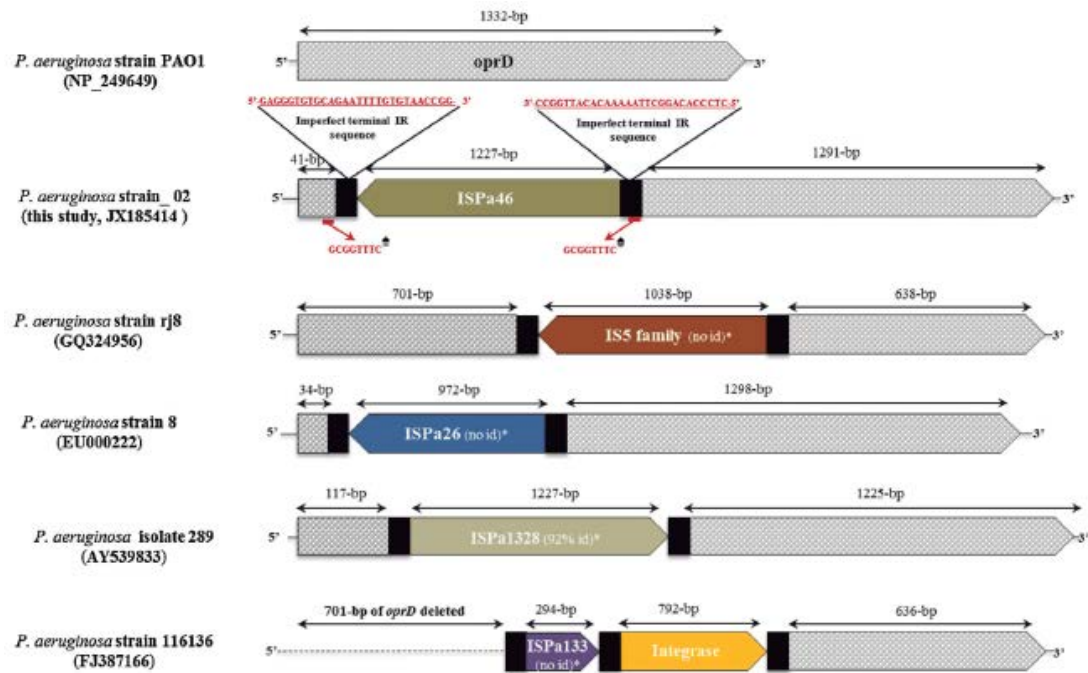


Figura 61.- Comparación de las secuencias de inserción en el gen *oprD* de diferentes cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem pero no productoras de MBL (Diene *et al.*, 2013).

En general, entre las cepas de origen alimentario, se observaron gran cantidad de alteraciones, respecto de la cepa de referencia PAO1, en el gen *oprD*, al igual que en el caso de los individuos sanos. A excepción de la cepa Ps159, que acabamos de mencionar, ninguno de los cambios aminoacídicos encontrados entre las secuencias del gen *oprD* de nuestras cepas aisladas de alimentos sugería la pérdida de la porina. De hecho, las otras cuatro cepas de *P. aeruginosa* aisladas de alimentos fueron clasificadas, según su secuencia de *OprD*, en dos grupos: A y B, que ya habían sido definidos en el caso de los individuos sanos. Los valores de CMI a los tres carbapenémicos testados en estas cuatro cepas tenían rangos más elevados que en el caso de las cepas procedentes de muestras fecales de personas sanas: imipenem (rango 4-8 µg/ml), meropenem (rango 0,5-4 µg/ml) y doripenem (rango 0,125-0,75 µg/ml). Como ya se comentó, las alteraciones de la porina *OprD* detectadas tanto en el grupo A como en el grupo B ya habían sido descritas en la bibliografía por otros autores (Ocampo-Sosa *et al.*, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009), destacando en ambos grupos las dos deleciones en el L7corto.

Podemos concluir, en este caso, que se ha encontrado una importante prevalencia de *Pseudomonas* spp. en vegetales que pertenecían a diferentes líneas genéticas y con distintos patrones de sensibilidad a los antibióticos, lo que puede suponer un vehículo de transmisión de genes de resistencia a los seres humanos a través de la cadena alimenticia. Hay autores que consideran el medioambiente como una de las fuentes iniciales de infección debido a la amplia distribución de patógenos como *P. aeruginosa* en el suelo, las plantas y el agua (Schelstraete *et al.*, 2008); así que, de igual modo que en los estudios de muestras clínicas, se debe destacar la importancia de vigilar los alimentos tanto en su producción como en su manipulación y consumo para evitar la diseminación de bacterias portadoras de determinados fenotipos de resistencia emergentes.

Pero sin duda alguna, los estudios de esta tesis y los publicados en la literatura se centran en la especie *P. aeruginosa* en el entorno hospitalario. Esta especie es la más destacada en el ámbito clínico debido a que es considerada uno de los patógenos oportunistas más dañinos entre los seres humanos y existen multitud de estudios donde se evalúa la presencia de este microorganismo tanto en pacientes, en especial asociados con fibrosis quística (Hauser *et al.*, 2011; Pollini *et al.*, 2011), como en material del hospital (Díaz-Granados *et al.*, 2009; Lister *et al.*, 2009; Muscarella, 2004). Además, en la bibliografía, se encuentran otras especies del género *Pseudomonas*, como *P. putida* o *P. fluorescens*, que también son considerados patógenos oportunistas y que presentan resistencia a varias familias de antibióticos dificultando el tratamiento del paciente (Gershman *et al.*, 2008; Juan *et al.*, 2010; Marchiaro *et al.*, 2010). En los dos hospitales analizados a lo largo de esta tesis (HSP de Logroño y HCULB de Zaragoza), se seleccionaron los aislados clínicos de la especie *P. aeruginosa* con resistencia o sensibilidad reducida al menos a uno de los 3 antibióticos carbapenémicos testados (imipenem, meropenem y doripenem) para realizar su análisis fenotípico completo, caracterizar los mecanismos de resistencia implicados y detectar la presencia de integrones.

En el HSP de Logroño, se recogieron 91 aislados entre septiembre de 2008 y diciembre de 2011; mientras que en el HCULB de Zaragoza, fueron seleccionados 123 aislados en el período junio de 2008 a octubre de 2010. En el estudio de la relación clonal por la técnica de PFGE entre estas cepas se demostró la no clonalidad

entre ellas en ambos hospitales por separado. En el HSP se detectó un total de 35 patrones de bandas diferentes entre las 61 cepas seleccionadas (de 60 pacientes) según el criterio “una cepa por paciente y con perfil de bandas PFGE diferente, a menos que dos cepas de un mismo paciente con el mismo perfil de PFGE tuvieran distinto fenotipo de resistencia”; y bajo este mismo criterio, en el HCULB se encontraron 64 perfiles de bandas entre las 87 cepas seleccionadas de 80 pacientes. Esto sugiere que las cepas aisladas de estos pacientes no eran el resultado de un brote epidémico, como en ocasiones, sucede en algunas unidades de hospitales con *P. aeruginosa* u otras bacterias (Dettori *et al.*, 2014; Knoester *et al.*, 2014; Wendel *et al.*, 2013). Sin embargo, en ambos hospitales encontramos algunas cepas estrechamente relacionadas. En el HSP se encontraron dos cluster (S1 y S2) de 10 y 9 cepas, respectivamente, pertenecientes todas ellas a diferentes pacientes pero con características similares en cuanto a secuencia tipo (ST175), estructura de integrón que albergan (*aadB-2* como único casete génico dentro de la región variable) y patrón de OprD al que pertenecen (ver **Figura S1** y **Tabla S3** en la sección de Anexos). De igual modo, en el HCULB se localizaron 7 cepas correspondientes a un mismo cluster (R32) con las mismas características que las 19 cepas del HSP descritas anteriormente (ver **Figura S2** y **Tabla S5** en la sección de Anexos). Además, en el hospital de Zaragoza se encontró otro perfil de PFGE (R11) que agrupaba 7 cepas productoras de MBL de 7 pacientes diferentes y correspondientes a la misma secuencia tipo (ST235), aunque distinta de la correspondiente a los clusteres anteriormente comentados. Todo esto puede sugerir que en algunos casos, una diseminación clonal puntual es también un camino de dispersión de cepas, por ejemplo, portadoras del gen *bla_{VIM-2}* como se ha observado en otros estudios (Tsakris *et al.*, 2009).

Según los datos obtenidos por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), las cepas de *P. aeruginosa* Carb-R han experimentado un cambio en cuanto a prevalencia en los últimos años. En la **Tabla 45** se puede ver su progresión en nuestro país, donde se produjo un incremento paulatino hasta 2010 (donde se llegó a su nivel más elevado), seguido de un ligero descenso que se mantuvo durante los años 2011 y 2012.

TABLA 45.- Porcentajes de resistencia a carbapenémicos en cepas de *P. aeruginosa* en España desde 2008 a 2012 (<http://ecdc.europa.eu>).

Año	Porcentaje de resistencia
2008	13,8%
2009	16,1%
2010	17,8%
2011	16,3%
2012	16,4%

En nuestro caso, la frecuencia de cepas de *P. aeruginosa* Carb-R en el HCULB era de 12,8% en el período 2008-2010; estando en todo momento por debajo de los valores generales de España. Existe un estudio multicéntrico en nuestro país de Peña y colaboradores (2012) donde se observó una tendencia al alza llegando a un valor del 23%.

De igual modo, es relevante el alto porcentaje de co-rresistencia a carbapenémicos y aminoglucósidos observado entre todas nuestras cepas clínicas. Cabe destacar la alta resistencia a amikacina (24,1%) en el HCULB de Zaragoza, que es muy superior a la detectada en estudios previos (Peña *et al.*, 2012; Sardelic *et al.*, 2012), e incluso a los datos obtenidos por ECDC tanto para este antibiótico como para la familia completa de los aminoglucósidos en España (**Tabla 46**). Sin embargo, el valor de 8% de resistencia a amikacina para las cepas del HSP se asemeja mucho más a lo descrito por otros autores (Peña *et al.*, 2012; Sardelic *et al.*, 2012), aunque sigue siendo algo superior a los datos del ECDC.

TABLA 46.- Porcentajes de resistencia a amikacina y a la familia de antibióticos aminoglucósidos en cepas de *P. aeruginosa* en España desde 2008 a 2012 (<http://ecdc.europa.eu>).

Año	Porcentaje de resistencia	
	Amikacina	Aminoglucósidos
2008	4,0%	17,6%
2009	4,9%	19,2%
2010	4,4%	18,2%
2011	3,1%	18,7%
2012	3,3%	16,3%

Pero el dato más importante para destacar entre las cepas procedentes del HSP es que aunque el criterio de selección, al igual que en el HCULB, fue “aislados de *P. aeruginosa* con resistencia o sensibilidad reducida al menos a uno de los antibióticos carbapenémicos testados”, ninguna de ellas presentó el fenotipo MBL o carbapenemasas de clase A; por lo que son otros los mecanismos de resistencia que actúan frente a los carbapenémicos en estas cepas clínicas. A esta misma conclusión se llegó en el estudio de Riera y colaboradores (2011), en el cual hablaban de una prevalencia al alza de productores de MBL en los últimos años; aunque estando todavía lejos, al menos en España, de la resistencia asociada a mutaciones: como la inactivación de OprD que incrementa la resistencia a imipenem o la hiperproducción de bombas de expulsión activa o de AmpC relacionadas con la resistencia a meropenem.

Por el contrario, en el HCULB se detectó el fenotipo MBL en el 49,4% de las cepas de *P. aeruginosa* Carb-R; estando asociado en todos los casos con la presencia del gen *bla*_{VIM-2}. La mayoría de los pacientes que portaban cepas de *P. aeruginosa* Carb-R estaban hospitalizados en la UCI, presentado diferentes enfermedades de base y habiendo recibido anteriormente antibióticos carbapenémicos y otros beta-lactámicos. De esta manera, estaban expuestos a diferentes factores de riesgo para la adquisición de *P. aeruginosa* multirresistentes similares a los descritos en estudios anteriores (Peña *et al.*, 2012; Tsakris *et al.*, 2009).

Ya se ha comentado que en las cepas clínicas de los dos hospitales analizados en esta tesis, se observan asociaciones de resistencia a las familias de antibióticos de beta-lactámicos y aminoglucósidos; cuya producción representa uno de los mecanismos más frecuentes en *P. aeruginosa* (Bonomo & Szabo, 2006). Ligados a estos genes de resistencia, están los elementos genéticos móviles y en especial, los casetes génicos insertados en integrones (comúnmente de clase 1). Se detectaron integrones de clase 1 en el 67% y 75% de las cepas de *P. aeruginosa* Carb-R de los dos hospitales analizados en esta tesis, respectivamente; y, todos ellos albergaban dentro de su región variable, algún gen de resistencia a beta-lactámicos y/o enzima modificante de aminoglucósidos. Sin embargo, en enterobacterias hay que destacar que, además de casetes génicos que confieren resistencia a aminoglucósidos y beta-

lactámicos, también aparecen otros que confieren resistencia a trimetoprim, cloranfenicol o rifampicina (Partridge *et al.*, 2009).

Tanto en el HCULB como en el HSP, únicamente se detectaron integrones de clase 1; aunque también se ha descrito la presencia de integrones de clase 3 en la especie *P. aeruginosa* (Fluit & Schmitz, 2004). La primera descripción del integrón de clase 3, cuya integrasa tiene una homología del 61% con la *intI1* (Sabaté & Prats, 2002), se realizó en Japón en el año 1995 en una cepa de *Serratia marcescens*, que albergaba como casete génico un gen que codifica una metalo-beta-lactamasa: *bla*_{IMP-1} (Arakawa *et al.*, 1995).

Sin embargo, a diferencia del HSP de Logroño, en el HCULB se encontraron 32 cepas (49% de las cepas con integrón en este hospital) que albergaban más de un integrón dentro de su material genético. Entre las 65 cepas portadoras de integrón se observaron hasta 12 estructuras diferentes; destacando el nuevo integrón In661 que portaba en su estructura la secuencia de inserción *ISPa34*. Esta secuencia de inserción fue detectada en diferentes estructuras genéticas de integrones de clase 1 tanto en cepas del linaje ST235 como del ST111; pero, no fue localizada en cepas del linaje ST973 como anteriormente se había descubierto en otra cepa de *P. aeruginosa* Carb-R (W37, caso clínico del HSP) estudiada en nuestro grupo (Rojo-Bezares *et al.*, 2011).

Por otro lado, aunque existen descripciones con presencia de GES, KPC y OXA en la especie *P. aeruginosa* (Villegas *et al.*, 2007; Sevillano *et al.*, 2009; Viedma *et al.*, 2009), éstas son ocasionales ya que las carbapenemasas más frecuentemente detectadas y diseminadas en esta especie son VIM e IMP (Cornaglia *et al.*, 2011; Diene & Rolain, 2014). De hecho, el gen *bla*_{VIM-2} fue detectado como casete génico en todas las cepas productoras de MBL de esta tesis (únicamente en el HCULB de Zaragoza), como ya han descrito otros autores en la bibliografía (Corvec *et al.*, 2008; Juan *et al.*, 2010; Patzer *et al.*, 2009; Rojo-Bezares *et al.*, 2011; Samuelsen *et al.*, 2010). Además, la mayoría de nuestras cepas productoras de este gen estaban adscritas a ST235, lo mismo que ocurre en otros países (Woodford *et al.*, 2011), aunque en España, este linaje estaba asociado a cepas que contenían otros genes como *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-5} o *bla*_{VIM-13} (Juan *et al.*, 2010; Viedma *et al.*, 2009).

Hay que remarcar que el casete génico *aadB-2* asociado a ST175 fue el más prevalente en el HSP donde se encontró en 35 cepas; siendo detectado, también, en 11 del HCULB. Previamente Nemec y colaboradores (2010) lo habían descrito en la República Checa aunque en la región variable del integrón normalmente aparecían dos genes diferentes: *aadB* + *aadA13*. La secuencia tipo ST175 es considerada un clon epidémico de alto riesgo y está diseminado entre los hospitales españoles relacionándose con cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes y productoras de MBL (García-Castillo *et al.*, 2011; Viedma *et al.*, 2012).

Aunque se han detectado otras secuencias tipo en los dos hospitales estudiados (ST308, ST639, ST253 y ST973), se observa una clara asociación de cepas adscritas a clones de alto riesgo (ST235, ST111 o ST175) con cepas portadoras de integrones de clase 1, como describen otros autores en la bibliografía (Juan *et al.*, 2010; Samuelsen *et al.*, 2010).

Cinco de nuestras cepas de *P. aeruginosa* Carb-R y no productoras de MBL del HCULB no pudieron amplificar el gen *oprD*; mientras que en el resto de cepas clínicas (82 del HCULB y 61 en el HSP) se detectaron gran cantidad de alteraciones. La relación directa entre la resistencia a carbapenémicos y las sustituciones en la porina OprD se manifiesta con la presencia de codones de finalización prematuros o el truncamiento de OprD por la inclusión de una secuencia de inserción que reducen la expresión transcripcional o inactivan la proteína (Gutiérrez *et al.*, 2007; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). En este sentido, debemos destacar que 52 y 45 de las cepas estudiadas (HSP y HCULB, respectivamente) presentaban un codon de finalización prematuro en diferentes localizaciones. Además, 13 cepas del HCULB ni siquiera poseían codon de inicio, hecho que no había sido descrito en la bibliografía hasta el momento.

Dos cepas en cada hospital (Ps92 y W64 en HSP y Ps33 y W368 en HCULB) tenían truncado el gen *oprD* por diferentes secuencias de inserción de gran tamaño (ISPa1328, ISPsp4, ISPa45 e ISPpu21) impidiendo su funcionalidad. ISPa45 ha sido descrita por primera vez en esta tesis (nº de acceso en GenBank JX440361) y pertenece a la familia IS4. Wolter y colaboradores (2004) describieron por primera vez la inactivación de la expresión del gen *oprD* por la presencia de secuencias de inserción (ISPa1328 e ISPa1635, pertenecientes a distintas familias IS), lo que

permitía a sus cepas un incremento de la resistencia a los carbapenémicos. Posteriormente, otros autores han descrito el mismo hecho con otras secuencias de inserción como ISPa26 (Evans & Segal, 2007), ISPa27 (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009), ISPst12 (Gutiérrez *et al.*, 2007), ISPa133 (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011a) o ISPa46 (Diene *et al.*, 2013). También debemos destacar que en otras dos cepas (W340 y Ps61) del hospital de Zaragoza, se encontró la secuencia de inserción ISPpu21 localizada justo delante del gen *oprD*, desconociendo si este hecho pudiera afectar a la función de la proteína y a su promotor.

Sin embargo, no todas las alteraciones encontradas en nuestras cepas clínicas están necesariamente implicadas en la manifestación de resistencia a imipenem y/o meropenem, ya que existen otros mecanismos involucrados en la resistencia a carbapenémicos que asumen este papel. En nuestro caso, en el HCULB lo podemos justificar con la producción del gen *bla*_{VIM-2} aunque es probable que también se hubieran sumado a este hecho la hiperproducción de AmpC o de bombas de expulsión activa, pero estos datos son desconocidos porque no se ha realizado su análisis. El acortamiento en dos aminoácidos del L7corto descrito anteriormente por Epp y colaboradores (2001), es un ejemplo de alteración que no afecta directamente a la resistencia a carbapenémicos porque no interrumpe la penetración óptima del antibiótico meropenem, ya que el canal de la porina tiene una apertura suficiente para ello (Li *et al.*, 2012). Este L7corto se encuentra en 10 cepas del HSP y 16 del HCULB (5 no productoras de MBL y 11 productoras).

Por otro lado, las alteraciones de OprD presentes en el patrón denominado como A (D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, L7-corto), que es común a todas nuestras cepas tanto clínicas como no clínicas (de personas sanos y de alimentos), ya habían sido descritas por otros autores, tanto en cepas sensibles como en cepas resistentes a los carbapenémicos (El Amin *et al.*, 2005; Farra *et al.*, 2008; Hammami *et al.*, 2009; Ocampo-Sosa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010). Estos mismos autores también habían detectado otros cambios aminoacídicos que se han descrito en nuestro trabajo (T103S, K115T, V127L, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E o A315G).

En resumen, entre nuestras cepas clínicas se han detectado cepas multirresistentes pertenecientes a clones epidémicos de alto riesgo (ST235, ST111 y

ST175), que albergan integrones de clase 1 en su interior, como las cepas ya descritas en la bibliografía. Mientras que en el HSP únicamente se localizaban enzimas modificantes de aminoglucósidos entre las regiones variables de estos integrones, en el HCULB se observaban estos genes junto a otros de resistencia a beta-lactámicos; destacando la presencia del gen *bla*_{VIM-2} entre las cepas productoras de MBL. La detección de secuencias de inserción, tanto dentro de integrones (*ISPa34*) como interrumpiendo secuencias del gen *oprD* (*ISPa45*), describe la constante evolución y adaptabilidad de la especie *P. aeruginosa* al entorno que le rodea y ofreciendo así muchas dificultades a la terapia frente a este patógeno.

Como ya se ha comentado en esta tesis, los integrones son elementos genéticos movilizables; es decir, que no pueden moverse por sí mismos pero sí pueden desplazarse con ayuda de otros elementos. Normalmente se integran en transposones o plásmidos conjugativos que les permiten esa movilidad (Gillings, 2014). Por otra parte, la prevalencia y diseminación mundial de genes MBL, y en el caso particular de *P. aeruginosa* de genes del tipo VIM integrados en integrones de clase 1, ponen de manifiesto la necesidad de obtener más información sobre los elementos transferibles responsables de tal diseminación. Por esta razón, se seleccionaron 13 cepas portadoras del gen *bla*_{VIM-2} para la realización de un estudio de localización cromosómica/plasmídica y contexto genético de este gen en colaboración con el HUSE de Palma de Mallorca. Todas nuestras cepas resultaron ser de codificación cromosómica, dato en concordancia con los descritos en la literatura, donde se sugiere la necesidad de una integración cromosómica de estos genes debido a una falta de replicación de los plásmidos dentro de la especie *P. aeruginosa* (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011b; Samuelsen *et al.*, 2010). Por el contrario, en el estudio de Juan y colaboradores (2010) se demuestra que la gran mayoría de genes MBL en cepas de la especie *P. putida* se encuentran localizados en plásmidos.

En cuanto al entorno genético donde se insertan los integrones portadores de genes MBL, nuestro trabajo se apoyó en estudios previos donde se describían estructuras derivadas del transposón Tn21 (Marchiaro *et al.*, 2010; Tato *et al.*, 2010). Esta asociación gen MBL-integrón-Tn21 se localizó en 11 de 13 de nuestras cepas seleccionadas. En ningún caso se encontró la pérdida del segmento 3' conservado con sustitución por el módulo *tmi* completo, como ya ha sido descrito previamente

(Marchiaro *et al.*, 2010; Scotta *et al.*, 2011), y que sugiere que este módulo es todavía funcional. Mientras que los integrones con estructura completa del segmento 3' conservado y el módulo *tnt* truncado, encontrada en nuestras cepas, se consideran defectivos para la transposición necesitando integrarse en transposones mayores que les permitan la movilización (Marchiaro *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012; Tato *et al.*, 2010). Se debe destacar la cepa Ps56 que es la única que presentó la secuencia de inserción IS1326 entre los genes *orf5* y *tntB1*; careciendo de la secuencia de inserción IS1353 que suele tener asociada (Liebert *et al.*, 1999) y poniendo de manifiesto un probable origen muy particular desde el integron In0 descrito (Partridge *et al.*, 2001; Tato *et al.*, 2010; Toleman *et al.*, 2007).

Para finalizar, como último objetivo, se estudió la estabilidad de la resistencia a imipenem en ausencia de presión antibiótica durante 100 días en 4 cepas clínicas del HCULB: tres de ellas portadoras del gen *bla_{VIM-2}* y otra, que aunque era carente de integrones, tenía el gen *oprD* truncado por la nueva secuencia de inserción ISPa45. En nuestro grupo de investigación ya se había estudiado previamente la estabilidad de integrones de clase 1 en cepas de la especie *Escherichia coli* (Vinué, 2010) o la estabilidad del fenotipo BLEE o AmpC en cepas de *Salmonella enterica* (De Toro, 2013). Los resultados obtenidos fueron diferentes. En nuestro caso, no se apreció cambio alguno en cuanto a fenotipo o genotipo en los 100 días, mientras que en el caso de *E. coli* hubo una cepa que perdió el integrón tras 75 pases en medio sin antibiótico y en el caso de *S. enterica* hubo 4 cepas que perdieron su fenotipo en diferentes días (5, 11, 49 y 72). Diferentes hipótesis pueden exponerse en referencia a estos resultados: por un lado, el coste biológico que supone a la bacteria mantener determinados fenotipos de resistencia y, por otro lado, la facilidad que pueden tener las bacterias de adquirir material exógeno. Además de todo esto, también hay que tener en cuenta la capacidad para integrar ese material en el DNA de la propia bacteria. Existen estudios en la literatura sobre la pérdida parcial o total de plásmidos con genes de resistencia (Brown *et al.*, 1991; Subbiah *et al.*, 2011). De hecho, *E. coli* está dentro del grupo *Enterobacteriaceae* cuya posibilidad para captar y escindir material genético es mucho más favorable; mientras que es importante remarcar que la especie *P. aeruginosa* tiende a integrar en el cromosoma el material externo que

adquiere reduciendo el coste biológico (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011b; Samuelsen *et al.*, 2010).

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1.- Se detecta una prevalencia moderada de *Pseudomonas* spp. en muestras fecales de individuos sanos y en alimentos (8,2% y 12,4%, respectivamente), siendo *P. aeruginosa* la única especie detectada en personas sanas, y *P. aeruginosa* y *P. putida* las especies predominantes en alimentos.
- 2.- Los aislados de *P. aeruginosa* de individuos sanos fueron sensibles a todos los antibióticos anti-pseudomónicos testados. En el caso de los aislados de alimentos, destaca la resistencia a ticarcilina e imipenem.
- 3.- Los aislados no clínicos de *P. aeruginosa* presentan una gran diversidad de mutaciones en la proteína OprD, no asociada con la resistencia a carbapenémicos. Sin embargo, la presencia de la nueva secuencia de inserción ISPa47 truncando la proteína OprD, justificó la resistencia a imipenem en un aislado de origen alimentario.
- 4.- Se observa una alta diversidad clonal en los aislados no clínicos de *P. aeruginosa*, detectándose, en algunos casos, líneas genéticas de amplia diseminación hospitalaria, como la secuencia tipo ST253 identificada en individuos sanos.
- 5.- La prevalencia de metalo-beta-lactamasas entre los aislados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos es muy variable en función de las características de cada hospital. De hecho, en el HSP de Logroño no se detectó ninguna cepa productora de metalo-beta-lactamasas, mientras que en el HCULB de Zaragoza prácticamente la mitad de los aislados presentaron dichos tipos de enzimas.
- 6.- Se evidencia una elevada diversidad de patrones de PFGE entre los aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos de ambos hospitales (99 patrones en 148 cepas), tanto entre los aislados productores como no productores de metalo-beta-lactamasas.
- 7.- La línea genética ST175 fue mayoritaria en el HSP de Logroño y la ST235 en el HCULB de Zaragoza.

Conclusiones

8.- Las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos de los 2 hospitales estudiados presentaron una alta frecuencia de integrones de clase 1 (> 65%), aunque se detectó una mayor diversidad de estructuras en los integrones de las cepas del HCULB de Zaragoza.

9.- Se han detectado 14 estructuras diferentes de integrón de clase 1 en las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos; todas ellas, excepto una, portadoras de casetes génicos de resistencia a aminoglucósidos.

10.- El gen *bla*_{VIM-2} fue detectado en todas las cepas metalo-beta-lactamasas positivas de esta tesis, siempre asociado a integrones de clase 1 y localizado en 4 estructuras diferentes.

11.- Se observa un gran polimorfismo en la proteína OprD de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, detectándose codones de finalización prematuros en más del 50% de las proteínas.

12.- Se han detectado 5 cepas de *P. aeruginosa* (4 clínicas y una de alimentos) con secuencias de inserción truncando el gen *oprD*, siendo 2 de estas IS nuevas (ISPa45 e ISPa47).

13.-En 11 cepas de *P. aeruginosa* metalo-beta-lactamasas positivas se evidenció la asociación del integrón portador del gen *bla*_{VIM-2} con el transposón Tn21, siendo en todos los casos la localización cromosómica.

14.- Los integrones portadores de *bla*_{VIM-2} presentaron alta estabilidad en ausencia de presión antibiótica selectiva. Asimismo, no se encontraron alteraciones en la proteína OprD en dichas condiciones de ausencia de antibióticos.

15.- En esta tesis se ha llevado a cabo un estudio de la epidemiología de *P. aeruginosa* en diferentes nichos ecológicos y se ha puesto de manifiesto la elevada diversidad genética de esta especie, junto con su capacidad de adquirir nuevos elementos genéticos que han sido caracterizados en este trabajo.

Bibliografia

BIBLIOGRAFÍA

- Abidi, S.H., Sherwani, S.K., Siddiqui, T.R., Bashir, A. & Kazmi, S.U.** 2013. Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. *BMC Ophthalmology*, 13:57.
- Allen, J.L., Begg, A.P. & Browning, G.F.** 2011. Outbreak of equine endometritis caused by a genotypically identical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23:1236-1239.
- Allydice-Francis, K. & Brown, P.D.** 2012. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *International Journal of Microbiology*, 2012:426241.
- Almuzara, M.N., Vazquez, M., Tanaka, N., Turco, M., Ramirez, M.S., Lopez, E.L., Pasteran, F., Rapoport, M., Procopio, A. & Vay, C.A.** 2010. First case of human infection due to *Pseudomonas fulva*, an environmental bacterium isolated from cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:660-664.
- Ambler, R.P.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289:321-331.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N. & Ohta, M.** 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:1612-1615.
- Arrebola, E., Cazorla, F.M., Pérez-García, A. & de Vicente, A.** 2011. Chemical and metabolic aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Toxins*, 3:1089-1110.
- Ballarini, A., Scalet, G., Kos, M., Cramer, N., Wiehlmann, L. & Jousson, O.** 2012. Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonucleotide-microarray. *BMC Microbiology*, 12:152.

- Bao, Z., Stodghill, P.V., Myers, C.R., Lam, H., Wei, H.L., Chakravarthy, S., Kvitko, B.H., Collmer, A., Cartinhour, S.W., Schweitzer, P. & Swingle, B.** 2014. Genomic plasticity enables phenotypic variation of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. PLoS ONE 9(2):e86628.
- Baquero, F. & Garau, J.** 2010. Prudent use of antimicrobial agents: revisiting concepts and estimating perspectives in a global world. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 28:487-488.
- Basset, P. & Blanc, D.S.** 2013. Fast and simple epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa* using the double-locus sequence typing (DLST) method. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 33:927-932.
- Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C. & Astilean, A.** 2013. New antibiotics for bad bugs: where are we? Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 12:22-36.
- Benito, N., Mirelis, B., Luz-Gálvez, M., Vila, M., López-Contreras, J., Cotura, A., Pomar, V., March, F., Navarro, F., Coll, P. & Gurguá, M.** 2012. Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection in a coronary care unit. The Journal of Hospital Infection, 82:286-289.
- Bennet, E.A., Coleman, L.E., Tsui, C., Pitard, W.S. & Devine, S.E.** 2004. Natural genetic variation caused by transposable elements in humans. Genetics, 168:933-951.
- Biskri, L., Bouvier, M., Guérout, A.M., Boissard, S. & Mazel, D.** 2005. Comparative study of class 1 integron and *Vibrio cholerae* superintegron integrase activities. Journal of Bacteriology, 187:1740-1750.
- Boers, S.A., Van der Reijden, W.A. & Jansen, R.** 2012. High-throughput multilocus sequence typing: bringing molecular typing to the next level. PLoS ONE 7(7):e39630.
- Bogaerts, P., Bouchrouf, W., Lissior, B., Denis, O. & Glupczynski, Y.** 2011. IMP-13-producing *Pseudomonas monteilii* recovered in a hospital environment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66:2434-2435.

- Bonomo R.A. & Szabo D.** 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 43 (suppl 2):S49-56.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B. & Bartlett, J.** 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48:1-12.
- Breidenstein, E.B., de la Fuente-Núñez, C. & Hancock, R.E.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19:419-426.
- Brittingham, M.C., Temple, S.A. & Duncan, R.M.** 1988. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 24:299-307.
- Brown, D.J., Threlfall, E.J. & Rowe, B.** 1991. Instability of multiple drug resistance plasmids in *Salmonella typhimurium* isolated from poultry. *Epidemiology and Infection*, 106:247-257.
- Bugden, D.L.** 2013. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 91:43-46.
- Bush, K., Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:1211-1233.
- Bush, K. & Jacoby, G.A.** 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:969-976.
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Domínguez, M.A., Gago, J.F., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L. & Oliver, A. on behalf of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** 2012. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:6349-6357.

Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Tubau, F., Macia, M.D., Rodríguez, C., Moyà, B., Zamorano, L., Suárez, C., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Oliver, A. & the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2011. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55:1906-1911.

Calvo, J. & Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27:44-52.

Cambray, G., Sánchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, E., Da Re, S., González-Zorn, B., Ploy, M.C., Barbé, J., Mazel, D. & Erill, I. 2011. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mobile DNA*, 2:6-20.

Campos, J. & Baquero, F. 2002. Resistencia a antibióticos: ¿qué hacer ahora? *Medicina Clínica*, 119:656-658.

Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:2227-2238.

Ceri, M., Ortabozkoyun, L., Altay, M., Unverdi, S., Kurultak, I., Huddam, B., Kilic, F., Yilmaz, R. & Duranay, M. 2010. Peritonitis due to *Pseudomonas stutzeri*, an organism that may be difficult to culture. *Peritoneal Dialysis International*, 30:484-486.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-third Informational Supplement. (M100-S23). Wayne, Pennsylvania, USA.

Collis, C.M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Stokes, H.W. & Hall, R.M. 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *Journal of Bacteriology*, 184:3017-3026.

Coque-González, T.M. 2005. Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23:251-253.

- Cornaglia, G., Giamarellou, H. & Rossolini, G.M.** 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infectious Diseases*, 11:381-393.
- Corvec, S., Poirel, L., Espaze, E., Giraudeau, C., Drugeon, H. & Nordmann, P.** 2008. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *Journal of Hospital Infection*, 68:73-82.
- Costa, M.C., Arroyo, L.G., Allen-Vercoe, E., Stämpfli, H.R., Kim, P.T., Sturgeon, A. & Weese, J.S.** 2012. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS ONE* 7(7):e41484.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. & Dowson, C.G.** 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:5644-5649.
- Daly, M., Power, E., Björkroth, J., Sheehan, P., O'Connell, A., Colgan, M., Korkeala, H. & Fanning, S.** 1999. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:2723-2729.
- De Toro, M.** 2013. Tesis doctoral: "Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en *Salmonella enterica*. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica". Universidad de La Rioja.
- Dettori, M., Piana, A., Deriu, M.G., Lo Curto, P., Cossu, A., Musumeci, R., Cocuzza, C., Astone, V., Contu, M.A. & Sotgiu, G.** 2014. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *New Microbiologica*, 37:185-191.
- Díaz-Granados, C.A., Jones, M.Y., Kongphet-Tran, T., White, N., Shapiro, M., Wang, Y.F., Ray, S.M. & Blumberg, H.M.** 2009. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contamination of a flexible bronchoscope. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 30:550-555.
- Dickinson, V.M., Duck, T., Schwalbe, C.R., Jarchow, J.L. & Trueblood, M.H.** 2001. Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the Western United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 37:252-257.

Diene, S.M., L'homme, T., Bellulo, S., Stremler, N., Dubus, J.C., Mely, L., Leroy, S., Degand, N. & Rolain, J.M. 2013. ISPa46, a novel insertion sequence in the *oprD* porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42:268-271.

Diene, S.M. & Rolain, J.M. 2014. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*, (*in press*).

Dortet, L., Poirel, L. & Nordmann, P. 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in gram-negative bacteria. *BioMed Research International*, 2014:249856.

El Amin, N., Giske, C.G., Jalal, S., Keijsers, B., Kronvall, G. & Wretling, B. 2005. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS*, 113:187-196.

Ellington, M.J., Kistler, J., Livermore, D.M. & Woodford, N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59:321-322.

El Salabi, A., Walsh, T.R. & Chouchani, C. 2013. Extended spectrum beta-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39:113-122.

Epp, S.F., Köhler, T., Plésiat, P., Michéa-Hamzehpour, M., Frey, J. & Pechère, J.C. 2001. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:1780-1787.

Evans, J.C. & Segal, H. 2007. A novel insertion sequence, ISPa26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:3776-3777.

Farra, A., Islam, S., Stralfors, A., Sörberg, M. & Wretling, B. 2008. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31:427-433.

Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Alba, J.M., Morosini, M.I., Lamas, A., Romero, B., Galán, J.C., del Campo, R. & Cantón, R. 2013. Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 51:2761-2765.

Fluit, A.C. & Schmitz, F.J. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10:272-288.

Fonseca, E.L., dos Santos, F. & Paulo, A.C. 2011. Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:797-801.

Franzetti, L. & Scarpellini, M. 2007. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57:39-47.

Fresnadillo-Martínez, M.J., García-García, M.I., García-Sánchez, E & García-Sánchez, J.E. 2010. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (supl 2):53-64.

García-Castillo, M., del Campo, R., Morosini, M.I., Riera, E., Cabot, G., Willems, R., van Mansfeld, R., Oliver, A. & Cantón, R. 2011. Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 49:2905-2910.

García-López, I., Otero, A., García-López, M. & Santos, J.A. 2004. Molecular and phenotypic characterization of nonmotile Gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology*, 96:878-886.

Garcillán-Barcia, M.P., Alvarado, A. & de la Cruz, F. 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:936-956.

Gerner-Smidt, P., Hyytiä-Trees, E. & Rota, P.A. 2011. Molecular epidemiology. In J. Versalovic *et al.* (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. (10th ed, pp.100-123) Washington, ASM Press.

Gershman, M.D., Kennedy, D.J., Noble-Wang, J., Kim, C., Gullion, J., Kacica, M., Jensen, B., Pascoe, N., Saiman, L., McHale, J., Wilkins, M., Schoonmaker-Bopp, D., Clayton, J., Arduino, M. & Srinivasan, A. for the *Pseudomonas fluorescens* Investigation Team. 2008. Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. *Clinical Infectious Diseases*, 47:1372-1379.

Giani, T., Marchese, A., Coppo, E., Kroumova, V. & Rossolini, G.M. 2012. VIM-1-producing *Pseudomonas mosselii* isolates in Italy, predating known VIM-producing index strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:2216-2217.

Gillings, M.R. 2014. Integrins: past, present, and future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78:257-277.

Gnanasundaran, S., Ranganathan, M., Das, B.N. & Mandal, A.B. 2013. Surface modified and medicated polyurethane materials capable of controlling microorganisms causing foot skin infection in athletes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102:139– 145.

Gómez-Romero, S.E., Gutiérrez-Bustos, D.C., Hernández-Marín, A.M., Hernández-Rodríguez, C.Z., Losada-Casallas, M. & Mantilla-Vargas, P.C. 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA Publicaciones científicas en Ciencias Biomédicas*, 6:76-84.

Gomila, M., Gallegos, M.C., Fernández-Baca, V., Pareja, A., Pascual, M., Díaz-Antolín, P., García-Valdés, E. & Lalucat, J. 2013. Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiology*, 13:138.

- Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A. & Leong, D.** 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:335-351.
- Guerra, B., Fischer, J. & Helmuth, R.** 2014. An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Veterinary Microbiology*, 171:290-297.
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Pérez, J.L. & Oliver, A.** 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:4329-4335.
- Hammami, S., Ghozzi, R., Burghoffer, B., Arlet, G. & Redjeb, S.** 2009. Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathologie Biologie*, 57:530-535.
- Hardalo, C. & Edberg, S.C.** 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology*, 23:47-75.
- Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M. & McColley, S.A.** 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24:29-70.
- Henry, D.A. & Speert, D.P.** 2011. *Pseudomonas*. In J. Versalovic *et al.* (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. (10th ed, pp.677-691) Washington, ASM Press.
- Heuer, H., Schmitt, H. & Smalla, K.** 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14:236-243.
- Hong, S.S., Kim, K., Huh, J.Y., Jung, B., Kang, M.S. & Hong, S.G.** 2012. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemasas. *Annals of Laboratory Medicine*, 32:359-361.

Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D. & Ploy, M.C. 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genetics* 6(1):e1000793.

Juan, C., Beceiro, A., Gutiérrez, O., Albertí, S., Garau, M., Pérez, J.L., Bou, G. & Oliver, A. 2008. Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integrón-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:3589-3596.

Juan, C. & Oliver, A. 2010. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (supl 1):19-28.

Juan, C., Zamorano, L., Mena, A., Albertí, S., Pérez, J.L. & Oliver, A. 2010. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65:474-478.

Kali, A., Srirangaraj, S., Kumar, S., Divya, H.A., Kalyani, A. & Umadevi, S. 2013. Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *The Australasian Medical Journal*, 6:686-693.

Kerckhoffs A.P., Ben-Amor K., Samsom M., van der Rest M.E., de Vogel J., Knol, J. & Akkermans, L.M. 2011. Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *Journal of Medical Microbiology*, 60:236-245.

Kidd, T.J., Grimwood, K., Ramsay, K.A., Rainey, P.B. & Bell, S.C. 2011. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49:263-268.

Kidd, T.J., Ritchie, S.R., Ramsay, K.A., Grimwood, K., Bell, S.C. & Rainey, P.B. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PLoS ONE* 7(9):e44199.

- Knoester, M., de Boer, M.G.J., Maarleveld, J.J., Claas, E.C.J., Bernards, A.T., de Jonge, E., van Dissel, J.T. & Veldkamp, K.E.** 2014. An integrated approach to control a prolonged outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Clinical Microbiology and Infection*, 20:O207-O215.
- Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A.V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D.L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J.B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M.A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D.M. & Woodford, N.** 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10:597-602.
- Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E.R. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. (1st ed, pp.115-175). Chichester (UK), John Wiley and Sons.
- Lanini, S., D'Arezzo, S., Puro, V., Martini, L., Imperi, F., Piselli, P., Montanaro, M., Paoletti, S., Visca, P. & Ippolito, G.** 2011. Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. *PLoS ONE* 6(2):e17064.
- Lavilla-Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A. & Abriouel, H.** 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International Journal of Food Microbiology*, 161:97-106.
- Ledbetter, E.C., Mun, J.J., Kowbel, D. & Fleiszig, S.M.J.** 2009. Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50:729-736.
- Lévesque, C. & Roy, P.H.** 1993. PCR analysis of integrons. In D.H. Persing *et al.* (Eds). *Diagnostic Molecular Microbiology*. (1st ed, pp.590-594) Washington, American Society for Microbiology.

Li, H., Luo, Y.F., Williams, B.J., Blackwell, T.S. & Xie, C.M. 2012. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*, 302:63-68.

Liakopoulos, A., Mavroidi, A., Katsifa, E.A., Theodosiou, A., Karagouni, A.D., Miriagou, V. & Petinaki, E. 2013. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infectious Diseases*, 13:505.

Liebert, C.A., Hall, R.M. & Summers, A.O. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63:507-522.

Lister, P.D., Wolter, D.J. & Hanson, N.D. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22:582-610.

Livermore, D.M. 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47:247-250.

Livermore, D.M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34:634-40.

López-Causapé, C., Rojo-Molinero, E., Mulet, X., Cabot, G., Moyà, B., Figuerola, J., Togores, B., Pérez, J.L. & Oliver, A. 2013. Clonal dissemination, emergence of mutator lineages and antibiotic resistance evolution in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis chronic lung infection. *PLoS ONE* 8(8):e71001.

Luna de Araújo-Jácome, P.R., Rodrigues-Alves, L., Borges-Cabral, A., Souza-Lopes, A.C. & Vieira-Maciel, M.A. 2012. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45:707-712.

Maâtallah, M., Bakhrouf, A., Habeeb, M.A., Turlej-Rogacka, A., Iversen, A., Pourcel, C., Sioud, O. & Giske, C.G. 2013. Four genotyping schemes for phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of their congruence with multi-locus sequence typing. *PLoS ONE* 8(12):e82069.

- Maâtallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do. T., Lanotte, P., Mastouri, M., Salem-Elghmati, M., Rojo, F., Mejdí, S. & Giske, C.G.** 2011. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. PLoS ONE 6(10):e25617.
- Madsen, L., Aarestrup, F.M. & Olsen, J.E.** 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. Veterinary Microbiology, 75:73-82.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. & Monnet, D.L.** 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection, 18:268-281.
- Marathe, N.P., Regina, V.R., Walujkar, S.A., Charna, S.S., Moore, E.R.B., Larsson, D.G.J. & Shouche, Y.S.** 2013. A treatment plant receiving waste water from multiple bulk drug manufacturers is a reservoir for highly multi-drug resistant integron-bearing bacteria. PLoS ONE 8(10):e77310.
- Marchiaro, P., Viale, A.M., Ballerini, V., Rossignol, G., Vila, A.J. & Limansky, A.** 2010. First report of a Tn402-like class 1 integron carrying *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas putida* from Argentina. Journal of Infection in Developing Countries, 4:412-416.
- Martínez, E., Marquez, C., Ingold, A., Merlino, J., Djordjevic, S.P., Stokes, H.W. & Chowdhury, P.R.** 2012. Diverse mobilized class 1 integrons are common in the chromosomes of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56:2169-2172.
- Martínez-Martínez, L. & Ruiz de Alegría, C.** 2009. *Escherichia coli* resistente a gentamicina y sensible a amikacina. En J.I. Alós *et al.* (Eds.), *Atlas del antibiograma*. (1ª ed, pp. 141-143) Madrid, bioMérieux University.

Mazel, D. 2008. Evolution of integrons and evolution of antibiotic resistance. In F. Baquero *et al.* (Eds.), *Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens*. (1st ed, pp.139-154) Washington, ASM Press.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A. & Davies, J. 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:1568-1574.

Mehri, I., Turki, Y., Chair, M., Chérif, H., Hassen, A., Meyer, J.M. & Gtari M. 2011. Genetic and functional heterogeneities among fluorescent *Pseudomonas* isolated from environmental samples. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57:101-114.

Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. & Palleroni, N.J. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2745-2753.

Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C.G., Gniadkowski, M., Malamou-Lada, E., Martínez-Martínez, L., Navarro, F., Nordmann, P., Peixe, L., Pournaras, S., Rossolini, G.M., Tsakris, A., Vatopoulos, A. & Cantón, R. 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection*, 16:112-122.

Mokracka, J., Koczura, R. & Kaznowski, A. 2012. Transferable integrons of Gram-negative bacteria isolated from the gut of a wild boar in the buffer zone of a national park. *Annals of Microbiology*, 62:877-880.

Morales-Espinosa, R., Soberón-Chávez, G., Delgado-Sapién, G., Sandner-Miranda, L., Méndez, J.L., González-Valencia, G. & Cravioto, A. 2012. Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. *PLoS ONE* 7(5):e37459.

Muscarella, L.F. 2004. Contribution of tap water and environmental surfaces to nosocomial transmission of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 25:342-345.

- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M. & Musilek, M.** 2010. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Research in Microbiology*, 161:234-242.
- Nikaido, H. & Saier, M.H. Jr.** 1992. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science*, 258:936-942.
- Nordmann, P., Nass, T. & Poirel, L.** 2011. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 17:1791-1798.
- Nseir, W., Taha, H., Abid, A. & Khateeb, J.** 2011. *Pseudomonas mendocina* sepsis in a healthy man. *The Israel Medical Association Journal*, 13:375-376.
- Ocampo-Sosa, A.A., Cabot, G., Rodríguez, C., Roman, E., Tubau, F., Macia, M.D., Moya, B., Zamorano, L., Suárez, C., Peña, C., Domínguez, M.A., Moncalián, G., Oliver, A., Martínez-Martínez, L. & the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** 2012. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:1703-1713.
- Ochs, M.M., Bains, M. & Hancock, R.E.** 2000. Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:1983-1985.
- Odumosu, B.T., Adeniyi, B.A. & Chandra, R.** 2013. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12:29.
- Oliver, A.** 2009. Impacto de la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasas en los hospitales: presente y futuro. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27:255-256.
- Opazo, A., Domínguez, M., Bello, H., Amyes, S.G.B. & González-Rocha, G.** 2012. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *Journal of Infection in Developing Countries*, 6:311-316.

- Palleroni, N.J.** 2005. *Pseudomonas*. In D.J. Brenner *et al.* (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2nd ed, pp.323-379) New York, Springer-Verlag.
- Palzkill, T.** 2013. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277:91-104.
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A. & Bonomo, R.A.** 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55:4943-4960.
- Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D. & Hooper, D.C.** 2006. Prevalence in the United States of *acc(6')*-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:3953-3955.
- Partridge, S.R., Brown, H.J., Stokes, H.W. & Hall, R.M.** 2001. Transposons *Tn1696* y *Tn21* and their integrons *In4* and *In2* have independent origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:1263-1270.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E & Iredell, J.R.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews*, 33:757-784.
- Paterson, D.L.** 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical Infectious Diseases*, 43 (suppl 2):S43-48.
- Patzer, J.A., Walsh, T.R., Weeks, J., Dzierzanowska, D. & Toleman, M.A.** 2009. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63:269-273.
- Peleg, A.Y. & Hooper, D.C.** 2010. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*, 362:1804-1813.

- Peña, C., Suarez, C., Gozalo, M., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Rodríguez, F., Tubau, F., Martínez-Martínez, L. & Oliver, A. for the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** 2012. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 56:1265-1272.
- Poirel, L., Potron, A. & Nordmann, P.** 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:1597-1606.
- Pollini, S., Fiscarelli, E., Mugnaioli, C., Di Pilato, V., Ricciotti, G., Neri, A.S. & Rossolini, G.M.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis caused by an epidemic metallo-beta-lactamase-producing clone with a heterogeneous carbapenem resistance phenotype. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:1272-1275.
- Poole, K.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2:65.
- Queenan, A.M. & Bush, K.** 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20:440-458.
- Quinn J.P.** 1998. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 27 (suppl 1):S117-124.
- Remold, S.K., Brown, C.K., Farris, J.E., Hundley, T.C., Perpich, J.A. & Purdy, M.E.** 2011. Differential habitat use and niche partitioning by *Pseudomonas* species in human homes. *Microbial Ecology*, 62:505-517.
- Rho, H., Shin, B., Lee, O., Choi, Y.H., Rho, J. & Lee, J.** 2012. Antibiotic resistance profile of bacterial isolates from animal farming aquatic environments and meats in a peri-urban community in Daejeon, Korea. *Journal of Environmental Monitoring*, 14:1616-1621.
- Rice, L.B. & Bonomo, R.A.** 2011. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In J. Versalovic *et al.* (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. (10th ed, pp.1082-1114) Washington, ASM Press.

Riera, E., Cabot, G., Mulet, X., García-Castillo, M., del Campo, R., Juan, C., Cantón R. & Oliver, A. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:2022-2027.

Rodrigo, C. 2010. Uso de los antimicrobianos en la población pediátrica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28:310-320.

Rodríguez, I., Guerra, B., Mendoza, M.C. & Rodicio, M.R. 2011. pUO-SeVR1 is an emergent virulence-resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66:218-220.

Rodríguez-Martínez, J.M., Poirel, L. & Nordmann, P. 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 53:4783-4788.

Rojo-Bezares, B., Estepa, V., de Toro, M., Undabeitia, E., Olarte, I., Torres, C. & Sáenz, Y. 2011. A novel class 1 integron array carrying *bla*_{VIM-2} genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 60:1053-1054.

Rolain, J.M. 2013. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Frontiers in Microbiology*, 4:173.

Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J. & Mazel, D. 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrins provides an ancestry for multiresistant integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:652-657.

Rowe-Magnus, D.A. & Mazel, D. 2001. Integrins: natural tools for bacterial genome evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 4:565-569.

Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., d'Ostuni, V., Fusté, E., Vinuesa, T. & Viñas, M. 2011a. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Microbiology*, 14:51-58.

- Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., Fusté, E., Vinuesa, T., Martínez, J.P. & Viñas, M.** 2011b. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38:398-402.
- Sabaté, M. & Prats, G.** 2002. Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20:341-345.
- Sajjad, A., Holley, M.P., Labbate, M., Stokes, H.W. & Gillings, M.R.** 2011. Preclinical class 1 integron with a complete Tn402-like transposition module. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:335-337.
- Samuelsen, Ø., Toleman, M.A., Sundsfjord, A., Rydberg, J., Leegaard, T.M., Walder, M., Lia, A., Ranheim, T.E., Rajendra, Y., Hermansen, N.O., Walsh, T.R. & Giske, C.G.** 2010. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:346-352.
- Sardelic, S., Benedic, B., Colinson-Dupuich, C., Orhanovic, S. Bosnjak, Z., Plecko, V. Cournoyer, B. & Rossolini, G.M.** 2012. Infrequent finding of metallo-beta-lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:2746-2749.
- Schelstraete, P., Van daele, S., De Boeck, K., Proesmans, M., Lebecque, P., Leclercq-Foucart, J., Malfroot, A., Vanechoutte, M. & De Baets, F.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients. *European Respiratory Journal*, 31:822-829.
- Scotta, C., Juan, C., Cabot, G., Oliver, A., Lalucat, J., Bennasar, A. & Albertí, S.** 2011. Environmental microbiota represents a natural reservoir for dissemination of clinically relevant metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55:5376-5379.
- Seok, Y., Shin, H., Lee, Y., Cho, I., Na, S., Yong, D., Jeong, S.H. & Lee, K.** 2010. First report of bloodstream infection caused by *Pseudomonas fulva*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:2656-2657.

- Sevillano, E., Gallego, L. & García-Lobo, J.M.** 2009. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathologie-Biologie*, 57:493-495.
- Shimada, T. & Matsumura, I.** 2014. Immune evasion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Japanese Journal of Clinical Immunology*, 37:33-41.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B. & Jackson, R.W.** 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:652-680.
- Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., Bertrand, X. & Hocquet, D.** 2012. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS ONE* 7(12):e49300.
- Souli, M., Galani, I. & Giamarellou, H.** 2008. Emergence of extensively drug-resistance and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill*, 13:47.
- Stokes, H.W., Nesbø, C.L., Holley, M., Bahl, M.I., Gillings, M.R. & Boucher, Y.** 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of Bacteriology*, 188:5722-5730.
- Stokes, H.W., Martínez, E., Chowdhury, P.R. & Djordjevic, S.** 2012. Class 1 integron-associated spread of resistance regions in *Pseudomonas aeruginosa*: plasmid or chromosomal platforms? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:1799-1800.
- Strateva, T. & Yordanov, D.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58:1133-1148.
- Suárez, C. & Gudiol, F.** 2009. Antibióticos beta-lactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27:116-129.
- Subbiah, M., Top, E.M., Shah, D.H. & Call, D.R.** 2011. Selection pressure required for long-term persistence of *bla*_{CMY-2}-positive IncA/C plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:4486-4493.

- Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Shimada, K., Shimojima, M. & Kirikae, T.** 2013. Novel 6'-*N*-aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57:96-100.
- Tamber, S., Ochs, M.M. & Hancock, R.E.W.** 2006. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188:45-54.
- Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H. & Nomura, N.** 2013. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes and Environments*, 28:13-24.
- Tato, M., Coque, M.T., Baquero, F. & Cantón, R.** 2010. Dispersal of carbapenemase *bla*_{VIM-1} gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:320-327.
- Teitzel, G.M. & Parsek, M.R.** 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:2313-2320.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:2233-2239.
- Thorolfsdottir, B.O. & Marteinson, V.T.** 2013. Microbiological analysis in three diverse natural geothermal bathing pools in Iceland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10:1085-1099.
- Tiago, G., Carvalheira, J. & Rocha, A.** 2012. Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54:20.

- Toleman, M.A., Vinodh, H., Sekar, U., Kamat, V. & Walsh, T.R.** 2007. *bla*_{VIM-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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:2636-2638.
- Torres, C., Moreno, M.A. & Zarazaga, M.** 2010. Prudent use of antimicrobial agents: not just for humans. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28:669-671.
- Treviño, M., Moldes, L., Hernández, M., Martínez-Lamas, L., García-Riestra, C. & Regueiro, B.J.** 2010. Nosocomial infection by VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida*. *Journal of Medical Microbiology*, 59:853-855.
- Tsakris, A., Poulou, A., Kristo, I., Pittaras, T., Spanakis, N., Pournaras, S. & Markou, F.** 2009. Large dissemination of VIM-2-metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:3524-3529.
- Uttley, L., Harnan, S., Cantrell, A., Taylor, C., Walshaw, M., Brownlee, K. & Tappenden, P.** 2013. Systematic review of the dry powder inhalers colistimethate sodium and tobramycin in cystic fibrosis. *European Respiratory Review*, 22:476-486.
- Van de Klundert, J.A. & Vliegthart, J.S.** 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In D.H. Persing *et al.* (Eds), *Diagnostic Molecular Microbiology*. (1st ed, pp.547-552) Washington, American Society for Microbiology.
- Van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., & Aarts, H.J.** 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 2:203.
- Vanhoof, R., Content, J., Van Bossuyt, E., Dewit, L. & Hannecart-Pokorni, E.** 1992. Identification of the *aadB* gene coding for the aminoglycoside-2''-O-nucleotidyltransferase, ANT (2''), by means of the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29:365-374.

- Vernez, I., Hauser, P., Bernasconi, M.V. & Blanc, D.S.** 2005. Population genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43:29-35.
- Viedma, E., Juan, C., Acosta, J., Zamorano, L., Otero, J.R., Sanz, F., Chaves, F. & Oliver, A.** 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:4930-4933.
- Viedma, E., Juan, C., Villa, J., Barrado, L., Orellana, M.A., Sanz, F., Otero, J.R., Oliver, A. & Chaves, F.** 2012. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 18:1235-1241.
- Villegas, M.V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J.N., Lopez, J.A., Quinn, J.P. & the Colombian Nosocomial Resistance Study Group.** 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:1553-1555.
- Vinué, L.** 2010. Tesis doctoral: "Prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas y comensales de *Escherichia coli*". Universidad de La Rioja.
- Vinué, L., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Olarte, I., Undabeitia, E., Somalo, S., Zarazaga, M. & Torres, C.** 2010. Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35:492-496.
- Vives-Flórez, M. & Garnica, D.** 2006. Comparison of virulence between clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *International Microbiology*, 9:247-252.
- Wagner, A.** 2006. Cooperation is fleeting in the world of transposable elements. *PLoS Computational Biology*, 2:e162.
- Walsh, T.R.** 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36 (suppl 3):S8-S14.

- Wang, J., Zhou, J.Y., Qu, T.T., Shen, P., Wei, Z.Q., Yub, Y.S. & Li, L.J.** 2010. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35:486-491.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M. & Mitsuhashi, S.** 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35:147-151.
- Waters, W., Zlosnik, J.E.A., Yau, Y.C.W., Speert, D.P., Aaron, S.D. & Guttman, D.S.** 2012. Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31:3341-3350.
- Wendel, A.F., Brodner, A.H.B., Wydra, S., Ressina, S., Henrich, B., Pfeffer, K., Toleman, M.A. & MacKenzie, C.R.** 2013. Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57:5162-5165.
- White, P.A., McIver, C.J. & Rawlinson, W.D.** 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:2658-2661.
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S.S., Ralyea, R. & Boor, K.J.** 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:2085-2095.
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Köhler, T., van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P. & Tümmler, B.** 2007. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:8101-8106.
- Wolter, D.J., Hanson, N.D. & Lister, P.D.** 2004. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 236:137-143.

Woodford, N., Turton, J.F. & Livermore, D.M. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:736-755.

Wright, C., Kominos, S.D. & Yee, R.B. 1976. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Applied and Environmental Microbiology*, 31:453-454.

Xiong, J., Alexander, D.C., Ma, J.H., Déraspe, M., Low, D.E., Jamieson, F.B. & Roy, P.H. 2013. Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57:3775-3782.

Yao, J.D.C. & Moellering, R.C. Jr. 2011. Antibacterial agents. In J. Versalovic *et al.* (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. (10th ed, pp.1043-1081) Washington, ASM Press.

Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K. & Walsh, T.R. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:5046-5054.

Young, D.C., Zobell, J.T., Stockmann, C., Waters, C.D., Ampofo, K., Sherwin, C.M. & Spigarelli, M.G. 2013. Optimization of anti-pseudomonal antibiotics for cystic fibrosis pulmonary exacerbations: aminoglycosides. *Pediatric Pulmonology*, 48:1047-1061.

PAGINAS WEB VISITADAS

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://ecdc.europa.eu>

<http://integrall.bio.ua.pt/>

http://pdj.org/eprints/index_en.cgi?PDB%3A2ODJ

<http://pubmlst.org/paeruginosa/>

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>

<http://www.cmbn.no/tonjum/seqMassager-saf.htm>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

<http://www.lahey.org/Studies/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ucl.ac.uk/eastman/research/departments/microbial-diseases/tn>

<https://www-is.biotoul.fr/>

ANEXOS

ANEXO I: Tablas y Figuras

TABLA S1.- Datos proporcionados por los voluntarios sanos en el momento del muestreo.

Individuo	Familia ^a	Edad (años) ^b	Sexo ^b	Contacto animales ^b	Alergias / Enfermedades ^b	Medicación ^b	Vegetariano ^b
1	F1	63	Hombre	No	Hipertensión	Doxazosina y Candesartan	No
2	F2	35	Hombre	No	No	No	No
3	F1	59	Mujer	No	Hipertensión	Candesartan	No
4	F2	37	Mujer	No	No	No	No
5	F1	29	Mujer	No	No	No	No
6	F3	26	Mujer	Gato	No	Aco (Loette)	No
7	F4	25	Mujer	Gato	No	No	No
8	F5	26	Hombre	No	Balsámicos	No	No
9	F3	27	Hombre	Gato	No	No	No
10	F6	61	Mujer	No	No	No	No
11	F7	37	Hombre	Conejo	Cardiopatía	Sintron	No
12	F7	9	Mujer	Conejo	No	No	No
13	F7	37	Mujer	Conejo	Hepatitis autoinmune	Cortisona y Dacortin	No
14	F7	5	Hombre	Conejo	No	No	No
15	F8	31	Hombre	No	No	No	No
16	F9	62	Hombre	No	No	No	No
17	F10	52	Mujer	Tortuga	No	No	No
18 ^c	F10	25	Mujer	Tortuga	Aspirina y aciclovir	No	No
19	F10	53	Hombre	Tortuga	No	No	No
20	F11	59	Mujer	No	No	No	No
21	F11	61	Hombre	No	No	No	No
22	F11	33	Hombre	No	Penicilinas	No	No
23	F12	25	Mujer	No	No	No	No
24	F12	32	Hombre	No	Asma	Ventolín	No
25	F13	25	Hombre	Perro	No	No	No
26	F14	27	Hombre	No	No	No	No
27 ^c	F15	58	Hombre	No	No	Metformina	No
28	F16	43	Hombre	No	No	No	No
29	F17	86	Mujer	No	Diabetes	Insulina	No
30	F18	56	Mujer	No	Diabetes e hipertensión	Eucreas, Parapres plus y Doxazosina	No
31	F18	59	Hombre	No	Hipertensión, ácido úrico y colesterol	Enalapril, Zyloric y Crestor	No

Individuo	Familia ^a	Edad (años) ^b	Sexo ^b	Contacto animales ^b	Alergias / Enfermedades ^b	Medicación ^b	Vegetariano ^b
32	F18	19	Hombre	No	No	No	No
33 ^c	F19	3	Hombre	No	No	No	No
34 ^c	F19	33	Hombre	No	No	No	No
35	F20	52	Mujer	Gato	No	No	No
36	F21	58	Mujer	Perro	Trastorno de tiroides	Levothroid y Eutirox	No
37	F22	26	Hombre	No	Derivación biliopancreática	Multicentrum y Vitamina D	No
38	F4	52	Mujer	Gato	No	No	No
39	F23	28	Hombre	Perro	No	No	No
40	F24	28	Mujer	Perro y gato	No	No	No
41	F25	54	Mujer	No	No	No	No
42	F25	57	Hombre	No	No	No	No
43	F26	25	Mujer	No	No	No	No
44	F19	9días	Mujer	No	No	No	Leche materna
45	F27	42	Hombre	No	No	No	No
46 ^c	F27	3	Mujer	No	Ibuprofeno	No	No
47	F27	41	Mujer	No	Ibuprofeno	No	No
48	F28	21	Mujer	No	No	Yasmin	No
49	F28	25	Hombre	No	No	No	No
50	F29	10	Hombre	No	No	No	No
51	F29	47	Hombre	No	No	No	No
52	F29	43	Mujer	No	No	No	No
53	F29	14	Hombre	No	No	No	No
54	F30	33	Mujer	No	Proctitis crónica inespecífica	Anticonceptivos y Claversal	No
55	F31	50	Hombre	Perro, tortuga y periquito	Diabetes, hepatitis C y cardiopatía	n.d.	No
56	F31	49	Mujer	Perro, tortuga y periquito	Hepatitis B	No	No
57	F32	34	Mujer	No	No	No	No
58	F33	32	Mujer	No	No	No	No
59	F34	36	Mujer	No	No	No	No
60	F35	64	Hombre	No	Alergia penicilinas e hipertensión	n.d.	No
61	F36	24	Hombre	Perro	Penicilinas	No	No

Individuo	Familia ^a	Edad (años) ^b	Sexo ^b	Contacto animales ^b	Alergias / Enfermedades ^b	Medicación ^b	Vegetariano ^b
62	F37	33	Mujer	No	No	No	No
63	F38	7meses	Hombre	No	No	No	Leche materna
64	F39	26	Hombre	Gato	Polen y pelo perro	n.d.	No
65	F40	7	Hombre	No	No	No	No
66	F41	23	Mujer	Perro y gato	No	No	No
67	F42	23	Mujer	Perro, gato, gallinas y conejos	Eccema atópico, alergia a polen y mercurio	n.d.	No
68	F43	22	Mujer	No	Hipertensión	Renitec	No
69	F44	23	Mujer	No	Alergia polen y mastocitosis	Antihistamínicos	No
70	F45	25	Hombre	Gato	No	Omeprazol e Inacid	No
71	F46	32	Mujer	No	No	Gestagyn	No
72	F47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
73	F48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
74	F49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
75	F50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
76	F51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
77	F52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
78	F53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
79	F54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
80	F55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
81	F56	35	Mujer	No	No	No	No
82	F57	11	Hombre	No	No	No	No
83	F58	33	Mujer	Gato	Trastorno de tiroides	Levothroid	No
84	F59	60	Hombre	Perro	Diabetes, arritmia y hepatitis C	Insulina, Sintrón y otros	No
85	F60	30	Mujer	No	No	No	No
86	F60	32	Hombre	No	No	No	No
87	F61	21	Mujer	No	No	No	No
88	F15	58	Mujer	No	No	Placinoral	No
89	F62	9	Hombre	No	No	No	No
90	F63	3	Hombre	No	No	No	No
91	F62	44	Mujer	No	No	No	No
92	F64	39	Hombre	No	No	No	No

Anexos

Individuo	Familia ^a	Edad (años) ^b	Sexo ^b	Contacto animales ^b	Alergias / Enfermedades ^b	Medicación ^b	Vegetariano ^b
93	F64	32	Mujer	No	Trombosis venosa profunda (2009)	No	No
94	F65	59	Mujer	No	No	No	No
95 ^c	F66	26	Hombre	Gato	No	No	No
96 ^c	F67	66	Hombre	No	No	No	No
97 ^c	F67	50	Mujer	No	No	No	No
98	F68	25	Hombre	No	Ácaros	No	No

^aSe consideran de la misma familia los individuos que habitan en una misma casa.

^bn.d. significa no determinado.

^c*P. aeruginosa* fue detectada en las muestras fecales de estos individuos.

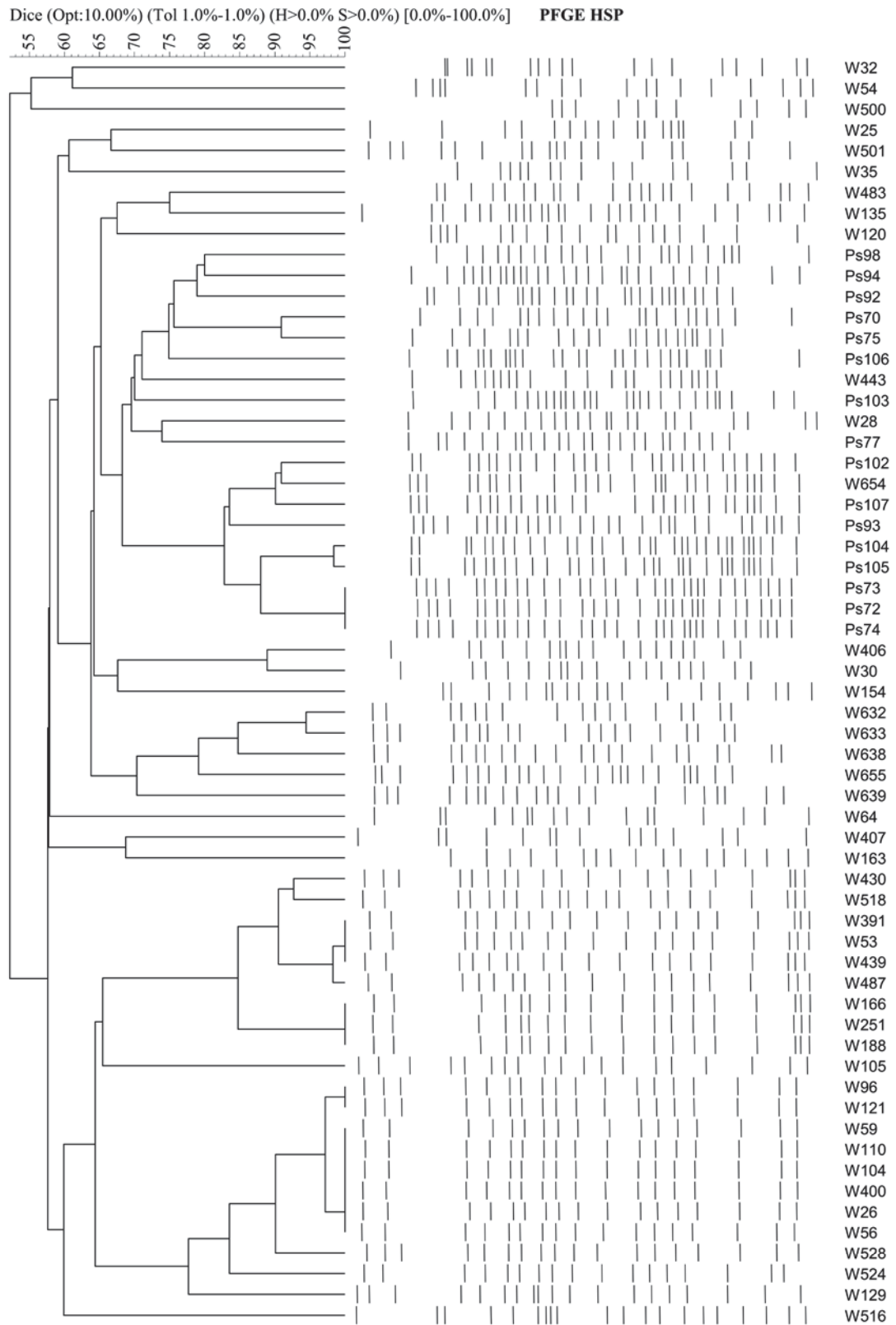


Figura S1.- Dendograma de las 61 cepas seleccionadas del HSP.

TABLA S2.- Cepas clínicas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP de Logroño incluidas en esta tesis y características de los pacientes de los que fueron aisladas.

Cepa	Paciente	Edad	Sexo	Origen de la muestra	Servicio	Tratamiento ^a	Año de aislamiento
W25	1	76	Mujer	Herida	Cirugía vascular	—	2008
W26	2	65	Hombre	Herida	Medicina general	—	2008
W28	3	32	Hombre	Úlcera	Hospitalización a domicilio	LZD	2008
W30	4	77	Hombre	Otros	Infecciosas	TOB	2008
W32	5	45	Mujer	Exudado	Cuidados paliativos	—	2008
W35	6	84	Hombre	Herida	Traumatología	IPM, LZD	2008
W53	7	55	Hombre	Herida	Neumología	CIP, VAN, TOB, MTZ	2009
W54	8	75	Hombre	Herida	Medicina general	—	2009
W56	9	69	Hombre	Herida	Infecciosas	—	2009
W59	10	46	Hombre	Exudado	Unidad Medicina Intensiva	—	2009
W64	11	86	Hombre	Exudado	Cardiología	CRO	2009
Ps74	12	78	Mujer	Espujo	Hospitalización a domicilio	TZP, SXT	2010
W96	13	79	Mujer	Orina	Nefrología	—	2009
W104	14	72	Hombre	Orina	Nefrología	—	2009
W105	15	56	Mujer	Otros	Hematología	—	2009
W110	16	88	Hombre	Herida	Medicina general	—	2009
W120	17	72	Hombre	Herida	Medicina general	—	2009
W121	18	41	Mujer	Herida	Ginecología	—	2009
W129	19	90	Mujer	Orina	Geriatría	LEV	2009
W135	20	35	Hombre	Úlcera	Medicina general	DAP, LEV	2009
W154	21	84	Mujer	Otros	Neumología	AMK	2009

Cepa	Paciente	Edad	Sexo	Origen de la muestra	Servicio	Tratamiento ^a	Año de aislamiento
W163	22	74	Hombre	Úlcera	Medicina interna	—	2009
W166	23	40	Hombre	Frotis rectal	Hematología	—	2009
W188	24	66	Hombre	Herida	Neumología	—	2009
W251	25	79	Hombre	Otros	Nefrología	—	2009
W391	26	83	Hombre	Orina	Hospitalización a domicilio	Fluconazol, DOX, CFX	2009
W638				Orina	Hematología	—	2010
W439	27	58	Hombre	Orina	Hospitalización a domicilio	—	2009
W400	28	79	Hombre	Úlcera	Medicina interna	TZP	2009
W406	29	48	Hombre	Úlcera	Urgencias	—	2009
W407	30	78	Hombre	Frotis inguinal	Unidad Cuidados Intensivos	—	2009
W430	31	99	Mujer	Herida	Medicina general	—	2009
W443	32	78	Hombre	Úlcera	Cirugía vascular	—	2009
W483	33	80	Hombre	Herida	Hospitalización a domicilio	ETP, TZP	2009
W500	34	73	Mujer	Frotis rectal	Cirugía	PRL, TOB	2009
W487	35	66	Hombre	Frotis rectal	Urología	—	2009
W501	36	64	Hombre	Frotis faríngeo	Infecciosas	—	2009
W516	37	57	Hombre	Frotis anal	Cirugía	—	2010
W518	38	16	Hombre	Exudado	Neumología	CT	2010
W524	39	79	Mujer	Frotis rectal	Neumología	CT	2010
W528	40	75	Hombre	Herida	Cirugía	—	2010
W633	41	63	Hombre	Orina	Traumatología	—	2010
W632	42	91	Hombre	Úlcera	Medicina general	—	2010
W639	43	60	Hombre	Frotis rectal	Hematología	MEM	2010
W654	44	55	Hombre	Otros	Digestivo	NOR, TZP	2010

Cepa	Paciente	Edad	Sexo	Origen de la muestra	Servicio	Tratamiento ^a	Año de aislamiento
W655	45	76	Hombre	Exudado	Neurología	AMK	2010
Ps72	46	79	Hombre	Orina	Cirugía	CFZ	2010
Ps70	47	83	Hombre	Herida	Cirugía	TZP, LZD	2010
Ps73	48	72	Hombre	Espujo	Neumología	Voriconazol	2010
Ps75	49	85	Hombre	Úlcera	Cirugía	—	2010
Ps77	50	34	Hombre	Herida	Traumatología	—	2010
Ps92	51	88	Mujer	Úlcera	Geriatría	TOB, LZD	2011
Ps93	52	81	Hombre	Orina	Medicina interna	—	2011
Ps94	53	79	Hombre	Herida	Cirugía	IPM, CAZ, LZD	2011
Ps98	54	83	Hombre	Espujo	Neumología	—	2011
Ps102	55	75	Hombre	Frotis anal	Oncología	AMK, LEV	2011
Ps103	56	81	Mujer	Herida	Cirugía	—	2011
Ps104	57	59	Hombre	Otros	Neumología	LEV, CRO	2011
Ps105	58	82	Hombre	Frotis anal	Medicina interna	AMK, TZP	2011
Ps106	59	86	Hombre	Úlcera	Cirugía vascular	—	2011
Ps107	60	42	Mujer	Orina	Nefrología	—	2011

^aAbreviaturas de los antibióticos: LZD = linezolid; TOB = tobramicina; IPM = imipenem; CIP = ciprofloxacina; VAN = vancomicina; MTZ = metronidazol; CRO = ceftriaxona; TZP = piperacilina-tazobactam; SXT = trimetoprim-sulfametoxazol; LEV = levofloxacina; DAP = daptomicina; AMK = amikacina; DOX = doxiciclina; CFZ = cefuroxima; ETP = ertapenem; PRL = piperacilina; CT = colistina; MEM = meropenem; NOR = norfloxacina; CFZ = cefazolina; CAZ = ceftazidima.

TABLA S3.- Tabla ampliada con las características analizadas de las 61 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HSP incluidas en esta tesis.

Cepa	Paciente / Año	PFGE	Fenotipo ^a	ST	Integrón		Patrón OprD ^b
					Promotor	Región variable	
W26	2 / 2008	S1a	TIC,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W56	9 / 2009	S1a	TIC,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W59	10 / 2009	S1a	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W104	14 / 2009	S1a	TIC,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W110	16 / 2009	S1a	TIC,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W400	28 / 2009	S1a	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W96	13 / 2009	S1b	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W121	18 / 2009	S1b	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W528	40 / 2010	S1c	TIC,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W524	39 / 2010	S1d	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W391	26 / 2009	S2a	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	A
W53	7 / 2009	S2a	TIC,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W439	27 / 2009	S2a	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W487	35 / 2009	S2b	TIC,ATM ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,AMK,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W166	23 / 2009	S2c	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W188	24 / 2009	S2c	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W251	25 / 2009	S2c	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W518	38 / 2010	S2d	TIC,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W430	31 / 2009	S2e	TIC,PRL ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
Ps104	57 / 2011	S3a	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
Ps105	58 / 2011	S3b	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F

Cepa	Paciente / Año	PFGGE	Fenotipo ^a	ST	Integrón		Patrón OprD ^b
					Promotor	Región variable	
W632	42 / 2010	S4a	TIC,ATM,CAZ,PRL,TZP,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W633	41 / 2010	S4b	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR ⁱ ,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W638	26 / 2010	S4c	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
Ps72	46 / 2010	S5	TIC,ATM,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
Ps73	48 / 2010	S5	TIC,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
Ps74	12 / 2010	S5	TIC,ATM,CAZ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W654	44 / 2010	S6a	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
Ps102	55 / 2011	S6b	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
Ps107	60 / 2011	S6c	TIC ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	M
W129	19 / 2009	S7	TIC,ATM,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W655	45 / 2010	S8	TIC,ATM,CAZ,PRL ⁱ ,TZP,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
Ps93	52 / 2011	S9	TIC,ATM,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,AMK ⁱ ,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	F
W105	15 / 2009	S10	TIC,ATM ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	H
W639	43 / 2010	S11	TIC,ATM,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	175	PcH1	<i>aadB-2</i>	L
W25	1 / 2008	S12	TIC ⁱ ,PRL ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,AMK ⁱ ,CIP,NOR	308	PcW	<i>aac(6')-Ib-3</i>	V
W163	22 / 2009	S13	TIC,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,AMK,CIP,NOR	308	PcW	<i>aac(6')-Ib-3</i>	V
Ps103	56 / 2011	S14	TIC,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,CIP,NOR	308	PcH1	<i>aac(6')-Ib'-3</i>	Z
Ps94	53 / 2011	S15	TIC,ATM ⁱ ,FEP,IPM,MEM,DOR,GEN,TOB,AMK,CIP,NOR	639	PcH1	<i>aac(6')-Ib'-3</i>	Q
W30	4 / 2008	S16a	TIC ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM,MEM ⁱ ,DOR,GEN,CIP,NOR	235	PcH2	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h</i>	Y
W406	29 / 2009	S16b	TIC,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM ⁱ ,DOR,GEN,CIP,NOR	235	PcH2	<i>aac(3)-Ia+aadA-1h</i>	Y
W516	37 / 2010	S17	TIC,ATM ⁱ ,CAZ,PRL ⁱ ,TZP,FEP ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR,GEN,AMK,CIP,NOR ⁱ	—	—	—	A
Ps77	50 / 2010	S18	TIC ⁱ ,FEP ⁱ ,DOR	—	—	—	A
Ps106	59 / 2011	S19	TIC,ATM,CAZ,PRL ⁱ ,TZP,FEP,DOR	—	—	—	A

Cepa	Paciente / Año	PFGE	Fenotipo ^a	ST	Integrón		Patrón OprD ^b
					Promotor	Región variable	
W500	34 / 2009	S20	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP	—	—	—	G
W407	30 / 2009	S21	TIC ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR	—	—	—	I
W32	5 / 2008	S22	IPM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR ⁱ	—	—	—	J
Ps98	54 / 2011	S23	IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR	—	—	—	K
W120	17 / 2009	S24	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,IPM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP	—	—	—	N
W501	36 / 2009	S25	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR	—	—	—	O
Ps70	47 / 2010	S26a	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR	—	—	—	P
Ps75	49 / 2010	S26b	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR	—	—	—	P
W54	8 / 2009	S27	TIC ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,AMK ⁱ ,CIP ⁱ	—	—	—	R
W35	6 / 2008	S28	TIC ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR	—	—	—	S
W154	21 / 2009	S29	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,CAZ ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR	—	—	—	T
Ps92	51 / 2011	S30	TIC ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ	—	—	—	U
W28	3 / 2008	S31	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR	—	—	—	W
W64	11 / 2009	S32	TIC ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR	—	—	—	X
W135	20 / 2009	S33	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,FEP ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR	—	—	—	a
W483	33 / 2009	S34	TIC ⁱ ,ATM ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR ⁱ	—	—	—	a
W443	32 / 2009	S35	TIC ⁱ ,PRL ⁱ ,TZP ⁱ ,IPM ⁱ ,MEM ⁱ ,DOR ⁱ ,CIP ⁱ ,NOR	—	—	—	b

^aAbreviaturas de los antibióticos: TIC = ticarcilina; ATM = aztreonam; CAZ = ceftazidima; PRL = piperacilina; TZP = piperacilina-tazobactam; FEP = cefepime; IPM = imipenem; MEM = meropenem; DOR = doripenem; GEN = gentamicina; TOB = tobramicina; AMK = amikacina; CIP = ciprofloxacina; NOR = norfloxacina; i: sensibilidad intermedia.

^bClasificación acorde a **Tabla 37**.

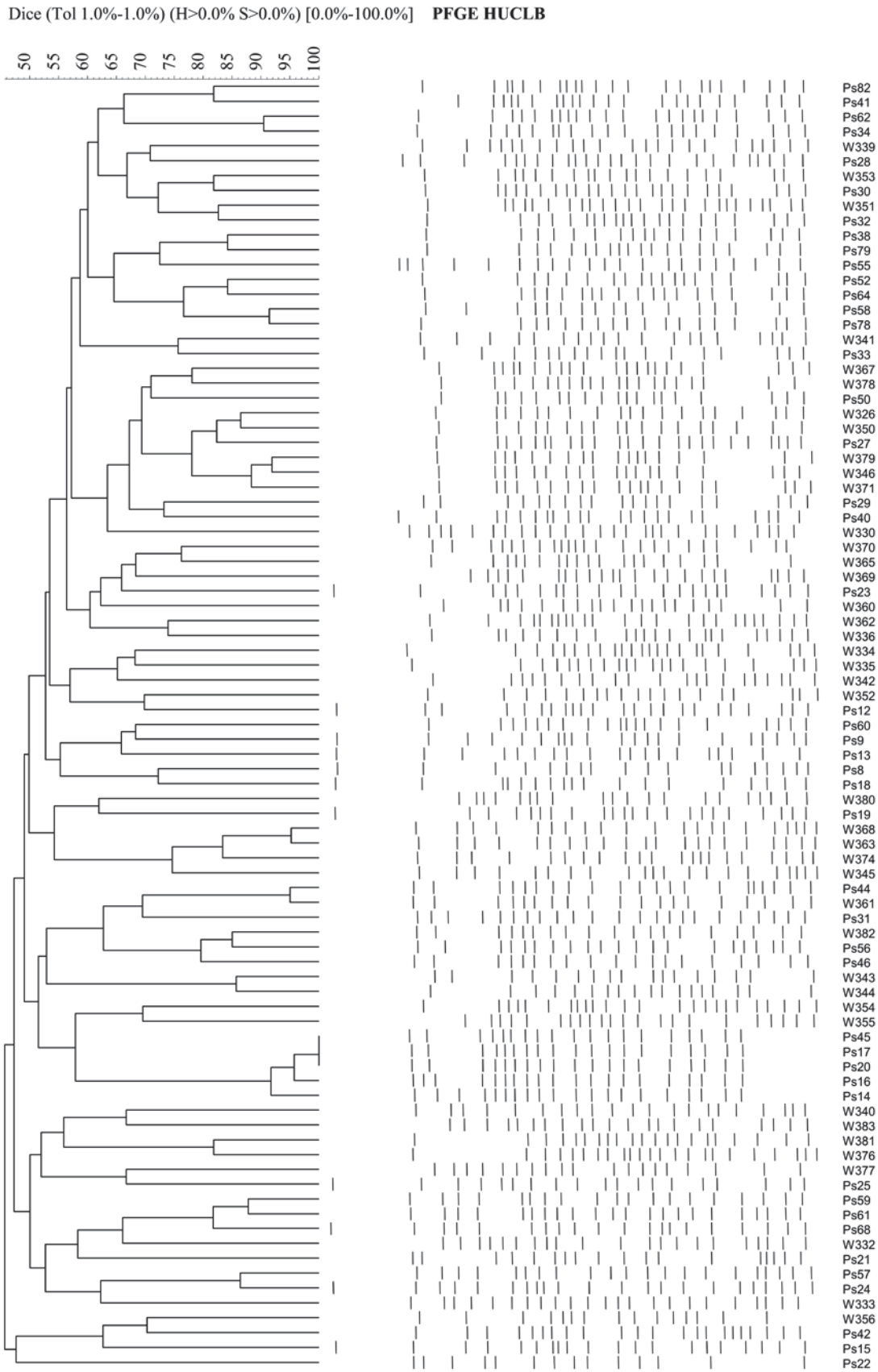


Figura S2.- Dendrograma de las 87 cepas seleccionadas del HCULB.

TABLA S4.- Cepas clínicas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB de Zaragoza incluidas en esta tesis y características de los pacientes de los que fueron aisladas.

Cepa	Paciente	Edad	Sexo	Origen de la muestra	Servicio	Tratamiento previo ^a	Año de aislamiento
W326	1b	39	Hombre	Líquido peritoneal	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W330	2b	72	Hombre	Absceso intraabdominal	UCI	Beta-lactámicos	2008
W332	3b	79	Hombre	Sangre	UCI	Carbapenémicos y otras familias	2008
W333	4b	41	Hombre	Sangre	UCI	Carbapenémicos y otras familias	2008
W334	5b	61	Hombre	Herida quirúrgica	Cirugía general	Carbapenémicos	2008
W335	6b	64	Hombre	Orina	Neurología	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W350				Sangre	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W336	7b	77	Mujer	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W339	8b	26	Mujer	Broncoaspirado	UCI	No	2008
W340	9b	49	Hombre	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W351				Lesión de piel	Nefrología	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W341	10b	78	Hombre	Herida quirúrgica	Cirugía general	Carbapenémicos	2008
W342	11b	68	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Otras familias	2008
W343	12b	21	Mujer	Orina	Infecciosas	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W344	13b	50	Hombre	Lesión de piel	UCI	No	2008
W345	14b	54	Hombre	Broncoaspirado	UCI	No	2008
W346				Sangre	UCI	No	2008
W352	15b	77	Hombre	Líquido peritoneal	UCI	No	2008
W354				Orina	UCI	No	2008
W353	16b	82	Hombre	Sangre	UCI	Carbapenémicos y otras familias	2008
W355	17b	44	Hombre	Sangre	Medicina interna	Carbapenémicos y otras familias	2008

Cepa	Paciente	Edad	Sexo	Origen de la muestra	Servicio	Tratamiento previo^a	Año de aislamiento
W356	18b	62	Hombre	Lesión de piel	Vascular	Carbapenémicos	2008
W360	19b	44	Mujer	Sangre	UCI	Beta-lactámicos y otras familias	2008
W361	20b	78	Hombre	Orina (sonda)	UCI	No	2008
W362	21b	74	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W363	22b	75	Mujer	Orina	UCI	No	2008
W365	23b	43	Hombre	Orina (sonda)	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2008
W367	24b	71	Mujer	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
W368	25b	45	Mujer	Orina	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
W369	26b	83	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Otras familias	2009
W370	27b	46	Hombre	Herida quirúrgica	Vascular	Carbapenémicos	2009
W371	28b	77	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
W374	29b	74	Hombre	Orina	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
W376	30b	85	Hombre	Broncoaspirado	UCI	Beta-lactámicos y otras familias	2009
W377	31b	63	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
W379				Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
W378	32b	45	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
W380	33b	83	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	No	2009
W381	34b	71	Mujer	Broncoaspirado	UCI	Beta-lactámicos	2009
W382	35b	78	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
W383	36b	68	Hombre	Lesión de piel	Neumología	Otras familias	2009
Ps8	37b	74	Hombre	Lesión de piel	Digestivo	Carbapenémicos	2009
Ps23	38b	44	Hombre	Espuito	Medicina interna	No	2009
Ps24	39b	65	Mujer	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009

Cepa	Paciente	Edad	Sexo	Origen de la muestra	Servicio	Tratamiento previo^a	Año de aislamiento
Ps25	40b	75	Mujer	Lesión de piel	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps27	41b	57	Hombre	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps9	42b	47	Mujer	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps28	43b	74	Hombre	Úlcera genital	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps55	44b	47	Hombre	Aspirado traqueal	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps50	45b	79	Hombre	Aspirado traqueal	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps29	46b	50	Mujer	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps30	47b	58	Mujer	Orina	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps31	48b	69	Hombre	Orina	Medicina interna	Carbapenémicos	2009
Ps12	49b	50	Mujer	Frotis faríngeo	UCI	Beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps56	50b	77	Hombre	Espujo	Hospitalización Ejea	No	2009
Ps52	51b	66	Mujer	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2009
Ps57	52b	80	Hombre	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps58	53b	71	Mujer	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos y otras familias	2010
Ps78	54b	66	Hombre	Orina	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps32	55b	62	Mujer	Orina	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps33	56b	39	Hombre	Absceso subfrénico	Digestivo	Carbapenémicos y otras familias	2010
Ps34	57b	53	Hombre	Absceso intraabdominal	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps62				Orina	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps59	58b	55	Mujer	Orina	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps79	59b	70	Mujer	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps82	60b	71	Hombre	Líquido peritoneal	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps60	61b	52	Mujer	Orina	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010

Cepa	Paciente	Edad	Sexo	Origen de la muestra	Servicio	Tratamiento previo^a	Año de aislamiento
Ps61	62b	66	Hombre	Orina	Oncología	Beta-lactámicos	2010
Ps13	63b	61	Hombre	Aspirado traqueal	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps14	64b	41	Hombre	Herida quirúrgica	Cirugía	Carbapenémicos y otras familias	2010
Ps16				Herida quirúrgica	Cirugía	Carbapenémicos y otras familias	2010
Ps15	65b	78	Hombre	Lesión de piel	Medicina interna	Carbapenémicos	2010
Ps64	66b	69	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps17	67b	67	Mujer	Espujo	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps18	68b	67	Mujer	Lesión de piel	Infecciosas	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps38	69b	45	Mujer	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps40	70b	63	Hombre	Broncoaspirado	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps68	71b	74	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps41	72b	61	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps19	73b	82	Hombre	Orina	Medicina interna	Beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps20	74b	58	Hombre	Orina	Centro Salud Botorrita	No	2010
Ps42	75b	56	Hombre	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps44	76b	85	Hombre	Lesión de piel	Medicina interna	Carbapenémicos	2010
Ps21	77b	72	Mujer	Lesión de piel	Medicina interna	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps45	78b	83	Hombre	Orina	Centro Salud Tarazona	No	2010
Ps46	79b	74	Mujer	Herida quirúrgica	UCI	Carbapenémicos, beta-lactámicos y otras familias	2010
Ps22	80b	92	Hombre	Bilis	Cirugía	No	2010

^aTratamiento previo: únicamente se especifica si han tomado carbapenémicos, otros beta-lactámicos u otras familias de antibióticos. En otras familias se engloban: quinolonas, tetraciclinas, aminoglicósidos, glicopéptidos, lincosamidas, sulfamidas, macrólidos, azoles o colistina; pudiendo haber tomado 1 o varios antibióticos de estas familias.

TABLA S5.- Tabla ampliada con las características analizadas de las 87 cepas de *P. aeruginosa* Carb-R del HCULB incluidas en esta tesis.

Cepa	Paciente / Año	PFGE	Fenotipo ^a	MBL	ST	Estructura(s) integrón ^b	Patrón OprD ^c
W330	2b / 2008	R1	CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK	Sí	973	10	A
W333	4b / 2008	R2	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK	Sí	973	10	A
W345	14b / 2008	R3a	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK	Sí	973	10	A
W363	22b / 2008	R3b	IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK	Sí	973	10	A
W368	25b / 2009	R3c	CAZ ⁱ , IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP ⁱ	Sí	973	10	g
W374	29b / 2009	R4	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR ⁱ , GEN, TOB, AMK	Sí	973	10	A
Ps24	39b / 2009	R5	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP ⁱ	Sí	973	10	A
Ps57	52b / 2010	R6	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK	Sí	973	10	A
Ps59	58b / 2010	R7	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	Sí	973	10	A
Ps61	62b / 2010	R8	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP ⁱ	Sí	973	10	A
Ps68	71b / 2010	R9	FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	Sí	973	10	A
W340	9b / 2008	R10	FEP ⁱ , IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	Sí	973	10	d
Ps32	55b / 2010	R11a	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	Sí	235	4 + 10	c
Ps64	66b / 2010	R11a	CAZ ⁱ , IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	c
Ps38	69b / 2010	R11b	FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	c
Ps52	51b / 2009	R11b	CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	Sí	235	4 + 10	c
Ps78	54b / 2010	R11b	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	c
Ps55	44b / 2009	R11c	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB ⁱ , CIP	Sí	235	4 + 10	c
Ps58	53b / 2010	R12	IPM, MEM ⁱ , DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	c
W335	6b / 2008	R13	CAZ, FEP ⁱ , IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	c
W376	30b / 2009	R14	ATM, CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	c
W381	34b / 2009	R15	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	c

Cepa	Paciente / Año	PFGE	Fenotipo ^a	MBL	ST	Estructura(s) integrón ^b	Patrón OprD ^c
Ps40	70b / 2010	R16	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	e
W344	13b / 2008	R17a	ATM, CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	e
W352	15b / 2008	R17b	ATM, CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	e
W353	16b / 2008	R18	CAZ, FEP, IPM, MEM, GEN, TOB, CIP	Sí	235	4 + 10	e
Ps79	59b / 2010	R11b	FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
W334	5b / 2008	R13	ATM ⁱ , CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, TOB ⁱ , CIP	Sí	235	5 + 10	c
W326	1b / 2008	R19	CAZ ⁱ , FEP ⁱ , IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
W346	14b / 2008	R20	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
W350	6b / 2008	R20	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
W360	19b / 2008	R21a	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
W371	28b / 2009	R21b	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
W379	31b / 2009	R21b	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
W365	23b / 2008	R22	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
Ps27	41b / 2009	R23	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 10	e
W343	12b / 2008	R24	CAZ, FEP ⁱ , IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	6 + 10	e
Ps60	61b / 2010	R25	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	8 + 10	e
W378	32b / 2009	R26	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	Sí	235	5 + 11	e
W336	7b / 2008	R27	CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, CIP	Sí	235	5 + 10 + 12	e
Ps12	49b / 2009	R28	CAZ, FEP, IPM ⁱ , MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	Sí	235	9	f
Ps29	46b / 2009	R29	CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	Sí	235	9	f
Ps56	50b / 2009	R30	ATM, CAZ ⁱ , IPM ⁱ , MEM ⁱ , GEN, TOB, AMK, CIP	Sí	175	1 + 10	A
W361	20b / 2008	R31	IPM, MEM ⁱ , DOR ⁱ , GEN, TOB, CIP	No	175	1	F
W382	35b / 2009	R31	ATM, CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	175	1	F

Cepa	Paciente / Año	PFGE	Fenotipo ^a	MBL	ST	Estructura(s) integrón ^b	Patrón OprD ^c
Ps14	64b / 2010	R32a	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	175	1	F
Ps16	64b / 2010	R32b	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	175	1	F
Ps17	67b / 2010	R32c	ATM, CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	175	1	F
Ps20	74b / 2010	R32c	CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	175	1	F
Ps44	76b / 2010	R32c	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	175	1	F
Ps45	78b / 2010	R32c	ATM, CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB ⁱ , CIP	No	175	1	F
Ps46	79b / 2010	R32c	ATM, CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	175	1	F
Ps31	48b / 2009	R33	ATM, CAZ ⁱ , FEP, IPM ⁱ , MEM ⁱ , DOR ⁱ , GEN, TOB, CIP	No	175	1	F
Ps50	45b / 2009	R34	CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	No	235	3	f
W342	11b / 2008	R35a	ATM ⁱ , FEP ⁱ , IPM, MEM, GEN, CIP	No	235	3 + 4	r
W351	9b / 2008	R35b	ATM, CAZ, FEP, IPM, DOR, GEN, CIP	No	235	3 + 4	q
W367	24b / 2009	R36	CAZ ⁱ , FEP, IPM, GEN, CIP	No	235	3 + 4	W
Ps28	43b / 2009	R37	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM ⁱ , GEN, AMK, CIP	No	235	4	s
Ps30	47b / 2009	R38	IPM, MEM ⁱ , GEN, CIP	No	235	4	c
Ps34	57b / 2010	R39a	IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	111	5	n
Ps62	57b / 2010	R39b	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	111	5	n
Ps41	72b / 2010	R40	IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	111	5	n
Ps82	60b / 2010	R39a	IPM, MEM, DOR, GEN, TOB, CIP	No	111	7	n
W354	15b / 2008	R41	IPM, MEM ⁱ , GEN, TOB, AMK, CIP	No	111	7	N.D.
W355	17b / 2008	R42	ATM, IPM ⁱ , MEM	No	253	2	D
Ps13	63b / 2010	R43	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR	No	—	—	A
Ps22	80b / 2010	R44	IPM	No	—	—	A
W370	27b / 2009	R45	ATM, CAZ ⁱ , IPM, MEM	No	—	—	N

Cepa	Paciente / Año	PFGE	Fenotipo ^a	MBL	ST	Estructura(s) integrón ^b	Patrón OprD ^c
Ps42	75b / 2010	R46	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, CIP	No	—	—	N
Ps21	77b / 2010	R47	ATM, IPM, MEM	No	—	—	B
W383	36b / 2009	R48	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR, GEN, AMK, CIP	No	—	—	W
W362	21b / 2008	R49	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR	No	—	—	h
Ps15	65b / 2010	R50	IPM, MEM ⁱ , DOR	No	—	—	i
W356	18b / 2008	R51	IPM, CIP	No	—	—	j
Ps9	42b / 2009	R52	ATM, IPM, MEM, DOR	No	—	—	k
W377	31b / 2009	R53	ATM, CAZ, TZP, FEP, IPM, MEM, DOR	No	—	—	l
W339	8b / 2008	R54	ATM, CAZ, FEP ⁱ , IPM, MEM, DOR	No	—	—	m
W380	33b / 2009	R55	ATM, IPM, MEM ⁱ , CIP	No	—	—	o
Ps8	37b / 2009	R56	IPM	No	—	—	p
Ps25	40b / 2009	R57	ATM, FEP, IPM ⁱ , MEM	No	—	—	f
Ps33	56b / 2010	R58	IPM	No	—	—	v
Ps18	68b / 2010	R59	IPM, MEM ⁱ	No	—	—	u
W341	10b / 2008	R60	IPM	No	—	—	t
W332	3b / 2008	R61	IPM	No	—	—	N.D.
W369	26b / 2009	R62	IPM, GEN	No	—	—	N.D.
Ps19	73b / 2010	R63	ATM, CAZ ⁱ , FEP, IPM, MEM, DOR	No	—	—	N.D.
Ps23	38b / 2009	R64	ATM, CAZ, FEP, IPM, MEM, DOR, CIP	No	—	—	N.D.

^aAbreviaturas. ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; TZP: piperacilina-tazobactam; FEP: cefepime; IPM: imipenem; MEM: meropenem; DOR: doripenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMK: amikacina; CIP: ciprofloxacina; i: sensibilidad intermedia.

^bEstructuras correspondientes a **Figura 49**.

^cN.D.: no determinado. Clasificación acorde a **Tabla 41**.

ANEXO II: Secuencias incluidas en la base de datos GenBank

1) *Pseudomonas aeruginosa* strain W64 insertion sequence IS*Psp4* transposase (*tnp*) gene, complete cds; and disrupted outer membrane protein (*oprD*) gene, complete sequence

```

LOCUS       KF517098                2441 bp    DNA        linear    BCT 23-NOV-2013
DEFINITION  Pseudomonas aeruginosa strain W64 insertion sequence ISPsp4
             transposase (tnp) gene, complete cds; and disrupted outer membrane
             protein (oprD) gene, complete sequence.
ACCESSION   KF517098
VERSION     KF517098.1  GI:558483914
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas aeruginosa
  ORGANISM  Pseudomonas aeruginosa
             Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
             Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1 (bases 1 to 2441)
  AUTHORS   Estepa,V., Rojo-Bezarez,B., Olarte,I., Torres,C. and Saenz,Y.
  TITLE     Characterization of carbapenem resistance mechanisms in Pseudomonas
             aeruginosa strains
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 2441)
  AUTHORS   Estepa,V., Rojo-Bezarez,B., Olarte,I., Torres,C. and Saenz,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-AUG-2013) Area de Microbiologia Molecular, Centro de
             Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono,
             La Rioja 26006, Spain
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
             Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
             ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..2441
                     /organism="Pseudomonas aeruginosa"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="W64"
                     /isolation_source="exudate"
                     /host="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:287"
                     /country="Spain"
     gene           1..>4
                     /gene="oprD"
                     /note="outer membrane protein; disrupted by insertion
                     sequence ISPsp4"
     repeat\_region  5..7
                     /note="target site duplication"
     mobile\_element 8..1119
                     /mobile_element_type="insertion sequence:ISPsp4"
     repeat\_region  8..20
                     /note="left repeat region"
                     /rpt_type=inverted
     gene           62..1090
                     /gene="tnp"
     CDS           62..1090
                     /gene="tnp"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="transposase"
                     /protein_id="AHA56768.1"
                     /db_xref="GI:558483915"
                     /translation="MSYSELVSEERATIQVSHAQGLSLRRIACLINRSPSTVSRMRR
             NRDAAGSYSARVAQQRMKARRQACRPMRKLPGSERFELVIHMLRQRLSPEQIAGKLR
             SMNIPSLRDYVCRETIYNAIYALPVGELRKEKELILCLRQKTRRRPRLGGVDRRGQIP
             EMVSIHLRPPVEEDRLMPGHWEGLIKKANASSVGTLVERTSGYLMLVKMNDATATS
             AMEGFSAALNNMPLAMRKSMTYDQGREMAQHAEITQRTGVAIYFCDPHSPWQRGSNEN
             INGLIRQYLPKGTDLVHSQEELDAIAFQLNMRPRKRFDFKCPIEVMSEVMQKALAMQ
             YDAPASIQ"

```

Anexos

```

repeat_region 1107..1119
                /note="right repeat region"
                /rpt_type=inverted
repeat_region 1120..1122
                /note="target site duplication"
gene <1123..2441
                /gene="oprD"
                /note="outer membrane protein; disrupted by insertion
                sequence ISPsp4"

```

ORIGIN

```

1 atgaaagggc ggcggcaaaa actgagtgca acacctgacc tttccggtac ggtgctgccc
61 tatgtcttat tccgaactca gcgttgaaga gcgtgccacc attcaagtta gtcatgccc
121 aggcctcagc ttgctcagga ttgcttctt gatcaaccga tccccttcga cggtcagccg
181 ggagatgcgc cgcaatcgag atgcagctgg cagctactcg gcccggtggtg ctcagcagcg
241 gatgaaggcc cgccgcagag ctgtctggcc catgcgaaag ctgctgcccag ggagtgagcg
301 ctttgaactg gtgatccata tgctgcgcca gcgtttgtct cccgagcaga ttgccggcaa
361 gctgctcagt atgaacatac ccagccttag agatgcctac gtctgtcggc agacgatcta
421 caacgcgatc tatgccctgc ccgtcgggga gctgcgcaag gaggttgatcc tttggttggc
481 ccaaggaagc acgacacgta gaccacgcct tggcggtgtg gatcggcgcg ggcagattcc
541 cgaagtcagt agcattcact tgcccccgc ggaagttgaa gaccggctga tgcggggca
601 ttgggaaggc gaccttatta agggtaaggc taacgcctcg tctgtaggta cgctggtgga
661 gcgcaactag ggttacctga tgctgggtaa gatgaacgac gcgacggcga cctcgcgat
721 ggagggcttc agcgcgcgcc tcaataacat gccgctggcg atgctgcaaga gcatgacct
781 cgaccagggc cgggaaatgc cacagcagc cgagatcacc cagagaaccg gtgtgctgat
841 ctactctctc gaccgcgaca gcccttggca gcgctggcagc aacgaaaaca ttaatggcct
901 gatccgcagc tacctgccc aaggcactga ctgtctggta catagccaag aagaactgga
961 tgccattgct tttcaactga acatgcgtcc acgtaagcgc ttcgatttca aatgtcctat
1021 cgaagtcagt agcgaagtga tgcaaaaagc ctgggctatg caatatgatg ctccctgctc
1081 aattcaataa ccgtgttgca ctcagctcct gcaaccgcca agtgatgaag tggagcgcca
1141 ttgcaactgc ggtttccgca ggtagcactc agttcgcctg ggccgacgca ttcgtcagcg
1201 atcagggcga agcgaagggg ttcacgcaag acagcagcct gcacctgctg ctccgcaact
1261 actatttcaa ccgtgacggc aaggaaggtc gggcgatcgc cgtcgattgg acccagggct
1321 tctcaccac ctacgaatcc ggttctactc aaggcaccgt gggcttccgc gtcgatgctc
1381 tccgtactct gggcctgaag ctgcagcgtc cctcggacaa gaccggcacc ggcaacctgc
1441 cgggatgtaa cgacggcaag ccgcgcgacg actacagccg cgctggggcg gccctgaagg
1501 tgcgcatttc caagacctg ctgaagtggg gcgaaaatgca acctaccgcg ccggcttctc
1561 ccgcccggcg cagccgcctg tccccgcaga ccgcgaccgg cttccaactg cagagcagtg
1621 aattcgaagg gctcgatctc gaagcgggcc acttcaccga aggcaagcag ggcaccacca
1681 ccaagtgcgc cggcgaactc tacgcaacct atgcaggcca gaccgccaag agcgcggact
1741 tcgcccggcg ccgctacgcg atcaccgaca atctcagcgc ctccctgtat ggcgccaat
1801 tgaagacat ctatcgccag tattacctga acaccaacta cacaatcccg ctggcatccg
1861 accagtcgct gggcttccgac ttcaacatct accgcaccac cgatgaaggc aaagccaagg
1921 ccggcgacat cagcaaacacc gcctgggtccc tggccggcgc gtacacctg gacgcgcaca
1981 ccttcaccct ggctaccag caggtgcatg gcgacgagcc gttcgaactc atcggcttcc
2041 gcgagaacgg ttccggcggc ggcggtgact cgattttctc cgccaactcc gtgcagtact
2101 ccgacttcaa cggccccggc gagaaatcct ggcaggcccg ctacgacctg aacatggcct
2161 cctacggcgt tcccggcctg accttcatgg ttcgttacat caacggtaag gacatcgacg
2221 gcaccaaggt cgactccagt tcctcctacg cgggcctgta cggcgaggac ggcaagcacc
2281 acgagaccaa cctggaagcc aagtacgtcg tccaggccgg cccggccaag gacctgctg
2341 tccgtatccg ccaggcctgg caccgcgcca atgcccagca gggatgaaggc gaccagaacg
2401 agttccgctc gatcgtcgac tatccgctgt cgatcctgta a

```

2) *Pseudomonas aeruginosa* strain Ps92 insertion sequence ISPa1328 transposase (*tnp*) gene, complete cds; and disrupted outer membrane protein (*oprD*) gene, complete sequence

```

LOCUS      KF517097                2668 bp    DNA        linear    BCT 23-NOV-2013
DEFINITION Pseudomonas aeruginosa strain Ps92 insertion sequence ISPa1328
            transposase (tnp) gene, complete cds; and disrupted outer membrane
            protein (oprD) gene, complete sequence.
ACCESSION  KF517097
VERSION    KF517097.1  GI:558483912
KEYWORDS   .
SOURCE     Pseudomonas aeruginosa
   ORGANISM Pseudomonas aeruginosa
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE  1 (bases 1 to 2668)
   AUTHORS Estepa,V., Rojo-Bezares,B., Olarte,I., Torres,C. and Saenz,Y.
   TITLE   Characterization of carbapenem resistance mechanisms in Pseudomonas
            aeruginosa strains
   JOURNAL Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 2668)
   AUTHORS Estepa,V., Rojo-Bezares,B., Olarte,I., Torres,C. and Saenz,Y.
   TITLE   Direct Submission
   JOURNAL Submitted (07-AUG-2013) Area de Microbiologia Molecular, Centro de
            Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono,
            La Rioja 26006, Spain
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
   source   1..2668
            /organism="Pseudomonas aeruginosa"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="Ps92"
            /isolation_source="clinical sample"
            /host="Homo sapiens"
            /db_xref="taxon:287"
            /country="Spain"
   gene     1..>455
            /gene="oprD"
            /note="outer membrane protein; disrupted by insertion
            sequence ISPa1328"
   repeat\_region 456..463
            /note="target site duplication"
   mobile\_element 464..1791
            /mobile_element_type="insertion sequence:ISPa1328"
   gene     complement(500..1726)
            /gene="tnp"
   CDS      complement(500..1726)
            /gene="tnp"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="transposase"
            /protein_id="AHA56767.1"
            /db_xref="GI:558483913"
            /translation="MNKTPHTITDELLDQLLANYQKPEDLIGTDGILKQLTKKLVERA
            LDAELTHHLGHNKHQPVSNWGMNTRNGFSKKKLKGEFGELPIEVRDRHGTFFDPQIIE
            KHQTRWTGFDDKILSLYARGMTVREIQAHLQEMYGAEVSPSLISSVTDAVADEVKAWQ
            SRPLDTPVPIVYLDCAIHSKVRGAVRVKAVYLLALGINLAGEKEILGLWIAQNEGAKFW
            LQVVTELRNRGVQDIFVACVDGLKGFPEAIEAVFPRTSVQLCIVHMRHSLNYSVSWKR
            RAEVAADLKRIYQSSTADEAELRLGEFEAKWDDDDYLPIGQSWRRNWARITPFFDFPPE
            IRKVIYTTNAIESVNMSLRKITKNRGSFSPDEALLKLFYLALRNI SKKWTMPIRDWKA
            ALTRFTISYEDRLPQQ"
   repeat\_region 1792..1799
            /note="target site duplication"
   gene     <1800..2668
            /gene="oprD"
            /note="outer membrane protein; disrupted by insertion
            sequence ISPa1328"

```

Anexos

ORIGIN

1 atgaaagtga tgaagtggag cgccattgca ctggcggttt ccgcaggtag cactcagttc
61 gccgtggccc acgcattcgt cagcgatcag gccgaagcga aggggttcat cgaagacagc
121 agcctcgacc tgctgctcog caactactat ttcaaccgtg acggcaagag cggcagcggg
181 gaccgcgtcg actggacca aggttcctc accacctatg aatccggctt cacccaaggg
241 accgtgggct tcggcgtcga tgcttcggc tacctcggtc tgaagctcga cggcaacctc
301 gacaagagcg gtaccggcaa cctgcccgtg atgaacgacg gcacgccccg tgacgactac
361 agccgcgccc gtggcgccgt gaaggtaacg atctccaaga ccattgtgaa gtggggcgag
421 atgcagccga ccgctccggt cttcgccgcc ggccgagcc gccgaggggtg tgcagaattt
481 tgtgtaaccg gggtaggggt tactgctcgc gcaggcggtc ttcgtagctg atcgtaaagc
541 gagtcagcgc cgcttccag tcacggatcg gcatcgcca tttcttgctg atgttgcgta
601 cctcgccagg gaagagtttc agcagccct cgtcaactggg gaacgagccg cggttcttgg
661 taatcttgcg caggctcatg ttcaccgatt cgatggcgtt ggtggtgtag atcaccttc
721 ggatctccgg cgggaagtcg aagaacggcg tgatcctggc ccagttgctg cgcacggact
781 ggccaatcgg caggtagtcg tcaccccact tggcctcgaa ttcaccgagg cgcagttcgg
841 cctcttcctg ggtgctggac tggataatcc gcttcaggtc ggccggcacc tccgcccggc
901 gcttccagga cacgtagttc aggtgtgccc tgaccatgtg cacgatgcac agctgcacgc
961 tggcgccggg gaacaccgcc tcgatggcct cggggaagcc cttcaagcca tccacgcagg
1021 cgacgaagat gtctgaacg ccacgggtgc gcagttcggg caccacctgc aaccagaact
1081 tggcgccctc gttctgggcg atccacagcg cgaggatttc cttctcgccg gccaggttga
1141 taccagcgcg cagatagacc gccttcccc gcacggcgc ctcgcgacc ttgctgtgga
1201 tgcagtcgag gttagacgat ggatacaccg tctcgagcgg gcgcgactgc caggccttga
1261 cctcatcggc caccgcgtcg gtccacgagg agatcaggct gggtgacacc tcggcaccgt
1321 acatttcctg caagtgcgac tggatctcgc gcaccgtcat gccgcggaac tacagcgaaa
1381 ggatcttgct gtcgaagccc gtccagcggg tctgggtgct ctcgatgatc tgcggatcga
1441 aggtgccatg ccggtcgcgc ggtacctcga tgggcagttc accgaactcg cccttgagtt
1501 tcttcttgct gaaaccgttg cgggtgtgtc ccattccaat gctgacaggg tgatgcttgt
1561 tgtggcccag gtgggtgggtc agctcggcat ccagcgcacg ctcgaccaac tcttggta
1621 gttgcttgag gatgcccgtc gtaccgatca agtcttcagg cttctgataa ttggccagaa
1681 gctgatccag cagttcgtcg gtaatggtgt ggggcgtctt gttcatggtg tctccagttc
1741 tcagcgacag tgtcgctcat gagccgggta cacaaaattt cggacacctt ccagccgct
1801 gttcccgcag accgcgaccg gcttccaact gcagagcagc gaactcgaag ggtcgtatct
1861 cgaagcgggc cacttcaccg aaggcaagca gggcaccacc accaagtcgc gcggcgaact
1921 ctacgcaacc tatgcaggcg agaccgcaa gagcgcgat ttcattgggg gccgctacgc
1981 aatcaccgat aacctcagcg cctccctgta cgggtgctgaa ctcgaagaca tctatcgtca
2041 gtattacctg aacagcaact acaccatccc actggcatcc gaccaatcgc tgggcttcga
2101 tttcaacatc taccgcacaa acgatgaagg caaggccaag gccggcgaca tcagcaaac
2161 cacttgggtc ctggcggcag cctacactct ggatgcgcac actttcacct tggcctacca
2221 gaaggtccat ggcgatcagc cgtttgatta tatcggcttc ggcgagaacg gttccggcgg
2281 cggcgggtgac tcgattttcc tcgccaaact cgtgcagtac tccgacttca acggcccgg
2341 cgagaaatcc tggcaggccc gctacgacct gaacctcgc tctatggcg tcccgccct
2401 gactttcatg gtccgctata tcaatggcaa ggacatcgat ggcaccaaga tgtctgacaa
2461 caacgtcggc tataagaact acggctacgg cgaggacggc aagcaccacg agaccaacct
2521 ggaagccaag tacgtggtcc agtccggtcc ggccaaggac ctgtcgttcc gcatccgcca
2581 ggcctggcac cgcgccaacg ccgaccaggc cgaaggcgac cagaacgagt tccgctgat
2641 cgtcgactat ccgctgtcga tctgtaa

3) *Pseudomonas aeruginosa* strain Ps159 insertion sequence ISPa47 transposase (*tnp*) gene, complete cds; and disrupted outer membrane protein (*oprD*) gene, complete sequence

```

LOCUS      KC502912                2441 bp    DNA        linear    BCT 07-MAR-2013
DEFINITION Pseudomonas aeruginosa strain Ps159 insertion sequence ISPa47
            ISPa47 transposase (tnp) gene, complete cds; and disrupted outer
            membrane protein (oprD) gene, complete sequence.
ACCESSION  KC502912
VERSION    KC502912.1  GI:456371665
KEYWORDS   .
SOURCE     Pseudomonas aeruginosa
   ORGANISM Pseudomonas aeruginosa
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE  1 (bases 1 to 2441)
   AUTHORS Estepa,V., Rojo-Bezares,B., Torres,C. and Saenz,Y.
   TITLE   Genetic lineages and antimicrobial resistance mechanisms in
            Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from different origins
   JOURNAL Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 2441)
   AUTHORS Estepa,V., Rojo-Bezares,B., Torres,C. and Saenz,Y.
   TITLE   Direct Submission
   JOURNAL Submitted (17-JAN-2013) Area de Microbiologia Molecular, Centro de
            Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono,
            La Rioja 26006, Spain
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
   source   1..2441
            /organism="Pseudomonas aeruginosa"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="Ps159"
            /isolation_source="vegetable"
            /host="green pepper"
            /db_xref="taxon:287"
            /country="Spain"
   gene     1..>144
            /gene="oprD"
            /note="outer membrane protein; disrupted by insertion
            sequence ISPa47"
   repeat\_region 145..146
            /note="target site duplication"
   mobile\_element 147..1253
            /mobile_element_type="insertion sequence:ISPa47"
   repeat\_region 147..165
            /note="left repeat region"
            /rpt_type=inverted
   gene     190..1227
            /gene="tnp"
   CDS      190..1227
            /gene="tnp"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="ISPa47 transposase"
            /protein_id="AGG37857.1"
            /db_xref="GI:456371666"
            /translation="MKIDARKKLSPEQREKRSTALRMREQGYTYKAIGEAVGVHPRTI
            AHWAQVAEHKGEKAAIAGGQRGVRRQGDRLSSSSQEVLRITLMTDKMPDQLKLGFWALW
            TRDAVRELIRQRCGFLMPVRTVGEYLKRWGYTPQRPLHRAQQKPEVVQHWLDNEYPR
            IAQRARAENGEIQWDEGTGMRSDSHAGRSYAPIGETPVRVLSGSRFSTNMISTVTNNG
            KLRFMPLYRETLTAPVLIIRFLSRLIRDAQGRKVFLILDNLRVHHSKKVSAWVGDRKEQI
            ELFFLPAYAPELNPDEYLNCDLKHQVRTGLPARNQDELEERRVRSVMRRLQLRPQRIRS
            YFRHPRIAYAA"
   repeat\_region 1235..1253
            /note="right repeat region"
            /rpt_type=inverted
   repeat\_region 1254..1255
            /note="target site duplication"

```

Anexos

[gene](#) <1256..2441
/gene="oprD"
/note="outer membrane protein; disrupted by insertion
sequence ISPa47"

ORIGIN

```
1 atgaaagtga tgaagtggag cgccattgca ctggcggttt cgcaggtag cactcagttc
61 gccgtggccg acgcattcgt cagcgatcag gccgaagcga aggggttcat cgaagacagc
121 agcctcgacc tgctgctccg caactattaa cctggcaaat aaatagggca tattagataa
181 tctgtctcca tgaaaataga tgcccgtaaa ctcagccccc aagaacaacg tgaaaagcgc
241 tccacggccc tacgcatcg ttagcagggt tacacctata aggctattgg cgaagcgggt
301 ggtgttcacc cccgcactat tgctcactgg gcgcaggctc cagaacataa aggcgaaaag
361 gctgccattc cggcgggcca gcctgggtg cgccagggtg atcgcccgag tttgagctcc
421 agccaggaag tgctgattcg caccttgatg accgataaga tgcccgacca actcaagctc
481 ggctttgctc tctggacgag tgatgctggt cgagaactga tccgccagcg ctgtggtttt
541 ctcatgcccg ttcgaacggt tggatgaatac ctcaagcgtt ggggctacac cccgcagcgc
601 ccactgcattc gggcttatca gcagaaacct gaagtgttcc agcactggct ggataatgaa
661 tatccacgca tcgcacagcg ggcacgggct gagaatggtg agattcagtg gggcgacgaa
721 accggtatgc gcagtgcagc ccatgctggc cgagctacg cccctattgg cgaacgcccg
781 gtgcgctcgg tcagcggcag tcgtttttcc accaacatga tttccaccgt gaccaatcgg
841 ggcaaatcgc gcttcattgc gtatcgggaa acgctgacag cccagtgctt gattcgcttc
901 ctgagtcgcc tgattcgcga tgctcagggc cgcaagggtg ttctgattct cgacaacctg
961 cgcgtacacc acagcaaaaa ggtgagcgc tgggttggcg accgcaaaag gcaaatcgaa
1021 ctgttcttct tgccggccta cgcgccggag ttgaacctg acgagtattt gaattgtgat
1081 ttgaaacatc aggttcgcac ggccttgcg gcgcgtaatc aggcgcaact ggaaaagcgt
1141 gttcgcctcg tcatgagacg attgcaatta cgccctcaaa gaatccgttc ttatttcggg
1201 catccacgta tcgcctacgc agcatgattt ggtgtatttg attgcccggg taatactatt
1261 tcaaccgtga cggcaagagc ggcagcgggg accgcgtcga ctggacccaa ggcttctca
1321 ccacctatga atccggcttc acccaaggca ctgtgggctt cggcgtcgat gccttcggct
1381 acctcggcct gaagctcgac ggtacctctg acaagagcgg caccggcaac ctgccagtaa
1441 tgaacgacg aacgccccgt gacgactaca gccgcgccgg tggcgccgtg aaggtagcga
1501 tctccaagac catgctgaag tggggcgaga tgcagccgac cgctccggtc ttcgcccgctg
1561 ggggcagccc cctgttcccc cagaccgcca cggcttcca gctgcagagc agcgaactcg
1621 aagggctcga cctcgaggca ggcacttca ccgagggcaa ggagccgacc accgtcaaat
1681 cgcgtggcga actctatgcc acctacgcag gcgagaccgc caagagcgc gatttcattg
1741 ggggcccgta cgcaatcacc gataacctca gcgcctccct gtacggcgcc gaactcgaag
1801 acatctatcg ccagtattac ctgaacagca actacacat cccactggca tccgaccaat
1861 cgctgggctt cgatttcaac atctaccgca caaacgatga aggcgaaggc aaggccggcg
1921 acatcagcaa caccacttgg tccttggcgg cagcctacac tctggatgcg cacactttca
1981 ccttggccta ccagaaggtc catggcgatc agccgtttga ttatatcggc ttcggccgca
2041 acgctctggt cgcagggtgg gactcgattt tctcgcgcaa ctctgtccag tactccgact
2101 tcaacggccc tggcgagaaa tcctggcagg ctcgctacga cctgaacctc gcctcctatg
2161 gcgttcccgg cctgactttc atggtccgct atatcaatgg caaggacatc gatggacca
2221 agatgtctga caacaacgct ggcataaaga actacggcta cggcgaggac ggcaagcacc
2281 acgagaccaa cctcgaagcc aagtacgtgg tccagtcgg tccggccaag gacctgtcgt
2341 tccgeatccg ccaggcctgg caccgtgcca acgcccagca gggcgaggc gaccagaacg
2401 agttccgct gatcgtcgac tatccgctgt cgatcctgta a
```

4) *Pseudomonas aeruginosa* strain Ps33 insertion sequence ISPa45 transposase (*tnp*) gene, complete cds; and *oprD* gene, partial sequence

LOCUS JX440361 2973 bp DNA linear BCT 07-OCT-2012
DEFINITION *Pseudomonas aeruginosa* strain Ps33 insertion sequence ISPa45 transposase (*tnp*) gene, complete cds; and *oprD* gene, partial sequence.
ACCESSION JX440361
VERSION JX440361.1 GI:407731555
KEYWORDS .
SOURCE *Pseudomonas aeruginosa*
ORGANISM [Pseudomonas aeruginosa](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2973)
AUTHORS **Estepa,V.**, Rojo-Bezares,B., Seral,C., Cebollada,R., Castillo,F.J., Torres,C. and Saenz,Y.
TITLE Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 2973)
AUTHORS **Estepa,V.**, Rojo-Bezares,B., Seral,C., Cebollada,R., Castillo,F.J., Torres,C. and Saenz,Y.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (31-JUL-2012) Area de Microbiologia Molecular, Centro de Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..2973
/organism="Pseudomonas aeruginosa"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Ps33"
/isolation_source="subphrenic abscess"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:287"
/country="Spain"
gene 1..>26
/gene="oprD"
/note="disrupted by ISPa45"
repeat_region 17..26
/note="target site duplication"
mobile_element complement(27..1663)
/mobile_element_type="insertion sequence:ISPa45"
repeat_region complement(27..44)
/note="right repeat region"
/rpt_type=inverted
gene complement(267..1538)
/gene="tnp"
CDS complement(267..1538)
/gene="tnp"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="transposase"
/protein_id="AFU25664.1"
/db_xref="GI:407731556"
/translation="MKIVQKITSQLDCPDFIDTHRQRPHDFTRRRQLTFKNLVLFLN
QPTALQTELDQFYRVLNQASAETQVVTAQAFSKARGKLPKPEVFESLNQTLQQQLDSL
GLRQTRWGLRVLAVDGGSTVHLPLESVMTRFFGCHSEFPVARLSMLYDADGQTLHSLI
VPSAVGERDCAHLHLEHLPADSLTLFDRGYPGHWLFFALFEQHRHFLMRLPCGYNAQV
KQFLRSGQTEDTQFFSASHPEARLFCTEAGVDPAGRVELRLIRVELASGESEVLLTSL
LDRQAFPAEVEFADLYHRRWGIETDYRRLKQTLCLDNFSGRSVTAVKQDFHAGQLKLN
ALLMQHLLQPVIEQRHKGRKLRWKNVFTQGVSRKNTLVLDLLVPRPGVQGLANVMELMA
NSLSAVRPGRSFPRQRMRLASRGCEGYKPTR"
repeat_region complement(1646..1663)
/note="left repeat region"
/rpt_type=inverted
gene <1664..2973
/gene="oprD"
/note="disrupted by ISPa45"
repeat_region 1664..1673
/note="target site duplication"

Anexos

ORIGIN

```

1 atgaaagtga tgaagtggag cgccatcaat gtcatacaact taagcccccga gcccttggccg
61 gggcaagaaa tcccggggct tggacgcgcg gttgcagcag tgccttctact ggttttggctc
121 cccagttcag cgcatagtgcg acccagacgc cagcttaatg gatgcccgggt cgcctcggcg
181 ggcgggattt ctctgtttcc gggcgagcgc gtgcccggcc ctgtctggcc agcttttttg
241 cggtgacagt cgggtgctgc ttgttcttag cgcgtcgggt tgtagccctc gcagccgcga
301 ctggccaggc gcatacgcctg gcgcgggaag ctgcccggcc ggcgcacagc gctgaggctg
361 ttggccatca actccatcac gttggccagc cctgcaacac cggggcgctac cagcaggctg
421 accagggtgt tcttgaggcg tgacaccctt tgggtgaagt tgacctcca gcgcagcttg
481 cggcctttgt ggcgctgctc gatgaccggg tcagcagat gtgcatcag cagcgtagg
541 tttttcagca gttgcccggc atgaaagtcc tgcttcacgg ccgtcacgct acggccgcta
601 aagtgtgcga ggcagagggt ctgcttgagg cggcggtagt ccgtttcgat gccccagcg
661 cgggtgtaaa gatccgcgaa cacctcggcc ggaaggcct gtcgatccag cagggaggctc
721 agcagcactt cgctttcacc gctggctagc tcgaccggga tcaggcgcaa ttcgaccgg
781 cccgcgggat cgacgcggc ctccgtacag aacaggcgcg cctcgggatg actggcagag
841 aagaactcgc tgtcttctgt ctgcccggag cggagaaact gtttgacctg cgcgttgtag
901 ccacacggca ggcgcatacag gaaatgtcgc cgggtgctgt cgaacagcgc aaacagccag
961 tgtccggggt agccgcgatc aaacaacgtc aggtgtcag cgggcagatg ctcgaggtgc
1021 agatggggcg aatcgcgctc gccgactgcg gatggcacga tcaggctgtg tagcgtctgg
1081 ccgtcggcga cgtcgtagag catggacaga cgggcaacgg gaaactcgt atggcagccg
1141 aaaaagcgcg tcatgaccga ctccagcggg aatggacgg tcgagccgct cacggcgagt
1201 acccgtaac cgcgccacgt ctggcgcagc ccgaggctgt cgagctgttg ctgaagggtt
1261 tgggtgaggc tctcgaagac ctccggcttg agcttgccgc gcgccttctg gaaggcctgc
1321 gcggtgacca cctgggtctc ggcgcaggcc tggttgagca cgcgatagaa ctgatcgagc
1381 tcggtttgca gggcgggtgcg tggctgattg agcaaaaaa ggcagaggtt ctgaaaggtc
1441 agttggcgtc ggcgggtaaa gtcgtgaggg cgtcggcggg gggatcgat gaagtcggga
1501 caatcgagct gactgggtat tttttgtaca attttcaagc cagggtttgc tgggcgggtg
1561 caaacgggtg ggaatgaggg gccaaaaagg ttctcctat gcgctgaatt tagcgtaat
1621 tataatgat ttataggaaa aattccttaa gttgatgaca ttgggagcgc cattgactg
1681 gcggtttccg caggtagcac tcagttccgc gtggccgacg cattcgtcag cgatcaggcc
1741 gaagcgaagg ggttcatacga agacagcagc ctgaacctgc tgctccgcaa ctactatttc
1801 aaccgtgacg gcaaggaagg tcgggggtgat cgcgtcgatt ggaccaggg ctctctcacc
1861 acctacgaat ccggcttcac tcaaggcacc gtgggcttcg gcgtcgatgc cttcggctac
1921 ctgggcctga agctcgacgg cacctccgac aagaccggca cgggcaacct gccggtgatg
1981 aacgacggca agccgcgcga tgactacagc cgcgcggcg gcgcctgtaa ggtgcgcatc
2041 tccaagacca tgctgaagtg ggcgagatg caaccgaccg ccccggtctt cgcctcggc
2101 ggcagccgcc tgttcccgca gaccgcgacc ggcttcagc tgcagagcag cgaatcgaa
2161 gggctcgacc tcgaggcagg ccacttcacc gagggcaagg agccgaccac cgtcaaatcg
2221 cgcggtgagc tctacgccac ctacgcggc cagacagcca agagcggcca cttcgtggc
2281 ggcgctacg cgatcaccga caacctcagc gctccctct atggcgcaga gctgaaagac
2341 atctatcgcc agtactacct gaacaccaac tacaccatcc cgtggcctc cgatcaatcg
2401 ctgggcttcg acttcaacat ctaccgcacc accgacgaag gcaagtccaa ggctggcgac
2461 atcagcaaca ccacctggtc cctggcgggc gcgtataccc tggacgcca cacctcacc
2521 ctggcctacc agcagggtca tggcgacgag ccgttcgact acatcggctt cggcggaac
2581 ggttcggcg cggcgggcga ctcgatcttc ctgcccaact ccgtccagta ctccgacttc
2641 aacggctcctg gcgagaaatc ctggcaggcc cgtacgacc tgaacctggc ctctacggc
2701 gttctcggcc tgaccttcat gctgcgttac atcaatggta aggacatcga cggtaaccaag
2761 gtcgattcca gctcctcta tgaggcctg tacggcgagg atggcaagca ccacgagacc
2821 aacctcgaag ccaagtacgt ggtccagtc ggtccggcca aggacctgtc gttccgcatc
2881 cgccaggcct ggcaccgtgc caacgcggac cagggcgagg gcgaccagaa cgagttccgc
2941 ctgatcgtcg actatccgct gtcgatcctg tga

```

5) *Pseudomonas aeruginosa* strain W368 insertion sequence IS*Ppu21* transposase (*tnp*) gene, complete cds; and *oprD* gene, partial sequence

LOCUS JX440360 2521 bp DNA linear BCT 07-OCT-2012
DEFINITION *Pseudomonas aeruginosa* strain W368 insertion sequence IS*Ppu21* transposase (*tnp*) gene, complete cds; and *oprD* gene, partial sequence.
ACCESSION JX440360
VERSION JX440360.1 GI:407731553
KEYWORDS .
SOURCE *Pseudomonas aeruginosa*
ORGANISM [Pseudomonas aeruginosa](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2521)
AUTHORS **Estepa,V.**, Rojo-Bezares,B., Seral,C., Cebollada,R., Castillo,F.J., Torres,C. and Saenz,Y.
TITLE Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 2521)
AUTHORS **Estepa,V.**, Rojo-Bezares,B., Seral,C., Cebollada,R., Castillo,F.J., Torres,C. and Saenz,Y.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-JUL-2012) Area de Microbiologia Molecular, Centro de Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..2521
/organism="Pseudomonas aeruginosa"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="W368"
/isolation_source="urine catheter"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:287"
/country="Spain"
gene 1..>7
/gene="oprD"
/note="disrupted by IS*Ppu21*"
repeat_region 4..7
/note="target site duplication"
mobile_element complement(8..1198)
/mobile_element_type="insertion sequence:IS*Ppu21*"
repeat_region complement(8..19)
/note="right repeat region"
gene complement(154..1134)
/gene="tnp"
CDS complement(154..1134)
/gene="tnp"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="transposase"
/protein_id="AFU25663.1"
/db_xref="GI:407731554"
/translation="MKQMTFADA EYAGKRKQTRKELFLIEME QVVPWQGLIALIEPHY
PKGEGGRPAYPLMAMLRVHL LQNWFYSDPAMEEALYETTILRQFAGLSLERIPDETT
ILNFRRLLE RHELAAGILAVINGYLGDRGLSLRQGTIVDATLIHAPSSTKNKDKGRDP
EMHQTKKGNQYYFGMKAHIGADSESGLVH SVVGTAA NVADVTQVDKLLHGEENLVSGD
AGYTGVEKRAEHAGRSVIWQIAARRSTYQQLSKRSPLYKAKRRIEKAKAQVRAKVEHP
FRVIKRQFGYTKVRFRLAKNTAQLITL FALS NLWMARRHLLANTGEVRL"
repeat_region complement(1187..1198)
/note="left repeat region"
gene <1199..2521
/gene="oprD"
/note="disrupted by IS*Ppu21*"
repeat_region 1199..1202
/note="target site duplication"

Anexos

ORIGIN

1 atgaaagga tggctgaag tagccacgta tttctggccg actacagacc tcgctgtttt
61 ttgaagcgat ccacgatca aaaagcgctc agatcgtcgt cttatgtagg gtttttagcc
121 gctacgcgta ccccgtagcg gctattcgcc gtgttacagg cgcacctctc ctgtgttcgc
181 gagtaaatgc cgccgcgcca tccacagatt cgacagcgca aacagcgtaa tcagtgtgac
241 ggtgttcttg gccaggccac ggaagcgcac ctgggtgtaa ccaaactggc gcttgatcac
301 ccggaatgga tgttcgacct tggcacgtac ctgcgccctg gccttctcga ttttgcgctt
361 ggccctgtac agcgggctgc gcttgcctcag ttgctggtaa gtgctgcgcc gcgccgcaat
421 ctgccagatg accgagcggc ctgcatgctc ggcacgcttc tcgacgccgg tatagccggc
481 atcgcgctg accaggttct cttcgccgtg cagcagcttg tccacctggg tgacatcggc
541 cacgttggcc gccgtgcca ccacgctgtg taccaggccg gattcgcgtg cggcgccgat
601 gtgcgcttc atgcccgaag agtactggtt gcccttcttg gtctggtgca tctcgggata
661 gcgcttgccg tccttgttct tggctgagct cggcgcatgg atcagcgtgg cgtcgcagat
721 ggtgccctgg cgcagcgaca gccacagctc gccacagtag ccattgatca ccgccagaat
781 cccggccgcc agctcgtggc gctccagcag gcgacggaag ttgaggatgg tggtttcgct
841 ggggatacgt tccaggctca gccggcgcaa ctggcgcaag atggctgctc cgtacagcgc
901 ttctccatc gccgggtcgc tgtagccgaa ccagttctgc aacagatgca cgcgcagcat
961 cgccatcagc ggataggcgg gacgaccgcc ttcaccttc gggtagtgcg gctcgcagat
1021 ggcgatcagg ccctgccacg gcaccacctg ttccatttcg atcaggaaca gttccttgcg
1081 ggtctgcttg cgttgccgg cgtactcggc gtggcgcaag gtcactcgtc tcatcggaat
1141 gctctgcccg tgaagtccgc ggattttgcc aaatcaggaa gtctttttca gagtttccaa
1201 agtgatgaag tggagcgcca ttgcactggc ggtttccgca ggtagcactc agttcgcctg
1261 ggcgacgca ttcgtcagcg atcaggccga agcgaagggg ttcatcgaag acagcagcct
1321 gaacctgctg ctccgcaact actatttcaa ccgtgacggc aaggaaggtc ggggtgatcg
1381 cgtcagattg acccagggtc tcctcaccac ctacgaatcc ggcttcactc aaggcaccgt
1441 gggcttcggc gtcgatgcct tcggctacct gggcctgaag ctgcagcgca cctccgacaa
1501 gaccggcacc ggcaacctgc cggatgatga cgacggcaag ccgcgcgatg actacagccg
1561 cgcggcgcc gccgtgaagg tgcgcatctc caagaccatg ctgaagtggg gcgagatgca
1621 accgaccgcc ccggtcttcg ccgctggcgg cagccgctg tccccgcaga ccgcgaccgg
1681 cttccagctg cagagcagcg aatcgaagg gctcagacct gaggcaggcc acttcaccga
1741 gggcaaggag ccgaccaccg tcaaatcgcg cggtagctc tacgccacct acgcccggca
1801 gacagccaag agcggcact tcgctggcgg ccgctacggc atcaccgaca acctcagcgc
1861 ctccctctat ggcgcagagc tgaagacat ctatcgccag tactacctga acaccaacta
1921 caccatcccg ctggcctccg atcaatcgcg gggcttcgac ttcaacatct accgcaccac
1981 cgacgaaggc aagtccaagg ctggcgacat cagcaacacc acctggtccc tggcgggcgc
2041 gtataccctg gacgcccaca ccttcaccct ggctaccag cagggtgatg gcgacgagcc
2101 gttcgactac atcggcttcg gcggcaacgg ttccggcgcc gggggcgact cगतcttct
2161 cgccaactcc gtccagta ctccgacttcaa cggctcctggc gagaaatcct ggcagggccc
2221 ctacgacctg aacctggcct cctacggcgt tcctggcctg acctcatgc tcggttacat
2281 caatggtaag gacatcgacg gtaccaaggc cgattccagc tcctcctatg caggcctgta
2341 cggcgaggat ggcaagcacc acgaaaccaa cctcgaagcc aagtacgtgg tccagtcggg
2401 tccggccaag gacctgtcgt tccgcatccg ccaggcctgg caccgtgcca acgcccacca
2461 gggcgaaggc gaccagaacg agttccgct gatcgtcgac tatccgctgt cगतctgta
2521 a

6) *Pseudomonas aeruginosa* strain W378 class 1 In661 integron, partial sequence

LOCUS JF265065 3508 bp DNA linear BCT 10-AUG-2011
DEFINITION *Pseudomonas aeruginosa* strain W378 class 1 In661 integron, partial sequence.
ACCESSION JF265065
VERSION JF265065.1 GI:342209871
KEYWORDS .
SOURCE *Pseudomonas aeruginosa*
ORGANISM [Pseudomonas aeruginosa](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 3508)
AUTHORS Rojo-Bezares,B., Seral,C., Castillo,F.J., **Estepa,V.**, de Toro,M., Torres,C. and Saenz,Y.
TITLE Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 3508)
AUTHORS Rojo-Bezares,B., Seral,C., Castillo,F.J., **Estepa,V.**, de Toro,M., Torres,C. and Saenz,Y.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (26-JAN-2011) Area de Microbiologia Molecular, Centro de Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..3508
/organism="Pseudomonas aeruginosa"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="W378"
/isolation_source="central catheter of hospital patient"
/db_xref="taxon:[287](#)"
/country="Spain"
[mobile_element](#) <1..>3508
/mobile_element_type="integron:class 1 In661"
[gene](#) complement(<1..475)
/gene="intI1"
[CDS](#) complement(<1..420)
/gene="intI1"
/note="IntI1"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="class 1 integrase"
/protein_id="[AEL16986.1](#)"
/db_xref="GI:342209875"
/translation="MKTATAPLPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSLRTEQAYVNWVRAFIRFHGVRHPATLGSSEVEAFLSWLANERKVSVSTHRQALAAALFFYGVKVLCTDLPWLQ EIGRPRPSRRLPVVLTPDEVVRIILGFLEGEHRLFAQLL"
[-35_signal](#) 305..310
/note="PcH2"
[-10_signal](#) 325..333
/note="PcH2"
[-10_signal](#) complement(447..452)
/gene="intI1"
[-35_signal](#) complement(470..475)
/gene="intI1"
[misc_recomb](#) 501..563
/note="attI recombination site"
[misc_feature](#) 557..2634
/note="aac(3)-I gene cassette with inserted ISPa34 element"
[gene](#) 572..1036
/gene="aac(3)-Ia"
[CDS](#) 572..1036
/gene="aac(3)-Ia"
/function="gentamicin resistance"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="aminoglycoside 3-N-acetyltransferase"
/protein_id="[AEL16983.1](#)"
/db_xref="GI:342209872"

```

/translation="MGIIRTCRLGPDQVKSMRAALDLFGREFGDVATYSQHQPDSYDL
GNLLRSKTFIALAAFQDEAVVVGALAAAYVLPKFEQARSEIYIYDLAVSGEHRRQGIATA
LINLLKHEANALGAYVIYVQADYGDPAVALYTKLGIREVMHFDIDPSTAT"
1031..2640
misc_recomb /note="attC site"
mobile_element complement(1264..2479)
/mobile_element_type="insertion sequence:ISPa34"
repeat_region complement(1267..1276)
/note="right inverted repeat"
/rpt_type=inverted
gene complement(1385..2443)
/ gene="tnp"
CDS complement(1385..2443)
/ gene="tnp"
/ codon_start=1
/ transl_table=11
/ product="ISPa34 transposase"
/ protein_id="AEL16984.1"
/ db_xref="GI:342209873"
/translation="MQSITAGVDLAKQVFAICLMDDAGHVTGRRELRRDGFHQWLAEQ
PEGMIVAMEACSSAHYWGRECQRHGLQPRLMQAQFVKPFRKRALIKNDRQDAEAIATA
ARQGNMRFVAVKDEPQQVRLSWHRVREGYKDALAVRNRLRGLLAIEFGVVIPESVTAL
KRTLADLDRHELPTGLLRLLIRLQQEHLKIEAGMAECDARIAEQATADERCQRLRALT
GIGPVTADAVVASVGNAAEFRNGRQFAAWMGLTPQFGSGGKVS LGHISCRGDRYLRT
LLIQGARSSLQRAKLIPTDTATPEQQWIVQLAARMSYGVKVLVAIANKHARQVWAMLAR
SEAYDPEAWLKHPMVQRT"
repeat_region complement(2463..2472)
/note="left inverted repeat"
/rpt_type=inverted
misc_feature 2635..3490
/note="aadA1h gene cassette"
gene 2644..3435
/ gene="aadA1h"
CDS 2644..3435
/ gene="aadA1h"
/ function="spectinomycin/streptomycin resistance"
/ note="identical to GenBank accession ACS12988"
/ codon_start=1
/ transl_table=11
/ product="aminoglycoside 3'-adenyltransferase"
/ protein_id="AEL16985.1"
/ db_xref="GI:342209874"
/translation="MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKP
HSDIDLLVTVTVRLEDETTRRALINDLLETSPGSEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYP
AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQ
DLFEALNETLTLWNSPPDWAGDERNVVLTLSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPA
QCQPVILEARQAYLGQEEEDRLASRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK"
misc_recomb 3337..3496
/note="attC site"
misc_feature 3491..>3508
/note="3'-conserved segment"

```


ORIGIN

1 cagaagctgg gcaacaacaac gatgctcgcc ttccagaaaa cagagatgc gaaccacttc
 61 atccggggtc agcaccaccg gcaagcgccg cgacggccga ggtcttccga tctcctgaag
 121 ccagggcaga tccgtgcaca gcacctggcc gtagaagaac agcaaggccg ccaatgcctg
 181 acgatgcgtg gagaccgaaa ccttgcgctc gttcgccagc caggacagaa atgcctcgac
 241 ttcgctgctg cccaaggttg cggggtgacg cacaccgtgg aaacggatga aggcacgaac
 301 ccagttagca taagcctgtt cggttcgtaa gctgtaatgc aagtagcgta tgcgctcagc
 361 caactgggtcc agaacctga cogaacgcag cggtggtaac ggcgcagtgg cggtttccat
 421 ggcttggtat gactgttttt ttgtacagtc tatgcctcgg gcatccaagc agcaagcgcg
 481 ttacgccgtg ggtcgatggt tgatggtatg gagcagcaac gatgttacgc agcagggcag
 541 tcgccctaaa acaaaagttag gtggctcaag tatgggcatc attcgcacat gttaggctcgg
 601 cctcgaccaa gtcaaatcca tgagggctgc tcttgatott ttcggtcgtg agttcggaga
 661 cgtagccacc tactccaac atcagccgga ctccgattac ctcggaact tgctccgtag
 721 taagacattc atcgcgcttg ctgcctcga ccaagaagcg gttgttggcg ctctcgcggc
 781 ttacgthctg cccaagtttg agcaagcgg tagtgagatc tatactatg atctcgcagt
 841 ctccggcag caccggattg agggcattgc caccgcgctc atcaatctoc tccatcgatga
 901 ggccaacgcg cttgggtgctt atgtgatcta cgtgcaagca gattacgggt acgatcccgc
 961 agtggctctc tatacaaagt tgggcatacg ggaagaagtg atgcactttg atatcgaccc
 1021 aagtaccgcc acctaacatg tccctaggac ttccctcgtc aacctctgat taagcctctc
 1081 catcacggcc cggtatcccg ggccgctttg tttgctggtg ttcatcccg ccgaaccacag
 1141 accgtaacgc tgcagactg catttcctta gtccggtcttg ttgtgcgctt cattgctgcg
 1201 caccggaccag tgtataaacc gcaccggag gcctcattcg ttcatcgggt atgccttagc
 1261 catgaggatc aatcacgacc agcagtgga accaacttgt tagtcaggct ctctccgggt
 1321 cgtctgacc cgttggtacc tccgtgctc tggcgtggat gttgtgctc ggtttcccg
 1381 aggctcaggt tccgtgcacc atcgggtgct tgagccagc ctccggatcg tatgcctcgc
 1441 tcggggccaa catggccag acctgtcgtg catgcttgtt ggcgatggcg accagcactt
 1501 tgcgtaact catgcccgt gccagtgca cgatccattg ctgctctggc gtggctggtg
 1561 cggttggtat cagcttcgct cgtgcaggg tgctgcgagc accctgtatt ccgaaggtac
 1621 gcaagtaacg atcacccca caactgatgt gcccgaggct gacctgctt cccgaaccga
 1681 actgcccggg tgcagacc atccaggcc cgaactggcg gccgttgcgg aactcggccg
 1741 cattcccagc cagggccact acggcatctg ccgtcaccgg gccaataccg gtcagcgcgc
 1801 aggcctccat gcagcgttca tccgcttgg cttgctcggc aatgcgggca tcacattcgg
 1861 ccatgcccgg ctcgatgatc ttgagatggt cctgctgcaa tcggatcagg cgtagcaggc
 1921 cggttggcag ttcatggcga tccagatcag ccagggtgcg cttgagtgcc gtgactgact
 1981 ccgggataac cacaccgaac tccggccagca gaccgcgcaa gcgattgccc acggccaggg
 2041 catccttctt gtaaccctcc cgtacgcgat gccagctcag acgcaactg tgggtctcat
 2101 ccttgaccggc cacgaagcgc atattgcctt ggccgcagc ggtggcaatg gcttcggcat
 2161 cctgcccgctc attcttgatc aaagcccgtc tgcgggaaggg tttgacgaat tggcggcca
 2221 tgaggcgtgg ctgcaagccg tgacgctggc attcacggcc ccagtagtga gcaactgctg
 2281 aggcctccat ggcgacgatc atgccttcgg gttgctcggc aagccattga tgaaccat
 2341 ctccggcgaag ctacggcgg ccggttacct gaccggcctc atccatgaga caaatggcaa
 2401 atacctgctt tgcgaggtca acaccgctg taatagactg catggcgact tccccttttc
 2461 gtgtgattga tccatgaaat gcaatcatgg cactcagatg ccgacgcggc actgcccgtt
 2521 gggaggggga agtctttttt actcgttcaa gccgagatcg cttcgcggcc cgggagttgt
 2581 tcggtaaatg gtccacaacgc cgcggccgca aagccgtccg gcttaactca ggcgttaaac
 2641 atcatgaggg aagcgggtgat cgcggaagta tccgactcaac tatcagaggt agttggcgtc
 2701 atcagagccc atctcgaacc gacggttctg gccgtacatt tgtacggctc cgcagtggtg
 2761 ggcggcctga agccacacag tgatattgat ttgctgggta cggtgaccgt aaggcttgat
 2821 gaaacaacgc ggcgagcttt gatcaacgac cttttggaaa cttcggcttc ccctggagag
 2881 agcgagattc tccgcgctgt agaagtcacc attgttgtgc acgacgacat cattccgtgg
 2941 cgttatccag ctaagcgcga actgcaattt ggagaatggc agcgcfaatg cattcttgca
 3001 ggtatcttcg agccagccac gatcgacatt gatctggcta tcttgctgac aaaagcaaga
 3061 gaacatagcg ttgccttggg aggtccagcg gcggaggaac tctttgatcc ggttctgaa
 3121 caggatctat ttgaggcgtc aatgaaacc ttaacgctat ggaactcgcg gcccgactgg
 3181 gctggcgatg agcgaaatgt agtgcttacg ttgtcccgca tttggtacag cgcagtaacc
 3241 ggcaaaatcg cgcgaaagga tgtcgtgccc gactgggcaa tggagcgcct gccggcccag
 3301 tgtcagcccg tcatacttga agctagacag gcttatcttg gacaagaaga agatcgcttg
 3361 gcctcccgcg cagatcagtt ggaagaattt gttcactacg tgaaaggcga gatccaag
 3421 gtatgcccga aataatgtct aacaattcgt tcaagccgac gccgcttcgc ggcgaggctt
 3481 aactcaagcg ttagatgcac taagcaca

7) *Pseudomonas aeruginosa* strain W37 class 1 integron, partial sequence

LOCUS GU354325 5429 bp DNA linear BCT 15-JUL-2011
DEFINITION *Pseudomonas aeruginosa* strain W37 class 1 integron, partial sequence.
ACCESSION GU354325
VERSION GU354325.1 GI:285877167
KEYWORDS .
SOURCE *Pseudomonas aeruginosa*
ORGANISM [Pseudomonas aeruginosa](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 5429)
AUTHORS Rojo-Bezares,B., **Estepa,V.**, de Toro,M., Undabeitia,E., Olarte,I., Torres,C. and Saenz,Y.
TITLE A novel class 1 integron array carrying blaVIM-2 genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital
JOURNAL J. Med. Microbiol. 60 (PT 7), 1053-1054 (2011)
PUBMED [21436368](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 5429)
AUTHORS Rojo-Bezares,B., Torres,C., **Estepa,V.**, Undabeitia,E., Olarte,I. and Saenz,Y.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (22-DEC-2009) Unidad de Microbiologia Molecular, Centro de Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain
REFERENCE 3 (bases 1 to 5429)
AUTHORS Rojo-Bezares,B., Torres,C., **Estepa,V.**, Undabeitia,E., Olarte,I. and Saenz,Y.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-FEB-2010) Unidad de Microbiologia Molecular, Centro de Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain
REMARK Amino acid sequence updated by submitter
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..5429
/organism="Pseudomonas aeruginosa"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="W37"
/isolation_source="urine sample"
/db_xref="taxon:[287](#)"
/country="Spain"
[mobile_element](#) <1..>5429
/mobile_element_type="integron:class 1"
[gene](#) complement(<1..496)
/gene="intI1"
[CDS](#) complement(<1..442)
/gene="intI1"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="class 1 integrase IntI1"
/protein_id="[ADC38939.1](#)"
/db_xref="GI:285877173"
/translation="MKTATAPLPPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSRTEQAYVHWVRAFIRFHGVRHPATLGSSEVEAFLSWLANERKVSVSTHRQALALLFFYQKVLCTDLPWLQ EIGRPRPSRRLPVVLTPEVVRIILGFLEGEHRLFAQLLYGTGMRI"
[-35_signal](#) 327..332
/note="Pc hybrid 1"
[-10_signal](#) 347..355
/note="Pc hybrid 1"
[-10_signal](#) complement(468..473)
/gene="intI1"
[-35_signal](#) complement(491..496)
/gene="intI1"
[misc_recomb](#) 527..584
/note="attI recombination site"
[misc_feature](#) 579..1487
/note="blaVIM-2 gene cassette"
[gene](#) 609..1409
/gene="blaVIM-2"

[CDS](#) 609..1409
 /gene="blaVIM-2"
 /function="imipenem resistance"
 /note="beta-lactam hydrolysis; confers carbapenem resistance"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="metallo-beta-lactamase VIM-2"
 /protein_id="[ADC38934.1](#)"
 /db_xref="GI:285877168"
 /translation="MFKLLSKLLVYLTA SIMAIASPLAFSVDSSGEYPTVSEI PVGVE RLYQIADGVWSHIATQSPDGA VYPSNGLIVRDGDELLLDITAWGAKNTAALLAEIEKQ IGLPVTRAVSTHFHDDR VGGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEI PTHSLEGLSS SGDAVRFGPVELFYPGAAHSTDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSR TSAGNVADADLAE WPTSIERIQQHYPEAQFVIPGHGLPGGLDLLKHTTNVVKAH TNRSVVE"
[misc_recomb](#) 1422..1428
 /note="inverse core site"
[misc_recomb](#) 1487..1493
 /note="core site"
[misc_feature](#) 1488..2126
 /note="aac(6')-Ib' gene cassette"
[gene](#) 1512..2066
 /gene="aac(6')-Ib'"
[CDS](#) 1512..2066
 /gene="aac(6')-Ib'"
 /function="confers resistance to aminoglycosides"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="aminoglycoside (6')-N-acetyltransferase Ib'"
 /protein_id="[ADC38935.2](#)"
 /db_xref="GI:288886192"
 /translation="MTNSNDSVTLRLMTEHDLAML YEWLNRSHIVEWGGEEARPTLA DVQEQLPSVLAQESVTPYIAMLNGEPIGYAQS YVALGSGDGWWEETDPGVRGIDQS LANASQLGKGLGTKLVRLVLEL FNDPEVTKIQ TDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTV TTPDGPVYVMVQTRQAFERTRSDA"
[misc_recomb](#) 2061..2067
 /note="inverse core site"
[misc_recomb](#) 2126..2132
 /note="core site"
[misc_feature](#) 2127..4484
 /note="aadA1 gene cassette with inserted ISPa34 element"
[gene](#) 2136..2927
 /gene="aadA1"
[CDS](#) 2136..2927
 /gene="aadA1"
 /function="spectinomycin/streptomycin resistance"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="aminoglycoside 3'-adenyltransferase"
 /protein_id="[ADC38936.1](#)"
 /db_xref="GI:285877170"
 /translation="MREAVIAEVSTQLSEVVGVI ERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKP HSDIDLLVTVTRLDETTRRALINDLLETSAS PGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYP AKRELQFGEWQRNDILAGIFEPATIDIDL AILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQ DLFEALNETLTLWNSPPDWAGDERNVVLTLSRIWYSAVTGRIAPKDVAADWAMERLPA QYQPVILEARQAYLGQEEDRLASRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK"
[misc_recomb](#) 2929..2935
 /note="inverse core site"
[mobile_element](#) complement(3162..4377)
 /mobile_element_type="insertion sequence:ISPa34"
[repeat_region](#) complement(3165..3174)
 /note="right inverted repeat"
 /rpt_type=inverted
[gene](#) complement(3283..4341)
 /gene="tnp"
[CDS](#) complement(3283..4341)
 /gene="tnp"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="transposase"
 /protein_id="[ADC38937.1](#)"
 /db_xref="GI:285877171"

```

/translation="MQSITAGVDLAKQVFAICLMDDAGHVVTGRELRRDGFHQWLAEQ
PEGMIVAMEACSSAHYWGRECQRHGLQPRLMAAQFVKPFRKRALIKNDRQDAEAIATA
ARQGNMRFVAVKDEPQQVRLSWHRVREGYKDALAVRNRLRGLLAEFGVVIPESVTAL
KRTLADLDRHELPTGLRLRLRLQQEHLKIIEAGMAECDARIAEQATADERCQRLRALT
GIGPVTADAVVASVGNAAEFRNQRQFAAWMGLTPTQFGSGGKVSILGHISCRGDRYLRT
LLIQGARSSLQRAKLIPTDTATPEQQWIVQLAARMSYGVKLVVAIANKKHARQVWAMLAR
SEAYDPEAWLKHPMVQRT"
repeat_region complement(4361..4370)
/note="left inverted repeat"
/rpt_type=inverted
misc_recomb 4484..4490
/note="core site"
misc_feature 4485..5393
/note="blaVIM-2 gene cassette"
gene 4515..5315
/gene="blaVIM-2"
CDS 4515..5315
/gene="blaVIM-2"
/function="imipenem resistance"
/note="beta-lactam hydrolysis; confers carbapenem
resistance"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="metallo-beta-lactamase VIM-2"
/protein_id="ADC38938.1"
/db_xref="GI:285877172"
/translation="MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSVDSSGEYPTVSEIPVGEV
RLYQIADGVNSHIATQSFQDGA VYPSNGLIVRDGDELLLDITAWGAKNTAALLAEIEKQ
IGLPVTRAVSTHFHDDRGGVDVLRAGVATYASPSRRLAEVEGNEIPHSLEGLSS
SGDAVRFGPVLELFPYGAHSTDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRTSAGNVADADLAE
WPTSIERIQQHYPEAQFVIPGHGLPGGLDLLKHTTNVKAHTNRSVVE"
misc_recomb 5328..5334
/note="inverse core site"
misc_recomb 5393..5399
/note="core site"
misc_feature 5394..>5429
/note="3' conserved segment"

```

ORIGIN

```

1  tgatccgcat  gcccgttcca  tacagaagct  gggcgaacaa  acgatgctcg  ccttccagaa
61  aaccgaggat  gcgaaccact  tcataccggg  tcagcaccac  cggcaagcgc  cgcgacggcc
121 gaggtcttcc  gatctcctga  agccagggca  gatccgtgca  cagcaccttg  ccgtagaaga
181 acagcaaggc  cgccaatgcc  tgacgatgcg  tggagaccca  aaccttgccg  tcggttcgca
241 gccaggacag  aaatgcctcg  acttcgctgc  tgcccaaggt  tgccgggtga  cgcacaccgt
301 ggaaacggat  gaaggcacga  acccagtgga  cataagcctg  ttcggttcgt  aaactgtaat
361 gcaagtagcg  tatgctctca  cgcaactggt  ccagaacctt  gaccgaacgc  agcggtggtg
421 acggcgcagt  ggcggttttc  atggcttgtt  atgactgttt  ttttgtacag  tctatgcctc
481 gggcatccaa  gcagcaagcg  cgttacgccg  tgggtcgatg  ttgatgttta  tggagcagca
541 acgatgttac  gcagcagggc  agtcgcccta  aaacaaagtt  atgccgcact  caccctcatg
601 gagttttgat  gttcaaacct  ttgagtaagt  tattggtcta  ttgaccgcg  tctatcatgg
661 ctattgagcg  tccgctcgct  ttttccgtag  attctagcgg  tgagtatccg  acagtcagcg
721 aaatccgggt  cggggaggtc  cggctttacc  agattgcoga  tgggtgtttg  tcgcatatcg
781 caacgcagtc  gtttgatggc  gcagctctac  cgtccaatgg  tctcattgtc  cgtgatgggt
841 atgagttgct  tttgattgat  acagcgtggg  gtgcgaaaaa  cacagcggca  cttctcggcg
901 agattgagaa  gcaaattgga  ctctctgtaa  cgcgtgcagt  ctccacgcac  tttcatgacg
961 accgcgctcg  cggcgttgat  gtccctcggg  cggctggggg  ggcaacgtac  gcatcaccgt
1021 cgcacacggc  gctagccgag  gtagagggga  acgagattcc  cagcactctc  ctagaaggac
1081 tctcatcgag  cggggacgca  gtgcgcttcg  gtccagtaga  actcttctat  cctggtgctg
1141 cgcattcgac  cgacaactta  gttgtgtacg  tcccgtctgc  gagtggtctc  tatggtggtt
1201 gtgcgattta  tgagttgtca  cgcacgtctg  cggggaacgt  ggccgatgac  gatctggctg
1261 aatggcccac  ctccattgag  cggattcaac  aacactacc  ggaagcacag  ttcgtcattc
1321 cggggcacgg  cctgccgggc  ggtctagact  tgctcaagca  cacaacgaat  gttgtaaaag
1381 cgcacacaaa  tcgctcagtc  gttgagtagc  aggcagatgc  ggcataacat  gaagttgcag
1441 cgcaccatca  ctccgctgcg  ctccgttctg  gcggctgaac  ttggcggtta  ggcatacaaa
1501 actacagcat  cgtgaccaac  agcaacgatt  cgtcacact  cgcctcatg  actgagcattg
1561 accttgccat  gctctatgag  tggctaaatc  gatctcatat  cgtcgagtgg  tggggcggag
1621 aagaagcacg  cccgacactt  gctgacgtac  aggaacagta  cttgccaaag  gttttagcgc
1681 aagagtcctg  cactccatac  attgcaatgc  tgaatggaga  gccgattggg  tatgccccag
1741 cgtacgcttc  tcttggaaag  ggggacggat  ggtgggaaga  aaaaaccgat  ccaggagtag
1801 gcggaataga  ccagtcactg  gcgaatgcat  cacaactggg  caaaggcttg  ggaaccaagc
1861 tgggtcagag  tctggttgag  ttgctgttca  atgatccgca  ggtcaccaag  atccaacggc
1921 aaccgtcgcc  gagcaacttg  cgagcgatcc  gatgctacga  gaaagcgggg  tttgagaggg
1981 aaggtaaccgt  aaccaccca  gatggctcag  cgtgtacat  ggttcaaca  cgcagggcat
2041 tcgagcgaac  acgcagtgat  gcctaaccct  tccatcgagg  gggacgtcca  agggctggcg

```

2101 cccttggccg ccctcatgt caaacgttaa acatcatgag ggaagcggg atcgcggaag
 2161 tatcgactca actatcagag gtagttggcg tcatcgagcg ccatctcgaa ccgacggttg
 2221 tggccgtaca tttgtacggc tccgcagtg atggcggcct gaagccacac agtgatattg
 2281 atttgctggg tacggtgacc gtaaggcttg atgaaacaac gcggcgagct ttgatcaacg
 2341 accttttggg aacgtcggct tcccctggag agagcgagat tctccgcgct gtagaagtca
 2401 ccattgttgt gcacgacgac atcattccgt ggcgttatcc agctaagcgc gaactgcagt
 2461 ttggagaatg gcagcgcaat gacattcttg caggtatctt cgagccagcc acgattgaca
 2521 ttgatctggc tatottgctg acaaaaacaa gagaacatag cgttgcttg gttagtccag
 2581 cggcggagga actctttgat cgggttctg aacaggatct atttgaggcg ctaaataaaa
 2641 ccttaacgct atggaactcg ccgcccgact gggctggcga tgagcgaat gtatgctta
 2701 cgttgctccg catttggtag agcgcagtaa ccggcagaat cgcccggaag gatgtcgtg
 2761 ccgcttggg aatggagcgc ctgcccggccc agtatcagcc cgtcactctg gaagctagac
 2821 aggcttatct tggacaagaa gaagatcgct tggcctcgcg cgcagatcag ttggaagaat
 2881 ttgttacta cgtgaaaggg gagatcacca aggtagtcgg caaataatgt ctaacaattc
 2941 cctaggactt ccctgtcaa cctctgatta agcctctcca tcacggcccgt gtatcccggg
 3001 ccgcttggg tgcgttggg catcccggcc gtccacagac cgtaacgctg gaagcactgca
 3061 tttccctagt cgttcttgg gtgcgcttca ttgctcgcga cggaccagtg tataaacgca
 3121 acccggaggg ctattcgtt catcgggtgat gccctagcca tgaggatcaa tcacgaccag
 3181 cagtggcaac caacttgta gtcaggctct ctccgggtcg gtctgaccgg ttgttacctc
 3241 cgtgctctg cgtggatgt tgttgcctcg tttcccagag gctcaggctt cgtgaccat
 3301 cgggtgcttg agccacgct ccggatcgta tgctcctg cgggccaaca tggcccagac
 3361 ctgtcgtgca tgccttggg cgtatggcag cagcactttg ccgtaactca tgcgcgctg
 3421 cagtgcacg atccattgct gctctggcgt ggctgtgtcg gttggatca gcttcgctg
 3481 cgccttggg tgcgtgagc cctgtattag caaggtacgc aagtaacgat ccaaccgca
 3541 actgatgtgc ccgaggtga ccttgcctcc cgaaccgaac tgcgtgggtg tcagaccat
 3601 ccaggccgcg aactggcggc cgttgcggaa ctccggcgcga tcccgcagcc aggcactac
 3661 ggcatctgcc gtcaccgggc caataccggt cagcgcgctg agacgctggc agcgttcatc
 3721 cgtgtgggct tgcctggcaa tgcgggcatc acattcggcc atgcccggct cgtgatctt
 3781 gagatgttcc tgcgcaatc ggatcaggcg tagcaggccg gttggcaggt catggcgatc
 3841 cagatcagcc aggtgctgct tgagtgccgt gactgactcc gggataacca caccgaactc
 3901 ggcagcaga ccgcgcaagc gattgcgcac ggccagggca tcttcttgt aaccctccc
 3961 tacgcgatgc cagctcagac gcacctgctg tggctcatcc ttgacggcca cgaaccgca
 4021 attgccttgg cgcgcagcgg tggcaatggc ttccggcatcc tgcgggtcat tcttgatcaa
 4081 agcccgtctg cggaaagggt tgacgaattg ggcggccatg aggcgtggct gcaagccgtg
 4141 acgctggcat tcacggcccc agtagtgagc actgctgcag gcctccatgg cgacgatcat
 4201 gccttcggg tgcctggcaa gccattgatg aaaccatct cggcgaagct cacggcggcc
 4261 ggttacatga ccggcatcat ccatgagaca aatggcaaat acctgcttg cgaggtcaac
 4321 accggctgta atagactgca tggcgacttc ccctttctgt gtgatgatc gatgaaatgc
 4381 aatcatggca ctcagatgcc gacgcggcac tgcgcttgg gagggggaag tcccttttac
 4441 tgcctcaagc cgacgcccgt tgcggcgcg gcttaacctg gccgttatgc cgcactcacc
 4501 ccatggagt tttgatgttc aaacttttga gtaagttatt ggtctatttg accgcgtcta
 4561 tcatggctat tgcgagtcg ctccgctttt ccgtagatc tagcgggtgag tatccgacag
 4621 tcagcgaat tccggtcggg gaggtccggc tttaccagat tgcggatgg gtttggctgc
 4681 atatcgcaac gcagtcgctt gatggcgcag tctaccgctc caatggctc atgtccgtg
 4741 atggatgata gttgcttttg attgatacag cgtggggtgc gaaaaacaca gcggcacttc
 4801 tgcggagat tgagaagcaa attggacttc ctgtaacgcg tgcagtctcc acgcactttc
 4861 atgacgaccg cgtcggcggc gttgatgtcc ttcgggcccg tggggtggca acgtacgcat
 4921 caccgtcgac acgcccgcta gccaggttag aggggaacga gattcccacg cactctctag
 4981 aaggactctc atcgagcggg gacgcagtg ccttcggctc agtagaactc ttctatctg
 5041 gtgctgcgca ttcgaccgac aacttagttg tgtacgtccc gtctgcgagt gtgctctatg
 5101 gtggttgtgc gatttatgag ttgtcagcga cgtctcgggg gaacgtggcc gatgccgatc
 5161 tggctgaatg gccacctcc attgagcggg ttcaacaaca ctaccggaa gcacagtctc
 5221 tcattccggg gcacggcctg ccgggctgct tagacttgct caagcacaca acgaatgtg
 5281 taaaagcgc caaaatcgc tcagtcgttg agtagcagcc agatgcggca taacatgaag
 5341 ttgcagccga ccatcactcc gctgcgctcc gttctggcgg ctgaacttc gcgttagatg
 5401 cactaagcac ataattgctc acagccaaa

ANEXO III: Publicaciones científicas

A novel class 1 integron array carrying *bla*_{VIM-2} genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital.

Rojo-Bezares B, **Estepa V**, de Toro M, Undabeitia E, Olarte I, Torres C, Sáenz Y.
J Med Microbiol. 2011; 60:1053-1054. doi: 10.1099/jmm.0.030973-0

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***, Juan C, Castillo-Verac J, Rojo-Bezares B, Seral C, Castillo FJ, Sáenz Y, Torres C, Chaves F, Oliver A.
Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58:2454-2458. doi: 10.1128/AAC.02586-13

Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons.

Rojo-Bezares B*, **Estepa V***, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, Castillo FJ, Torres C, Sáenz Y.
Int J Med Microbiol. 2014; 304:405-414. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.01.001

Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: antimicrobial susceptibility and global genetic lineages.

Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Sáenz Y.
FEMS Microbiol Ecol. 2014; 89:15-19. doi: 10.1111/1574-6941.12301

First description of a *bla*_{VIM-2}-carrying *Citrobacter freundii* in Spain.

Porres-Osante N*, **Estepa V***, Seral C, Rojo-Bezares B, Salvo S, Algarate S, Torres C, Castillo FJ, Sáenz Y.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014 (**en prensa**)

Genetic lineages and antimicrobial resistance in *Pseudomonas* spp. isolates recovered from food samples.

Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Sáenz Y.

The Scientific World Journal 2014 (**sometido**)

A novel class 1 integron array carrying *bla*_{VIM-2} genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital

Pseudomonas aeruginosa is a pathogen commonly implicated in nosocomial infections. Carbapenems are an effective treatment option, but *P. aeruginosa* resistant to these agents are increasingly reported. The zinc-dependent metallo- β -lactamases (MBLs) are one of the most clinically important enzymes that hydrolyse carbapenems, penicillins and extended-spectrum cephalosporins, but not aztreonam (Walsh *et al.*, 2005). Their activity is inhibited by the effect of metal chelators such as EDTA. The MBLs most frequently detected worldwide are the IMP and VIM types, which have been reported within genetic elements such as integrons (Walsh *et al.*, 2005; Partridge *et al.*, 2009). Integrons have the ability to capture, integrate and express gene cassettes involved in the resistance to different antimicrobial families (e.g. β -lactams, carbapenems and aminoglycosides) (Partridge *et al.*, 2009). This facilitates the dissemination and co-selection of multiresistant *P. aeruginosa* strains and limits the therapeutic options (Bonomo & Szabo, 2006).

P. aeruginosa strain W37 was recovered from a urinary sample in a Spanish hospital in 2007. Susceptibility testing was performed by the disc-diffusion method (CLSI, 2010). This strain showed resistance to imipenem, meropenem, ticarcillin, ceftriaxone, cefotaxime, gentamicin, tobramycin and sulfonamides; intermediate resistance to cefepime, aztreonam and ciprofloxacin; and susceptibility to ceftazidime, amikacin and colistin. The MICs of imipenem (IPM) and meropenem (MEM), determined by the agar dilution method (CLSI, 2010), were >256 and 64 mg l^{-1} , respectively. The MBL Etest (AB bioMérieux) and the

double-disc (IPM/0.5 M EDTA/MEM) (Lee *et al.*, 2001) methods proved an MBL-positive phenotype in this strain.

Multilocus sequence typing (MLST) showed in *P. aeruginosa* W37 a new allelic combination of the seven sequenced housekeeping genes (*acsA6*, *aroE5*, *guaA6*, *mutL5*, *nuoD4*, *ppsA94*, *trpE7*) that was registered and named ST973 in the MLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) (Curran *et al.*, 2004). This sequence type is a single-locus variant of ST641 and no clonal complex is yet described (Nemec *et al.*, 2010).

MBL genes were detected and characterized by multiplex-PCR and subsequent sequencing (Ellington *et al.*, 2007). The presence of class 1 and 2 integrons was determined by PCR, using primers targeting genes in the integron conserved segments (*intI1*, *intI2* and *qacEΔ1 + sul1*). Integron variable regions were analysed by PCR mapping and sequencing (Sáenz *et al.*, 2004).

P. aeruginosa W37 harboured the *bla*_{VIM-2} gene and two class 1 integrons. One of these integrons contained only a *bla*_{VIM-2} gene cassette in its variable region, but the other one had a variable region of 5429 bp that included *bla*_{VIM-2} + *aac(6')-Ib'* + *aadA1* gene cassettes followed by a new open reading frame (ORF) and another *bla*_{VIM-2} gene cassette (Fig. 1). The presence of two copies of the *bla*_{VIM-2} gene is remarkable in this last integron. The *aac(6')-Ib'* gene encodes the AAC(6')-Ib' aminoglycoside acetyltransferase, which has an amino acid substitution (Leu119→Ser) with respect to AAC(6')-Ib, and confers resistance to gentamicin, tobramycin, kanamycin and netilmicin, a typical phenotype of an AAC(6')-II enzyme (Lambert *et al.*, 1994).

The new ORF (1059 bp) encoded a putative transposase of 352 amino acids which is 62% similar to the IS1618 transposase. This ORF was part of a new IS

of 1216 bp, designated ISPa34 by IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/>). ISPa34 belongs to the IS110 family and IS1111 group, and it was inserted into the *attC* of the *aadA1* gene cassette, whose mobilization could be affected. According to the IS110 family characteristics, no direct target repeats are created by ISPa34 (Mahillon & Chandler, 1998).

The nucleotide sequence of the novel class 1 integron array determined in this study was deposited in the GenBank database with the accession number GU354325.

Several studies have described class 1 integrons containing the *bla*_{VIM-2} gene cassette (Walsh *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010; Samuelsen *et al.*, 2010; Hammami *et al.*, 2010), but to our knowledge, this is the first report of the double detection of *bla*_{VIM-2} gene cassettes in the variable region of the same integron in *P. aeruginosa*. In addition, the presence of a new insertion sequence in the surrounding environment could be implicated in the mobilization of these gene cassettes.

The polymorphisms of the promoter (Pc) responsible for the expression of inserted gene cassettes were characterized by PCR and sequencing in the two class 1 integrons of strain W37. The Pc hybrid 1 (PcH1) was detected in both integrons, characterized by the TGGACA and TAAACT sequences at the -35 and -10 hexamer positions, respectively. An *in silico* study has previously described (Jové *et al.*, 2010) that the PcH1 variant is associated with weak expression of gene cassettes, and the resulting integrase with high excision activity, which favours the capacity for rearrangement of gene cassettes, in order to place the required gene cassette closer to PcH1.

The location of the class 1 integrons was studied by independent genomic DNA digestions with the nuclease S1 (8 U per plug) and the endonucleases I-CeuI and

The GenBank accession number for the nucleotide sequence of the novel class 1 integron array determined in this study is GU354325.

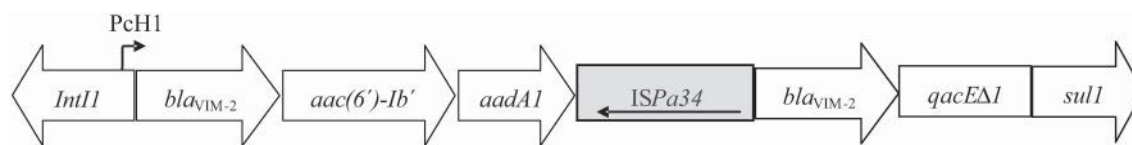


Fig. 1. Structure of the new class 1 integron of *P. aeruginosa* W37 (GenBank accession number GU354325).

SpeI (10 U per plug) (New England Biolabs), and subsequent PFGE separations. Bacterial DNA embedded in agarose plugs was prepared as described by Kaufmann (1998). The PFGE conditions used were as follows: pulse time ranging from 5 s to 45 s for 16 h after nuclease S1 digestion, from 50 s to 90 s for 22 h after *I-CeuI* digestion, and two ramps were used after *SpeI* digestion, from 5 s to 15 s for 10 h and from 15 s to 45 s for another 10 h. All gels were run at 6 V cm^{-2} and at 14°C . Digested PFGE gels were analysed by Southern blotting and hybridization using *bla*_{VIM-2}, *intI1*, *ISPa34* and 16S rRNA gene probes. The *bla*_{VIM-2} and *intI1* genes hybridized in two bands with sizes between 97 and 145.4 kb in the *SpeI*-PFGE gel. DNA digestion with *I-CeuI* showed that the *bla*_{VIM-2}, *intI1*, *ISPa34* and 16S rRNA probes hybridized only with chromosomal DNA. A DNA plasmid extraction and subsequent hybridization was performed and this also confirmed that the integron is chromosomally located.

In summary, a novel class 1 integron that contains two copies of the *bla*_{VIM-2} gene and a new insertion sequence *ISPa34* is reported. The accumulation of genes encoding MBL in *P. aeruginosa* strains is worrisome, especially when these structures could be mobilized by plasmids or transposons and transferred to other bacteria.

Acknowledgements

We thank Patricia Siguier for analysing the new *ISPa34* (<http://www-is.biotoul.fr/>). The study did not receive financial support from third parties. M. de Toro has a pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, Spain (grant number FI08/00506). V. Estepa has a pre-doctoral fellowship from the Universidad de La Rioja, Spain (grant number FPI-UR-09/16599009). Part of this

study was presented at the XIV SEIMC Congress (Barcelona, Spain, 19–22 May 2010).

**Beatriz Rojo-Bezares,¹
Vanessa Estepa,² María de Toro,^{1,2}
Esther Undabeitia,³ Inés Olarte,³
Carmen Torres^{1,2} and Yolanda Sáenz¹**

¹Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

²Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain

³Laboratorio de Microbiología, Hospital San Pedro, Logroño, Spain

Correspondence: Yolanda Sáenz (ysaenz@riojasalud.es)

Bonomo, R. A. & Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **43** (Suppl. 2), S49–S56.

CLSI (2010). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 20th International Supplement M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. & Dowson, C. G. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **42**, 5644–5649.

Ellington, M. J., Kistler, J., Livermore, D. M. & Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* **59**, 321–322.

Hammami, S., Gautier, V., Ghazzi, R., Da Costa, A., Ben-Redjeb, S. & Arlet, G. (2010). Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional *bla*_{SHV2a} carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis. *Clin Microbiol Infect* **16**, 189–193.

Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D. & Ploy, M. C. (2010). Inverse correlation between

promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet* **6**, e1000793.

Kaufmann, M. E. (1998). Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med* **15**, 33–50.

Lambert, T., Ploy, M. C. & Courvalin, P. (1994). A spontaneous point mutation in the *aac(6')-Ib'* gene results in altered substrate specificity of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *FEMS Microbiol Lett* **115**, 297–304.

Lee, K., Chong, Y., Shin, H. B., Kim, Y. A., Yong, D. & Yum, J. H. (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* **7**, 88–91.

Mahillon, J. & Chandler, M. (1998). Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 725–774.

Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M. & Musilek, M. (2010). Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol* **161**, 234–242.

Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E. & Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 757–784.

Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J. & Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3996–4001.

Samuelsen, Ø., Toleman, M. A., Sundsfjord, A., Rydberg, J., Leegaard, T. M., Walder, M., Lia, A., Ranheim, T. E., Rajendra, Y. & other authors (2010). 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* **54**, 346–352.

Santos, C., Caetano, T., Ferreira, S. & Mendes, S. (2010). Tn5090-like class 1 integron carrying *bla*_{VIM-2} in a *Pseudomonas putida* strain from Portugal. *Clin Microbiol Infect* **16**, 1558–1561.

Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L. & Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* **18**, 306–325.

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.

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

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain^a; Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain^b; Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa), Palma de Mallorca, Spain^c; Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain^d; Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain^e; Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain^f

Twenty-seven well-characterized metallo- β -lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas* strains from two distantly located hospitals were analyzed. The results revealed specific features defining the multilevel epidemiology of strains from each hospital in terms of species, clonality, predominance of high-risk clones, composition/diversity of integrons, and linkages of Tn402-related structures. Therefore, despite the global trends driving the epidemiology of MBL-producing *Pseudomonas* spp., the presence of local features has to be considered in order to understand this threat and implement proper control strategies.

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

For this purpose, a total of 27 isolates from two previously established collections of MBL-positive *Pseudomonas* strains detected between June 2008 and June 2010 in the Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HLB) (848 beds) (Zaragoza, Spain), and Hospital 12 de Octubre (H12O) (1,300 beds) (Madrid, Spain) were used (5, 6). The H12O collection included one isolate representing each *Pseudomonas* sp. pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) clone proved to harbor an MBL during the study period, 5 *P. putida* and 6 *P. aeruginosa* clones. Additionally, due to the extraordinary epidemic spread (104 patients between 2007 and 2010) of an additional *P. aeruginosa* clone (the previously described clone B), 4 representative samples of it were also studied in order to find potential differences in their acquired resistance determinants (5, 7). Hence, the H12O collection constituted a total of 10 *P. aeruginosa* samples. Regarding the isolates collected from HLB, no MBL-positive isolates of *Pseudomonas* species different from *P. aeruginosa* were detected, but a high number of different clones was found (up to 30), from which 12 strains of representative pulsotypes were selected (6). The clinical data, resistance profiles, and clonal relatedness (PFGE and multilocus sequence typ-

ing [MLST] analysis) of both collections are shown in Table 1. Most of the 27 cases (89%) were considered infections, presenting a crude 30-day mortality of 15%. As expected, the most frequently involved hospital department was the intensive care unit (ICU) (59%), and the acquisition of the infection occurred in patients on average 55.8 days after admission, without significant differences between the two participating hospitals (Table 1). Twenty-five of the 27 strains produced VIM-2 (one was additionally positive for VIM-1), while the remaining two strains produced VIM-1 or IMP-22 (Table 1). MBLs were frequently linked to globally spread high-risk clones (8–14) in both hospitals with different distributions. Sequence type 111 (ST111) and ST244 were detected only among H12O strains, whereas ST235 was detected only in the HLB strains. Moreover, MLST analysis indicated distinct wide dissemination of ST175 in the H12O hospital and ST235 in HLB (represented by 8 different pulsotypes). In this sense, the low number of different STs harboring MBLs (just three) among the HLB isolates was remarkable in contrast with the relatively high number of STs (six) in H12O. Likewise, polyclonal MBL-positive *P. putida* strains, found to act as environmental reservoirs of genetic elements harboring these resistance determinants (8, 13), were also found only among H12O isolates.

The composition of the MBL-carrying integrons was analyzed through PCR amplification and sequencing following previously described protocols (8, 15, 16), and results are shown in Fig. 1. Those combinations of cassettes not previously described were uploaded on the Integrall database (<http://integrall.bio.ua.pt/>), and the provided nomenclature is also shown in Fig. 1. Interest-

Received 27 November 2013 Returned for modification 31 December 2013

Accepted 26 January 2014

Published ahead of print 3 February 2014

Address correspondence to Carlos Juan, carlos.juan@ssib.es.

E.V. and V.E. contributed equally to this article.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02586-13

TABLE 1 Clinical data of patients and molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of all the strains included in this study

Strain code	Species	Hospital ^a (ward)	Patient gender (age [yr])	Underlying pathology ^b	Sample (C/D) ^c	Date of isolation (day/month/yr [days of admission before isolation])	Crude 30-day mortality	PRGE	ST	MBL	Resistance pattern ^d
W335	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	M (64)	Subarachnoid hemorrhage	Urine (I)	03/07/08 (37)	No	HLB-3	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
W340	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	M (49)	Subdural hematoma	Bronchial aspirate (I)	04/07/08 (38)	No	HLB-11	973	VIM-2	IMP, MER, FEP, GEN, TOB, AMK, CIP
W336	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	F (77)	Eventration	Bronchial aspirate (I)	05/07/08 (115)	Yes	HLB-8	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, CIP
W343	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	F (21)	Viral meningencephalitis	Urine (I)	16/07/08 (76)	No	HLB-6	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
W368	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	F (45)	Community pneumonia with septic shock	Urine (I)	20/02/09 (45)	No	HLB-12	973	VIM-2	IMP, MER, CAZ, GEN, TOB, AMK, CIP
W378	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	M (45)	TBC, HCV, renal insufficiency	Surgical wound (I)	07/05/09 (18)	No	HLB-7	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, TOB, AMK, CIP
PS24	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	F (65)	Subarachnoid hemorrhage	Bronchial aspirate (I)	22/07/09 (13)	No	HLB-10	973	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, CIP
PS27	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	M (57)	Goodpasture syndrome with lung hemorrhage	Bronchial aspirate (I)	17/08/09 (10)	Yes	HLB-4	235	VIM-2	IMP, MER, TOB, CIP
PS56	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (HOS)	M (77)	Chronic prostatitis	Sputum (I)	18/12/09 (123)	No	HLB-9	175	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, CIP
PS12	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	F (50)	Cardiogenic shock	Pharynx exudate (I)	18/12/09 (16)	Yes	HLB-1	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, AMK, CIP
PS2	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	F (62)	Septic shock	Urine (I)	23/03/10 (41)	No	HLB-2	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, AMK, CIP
PS60	<i>P. aeruginosa</i>	HLB (ICU)	F (52)	Carcinoma of ampulla	Urine (I)	28/05/10 (31)	No	HLB-5	235	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, AMK, CIP
1204	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (DS)	M (74)	BOOP	Sputum (C)	07/08/08 (14)	No	HL20-B	175	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, TOB, CIP
1205	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (PNE)	F (36)	Epilepsy	Urine (I)	16/10/08 (122)	No	HL20-F	111	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
1209	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (ICU)	M (48)	Chronic hepatic pathology	Bile (I)	22/12/08 (40)	No	HL20-C	450	VIM-2	IMP, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
12010	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (DS)	M (79)	Chronic respiratory failure	Sputum (I)	29/12/08 (15)	No	HL20-G	244	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
12011	<i>P. putida</i>	HL20 (IM)	F (51)	Cardiovascular pathology	Inguinal exudate (C)	13/11/08 (5)	No	HL20-H	-	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
12012	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (ICU)	M (65)	Cardiovascular pathology	Blood culture (I)	26/02/09 (30)	No	HL20-I	155	VIM-1	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, AMK, CIP
12013	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (ICU)	F (53)	Obstruction intestinal syndrome	Urine (I)	03/04/09 (82)	No	HL20-J	244	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, CIP
12014	<i>P. putida</i>	HL20 (DAM)	F (82)	Actinic enteritis	Urine (I)	27/04/09 (160)	No	HL20-K	-	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
12019	<i>P. putida</i>	HL20 (GS)	M (77)	Rectal adenocarcinoma	Blood culture (I)	01/10/09 (28)	No	HL20-L	-	VIM-2	IMP, MER, CAZ, PTZ, GEN, TOB, CIP
12021	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (IM)	M (58)	Solid tumor	Blood culture (I)	10/02/10 (324)	No	HL20-B	175	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
12023	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (ICU)	M (58)	Abdominal perforation	Bile (I)	02/03/10 (10)	Yes	HL20-B	175	IMP-22	IMP, MER, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP
12025	<i>P. putida</i>	HL20 (ICU)	M (71)	Gastric carcinoma	Urine (I)	11/05/10 (33)	No	HL20-M	-	VIM-1 and VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, CIP
12026	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (ONC)	F (70)	BOOP	Sputum (I)	10/05/10 (42)	No	HL20-B	175	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, GEN, TOB, CIP
12027	<i>P. putida</i>	HL20 (PNE)	M (74)	Deep vein thrombosis	Urine (C)	12/05/10 (14)	No	HL20-N	-	VIM-2	IMP, MER, CAZ, FEP, PTZ, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP
12028	<i>P. aeruginosa</i>	HL20 (IM)	F (89)	Cholangiocarcinoma	Catheter (I)	28/05/10 (26)	No	HL20-O	253	VIM-2	IMP, MER, PTZ, GEN, TOB, CIP

^a HLB, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa; HL20, Hospital 12 de Octubre; ICU, intensive care unit; HOS, general hospitalization; DS, digestive surgery; PNE, pneumology; IM, internal medicine; DAM, digestive apparatus medicine; GS, general surgery; ONC, oncology.

^b TBC, tuberculosis; HCV, hepatitis C virus; BOOP, bronchiolitis obliterans organizing pneumonia; ^c C, colonization; I, infection.

^d The displayed antibiotics are those to which each strain showed clinical resistance, following the 2013 version 3.1 EUCAST breakpoints (www.eucast.org/clinical_breakpoints/). IMP, imipenem; MER, meropenem; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; PTZ, piperacillin-tazobactam; ATM, aztreonam; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin.

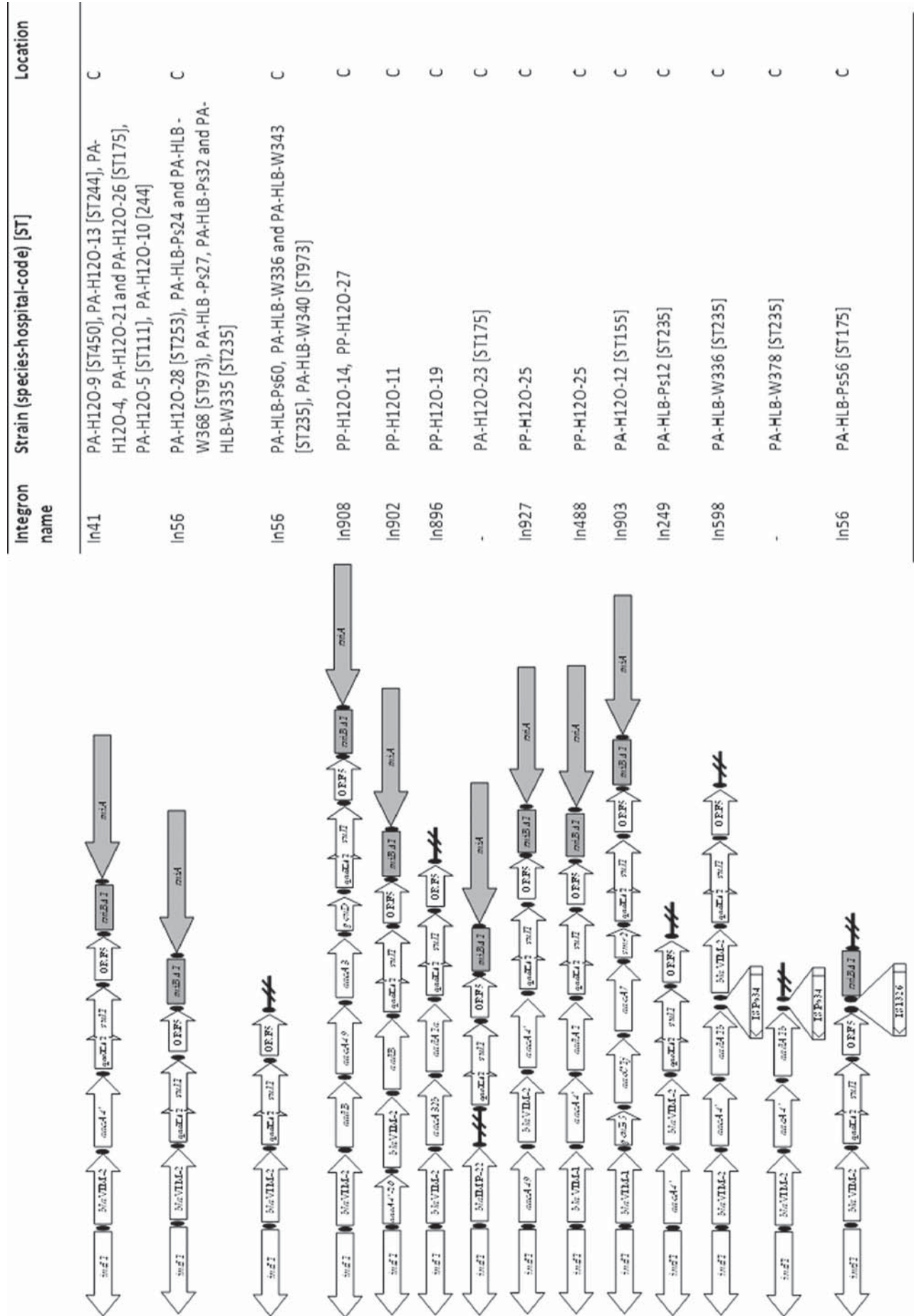


FIG 1 Composition of the MBL-carrying integrons and their genetic context. The gray boxes/arrows represent the genes belonging to Tn402-related structures carrying the integrons. The thick black lines interrupted by two diagonals represent the areas that could not be amplified by PCR. The black oval dots represent the intergenic DNA. The integrons' names and their cassettes were obtained in the Integrall database (<http://integrall.bio.ua.pt/>). The dashes in the column labeled "Integron name" indicate an incomplete integron structure; the Integrall database (<http://integrall.bio.ua.pt/>) does not provide In- names for partial integrons. Abbreviations in column 2: PA, *Pseudomonas aeruginosa*; PP, *Pseudomonas putida*; ST, sequence type; HLB, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa; H120, Hospital 12 de Octubre. Location "C" represents "chromosomal."

ingly, most of the HLB *bla*_{VIM-2} integrons were quite uniform in their simplicity, given that in all the strains but two (PA-HLB-Ps12 and PA-HLB-W378), *bla*_{VIM-2} was the unique cassette detected in the variable region (In56). This fact suggests the potential recent and contemporary acquisition of the VIM-2-carrying integrons in most of the strains, which would not have had enough time to accumulate new cassettes. On the other hand, the sequencing of the PA-HLB-W378 strain integron revealed a partial structure, containing IS*Pa34*, which has been previously described in another Spanish hospital (17). Interestingly, exactly the same complete integron from the latter work (codifying two copies of *bla*_{VIM-2} among other genes) was found in the strain PA-HLB-W336, which additionally harbored another class 1 integron with only *bla*_{VIM-2}. The integrons of H12O strains were much more variable, showing different combinations of MBLs and aminoglycoside-modifying enzymes, even with a strain (PP-H12O-25) harboring *bla*_{VIM-1} and *bla*_{VIM-2} codified in two different integrons. Moreover, two *P. putida* strains from H12O harbored a new aminoglycoside-modifying enzyme gene variant, designated *aac*(6')-49, presumably with acetyltransferase activity, given its homology with other aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferases (53 to 55% amino acid identities). Five of the 11 MBL-harboring integron structures detected were novel; In896, In902, In903, In908, and In927 were most detected in H12O (Fig. 1).

Most of the studies dealing with MBL-carrying integrons focus on their cassette composition, but fewer studies have investigated the genetic context where the integrons are inserted, in order to understand the potential mechanisms of dissemination and particularities of their origin. To gain insights into these matters, PCRs using previously described overlapping primers for the amplification of *tni* genes (*tniQ*, *tniC*, *tniB*, and *tniA*, belonging to Tn402-like structures), often located downstream of the 3'-conserved segment (3'CS) of class 1 integrons, and subsequent sequencing were performed (8, 15, 18, 19). The resulting sequences were then compared with those on GenBank, and the obtained data are shown in Fig. 1. The location of MBL integrons within transposon structures deriving from Tn402, a widely reported pattern for the class 1 integrons, was very frequent (19 of the 27 studied strains) (Fig. 1). However, the structures of integrons lacking the whole 3'CS (*qacE1*, *sul1*, and ORF5) and showing a complete *tni* module instead (*tniC*, *tniQ*, *tniB*, and *tniA*), which have already been described in our country and elsewhere (15, 18), were not detected in any of the strains from the two hospitals. These particular integron-*tni* complete module structures have been proposed to be still-functional transposable elements, in contrast to those integrons with complete 3'CS but a truncated *tni* module, which are thus transposition-defective transposon derivatives that would need to be embedded in additional larger transposons to be mobilized (18–20). Precisely these truncated variants were those most usual in our work (19 of the total 27 strains), with a high degree of homology in the *tniB*Δ and *tniA* nucleotide sequences (more than 97% among all the strains). The presence of particular Tn402-like variants, with insertion sequences interrupting *tniB*, was exceptional. Only the PA-HLB-Ps56 strain showed an IS1326 between ORF5 and *tniB*. However, the widely described presence of IS1353 upstream of IS1326 was not found in this strain, constituting a rare variant of Tn402-like structure, probably indicating a very particular origin proceeding from the described *In0* (19, 21, 22). Another particular structure, containing a different specific deletion site for *tniB*, previously described

as *tniB*Δ3 (19), was found only in one strain, PA-H12O-12, also suggesting a very particular and differential origin for this integron (Fig. 1). In contrast, in most cases (17 strains), the PCRs for partial *tniB* (disrupted in a common site yielding a particular *tniB* fragment previously denominated as *tniB*Δ1) and *tniA* genes provided positive results (Fig. 1). Therefore, the sharing of specific transposon structures, different from those of integrons with the complete *tni* module, as has been shown for the U.S., Russian, and Indian class 1 integrons (22, 23), suggests a single ancestral origin for most of the MBL-harboring genetic elements described in this work, detected among strains from both participating hospitals and among both *P. aeruginosa* and *P. putida* isolates. For 8 of the strains, neither *tniA* nor *tniB* could be amplified using different combinations of primers, suggesting the presence of alternative, not yet described genetic elements carrying the integrons of these strains that need to be explored in future studies. This alternative structure was almost exclusively detected in HLB strains, further supporting the concept that each health center shows particular and not generalizable epidemiologic features, including the origin of the dominant MBL integrons.

Finally, 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; Mo-Bio) to the PAO1 reference strain through electroporation/conjugation yielded negative results. Furthermore, the Southern blot hybridization following described protocols (15) using the North2South complete biotin random primer labeling and detection kit (Thermo Scientific), over the I-CeuI/S1 nuclease-digested genomes, suggested the chromosomal location of MBL genes in all the strains, given that the respective MBL gene probes hybridized with bands which also hybridized with the rRNA gene probe (data not shown). This finding is supported by several previous studies that have also shown that the majority of MBL genes are chromosomally located in *P. aeruginosa*, probably due to a poor replication of plasmids within this species, and the necessity of a chromosome integration of the genes (24, 25). Moreover, chromosomal location was also observed in all *P. putida* strains analyzed. This result contrasts with those of a different hospital in Spain for which in the vast majority of MBL-producing *P. putida* strains plasmid locations were demonstrated (8).

In conclusion, despite the uniform dominance of VIM-2 production, our results indicate the presence of specific features defining the multilevel epidemiology of MBL-producing *Pseudomonas* spp. in each of the two participating hospitals, in terms of *Pseudomonas* species, clonal diversity, predominance of particular high-risk clones, and composition and diversity of integrons and their linkage to Tn402-related structures. Therefore, despite clear global trends driving the epidemiology of MBL-producing *Pseudomonas* spp., the presence of specific local features also needs to be considered for understanding this growing threat and implementing optimal control strategies. In light of our findings, the measures to be implemented at the local level should likely include the detection and control of the so-called high-risk clones, even if they have not yet acquired MBL determinants, and the search for environmental reservoirs of MBL-producing genetic elements before they are successfully transferred to those high-risk clones.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and the Instituto de Salud Carlos III, through the Spanish

Network for the Research in Infectious Diseases (no. RD06/0008 and RD12/0015), the projects FIS PI12/01276 and SAF2012-35474, the Direcció General d'Universitats, Recerca i Transferència del Coneixement del Govern de les Illes Balears, and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). During the experimental work for this study, V. Estepa had a predoctoral fellowship from the University of La Rioja, Spain.

REFERENCES

- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:582–610. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
- Poole K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* 2:65. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>.
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis.* 11:381–393. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70056-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1).
- Juan C, Oliver A. 2010. Carbapenemases in *Pseudomonas* spp. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 1:19–28. (In Spanish). [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5).
- Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MA, Sanz F, Otero JR, Oliver A, Chaves F. 2012. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1235–1241. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.111234>.
- Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, Castillo FJ, Torres C, Sáenz Y. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: characterization of metallo- β -lactamases, porin OprD and integrons. *Int. J. Med. Microbiol.*, in press.
- 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:e0011213. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00112-13>.
- Juan C, Zamorano L, Mena A, Albertí S, Pérez JL, Oliver A. 2010. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:474–478. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp491>.
- Viedma E, Juan C, Acosta Zamorano JL, Otero JR, Sanz F, Chaves F, Oliver A. 2009. 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4930–4933. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00900-09>.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:736–755. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
- Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C, Cantón R, Oliver A. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:2022–2027. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr232>.
- Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I, Zamorano L, Dobrev E, Velinov T, Kantardjiev T, Oliver A. 2013. Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microb. Drug Resist.* 19:355–361. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2013.0004>.
- Gilarranz R, Juan C, Castillo-Vera J, Chamizo FJ, Artilles F, Álamo I, Oliver A. 2013. First detection in Europe of the metallo- β -lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* 19:E424–E427. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12248>.
- Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2013. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5527–5535. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01481-13>.
- Scotta C, Juan C, Cabot G, Oliver A, Lalucat J, Bennisar A, Albertí S. 2011. Environmental microbiota represents a natural reservoir for dissemination of clinically relevant metallo- β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5376–5379. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00716-11>.
- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Pérez JL, Oliver A. 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:4329–4335. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00810-07>.
- Rojo-Bezares B, Estepa V, de Toro Undabeitia ME, Olarte I, Torres C, Sáenz Y. 2011. A novel class 1 integron array carrying *blaVIM-2* genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital. *J. Med. Microbiol.* 60:1053–1054. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.030973-0>.
- Marchiaro P, Viale AM, Ballerini Rossignol VG, Vila AJ, Limansky A. 2010. First report of a Tn402-like class 1 integron carrying *blaVIM-2* in *Pseudomonas putida* from Argentina. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4:412–416. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.1012>.
- Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R. 2010. Dispersal of carbapenemase *blaVIM-1* gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:320–327. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00783-09>.
- Martínez E, Marquez C, Ingold A, Merlino J, Djordjevic SP, Stokes HW, Chowdhury PR. 2012. Diverse mobilized class 1 integrons are common in the chromosomes of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:2169–2172. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06048-11>.
- Partridge SR, Brown HJ, Stokes HW, Hall RM. 2001. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1263–1270. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.4.1263-1270.2001>.
- Toleman MA, Vinodh H, Sekar U, Kamat V, Walsh TR. 2007. *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.* 51:2636–2638. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01043-06>.
- Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. 2009. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo- β -lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1225–1227. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01011-08>.
- Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas M. 2011. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38:398–402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.06.016>.
- Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, Lia A, Ranheim TE, Rajendra Y, Hermansen NO, Walsh TR, Giske CG. 2010. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:346–352. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00824-09>.



Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons



Beatriz Rojo-Bezares^{a,1}, Vanesa Estepa^{b,1}, Rocío Cebollada^c, María de Toro^{a,b}, Sergio Somalo^b, Cristina Seral^{c,d}, Francisco Javier Castillo^{c,d}, Carmen Torres^{a,b}, Yolanda Sáenz^{a,*}

^a Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

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

^c Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain

^d Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2013

Received in revised form 15 January 2014

Accepted 19 January 2014

Keywords:

Carbapenem resistance

*bla*_{VIM-2}

ISPa45

ST175

ST235

ST973

ABSTRACT

Molecular typing and mechanisms of carbapenem resistance such as alterations in porin OprD and presence of metallo-beta-lactamases (MBLs), as well as integrons have been studied in a collection of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) isolates from a Spanish hospital. One hundred and twenty-three CRPA isolates were recovered from different samples of 80 patients. Clonal relationship among CRPA was analyzed by *SpeI*-PFGE. Susceptibility testing to 11 antibiotics and MBL phenotype was determined by microdilution, IP/IPI E-test and double disc method. The *oprD* gene was studied by PCR and sequencing, and mutations were determined comparing with *P. aeruginosa* PAO1 sequence. Characterization of MBLs, and class 1 and 2 integrons were studied by PCR and sequencing. SDS-PAGE analysis of outer membrane proteins of selected strains was performed.

Seventy-four-per-cent of patients with CRPA were hospitalised in the ICU setting and 50% had long hospitalization stays. Sixty-four different PFGE patterns were detected, and 87 CRPA strains were further analyzed. MBL phenotype was detected in 43 of 87 strains (49.4%), which contained *bla*_{VIM-2} gene inside class 1 integrons. VIM-2-producing strains belonged to lineages ST175, ST235, and ST973. A great diversity of nucleotide insertions, deletions, and mutations in *oprD* gene, and the presence of a new insertion sequence (ISPa45) truncating *oprD* were identified among CRPA strains. Class 1 integrons were detected in 75% of CRPA strains, *bla*_{VIM-2} and the new arrangement *aac(3)-Ia+ISPa34+aadA1* (named as In661) being the most frequent gene-cassette arrays detected. Other gene cassettes detected in integrons were: *aadB*, *aadA6*, *aadA7*, *aac(6')-Ib'*, and *bla*_{OXA-46}.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a common opportunistic and nosocomial pathogen that causes severe infections with a high mortality rate, especially in immunocompromised patients or those with underlying diseases (Poole, 2011). Multidrug resistant (MDR) *P. aeruginosa* isolates, resistant to almost all beta-lactams, aminoglycosides and quinolones, often ascribed to epidemic clones (ST235 or

ST111), have been detected in hospitals worldwide, mainly within intensive care units (ICU) (Woodford et al., 2011; Paterson, 2006). The increasing prevalence of MDR *P. aeruginosa* isolates is a global health problem, because of the limitation in clinical treatment options.

Nowadays, intensive clinical use of carbapenems has caused the presence of carbapenem heteroresistant *P. aeruginosa* subpopulations (Pournaras et al., 2007; Oikonomou et al., 2011) and an increase in carbapenem resistance by acquisition of different mechanisms, such as hyperproduction of chromosomal AmpC beta-lactamase, overexpression of efflux systems, alteration or lack of outer membrane proteins (such as porin OprD), and production of carbapenemases (Lister et al., 2009).

Porin OprD is a 443 amino acid protein composed by a 16 strand transmembrane beta-barrel structure connected with 7

* Corresponding author at: Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/Piqueras 98, 3^a planta, 26006 Logroño, Spain. Tel.: +34 941278868; fax: +34 941278887.

E-mail address: ysaenz@riojasalud.es (Y. Sáenz).

¹ These authors contributed equally to this work.

short periplasmic turn sequences and 8 loops on the external surface (Huang et al., 1995; Ochs et al., 2000). The *P. aeruginosa* protein OprD is a substrate-specific porin that facilitates the diffusion of basic amino acids, small peptides and carbapenems into the cell. The alterations or loss of OprD significantly decreases the susceptibility to available carbapenems in *P. aeruginosa* (Lister et al., 2009).

The most significant carbapenemases acquired by *P. aeruginosa* are the zinc-dependent metallo-beta-lactamases (MBLs) that are capable of hydrolyzing imipenem, and extended-spectrum cephalosporins, but not aztreonam, and are inhibited by the EDTA chelator. The most important types of MBLs for epidemiological dissemination and clinical relevance are: IMP, VIM, SPM and currently NDM types (Cornaglia et al., 2011; Poole, 2011). Nevertheless, the MBLs most frequently detected worldwide in *P. aeruginosa* are IMP and VIM types that have been reported within mobilizable elements such as integrons (Partridge et al., 2009; Walsh et al., 2005). Integrons are genetic elements able to capture, integrate and express gene cassettes. The presence of genes encoding VIM enzymes, especially VIM-2, included inside integron structures has been reported in clinical MDR *P. aeruginosa* isolates, however the prevalence reported in Spanish hospitals is still low (Gutiérrez et al., 2007).

In this study, a collection of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) isolates from a Spanish hospital has been studied in order to determine their molecular typing, and to characterize the carbapenemase genes and integrons, as well as the alterations in porin OprD.

Material and methods

Bacterial isolates

One hundred and twenty-three CRPA isolates were recovered from 80 patients in the Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain) during June 2008 to October 2010. These CRPA isolates were recovered from different types of samples [surgical wound, 33; urine, 28; bronchial aspirate, 22; skin lesion, 13; blood, 9; abscess, 5; tracheal aspirate, 4; sputum, 3; peritoneal fluid, 3, and others, 3].

Molecular typing

The clonal relationship among CRPA isolates was evaluated by PFGE using *SpeI* enzyme for genomic DNA restriction, and DNA fragments were separated as previously described (Rojo-Bezares et al., 2011). PFGE patterns were analyzed and interpreted by the BioNumerics software 2.0 (Applied Maths, Belgium) with the Dice similarity coefficient with a 1.0% band position tolerance, and also as previously recommended by Tenover et al. (1995).

Multilocus sequence typing (MLST) was performed as recommended (Curran et al., 2004), and the nucleotide sequences of alleles were compared with those of MLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) to obtain the specific sequence type (ST).

Antibiotic susceptibility

Susceptibility testing to 11 antipseudomonal agents (piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, and colistin) was performed by WIDER microdilution system using the breakpoints recommended by CLSI (2012).

The MBL phenotype was determined by IP/IPI E-test (AB Biomérieux, Solna, Sweden) and by the double-disc diffusion

method (imipenem, 0.5 M EDTA pH 8, meropenem) (Lee et al., 2001).

Characterization of MBLs and porin OprD

The presence of MBL-encoding genes was carried out by multiplex-PCR and subsequent sequencing (Ellington et al., 2007).

The amino acid changes of the protein OprD were analyzed by PCR and sequencing in all CRPA isolates (Wolter et al., 2004; Gutiérrez et al., 2007). The mutations were determined by comparison with the sequence of the control strain *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank accession number AE004091).

Outer membrane proteins isolation and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The outer membrane proteins (OMPs) were obtained, were visualized by SDS-PAGE in a Bio-Rad apparatus (Mini-Protean II) and were stained with Coomassie brilliant blue as previously described (Ruiz-Martínez et al., 2011). The *P. aeruginosa* PAO1 was included as an OprD-positive control strain.

Detection and characterization of integron structure

The presence of genes encoding type 1 and 2 integrases, as well as the 3'-conserved region of class 1 integrons (*qacEΔ1+sul1*) was studied by PCR. The characterization of class 1 integron variable regions was performed by PCR mapping and sequencing (Sáenz et al., 2004).

Results

Clinical and epidemiological data

The characteristics of the 80 patients (55 males and 25 females) who carried the 123 CRPA isolates are shown in Table 1. The average age of patients was 64 years. Most of patients with CRPA isolates (74%) were hospitalised in the ICU setting, and 50% of total patients were hospitalised over 30 days (Table 1).

Beta-lactams, fluoroquinolones, aminoglycosides and colistin were the antibiotics most commonly used in the previous 30 days of CRPA recovery (Table 1). Beta-lactams were used in 65 patients, 58 of them receiving carbapenems. Forty-four patients were treated with three or more different antimicrobial families, including carbapenems and other beta-lactams. On the other hand, seven patients were not pre-treated with antibiotics (Table 1).

Clonal relationship

Sixty-four different PFGE patterns were detected among the 123 CRPA isolates recovered from 80 patients (Figure 1 supplementary material). Thirty-three CRPA strains, recovered from 31 patients, shared 10 different PFGE patterns, and 14 strains were grouped in two of these patterns (7 strains each one).

A total of 87 CRPA strains were further characterized in this study (one CRPA strain per patient, with the exception of 7 patients who harboured 2 strains with different or closely related PFGE patterns that were also included).

Antibiotic susceptibility profiles and detection of MBLs

The MBL phenotype was detected in 43 of the 87 CRPA strains (49.4%) recovered from 40 patients (Table 1), and the *bla_{VIM-2}* gene was found in all MBL-positive strains. Nineteen MBL-producing strains were ascribed to 6 PFGE patterns (one PFGE-pattern grouped 7 MBL-producing strains and 5 patterns included 12 strains). The

Table 1
Characteristics of the 80 patients who harboured a CRPA isolate in a Spanish hospital during 2008–2010.

Characteristic of patients	Number of patients (n = 80)	Patients with MBL-producer (n = 40) ^a	Patients with non-MBL-producer (n = 40)
Gender			
Number of males (%)	55 (68.8%)	24 (60%)	31 (77.5%)
Number of females (%)	25 (31.2%)	16 (40%)	9 (22.5%)
Age (years) (year range)	64 (21–92)	61 (21–85)	67 (26–92)
Hospital admission to:			
ICU	59	37	22
Internal medicine	7	0	7
Surgery	3	1	2
Primary attention	3	1	2
Gastroenterology	2	0	2
Cardiology	2	0	2
Pulmonology	1	0	1
Infectious disease	1	0	1
Oncology	1	1	0
Non-available data	1	0	1
Underlying disease:			
Abdominal disease	19	11	8
Septic shock	18	6	12
Respiratory disease	17	8	9
Neurological disease	9	7	2
Vascular/heart disease	4	1	3
Neoplastic disease	4	3	1
Polytraumatism	3	3	0
Kidney disease	1	0	1
Non-available data	5	1	4
≥30 days hospitalised	47	25	22
Antimicrobial therapy ^b :			
Beta-lactams (carbapenems)	65 (58)	35 (29)	30 (29)
Fluoroquinolones	33	21	12
Aminoglycosides	27	16	11
Colistin	14	7	7
≥3 antibiotic families	44	26	18
Non-antimicrobial treatment	7	4	3
Non-available data	5	1	4

^a Three of these patients also harboured an additional non-MBL *P. aeruginosa* isolate.

^b The exposure to antimicrobial agents in the previous 30 days of CRPA isolates recovery.

remaining 24 MBL-producing strains showed unrelated PFGE patterns (Figure 1 supplementary material).

Fig. 1 shows the percentages of resistance to different antipseudomonal agents in the 87 CRPA. All strains showed a multiresistance phenotype (resistant to three or more antipseudomonal families), but none of them were resistant to colistin. It is noteworthy the high resistance percentages to aminoglycosides, such as gentamicin (72.4%), tobramycin (63.2%) and amikacin (24.1%). The MBL-producing *P. aeruginosa* strains were more resistant than non-MBL-producing strains, with the exception of aztreonam (Fig. 1). It is important to highlight that 8 CRPA strains showed resistance to all beta-lactams (including aztreonam and carbapenems) and fluoroquinolones, and besides, 5 of them were MBL-producing strains.

Characterization of protein OprD

The *oprD* gene was amplified in 82 of 87 CRPA strains, and their deduced OprD amino acid sequences (443 amino acids) were compared with the OprD sequence of *P. aeruginosa* PAO1. Nucleotide insertions, deletions, mutations and the presence of insertion sequences truncating the *oprD* gene were obtained among the strains. Table 2 shows the high polymorphism detected in OprD amino acid sequence of the 82 CRPA strains, being higher among the non-MBL-producing strains.

The most frequent amino acid changes detected in loop L1 (positions from amino acid 44 to 61) were S57E and S59R, identified in 20 non-MBL-producing and in 11 MBL-producing strains (37.8%). The replacement of an aspartic residue by asparagine at position

43 (D43N) preceding the loop L1 was detected in 37.8% of studied strains (19 non-MBL-producing and 12 MBL-producing strains).

The substitutions found in loop L2 (positions from amino acid 93 to 127) were T103S, and K115T detected in 9 strains, and V127L in other 6 strains. The F170L, E185Q, P186G, and V189T amino acid changes were the most common ones described in loop L3 (positions 153–192). Moreover, the E230K amino acid change was detected in some cases when loop L4 (positions 221–233) was mutated. The N262T and A267S amino acid changes were identified in loop L5 (positions 260–274) and the R310E and A315G in loop L6 (positions 304–317). Mutations in loop L8 (positions 418–431) were rarely detected among our strains, and only one strain contained the Q424E substitution.

In the region from amino acid 372 to 383 of the loop L7 (MSDNNVGYKKNYG), the deletion of two amino acids, named loop L7-short (VDSSSSYAGL), which encoded a protein OprD of 441 amino acids, was identified in 5 non-MBL-producing and 11 MBL-producing isolates.

A total of 58 strains (70.7%) showed a premature stop codon, due to insertion, deletion or point mutation events which modify the size of the expected protein OprD. Additionally, 12 strains showed a threonine instead of a methionine in the first amino acid of the OprD protein. In five *P. aeruginosa* strains (W367, W370, W383, Ps21, and Ps42), a stop codon was not detected, therefore the protein OprD have more than 443 amino acids (Table 2).

The presence of insertion sequences truncating the *oprD* gene was detected in two strains. The *oprD* of Ps33 strain was disrupted by a new insertion sequence belonging to IS4 family, similar to ISPa1635 (90%) and named as ISPa45 by ISFinder (<https://www-is.biotoul.fr/is.html>). ISPa45 was firstly described in

Table 2
Molecular characterization of protein OprD in MBL- and non-MBL-producing *P. aeruginosa* strains.

Strains (Number of strains)	Resistance phenotype ^a		OprD size (Number of amino acids)	Amino acid changes in OprD sequence ^b	OprD loops affected ^c	Insertion/deletion
	IPM	MEM				
Non-MBL-producing strains (n = 44)						
W342 (1)	R	R	88	–	None	Deletion of 16 bp at codon 18 (nt 55)
Ps28 ^d (1)	R	R	53	–	None	Insertion of 1 bp (A) at codon 49 (nt 148)
W341 (1)	R	I	93	–	None	Deletion of 1 bp (G) at codon 59 (nt 177)
W351 (1)	R	I	64	W65STOP ^e	None	–
Ps18 (1)	R	R	116	R117STOP ^e	None	Deletion of 2 bp at codon 84 (nt 250)
W356 (1)	R	S	112	D43N, S57E, S59R	L1	Deletion of 17 bp at codon 69 (nt 207)
W362 ^d (1)	R	R	66	D43N, S57E, S59R, Q67STOP ^e	L1	–
W361, W382, Ps14, Ps16, Ps17, Ps20, Ps31, Ps44, Ps45, Ps46 (10)	R	R	141	D43N, S57E, S59R, Q142STOP ^e	L1	–
Ps9 (1)	R	R	220	D43N, S57E, S59R, S221STOP ^e	L1, L4	Deletion of 22 bp at codon 180 (nt 540)
W377 (1)	R	R	327	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K	L1, L4	Deletion of 52 bp at codon 234 (nt 702)
Ps15 (1)	R	R	276	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, W277STOP ^e	L1, L4, L5	–
Ps13, Ps22 (2)	R	R, I	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L	L1, L4, L5, L6, L7	Loop L7-short ^f
W370, Ps42 (2)	R	R, I	>443	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L	L1, L4, L5, L6, L7	Loop L7-short ^f
W339 (1)	R	R	253	S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K	L1, L2, L3, L4	Insertion of 1 bp (G) at codon 236 (nt 708)
W380 (1)	R	R	218	T103S, K115T	L2	Insertion of 1 bp (A) at codon 165 (nt 495)
Ps8 (1)	R	I	276	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, W277STOP ^e	L2, L3	–
Ps25, Ps50 (2)	R	R	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G	L2, L3, L6	–
W355 (1)	R	R	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G325A	L2, L3, L6	–
W367, W383 (2)	R	I, R	>443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G	L2, L3, L6	Insertion of 1 bp (C) at codon 402 (nt 1206)
Ps34, Ps41, Ps62, Ps82 (4)	R	R	223	V127L, L224STOP ^e	L2, L4	Non detected stop codon
Ps21 ^d (1)	I	R	>443	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, S403A, Q424E	L2, L3, L4, L5, L6, L8	Deletion of 13 bp at codon 155 (nt 464)
Ps30 (1)	R	R	–	M11	–	Loop L7-short ^f
Ps33 ^{d,g} (1)	R	I	–	–	–	Non detected stop codon
W332, W354, W369, Ps19, Ps23 (5)	R	R, I	NA ^a	–	–	OprD is truncated by new IS (ISPa45)

MBL-producing strains (n = 43)	R	R	66	Q67STOP ^e	None	–
W326, W336 ^d , W343, W344, W346, W350, W352, W353, W360, W365, W371, W378, W379, Ps27, Ps40, Ps60, Ps79 (17)	R	R	66	Q67STOP ^e	None	–
W330, W333, W345, W363, W374, Ps24, Ps56, Ps57, Ps59, Ps68, Ps61 ^{dh} (11)	R	R	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L	L1, L4, L5, L6, L7	Loop L7-short ^f
Ps12, Ps29 (2)	R	R	443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, MIT	L2, L3, L6	–
Ps32 ^d , Ps38, Ps52, Ps55, Ps58, Ps64, Ps78, W334 ^e , W335, W376, W381 (11)	R	R	–	–	–	–
W340 ^{dh} (1)	R	R	60	D43N	–	Insertion of 1 bp (G) at codon 57 (nt 169)
W368 ^{dh} (1)	R	R	–	–	–	OprD is truncated by ISPpu21

^a Abbreviations: IPM: imipenem; MEM: meropenem; NA: None amplicon was obtained in PCR; R: resistant phenotype; I: intermediate phenotype; S: susceptible phenotype.

^b The substitutions were determined by comparison with the sequence of *P. aeruginosa* PAO1 control strain (GenBank accession number AE004091) that encodes a protein of 443 amino acids (aa).

^c The putative loops in protein OprD previously reported by Huang et al. (1995) and Epp et al. (2001).

^d The SDS-PAGE analysis showed that the OprD proteins of these strains were not detected in the gel.

^e Premature stop codon.

^f Shortening of putative Loop L7 previously reported by Epp et al. (2001).

^g GenBank accession number: JX440361.

^h ISPpu21 is located upstream of protein OprD.

ⁱ GenBank accession number: JX440360.

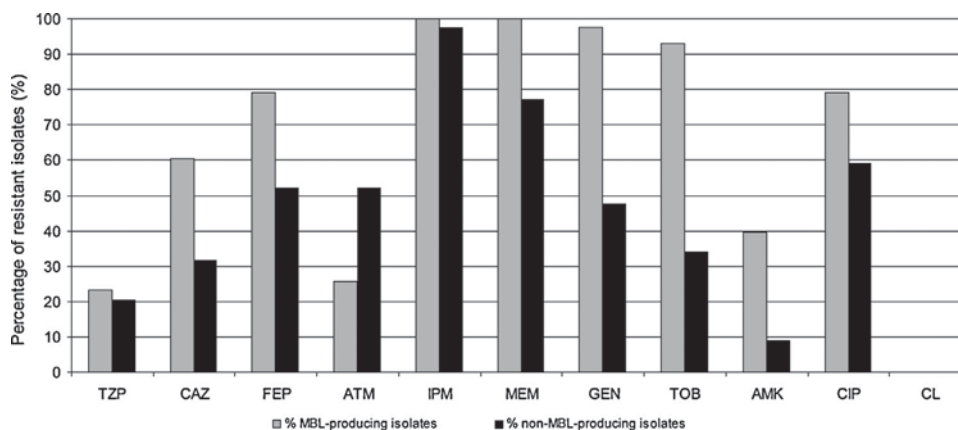


Fig. 1. Percentages of resistance to different antibiotics in 87 CRPA strains. Abbreviations: TZP: piperacillin-tazobactam, CAZ: ceftazidime, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IPM: imipenem, MEM: meropenem, GEN: gentamicin, TOB: tobramycin, AMK: amikacin, CIP: ciprofloxacin, CL: colistin.

this work and included in GenBank database with the accession number JX440361. In addition, the *oprD* gene of W368 strain was truncated by *ISPpu21*, and this genetic sequence was included into GenBank database with the accession number JX440360. Unexpectedly, *ISPpu21* was located upstream of *oprD* gene in W340 and Ps61 strains, but the *OprD* coding sequence was not affected by this genetic element (Table 2).

A total of 10 *P. aeruginosa* strains (Ps28, W362, Ps21, Ps33, W336, Ps61, Ps32, W334, W340 and W368) with different protein *OprD* profiles were selected to study their outer membrane proteins by SDS-PAGE. None of them showed a band corresponding to the porin *OprD* (Figure 2 supplementary material).

Characterization of integron structure and sequence type

Class 1 integrons were detected in 65 of the 87 studied CRPA strains (75%), but none of them carried class 2 integrons (Table 3). Twelve genetic arrangements of class 1 integron were detected in both MBL and non-MBL-producing strains (Fig. 2). More than one integron per strain were detected in 32 of 65 CRPA strains (49.2%). All the 43 MBL-positive strains contained the *bla_{VIM-2}* gene inside class 1 integrons (Fig. 2, structures I, J, K and L). In four strains, the *bla_{VIM-2}* gene was associated with gene cassettes related to resistance to aminoglycosides (Table 3).

The most prevalent class 1 integrons among the 65 strains were the *bla_{VIM-2}* array (61.5%), and also the new gene cassette arrangement, *aac(3)-Ia+ISPa34+aadA1* (23.1%). This new class 1 integron (Fig. 2, structure E) was submitted to INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>) and GenBank databases, and the name In661 and the accession number JF265065 were assigned.

The 65 CRPA strains harboured class 1 integrons whose variable regions were composed of gene cassettes involved in resistance to aminoglycosides (*aadB*, *aadA1*, *aadA6*, *aadA7*, *aac(3)-Ia* and *aac(6')-Ib'*) and to beta-lactams (*bla_{VIM-2}*, *bla_{OXA-46}*). The insertion sequence *ISPa34* was detected in four class 1 integron arrangements (including the new integron In661) of 16 strains as Fig. 2 and Table 3 shown. The genetic structures of class 1 integron called B, C, and G were only found among the non-MBL-producing strains, and a greater variety of arrangements were only found among the MBL-producing strains (F, H, I, J, K, and L) (Table 3). Considering the Pc promoter studies, an association was observed between the type of promoter and the first gene cassette detected downstream of the integrase gene in each arrangement. The PcW was observed linked to the *aadA7* gene cassette; the Pch1 with *aadB*, *aadA6*, and *bla_{VIM-2}*; and the Pch2 promoter with the *aac(3)-Ia* gene cassette. The exception was the *aac(6')-Ib'* gene cassette that was linked to different promoters depending on the array where was detected, i.e. Pch1 in

aac(6')-Ib'+bla_{OXA-46}; Pch2 in *aac(6')-Ib'+bla_{VIM-2}*; and PcS in the *aac(6')-Ib'+orfD* arrangement.

The sequence types (ST) were determined among the 65 integron-positive strains, and the diversity found was as follows (number of strains): ST235 (36), ST973 (12), ST175 (11), ST111 (5), and ST253 (1) (Table 3).

Twelve of the 43 MBL-producing strains belonged to ST973 and the *bla_{VIM-2}* was the unique gene cassette found into a class 1 integron. Other STs related to the *bla_{VIM-2}* gene were ST235 and ST175 (Table 3). It is interesting to remark that the lineage ST235 was identified in 36 strains (55.4%), 30 of them MBL-producers containing several class 1 integrons. On the other hand, the *aadB* array was contained in 17% of CRPA strains and all of them belonged to ST175. The ST111 was found only in non-MBL-producing strains ($n=5$), and three of them had the arrangement called E and two the arrangement G (Table 3).

Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences obtained in this study have been deposited in the GenBank database with the numbers: JF265065, JX440360, and JX440361.

Discussion

The prevalence of CRPA isolates has increased in Spain from 13.8% in 2008 to 17.8% in 2010 (<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/database.as>). However, the CRPA frequency in the studied hospital was 12.8% in the period 2008–2010, being lower than the upward trend (23%) observed in a Spanish multicenter study (Peña et al., 2012). The high percentage of co-resistance to carbapenems and aminoglycosides is relevant among the studied CRPA, highlighting the percentage of resistance to amikacin (24.1%) that was higher than other previous studies (Peña et al., 2012; Sardelic et al., 2012).

In our study, 49.4% of CRPA strains showed a MBL phenotype associated with the presence of the *bla_{VIM-2}* gene. Most of CRPA-carrying patients were hospitalised in ICU settings, presented different underlying diseases, previously received carbapenems or other beta-lactam antibiotics and, exhibited risk factors for the acquisition of *P. aeruginosa* isolates, similar to previous studies (Tsakris et al., 2009; Peña et al., 2012). The non clonal population structure was demonstrated by PFGE among the CRPA strains (64 unrelated PFGE patterns among the 80 patients) which suggest that the emergence of this resistance phenotype is not the result of an epidemic outbreak. One PFGE-pattern was detected in MBL-producing strains of 7 patients suggesting that in some

Table 3
Characterization of class 1 integrons detected in the 65 CRPA, and molecular typing of strains by MLST.

	Integron-positive strains (Number of strains)	MLST	Promoter variant	Genetic structure of class 1 integron ^a		
Non-MBL-producing strains (n = 22)	W361, W382, Ps14, Ps16, Ps17, Ps20, Ps31, Ps44, Ps45, Ps46 (10)	ST175	PcH1	<i>aadB</i>	A	
	W355 (1)	ST253	PcW	<i>aadA7</i>	B	
	Ps50 (1)	ST235	PcH1	<i>aadA6+orfD</i>	C	
	W342, W351, W367 (3)	ST235	PcH1	<i>aadA6+orfD</i>	C	
	Ps28, Ps30 (2)	ST235	PcH2	<i>aac(3)-Ia+aadA1</i>	D	
	Ps34, Ps62, Ps41 (3)	ST111	PcH2	<i>aac(3)-Ia+aadA1</i>	D	
	W354, Ps82 (2)	ST111	PcH1	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA1^b</i> <i>aac(6')-Ib+bla_{OXA-46}</i>	E	
					G	
	MBL-producing strains (n = 43)	W330, W333, W340, W345, W363, W368, W374, Ps24, Ps57, Ps59, Ps61, Ps68 (12) Ps12, Ps29 (2)	ST973	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	J
		W335, W344, W352, W353, W376, W381, Ps32, Ps38, Ps40, Ps52, Ps55, Ps58, Ps64, Ps78 (14)	ST235	PcH2	<i>aac(6')-Ib+bla_{VIM-2}</i>	I
		W326, W334, W346, W350, W360, W365, W371, W379, Ps27, Ps79 (10)	ST235	PcH2	<i>aac(3)-Ia+aadA1</i>	D
		W343 (1)	ST235	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	J
		Ps56 (1)	ST235	PcH2	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA1^b</i>	E
		Ps60 (1)	ST175	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	J
W378 (1)		ST235	PcS	<i>aac(3)-Ia+aadA1+ISPa34</i>	F	
W336 (1)		ST235	PcH1	<i>aadB</i>	J	
		ST235	PcH1	<i>aac(6')-Ib+orfD</i>	A	
		ST235	PcH1	<i>aac(6')-Ib+orfD</i>	H	
	ST235	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	J		
	ST235	PcH2	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA1^b</i>	J		
	ST235	PcH2	<i>bla_{VIM-2}+aac(6')-Ib'+aadA1+ISPa34+ND</i>	E		
	ST235	PcH2	<i>aac(3)-Ia+ISPa34+aadA1^b</i>	K		
	ST235	PcH1	<i>bla_{VIM-2}</i>	E		
	ST235	PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aac(6')-Ib'+aadA1+ISPa34+bla_{VIM-2}</i>	J		
	ST235	PcH1	<i>bla_{VIM-2}+aac(6')-Ib'+aadA1+ISPa34+bla_{VIM-2}</i>	L		

ND: Non determined.

^a The letter of integron structure corresponds to the ones shown in Fig. 2.

^b GenBank accession number: JF265065.

Structure of class 1 integron (N° of strains)

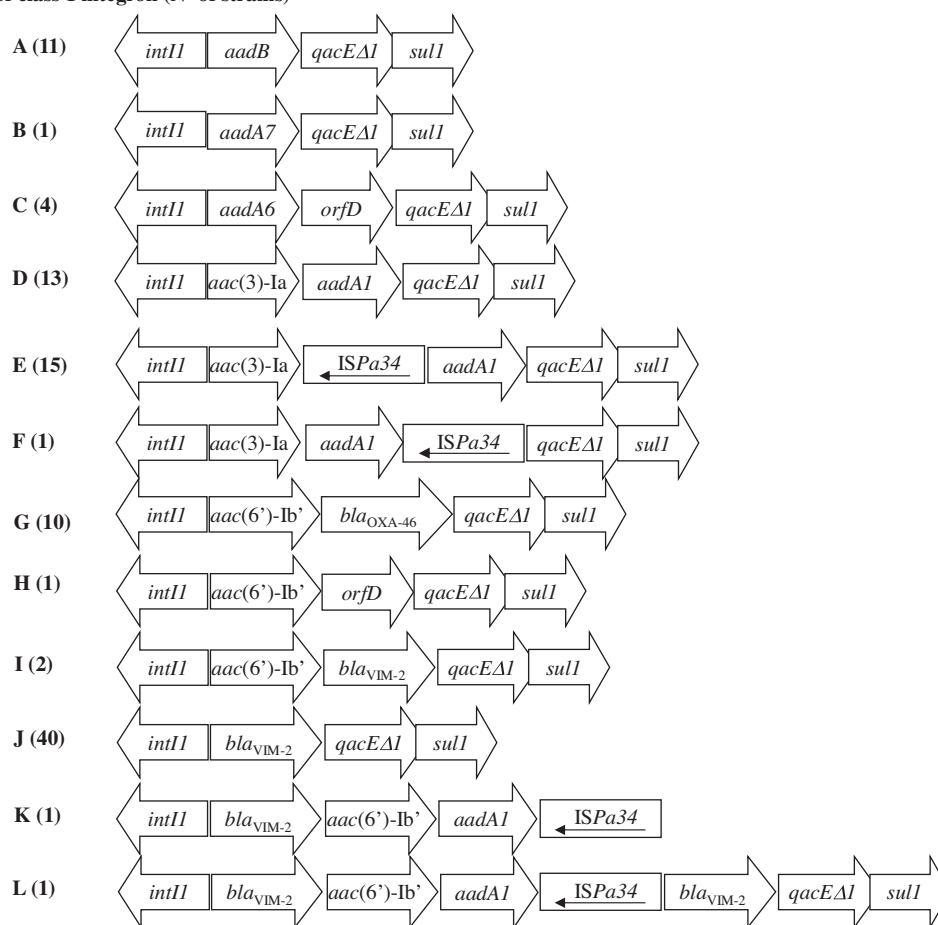


Fig. 2. Diversity of class 1 integron arrangements found among CRPA strains.

cases a clonal dissemination was also a way of dispersion of VIM-2-producing strains, as observed in other studies (Tsakris et al., 2009).

Our work shows that 9.2% of the CRPA strains contained different amino acid changes in loops L2, L3 and L6 of porin OprD. It is noteworthy that these substitutions were found in long loops, since the loops L2 and L3 have been proposed to be implicated in specific binding to imipenem and basic amino acids (Huang et al., 1995; Huang and Hancock, 1996; Ochs et al., 2000). The most frequent amino acid changes found in our strains in loop L2 (T103S, K115T and V127L), loop L3 (F170L, E185Q, P186G, and V189T), and loop L6 (R310E and A315G) were previously described in other studies (El Amin et al., 2005; Gutiérrez et al., 2007; Farra et al., 2008; Hammami et al., 2009; Wang et al., 2010; Ocampo-Sosa et al., 2012). Some mutations in loop L2 and L3 of OprD in our CRPA strains have been also described in clinical carbapenem-susceptible *P. aeruginosa* isolates (Ocampo-Sosa et al., 2012). Hence it could be assumed that other mechanisms are involved in resistance of our isolates.

Furthermore, amino acid changes in the loops L1, L4, L5, L6 and L7 were found. Four non-MBL-producing isolates and 11 MBL-producing isolates (18.3%) contained the same changes in protein OprD (D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, and loop L7-short). In the same way, some of these amino acid changes had been shown by other authors, both in carbapenem-susceptible and -resistant strains (El Amin et al., 2005; Farra et al., 2008; Hammami et al., 2009; Wang et al., 2010; Ocampo-Sosa et al., 2012).

The loop L7-short previously reported by Epp et al. (2001), was described in 5 non-MBL-producing and 11 MBL-producing

isolates. Although this OprD protein is short (441 amino acids), the porin channel is sufficiently opened to allow optimal penetration of meropenem (Epp et al., 2001). Nevertheless, a direct correlation between carbapenem resistance and OprD substitutions was not observed in our study, with the exception of the presence of M1T substitutions, premature stop codons or truncations of *oprD* by IS inclusions. In this sense, 57.3% of CRPA isolates had its protein OprD affected, producing a premature stop codon with OprD inactivation, as was demonstrated by SDS-PAGE analysis in some selected strains (Ps28, W362, W336, W340), or as it was also observed in previous studies (Gutiérrez et al., 2007; Rodríguez-Martínez et al., 2009).

The report of Wolter et al. (2004) was the first description of the inactivation of *oprD* gene expression by insertion sequence elements, such as ISPa1328 and ISPa1635, leading to an increase in carbapenem resistance. In our study, the *oprD* gene of *P. aeruginosa* strain Ps33 was truncated by the new ISPa45, and the *oprD* gene of W368 strain was truncated by ISPpu21. None of both strains showed an OprD band in the SDS-PAGE gels. This fact demonstrates that these insertion sequences are the cause of the carbapenem resistance phenotype in these strains for a reduction in the transcriptional expression of *oprD* gene or its inactivation, as was also caused by ISPa26, ISPst12, ISPa27 and ISPa133 in other studies (Evans and Segal, 2007; Gutiérrez et al., 2007; Rodríguez-Martínez et al., 2009; Ruiz-Martínez et al., 2011). Insertion sequences can also produce a disruption of the *oprD* gene promoter region as occurs in W340 and Ps61 strains in which ISPpu21 was located upstream of *oprD* gene.

Most of our VIM-2 producing CRPA strains were ascribed to ST235, similar as data reported in other countries (Woodford et al.,

2011), although in Spain, this lineage has been associated with strains harbouring *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-5}, and *bla*_{VIM-13} genes (Viedma et al., 2009; Juan et al., 2010). To the best of our knowledge it is the first description of VIM-2 producing strains belonging to ST235 in Spain. Seventeen per cent of our CRPA strains were ascribed to lineage ST175. The clone ST175 is considered as a high risk epidemic clone, and has been well disseminated among multiresistant *P. aeruginosa* isolates in 10 of 16 Spanish hospitals in previous studies (García-Castillo et al., 2011; Viedma et al., 2012).

Class 1 integrons were detected in 75% of our CRPA strains, whose variable region harboured resistance gene cassettes to aminoglycoside and beta-lactam, including the *bla*_{VIM-2} gene in MBL-producing strains as gene cassette, as previously described by other authors in *P. aeruginosa* (Corvec et al., 2008; Patzer et al., 2009; Juan et al., 2010; Samuelson et al., 2010; Rojo-Bezares et al., 2011). On the contrary, in *Enterobacteriaceae* the cassette arrays revealed a predominance of gene cassettes that confer resistance to the beta-lactams, trimethoprim, chloramphenicol, rifampin and aminoglycosides (Partridge et al., 2009). The *aadB* gene cassette was contained in our *P. aeruginosa* strains which belonged to ST175, previously described by Nemeč et al. (2010). The insertion sequence ISPa34 was detected in different genetic structures of class 1 integrons in strains of lineages ST235 and ST111, but it was not detected in strains of lineage ST973 as had been previously reported by our group (Rojo-Bezares et al., 2011). As well, a new gene cassette arrangement of class 1 integron, called In661, which harboured the ISPa34 was identified in this study.

In summary, a high prevalence of MBL-producing *P. aeruginosa* strains has been found among clinical multiresistant CRPA in the studied hospital. The dissemination of *bla*_{VIM-2} gene through elements, such as class 1 integrons, which also included other resistance genes to beta-lactams and aminoglycosides, is a cause of great concern. These mobilizable elements constitute an effective way of spreading multiple antibiotic resistances. The alteration of the protein OprD associated with the presence of insertions, deletions and/or premature terminations in the sequence of *oprD* gene was also detected in our strains. A high polymorphism has been identified in the *oprD* gene in our clinical CRPA strains, which could be implicated in the variable susceptibility of *P. aeruginosa* strains to carbapenems.

Acknowledgments

We thank Patricia Siguier for analysing the ISPa45 sequence (<http://www-is.biotoul.fr/>).

V. Estepa has a pre-doctoral fellowship from the Universidad de La Rioja, Spain (grant number FPI-UR-09/16599009). M. de Toro has a pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, Spain (grant number FI08/00506). S. Somalo has a contract associated with project SAF2009-08570. This work was partially supported by Instituto de Salud Carlos III of Spain (FIS PI12/01276), by project SAF2012-35474 of the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and FEDER, and by Departamento de Ciencia, Tecnología and Universidad del Gobierno de Aragón, Spain (Project DGA-FSE/Grupos consolidados, B24-211130).

Part of this study was presented at the 20th ECCMID Congress (Vienna, Austria, 10–13 April 2010) and XVI SEIMC Congress (Bilbao, Spain, 9–11 May 2012).

Appendix A. Supplementary data

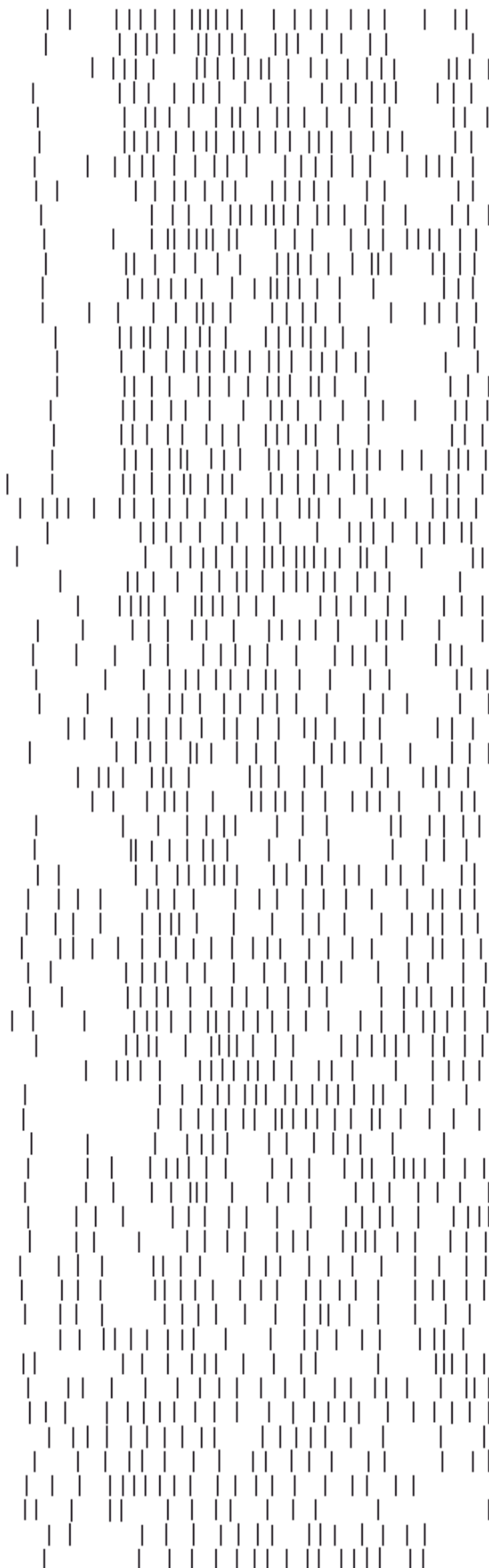
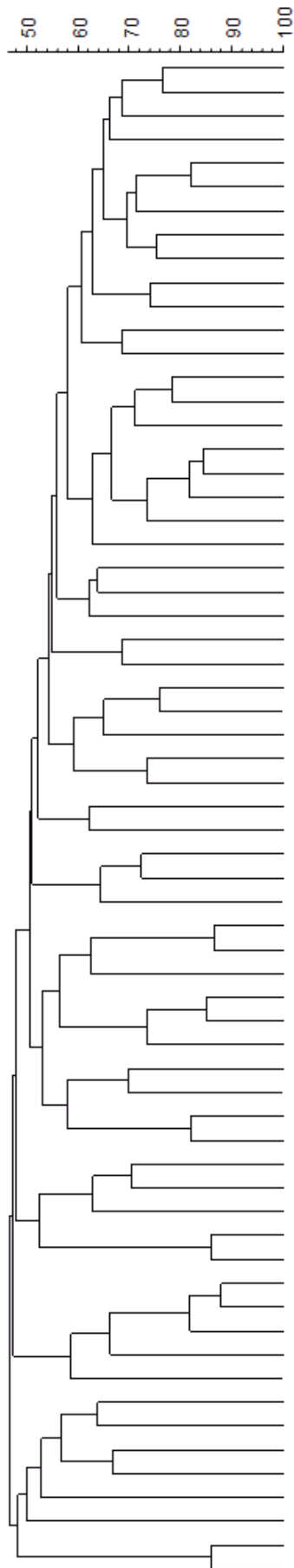
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.01.001>.

References

- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second International Supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., Rossolini, G.M., 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis.* 11, 381–393.
- Corvec, S., Poirel, L., Espaze, E., Giraudeau, C., Drugeon, H., Nordmann, P., 2008. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J. Hosp. Infect.* 68, 73–82.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., Dowson, C.G., 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5644–5649.
- El Amin, N., Giske, C.G., Jalal, S., Keijsers, B., Kronvall, G., Wretling, B., 2005. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS* 113, 187–196.
- Ellington, M.J., Kistler, J., Livermore, D.M., Woodford, N., 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 321–322.
- Epp, S.F., Köhler, T., Plésiat, P., Michéa-Hamzehpour, M., Frey, J., Pechère, J.C., 2001. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1780–1787.
- Evans, J.C., Segal, H., 2007. A novel insertion sequence, ISPa26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3776–3777.
- Farra, A., Islam, S., Strålfors, A., Sörberg, M., Wretling, B., 2008. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 427–433.
- García-Castillo, M., Del Campo, R., Morosini, M.I., Riera, E., Cabot, G., Willems, R., van Mansfeld, R., Oliver, A., Cantón, R., 2011. Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2905–2910.
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Pérez, J.L., Oliver, A., 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4329–4335.
- Hammami, S., Ghozzi, R., Burghoffer, B., Arlet, G., Redjeb, S., 2009. Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathol. Biol. (Paris)* 57, 530–555.
- Huang, H., Hancock, R.E., 1996. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 178, 3085–3090.
- Huang, H., Jeantun, D., Pattus, F., Hancock, R.E., 1995. Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol. Microbiol.* 16, 931–941.
- Juan, C., Zamorano, L., Mena, A., Albertí, S., Pérez, J.L., Oliver, A., 2010. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 474–478.
- Lee, K., Chong, Y., Shin, H.B., Kim, Y.A., Yong, D., Yum, J.H., 2001. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 88–91.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., Hanson, N.D., 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610.
- Nemeč, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Musilek, M., 2010. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res. Microbiol.* 161, 234–242.
- Ocampo-Sosa, A.A., Cabot, G., Rodríguez, C., Roman, E., Tubau, F., Macia, M.D., Moya, B., Zamorano, L., Suárez, C., Peña, C., Domínguez, M.A., Moncalián, G., Oliver, A., Martínez-Martínez, L., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), 2012. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1703–1713.
- Ochs, M.M., Bains, M., Hancock, R.E., 2000. Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1983–1985.
- Oikonomou, O., Panopoulou, M., Ikonomidis, A., 2011. Investigation of carbapenem heteroresistance among different sequence types of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates reveals further diversity. *J. Med. Microbiol.* 60, 1556–1558.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 757–784.
- Paterson, D.L., 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43 (Suppl 2), S43–S48.
- Patzer, J.A., Walsh, T.R., Weeks, J., Dzierzanowska, D., Toleman, M.A., 2009. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998–2006. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 269–273.
- Peña, C., Suarez, C., Gozalo, M., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Rodríguez, F., Tubau, F., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., REIPI Spanish Network for Research in Infectious Diseases, 2012. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem

- resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1265–1272.
- Poole, K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* 2, 65.
- Pournaras, S., Ikonomidis, A., Markogiannakis, A., Spanakis, N., Maniatis, A.N., Tsakris, A., 2007. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *J. Med. Microbiol.* 56, 66–70.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Poirel, L., Nordmann, P., 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4783–4788.
- Rojo-Bezares, B., Estepa, V., de Toro, M., Undabeitia, E., Olarte, I., Torres, C., Sáenz, Y., 2011. A novel class 1 integron array carrying *bla_{VIM-2}* genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital. *J. Med. Microbiol.* 60, 1053–1054.
- Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., d'Ostuni, V., Fusté, E., Vinuesa, T., Viñas, M., 2011. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Microbiol.* 14, 51–58.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C., 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3996–4001.
- Samuelsen, O., Toleman, M.A., Sundsfjord, A., Rydberg, J., Leegaard, T.M., Walder, M., Lia, A., Ranheim, T.E., Rajendra, Y., Hermansen, N.O., Walsh, T.R., Giske, C.G., 2010. 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.* 54, 346–352.
- Sardelic, S., Bedenic, B., Colinon-Dupuich, C., Orhanovic, S., Bosnjak, Z., Plecko, V., Cournoyer, B., Rossolini, G.M., 2012. Infrequent finding of metallo-β-lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2746–2749.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Tsakris, A., Poulou, A., Kristo, I., Pittaras, T., Spanakis, N., Pournaras, S., Markou, F., 2009. Large dissemination of VIM-2-metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3524–3529.
- Viedma, E., Juan, C., Acosta, J., Zamorano, L., Otero, J.R., Sanz, F., Chaves, F., Oliver, A., 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4930–4933.
- Viedma, E., Juan, C., Villa, J., Barrado, L., Orellana, M.A., Sanz, F., Otero, J.R., Oliver, A., Chaves, F., 2012. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1235–1241.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P., 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 306–325.
- Wang, J., Zhou, J.Y., Qu, T.T., Shen, P., Wei, Z.Q., Yu, Y.S., Li, L.J., 2010. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 486–491.
- Wolter, D.J., Hanson, N.D., Lister, P.D., 2004. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 137–143.
- Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M., 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 736–755.

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]



Strain	Sequence Type	MBL	Integron
W370		N	N
W365	ST235	Y	Y
W369		N	N
Ps23		N	N
W353	ST235	Y	Y
Ps30	ST235	N	Y
W339		N	N
Ps29	ST235	Y	Y
Ps32	ST235	Y	Y
W362		N	N
W336	ST235	Y	Y
Ps60	ST235	Y	Y
Ps9		N	N
W367	ST235	N	Y
W378	ST235	Y	Y
Ps50	ST235	N	Y
W326	ST235	Y	Y
W346	ST235	Y	Y
Ps27	ST235	Y	Y
Ps40	ST235	Y	Y
W330	ST973	Y	Y
W342	ST235	N	Y
W335	ST235	Y	Y
W360	ST235	Y	Y
Ps41	ST111	N	Y
Ps13		N	N
W341		N	N
Ps33		N	N
Ps58	ST235	Y	Y
W383		N	N
Ps34	ST111	N	Y
W380		N	N
Ps19		N	N
Ps8		N	N
Ps18		N	N
Ps12	ST235	Y	Y
Ps57	ST973	Y	Y
Ps24	ST973	Y	Y
W333	ST973	Y	Y
W382	ST175	N	Y
Ps56	ST175	Y	Y
Ps28	ST235	N	Y
W354	ST111	N	Y
W355	ST253	N	Y
W381	ST235	Y	Y
W376	ST235	Y	Y
W356		N	N
Ps42		N	N
Ps15		N	N
W368	ST973	Y	Y
W374	ST973	Y	Y
Ps59	ST973	Y	Y
Ps61	ST973	Y	Y
Ps68	ST973	Y	Y
W332		N	N
Ps21		N	N
W340	ST973	Y	Y
Ps31	ST175	N	Y
W377		N	N
Ps25		N	N
Ps14	ST175	N	Y
Ps22		N	N
W343	ST235	Y	Y
W344	ST235	Y	Y

Figure 1 Supplementary material. Dendrogram of the 64 different PFGE patterns detected among the 123 CRPA strains. The molecular typing data, and the presence or absence of MBL enzymes and integrons has also been included. Abbreviations: MBL: metallo-beta-lactamase, Y: yes, N: no.

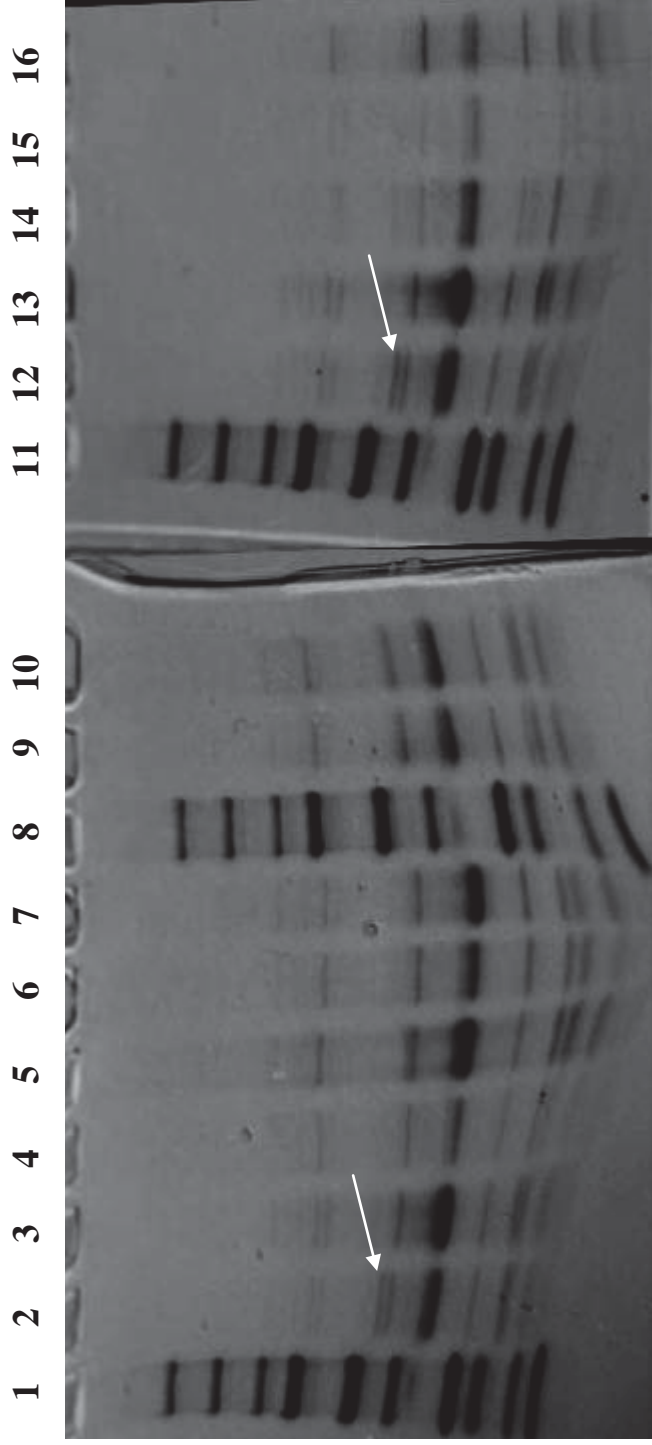


Figure 2 Supplementary material. SDS-PAGE gels with the outer membrane protein profiles of ten selected CRPA strains. Lane 1, 8 and 11, molecular weight marker (Precision plus protein dual colour standards, BioRad); lanes 2 and 12: *P. aeruginosa* PAO1 control strain; lanes 3 and 13: W362 strain; lane 4: Ps32; lane5: Ps61; lane 6: W334; lane 7: W336; lane 9: W340; lane 10: W368; lane 14: Ps21; lane 15: Ps28; lane 16: Ps33. The arrows indicate the OprD band.

Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: antimicrobial susceptibility and global genetic lineages

Vanesa Estepa¹, Beatriz Rojo-Bezares², Carmen Torres^{1,2} & Yolanda Sáenz²

¹Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain; and ²Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

Correspondence: Yolanda Sáenz, Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/ Piqueras 98, 3ª planta, 26006, Logroño, Spain. Tel.: +34 941278868; fax: +34 941278887; e-mail: ysaenz@riojasalud.es

Received 18 December 2013; revised 30 January 2014; accepted 5 February 2014. Final version published online 10 March 2014.

DOI: 10.1111/1574-6941.12301

Editor: Julian Marchesi

Keywords

MLST; PFGE; integron; antimicrobial agents.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunist pathogen responsible for worldwide nosocomial infections (Lister *et al.*, 2009), but it is also frequently detected in a wide range of terrestrial and aquatic environments, due to its ability to use a variety of metabolic compounds to grow up. *Pseudomonas aeruginosa* presents high intrinsic resistance to several antibiotics and also has extraordinary capacity to acquire new resistance mechanisms through chromosomal mutations or by horizontal transfer, for this reason it is very difficult to find therapeutic alternatives (Lister *et al.*, 2009; Strateva & Yordanov, 2009). Additionally, certain multidrug-resistant (MDR) epidemiological clones have been globally distributed (Woodford *et al.*, 2011; Cabot *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2012). Molecular typing is a tool that has been used to assess the local outbreaks or to understand the epidemiology of infections or the population genetic background. But, in contrast to the extensive researches on *P. aeruginosa* in the hospital environment, there are very few studies about molecular

Abstract

The aim of this study was to analyse the *Pseudomonas aeruginosa* faecal carriage rate in 98 healthy humans and to perform the phenotypic and genotypic characterization of recovered isolates. The genetic relatedness among the isolates was analysed by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing that was compared with worldwide epidemic clones. *Pseudomonas aeruginosa* was isolated from eight healthy individuals (8.2%), and two of them remained colonized after 5 months (in one case by the same clone). All 10 isolates (one/sample) were susceptible to 14 tested antipseudomonal agents and lacked integron structures. Six pulsed-field gel electrophoresis patterns and six sequence types (ST245, ST253, ST254, ST274, ST663 and the new one, ST1059) were identified among them. Four groups of OprD alterations were detected based on mutations and deletions related to PAO1 reference strain in our carbapenem-susceptible strains. This is the first study focused on *P. aeruginosa* from faecal samples of healthy humans that provides additional insights into the antimicrobial resistance and genetic diversity of *P. aeruginosa*. Although the isolates were antimicrobial susceptible, most of the sequence types detected were genetically related to Spanish epidemic clones or globally spread sequence types, such as ST274 and ST253.

characterization of *P. aeruginosa* from healthy individuals (Lister *et al.*, 2009; Kerckhoffs *et al.*, 2011), and even absent related to antibiotic resistance or clonal diversity. The aim of this study was to analyse the occurrence of *P. aeruginosa* in faecal samples of healthy humans as well as to characterize the antibiotic susceptibility phenotype, the protein OprD polymorphism and the genetic lineages of the recovered isolates to compare with worldwide epidemic clones.

Materials and methods

From September 2010 to January 2011, a total of 98 faecal samples from healthy human volunteers (age range from 9 days to 86 years, and belonging to 75 families) were recovered in La Rioja, region of the northern Spain (Table S1 in Supporting information). All individuals (or their guardians) gave their consent to participate in the study, and none of them had received antibiotic treatment in the three months previous to sampling. A dry and sterile swab was given to each individual to obtain a

certain amount of faecal material from the interior of the stool sample and to send the sample to the laboratory. The faecal samples were immediately processed or stored at 4 °C during 24 h before processing. Swabs of faecal samples were suspended in saline solution (0.9% NaCl) and after enrichment in peptone water (1:20 v/v), a 100 µL aliquot was streaked onto cetrinide agar plates (Remel, Lenexa, KS). After incubation at 37 °C during 24 h, one colony per sample with *P. aeruginosa* morphology was selected, identified by classical biochemical methods (Gram stain, Triple Sugar Iron, catalase and oxidase reactions) and confirmed by PCR amplification of 16S rRNA gene fragment and subsequent sequencing (Table S2).

The clonal relationship among the *P. aeruginosa* isolates recovered was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *SpeI* enzyme to digest genomic DNA. Bacterial DNA embedded in agarose plugs were prepared as previously described (Kaufmann, 1998). The PFGE conditions used were two ramps at 6 V cm⁻², at 14 °C and with pulse time ranging from 5 to 15 s during 10 h and from 15 to 45 s during other 10 h. DNA profiles were analysed by the BioNumerics software 2.0 (Applied Maths, Belgium) using the Dice coefficient with tolerance of 1.1%. Multilocus sequence typing (MLST) was performed by PCR and bidirectional sequencing of seven housekeeping genes according to the *P. aeruginosa* PubMLST website database recommendations (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>; Curran *et al.*, 2004).

Susceptibility testing to 14 antipseudomonal agents (ticarcillin, piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem (IPM), meropenem (MEM), doripenem (DOR), gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin and colistin) was performed by the disc diffusion method following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Minimum inhibitory concentration (MIC) of IPM and MEM was detected by dilution agar method (CLSI, 2013) and MIC of DOR by E-test (manufacturer's recommendations). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 was used as a control strain.

The presence of integrons was studied in all *P. aeruginosa* isolates, amplifying the *intI1*, *intI2*, *intI3* and *qacEΔ1-sulI* genes by PCR (Table S2). Moreover, mutations in *oprD* gene were analysed by PCR (Table S2), sequencing and comparison with porin OprD of *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank accession no. AE004091). Positive controls from the collection of the University of La Rioja were included in all PCR assays.

Results and discussion

Pseudomonas aeruginosa isolates were detected in eight of the 98 faecal samples tested (8.2%), which is an

occurrence within the range previously reported in healthy individuals (2.6–24%) (Lister *et al.*, 2009; Kerkhoffs *et al.*, 2011). Five different PFGE patterns (Fig. 1) and five sequence types (ST245, ST253, ST254, ST274, ST1059) were obtained (Table 1). Two isolates recovered from two family-related volunteers showed an indistinguishable PFGE pattern and a same new ST due to a new alleles combination (*acsA17*, *aroE5*, *guaA37*, *mutL62*, *nuoD1*, *ppsA7*, *trpE25*) that was annotated in the MLST database as ST1059 (Table 1 and Fig. 1).

All eight isolates were susceptible to the 14 tested antipseudomonal agents, in contrast to the frequent reports of MDR *P. aeruginosa* isolated from clinical samples. *Pseudomonas aeruginosa* compromises the selection of appropriate antibiotics to treat them due to their great ability to develop MDR phenotypes, even during the course of treating an infection (Lister *et al.*, 2009; Woodford *et al.*, 2011). However, the obtained isolates in our work were still susceptible to the tested antibiotics, apparently due to they had not faced antibiotic pressure, and likely they were all from environmental sources.

Additionally, five months later, a new faecal sample was obtained and processed as above, from eight individuals that were *P. aeruginosa* positive in the first set of samples. Only two of the eight individuals remained positive for *P. aeruginosa* occurrence (individuals H27 and H97, Table 1). It is important to remark that in one case, the recovered isolate (Ps88-2) corresponded to the same clone and ST to the one initially recovered (PFGE6 and ST253). But in the other case, the isolate Ps4-2 belonged to a different PFGE and ST than the isolate Ps4-1, which could be interpreted as a case of recolonization with different bacteria. In the remaining six positive individuals, the absence of *P. aeruginosa* in the second sampling could reflect a transitory colonization by this microorganism.

Over the last years, the dissemination of *P. aeruginosa* high risk clones has played a major role in the spread of resistance worldwide (Woodford *et al.*, 2011). The MLST analysis permitted us to know the molecular typing of the healthy human isolates and compare them with those worldwide epidemic or environmental clones. More than 1600 STs are registered in *P. aeruginosa* PubMLST website (accessed 12 November 2013), and among the high risk clones disseminated in worldwide several hospitals, the ST235, ST111 and ST175 are the most widespread, normally associated with MDR, carbapenem-resistant strains and/or metallo-beta-lactamase producers (García-Castillo *et al.*, 2011; Cabot *et al.*, 2012), but none of our strains belonged to those STs. Regarding the diversity of STs detected among our susceptible isolates, the ST245, ST253, ST254 and ST274 are predicted founders of different BURST groups determined by 1070 STs eBURST analysis of the PubMLST database. The ST1059 is a

Table 1. Main characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from faecal healthy human samples and control strains (*P. aeruginosa* ATCC27853 and PAO1)

Individuals	Age	Sex	Strain	ST	OprD pattern* [†]	PFGE	MIC (mg L ⁻¹)		
							IPM	MEM	DOR
H18	25	Woman	Ps2	ST254	A	1	1	0.25	0.125
H27	58	Man	Ps4-1	ST274	A	2	4	2	0.38
H27	58	Man	Ps4-2 [‡]	ST663	A	3	4	0.5	0.19
H33 [§]	3	Man	Ps5	ST1059 [¶]	B	4	2	0.125	0.094
H34 [§]	33	Man	Ps6	ST1059 [¶]	B	4	4	0.25	0.094
H46	3	Woman	Ps76	ST245	C	5	4	1	0.75
H95	26	Man	Ps86	ST253	D	6	1	0.5	0.5
H96**	66	Man	Ps87	ST253	D	6	1	0.5	0.5
H97**	50	Woman	Ps88-1	ST253	D	6	2	1	0.38
H97**	50	Woman	Ps88-2 [‡]	ST253	D	6	1	1	0.5
—	—	—	ATCC27853	—	A	7	2	0.125	0.125
—	—	—	PAO1	—	Wild	8	1	0.5	—

*The porin OprD wild type was the OprD of *P. aeruginosa* PAO1 strain (GenBank accession no. AE004091).

[†]Mutations detected in each OprD pattern: group A: D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, loop L7-short (372VDS5SSSYAGL383); group B: V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, loop L7-short (372VDS5SSSYAGL383), S403A, Q424E; group C: T103S, K115T, F170L; group D: T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A.

[‡]This strain was obtained in a second sampling five months later.

[§]Individuals H33 and H34 live in the same house.

[¶]New allelic combination (*acsA17*, *aroE5*, *guaA37*, *mutL62*, *nuoD1*, *ppsA7*, *trpE25*).

**Individuals H96 and H97 live in the same house.

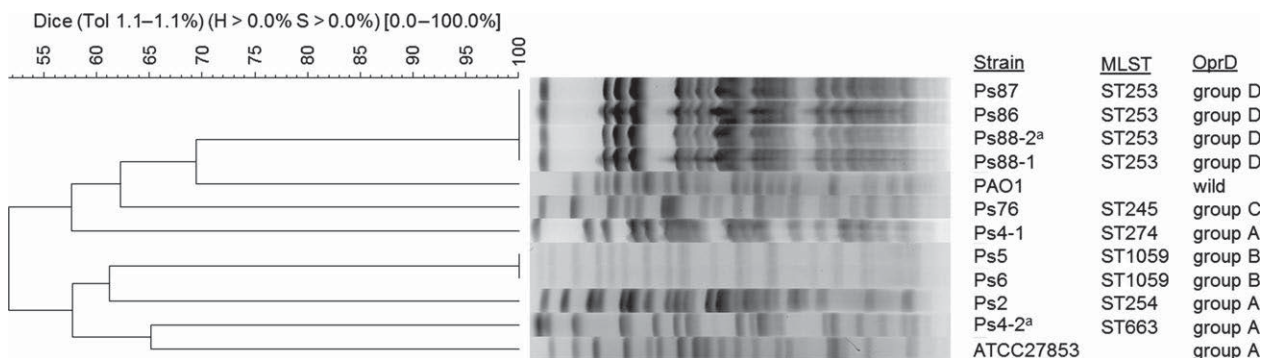


Fig. 1. Dendrogram of pulsed-field gel electrophoresis patterns in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. ^aThese strains were obtained in a second sampling five months later.

singleton, and the ST663 shares a BURST group with ST131 (Kidd *et al.*, 2012). The ST245, ST253, ST254 and ST274 were previously reported among carbapenem-susceptible *P. aeruginosa* isolates, but ST245, ST253 and ST274 also among carbapenem-resistant, even MDR ones (García-Castillo *et al.*, 2011; Woodford *et al.*, 2011; Cabot *et al.*, 2012). The ST274 and ST253 are associated with cystic fibrosis patients and multiple other ecological settings (Kidd *et al.*, 2012). Indeed, the ST274, previously described in patients from different European countries and Australia (PubMLST database), is a cystic fibrosis epidemic clone circulating in Spain (García-Castillo *et al.*, 2011; Cabot *et al.*, 2012; Fernández-Olmos *et al.*, 2013;

López-Causapé *et al.*, 2013). It is important to remark that the ST253 belongs to clonal complex PA14, previously had been detected in *P. aeruginosa* from animal, human (cystic fibrosis and other patients) and environmental samples (Wiehlmann *et al.*, 2007; Kidd *et al.*, 2012), was the most prevalent one in our study and the third one in a study performed in a public hospital in Spain (Gomila *et al.*, 2013). In both studies, non-MDR isolates were included.

Integron structures and MDR phenotype are frequently demonstrated among clinical isolates (Rojo-Bezares *et al.*, 2014); however, none of the 10 antimicrobial susceptible isolates contained integron structures, as reported in

other previous studies among environment *P. aeruginosa* isolates (Ruiz-Martínez et al., 2011).

On the other hand, OprD is a substrate-specific channel that serves as the entryway for most of small molecules as carbapenems (Wolter et al., 2004; Lister et al., 2009). The loss of porin OprD due to premature stop codons, 1-bp insertion/deletion and *oprD* disruption by insertion sequences confers carbapenem resistance in *P. aeruginosa* (Wolter et al., 2004; Lister et al., 2009; Rojo-Bezares et al., 2014). These alterations have not been observed in our study, but other some modifications were detected in the protein OprD of all 10 studied *P. aeruginosa* strains, even if they were susceptible or intermediate resistant to IPM (MICs range: 1–4 mg L⁻¹), MEM (MICs range: 0.125–2 mg L⁻¹) and DOR (MICs range: 0.094–0.75 mg L⁻¹). The OprD of our strains were classified into four groups (Table 1). The deletions of two amino acids in the loop L7 (called loop L7-short), found in OprD groups A and B (Table 1), were detected in half of our strains, but also in previously reported carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (Rodríguez-Martínez et al., 2009). Amino acid changes in groups A, C and D were previously reported in carbapenem-susceptible clinical *P. aeruginosa* isolates (Rodríguez-Martínez et al., 2009; Ocampo-Sosa et al., 2012). As other authors have previously reported (Ocampo-Sosa et al., 2012), all these alterations in protein OprD might not cause porin loss neither consequently carbapenem resistance levels.

To our knowledge, this is the first report in which the antimicrobial resistance, the molecular typing and the polymorphism in porin OprD of *P. aeruginosa* from healthy humans were analysed. Allelic variations were detected in our carbapenem-susceptible isolates (respect to PAO1 reference strain) that suggest they might not be implicated in carbapenem resistance. This study provides additional insights into the genetic diversity of *P. aeruginosa*, being most of the STs detected genetically related to Spanish epidemic clones or to globally spread STs, such as ST274 and ST253. However, further investigations are needed to better understand the *P. aeruginosa* relatedness, antimicrobial susceptibility characteristic and clonal dissemination among the clinical and other different environments.

Acknowledgements

Vanesa Estepa has a predoctoral fellowship from the Universidad de La Rioja, Spain (Grant Number FPI-UR-09/16599009). This work was partially supported by the Instituto de Salud Carlos III of Spain (project FIS PI12/01276) and by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (project SAF2012-35474) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Statement

Part of this study was presented at the XV SEIMC Congress (Abstract 699, Málaga, Spain, 1–4 June 2011).

References

- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA et al. (2012) Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 6349–6357.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-third Informational Supplement (M100-S23)*. National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T & Dowson CG (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **42**: 5644–5649.
- Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Alba JM, Morosini MI, Lamas A, Romero B, Galán JC, del Campo R & Cantón R (2013) Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **51**: 2761–2765.
- García-Castillo M, del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, van Mansfeld R, Oliver A & Cantón R (2011) Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol* **49**: 2905–2910.
- Gomila M, Gallegos MC, Fernández-Baca V, Pareja A, Pascual M, Díaz-Antolín P, García-Valdés E & Lalueca J (2013) Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol* **13**: 138.
- Kaufmann ME (1998) Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med* **15**: 17–31.
- Kerckhoffs AP, Ben-Amor K, Samsom M, van der Rest ME, de Vogel J, Knol J & Akkermans LM (2011) Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *J Med Microbiol* **60**: 236–245.
- Kidd TJ, Ritchie SR, Ramsay KA, Grimwood K, Bell SC & Rainey PB (2012) *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PLoS One* **7**: e44199.
- Lister PD, Wolter DJ & Hanson ND (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* **22**: 582–610.
- López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Mulet X, Cabot G, Moyà B, Figuerola J, Togores B, Pérez JL & Oliver A (2013) Clonal dissemination, emergence of mutator lineages and

- antibiotic resistance evolution in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis chronic lung infection. *PLoS One* **8**: e71001.
- Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C *et al.* (2012) Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 1703–1713.
- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L & Nordmann P (2009) Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4783–4788.
- Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, Castillo FJ, Torres C & Sáenz Y (2014) Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int J Med Microbiol* DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.01.001, in press.
- Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP & Viñas M (2011) Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **38**: 398–402.
- Strateva T & Yordanov D (2009) *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* **58**: 1133–1148.
- Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N *et al.* (2007) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *P Natl Acad Sci USA* **104**: 8101–8106.
- Wolter DJ, Hanson ND & Lister PD (2004) Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett* **236**: 137–143.
- Woodford N, Turton JF & Livermore DM (2011) Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 736–755.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Data of the 98 healthy human sample-donors from La Rioja, Spain.

Table S2. Primers and annealing temperatures used in the PCR reactions of this study.

Table S1: Data of the 98 healthy human sample-donors from La Rioja, Spain.

Individuals	Family ^a	Sex ^b	Age (year)	Domestic animals ^c
H1	1	M	63	None
H2	2	M	35	None
H3	1	W	59	None
H4	2	W	37	None
H5	1	W	29	None
H6	3	W	26	Cat
H7	4	W	25	Cat
H8	5	M	26	None
H9	3	M	27	Cat
H10	6	W	61	None
H11	7	M	37	Rabbit
H12	8	W	9	Rabbit
H13	9	W	37	Rabbit
H14	10	M	5	Rabbit
H15	11	M	31	None
H16	12	M	62	None
H17	13	W	52	Turtle
H18 ^d	13	W	25	Turtle
H19	13	M	53	Turtle
H20	14	W	59	None
H21	14	M	61	None
H22	14	M	33	None
H23	15	W	25	None
H24	15	M	32	None
H25	16	M	25	Dog
H26	17	M	27	None
H27 ^d	18	M	58	None
H28	19	M	43	None
H29	20	W	86	None
H30	21	W	56	None
H31	21	M	59	None
H32	21	M	19	None
H33 ^d	22	M	3	None
H34 ^d	22	M	33	None
H35	23	W	52	Cat
H36	24	W	58	Dog
H37	25	M	26	None
H38	4	W	52	Cat
H39	26	M	28	Dog
H40	27	W	28	Cat, dog
H41	28	W	54	None
H42	28	M	57	None
H43	29	W	25	None
H44	22	W	9 days	None
H45	30	M	42	None
H46 ^d	30	W	3	None
H47	30	W	41	None
H48	31	W	21	None
H49	31	W	25	None
H50	32	M	10	None
H51	33	M	47	None
H52	34	W	43	None
H53	35	M	14	None

H54	36	W	33	None
H55	37	M	50	Dog, turtle, bird
H56	38	W	49	Dog, turtle, bird
H57	39	W	34	None
H58	40	W	32	None
H59	41	W	36	None
H60	42	M	64	None
H61	43	M	24	Dog
H62	44	W	33	None
H63	45	M	7 months	None
H64	46	M	26	Cat
H65	47	M	7	None
H66	48	W	23	Dog, cat
H67	49	W	23	Dog, cat, rabbit
H68	50	W	22	None
H69	51	W	23	None
H70	52	M	25	Cat
H71	53	W	32	None
H72	54	ND	na.	na.
H73	55	ND	na.	na.
H74	56	ND	na.	na.
H75	57	ND	na.	na.
H76	58	ND	na.	na.
H77	59	ND	na.	na.
H78	60	ND	na.	na.
H79	61	ND	na.	na.
H80	62	ND	na.	na.
H81	63	W	35	None
H82	64	M	11	None
H83	65	W	33	Cat
H84	66	M	60	Dog
H85	67	W	30	None
H86	67	M	32	None
H87	68	W	21	None
H88	18	W	58	None
H89	69	M	9	None
H90	70	M	3	None
H91	69	W	44	None
H92	71	M	39	None
H93	71	W	32	None
H94	72	W	59	None
H95 ^d	73	M	26	Cat
H96 ^d	74	M	66	None
H97 ^d	74	W	50	None
H98	75	M	25	None

^a Those individuals who live in a same house are considered to belong to a same family.

^b M. man; W: woman; na. not available

^c Domestic animals owned by the individuals.

^d *Pseudomonas aeruginosa* were detected among the faecal samples from these individuals

Table S2: Primers and annealing temperatures used in the PCR reactions of this study.

Primer name	Sequence (5'→3')	Target gene	PCR product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
16Suniv-F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG ^a	16S rDNA	1585	52	1
16Suniv-R	GGYTACCTTGTTACGACTT ^a				
intI1-F	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	<i>intI1</i>	483	62	2
intI1-R	ACATGCGTGTAATCATCGTTCG				
intI2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	<i>intI2</i>	788	62	2
intI2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG				
intI3-F	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	<i>intI3</i>	979	62	2
intI3-R	ACGGATCTGCCAACCTGACT				
qacED1-F	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	<i>qacEΔ1-sul1</i>	1125	63	2
sul1-R	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG				
OprDlong-F	CTACGCAGATGCGACATGC	<i>oprD</i>	1518	55	3
OprDlong-R	CCTTTATAGGCGCGTTGCC				
OprD-F	CGCCGACAAGAAGAACTAGC	<i>oprD</i>	1412	55	4
OprD-R	GTCGATTACAGGATCGACAG				

^a Degenerated primers: Y= C or T and M = A or C.

References:

- 1.- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt ER, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematic, John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom, pp 115-175
- 2.- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J (2000) Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. Antimicrob Agents Chemother 44:1568–1574
- 3.- Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD (2004) Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. FEMS Microbiol Lett 236:137-143
- 4.- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Pérez JL, Oliver A (2007) Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 51:4329-4335

MANUSCRITO EN PRENSA

First description of a *bla*_{VIM-2}-carrying *Citrobacter freundii* in Spain

Nerea Porres-Osante ^{1,2†}, Vanesa Estepa ^{1†}, Cristina Seral ^{3,4}, Beatriz Rojo-Bezales ², Soledad Salvo ^{3,4}, Sonia Algarate ^{3,4}, Carmen Torres ^{1,2}, Francisco Javier Castillo ^{3,4}, Yolanda Sáenz ^{2#}

[†] *These authors contributed equally*

¹ Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

² Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain.

³ Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain.

⁴ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza, Spain.

Key words: *aac(6′)-Ib′*, integron, OprD, CMY, plasmid

Running title: VIM-2-producing *C. freundii* in Spain

Corresponding author:

Yolanda Sáenz PhD

e-mail: ysaenz@riojasalud.es

Área de Microbiología Molecular,

Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR),

C/ Piqueras 98, 3^a planta, 26006, Logroño.

Phone: +34-941278868; Fax: +34-941278887

The increasing prevalence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and non-fermenting Gram-negative bacteria is a growing public health threat. The carbapenemase acquisition is one of the most clinically important and reported carbapenem-resistance mechanisms, highlighting metallo-beta-lactamase ones (MBL) [1, 2]. VIM enzyme is one of the MBL most widespread, linked to class 1 integrons, plasmids or particular clones [3]. In this work, we describe the infection with VIM-2-producing *Citrobacter freundii* and *Pseudomonas aeruginosa* in a Spanish patient.

A 44 year-old male liver transplant recipient was admitted to a Spanish hospital 17 months after surgery, with important vascular affection due to cryoglobulinemia secondary to hepatitis C. After four weeks of ICU admission, the patient suffered an upper gastrointestinal haemorrhage secondary to gastric necrosis, and a gastric resection was performed. Additionally to the hemodynamic complications, different organs were infected by multidrug-resistant microorganisms (*P. aeruginosa*, *C. freundii* and *Enterococcus faecium*). Despite broad antimicrobial therapies, the patient died 24 days later with a severe sepsis.

C. freundii W1052 and *P. aeruginosa* Ps121 were isolated from the same gastric surgical wound sample. Both isolates were resistant to all tested beta-lactams (including carbapenems), streptomycin, gentamicin, kanamycin, tobramycin, netilmicin, fosfomicin, and nalidixic acid, but susceptible to amikacin and colistin (performed by disc diffusion method) [4]. Additionally, the *P. aeruginosa* isolate was resistant to ciprofloxacin. Table 1 shows the MICs of 13 antimicrobial agents (performed by agar dilution method) [4]. The MBL tests (Etest and double-disc [5]) proved a MBL-positive phenotype in both isolates.

Multiplex-PCR and sequencing was used to detect MBL genes [6], mutations in Ps121 *oprD* were analyzed by PCR and sequencing [5], and integron characterization by PCR-mapping and sequencing [7].

Both isolates harbored the *bla*_{VIM-2} gene that was located inside different class 1 integron arrangements. *P. aeruginosa* possessed three copies of *bla*_{VIM-2} into two different class 1 integrons: *intI1+bla*_{VIM-2}*+qacEΔ1+sul1* (integron In56; GenBank no. AF191564), and *intI1+bla*_{VIM-2}*+aac(6′)-Ib′+aadA1+ISPa34+bla*_{VIM-2}*+qacEΔ1+sul1* (In598; GenBank no. GU354325) (Figure 1). Additionally, this strain showed an inactivated OprD (Asp43Asn, Ser57Glu, Ser59Arg and Ala65STOP substitutions). On the other hand, the *C. freundii* isolate carried the *bla*_{VIM-2} gene into a class 1 integron lacking the 3′-conserved segment (CS) with the *intI1+aac(6′)-Ib′+bla*_{VIM-2}*+aac(6′)-Ib′* arrangement (Figure 1). None of the *tni* genes belonging to Tn402-like structures were amplified [8]. By PCR and sequencing [9], the PcH1 gene cassette promoter was detected in both Ps121 integrons, and the PcS in W1052 integron.

Curiously, both integrons detected in *P. aeruginosa* Ps121 were also identified in our previously described *P. aeruginosa* W37 [10]. Ps121 was ascribed to ST973 by MLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>), as *P. aeruginosa* W37. Nevertheless, the *SpeI*-PFGE analysis [10] showed very different patterns between both strains (data not shown).

The *bla*_{VIM-2}-producing *P. aeruginosa* isolates are widespread worldwide, whereas there are scarce reports about *bla*_{VIM-2}-positive *Citrobacter* isolates [11,12]. Indeed, our work is the first description in Spain.

Other antimicrobial resistance genes (outside integron) were studied by PCR and sequencing [13]. *bla*_{OXA-1} gene was found in *P. aeruginosa* Ps121. *C. freundii* W1052 harbored the chromosomal *bla*_{CMY-51} *ampC* variant (*ampR-bla*_{CMY-51}*-blc*) (GenBank

JQ733571). Regarding quinolone-resistance in *C. freundii*, the Thr83Ile substitution in GyrA protein, and a truncated *qnrB* gene (287bp) were found. The *pspF-ΔqnrB-sapA* region (1030bp) was 99% identical to the *C. freundii* ATCC8090 sequence (GenBank AB734052), whose *qnrB*-truncated sequence did not affect the quinolone susceptibility in transformed *E. coli* isolates [14].

Plasmids in *P. aeruginosa* Ps121 and *C. freundii* W1052 were studied by PCR-based replicon-typing [15,16], S1-PFGE, I-*Ceu*-1-PFGE, southern blotting and hybridization [10]. The *bla*_{VIM-2} gene was detected in the chromosome of *P. aeruginosa* Ps121, and in chromosome and in an untypable plasmid (<48.5 kb) in *C. freundii* W1052. To our knowledge, this is the first report of chromosomal location of *bla*_{VIM-2} in a *Citrobacter* isolate.

A possible association between coinfection and carbapenem-resistance could be related to a potential transference of reorganized *bla*_{VIM-2}-harboring genetic elements among genera. The antimicrobial resistance horizontal spread is worrisome worldwide, and control measures should be taken.

Acknowledgements

During the experimental work of this study, N. Porres-Osante had a fellowship from the Instituto de Salud Carlos III (FI09/00466), and V. Estepa had a pre-doctoral fellowship from Universidad de La Rioja. This work was partially supported by the Instituto de Salud Carlos III of Spain (project FIS PI12/01276) and by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (project SAF2012-35474) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Part of this study was presented at the XVII SEIMC Congress (Oral presentation 045, Zaragoza, Spain, 29-31 May 2013).

The authors declare no conflicts of interest.

References:

1. **Nordmann P, Dortet L, Poirel L.** 2012. Carbapenem resistance in enterobacteriaceae: here is the storm!. Trends. Mol. Med. **18**: 263-272.
2. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? Lancet Infect. Dis.. **11**(5):381-393.
3. **Diene SM, Rolain JM.** 2014. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin. Microbiol. Infect. doi: 10.1111/1469-0691.12655.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S24. CLSI, Wayne, PA, USA.
5. **Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, Castillo FJ, Torres C, Sáenz Y.** 2014. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. Int. J. Med. Microbiol. **304**: 405-414
6. **Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N.** 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. **59**: 321-322.
7. **Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J.** 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 1568-1574.

8. **Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** 2010. Dispersal of carbapenemase *bla*_{VIM-1} gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 320-327.
9. **Jové T, Da Re S, Denis F, Mazel D, Ploy MC.** 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet.* **6**: e1000793.
10. **Rojo-Bezares B, Estepa V, de Toro M, Undabeitia E, Olarte I, Torres C, Sáenz Y.** 2011. A novel class 1 integron array carrying *bla*_{VIM-2} genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital. *J. Med. Microbiol.* **60**: 1053-1054.
11. **Yan JJ, Ko WC, Chuang CL, Wu JJ.** 2002. Metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**: 503-511.
12. **Lee HK, Park YJ, Kim JY, Chang E, Cho SG, Chae HS, Kang CS.** 2005. Prevalence of decreased susceptibility to carbapenems among *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, and *Citrobacter freundii* and investigation of carbapenemases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **52**: 331-336.
13. **Porres-Osante N, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y.** 2014. Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**: 1792-1795.

- Saga T, Sabtcheva S, Mitsutake K, Ishii Y, Tateda K, Yamaguchi K, Kaku M.** 2013. Characterization of *qnrB*-like genes in *Citrobacter* species of the American Type Culture Collection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 2863-2866.
14. **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ.** 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods.* **63**: 219-228.
15. **García-Fernández A, Fortini D, Veldman K.** 2009. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**: 274-281.

Table 1: MIC values to 13 antimicrobial agents in *C. freundii* W1052 and *P. aeruginosa* Ps121 isolates.

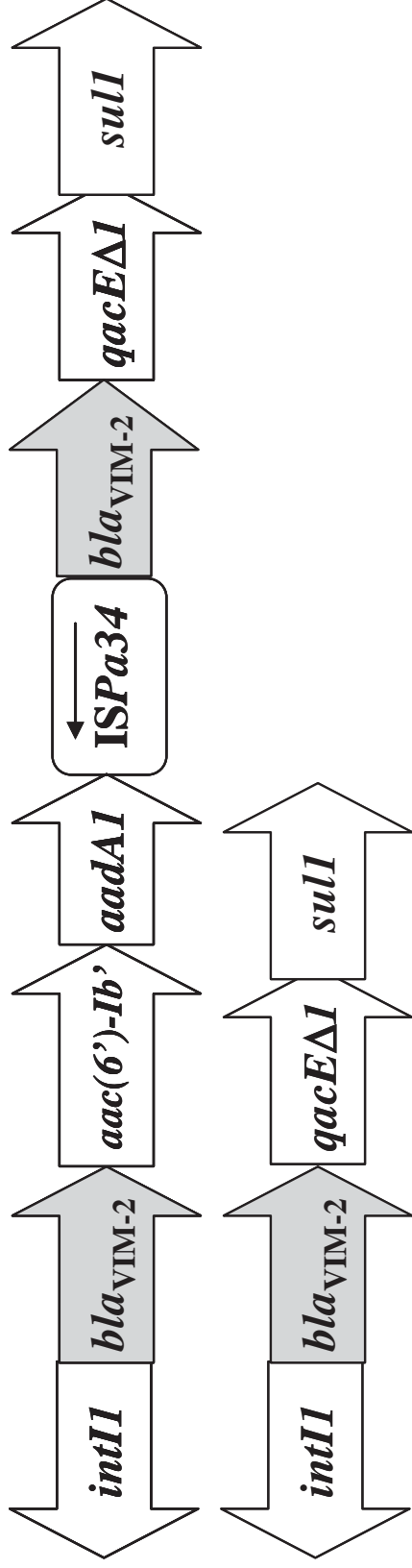
Isolate	MIC (mg/L)												
	AMP	CAZ	ATM	FOX	CTX	FEP	IPM	MEM	NAL	CIP	LVX	NOR	OFX
W1052	>256	>256	64	>256	256	16	256	64	512	0.5	2	4	2
Ps121	>256	>256	128	>256	>256	>16	>256	256	>512	16	16	32	64

AMP: ampicillin; CAZ: ceftazidime, ATM: aztreonam, FOX: cefoxitin; CTX: cefotaxime; FEP: cefepime; IPM: imipenem; MEM: meropenem; NAL: nalidixic acid; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; NOR: norfloxacin, OFX: ofloxacin.

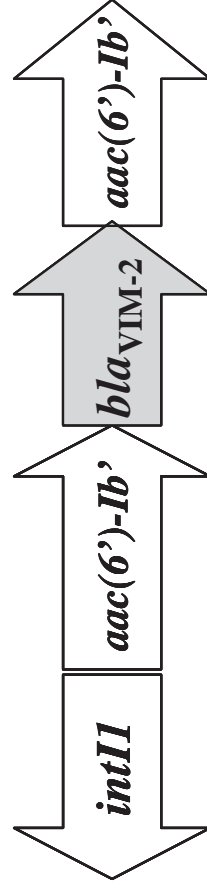
FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Integron structures found in *bla*_{VIM-2}-positive *P. aeruginosa* Ps121 and *C. freundii* W1052 isolates. The *bla*_{VIM-2} gene was detected in the chromosome of Ps121, and in chromosome and in an untypable plasmid (<48.5 kb) in W1052.

***P. aeruginosa* Ps121**



***C. freundii* W1052**



MANUSCRITO SOMETIDO

Genetic lineages and antimicrobial resistance in *Pseudomonas* spp. isolates recovered from food samples

Vanesa Estepa^a, Beatriz Rojo-Bezares^b, Carmen Torres^{a,b} and Yolanda Sáenz^{b*}

^aÁrea de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Avda. Madre de Dios 51, 26006, Logroño, Spain

^bÁrea de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/ Piqueras 98, 3^aplanta, 26006, Logroño, Spain

Corresponding author:

Yolanda Sáenz PhD

e-mail: ysaenz@riojasalud.es

Área de Microbiología Molecular,

Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR),

C/ Piqueras 98, 3^aplanta, 26006, Logroño.

Phone: +34-941278868; Fax: +34-941278887

Running title: *Pseudomonas* spp. in food samples

Abstract

Raw food is an important reservoir of *Pseudomonas* isolates that could be disseminated to consumers. The presence of *Pseudomonas* spp. was studied in food samples, and the phenotypic and genotypic characterization of the recovered isolates were analyzed. Two samples of meat (3%) and 13 of vegetables (22%) contained *Pseudomonas* spp. A total of 20 isolates were identified, and were classified as follows (number of isolates): *P. aeruginosa* (5), *P. putida* (5), *P. nitroreducens* (4), *P. fulva* (2), *P. mosselii* (1), *P. mendocina* (1), *P. monteilii* (1) and *Pseudomonas* sp (1). These 20 *Pseudomonas* isolates were clonally different by pulsed-field-gel-electrophoresis, and were resistant to the following antibiotics: ticarcillin (85%), aztreonam (30%), cefepime (10%), imipenem (10%), meropenem (5%) and doripenem (5%), but were susceptible to ceftazidime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, norfloxacin, and colistin. Only one strain (Ps158) presented a class 1 integron lacking the 3' conserved segment. The five *P. aeruginosa* strains were typed by multilocus sequence typing in five different sequence-types (ST17, ST270, ST800, ST1455, and ST1456), and different mutations were detected in protein OprD that were classified in three groups. One strain (Ps159) showed a new insertion sequence (*ISPa47*) truncating the *oprD* gene, and conferring resistance to imipenem.

Keywords: Vegetables, meat, protein OprD, sequence type, carbapenem resistance, *ISPa47*

1.- Introduction

Vegetables and fresh fruit are important products in a healthy diet and, in the last years, good lifestyles have led to an increased consumption of fresh products. Nevertheless, food is well recognized as a vehicle for the transference of bacterial pathogens, especially in raw or undercooked food [1].

Pseudomonas is a non-fermenting Gram-negative bacteria that colonizes different terrestrial and aquatic environments [2], and includes a diversity of species. Among them, *Pseudomonas aeruginosa* is of great relevance in human medicine, due not only to its frequent implication in nosocomial infections or in chronic lung infections in cystic fibrosis patients, but also to its frequent broad antimicrobial resistance profile [2- 4]. *P. aeruginosa* has a high intrinsic resistance to several antibiotic families and, on the other hand, an extraordinary capacity to acquire new mechanisms of resistance, even during antibiotic treatment, making it difficult to find alternative therapies [4]. The intrinsic resistance in *P. aeruginosa* is due to its low outer membrane permeability, its chromosomal and inducible AmpC beta-lactamase, and its complex system of antimicrobial efflux pumps. In addition, *P. aeruginosa* has the ability to develop resistance by horizontal acquisition of resistance genes carried on plasmids, transposons, or integrons [2, 4, 5].

While *P. aeruginosa* is an important opportunist pathogen responsible of worldwide nosocomial infections, other species such as *P. syringae* is wide known as a plant deleterious, and *P. putida* or *P. fluorescens* are considered as plant growth promoters [6].

Previous studies have given information about the detection of *Pseudomonas* spp. in food of animal or vegetal origin, but there is few data about their antimicrobial phenotype and genotype or about the genetic lineages identified in this niche [7, 8]. For this reason, the purpose of this study was to analyze the occurrence of *Pseudomonas* spp. in food samples

(meat and vegetables), and to characterize the antimicrobial phenotype and genotype of the recovered isolates.

2.- Materials and methods

2.1.- Bacterial isolation

From June 2011 to July 2012, 62 meat samples were analyzed for *Pseudomonas* spp isolation (24 obtained in butcheries and 38 in supermarkets). The origin of these meat samples were as follows (number of samples): chicken (20), pig (19), beef (11), turkey (8), sheep (2) and mixed meat (2). After homogenizing 0.3 g of meat in 3 ml saline solution, 100 µl was inoculated in 2 ml of peptone water and incubated at 37°C during 48h. Next, 100 µl of the suspension were streaked onto cetrimide-agar plates, and were incubated at 37°C during 24h.

In July 2012, 59 vegetable samples were analyzed (35 tomatoes and 24 peppers), 13 of them obtained in local supermarkets, 23 in greengrocers and 23 directly collected in orchards. All vegetables were loose and unprocessed. After triturating 25-30 g of vegetables in 100 ml of peptone water, 100 µl of this suspension was streaked onto cetrimide-agar plates and incubated at 37°C during 24-48h.

One or two colonies per meat or vegetable sample, presumptive of being *Pseudomonas*, were selected, identified by classical biochemical techniques (Gram stain, triple sugar iron, catalase and oxidase reactions) and confirmed by a molecular method (16S rRNA gene fragment PCR amplification and sequencing) [9].

2.2.- Antibiotic susceptibility

Susceptibility testing to 15 antipseudomonal agents (ticarcillin, piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem (IPM), meropenem (MEM), doripenem (DOR), gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, norfloxacin, colistin) was performed by the disc diffusion method following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute [10]. Minimum inhibitory concentration (MIC) of IPM and MEM was performed by agar dilution method [10] and MIC of DOR by Etest method (manufacturer's recommendations, bioMérieux). Extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL), metallo-beta-lactamase (MBL) and class A carbapenemase phenotypes were determined by double-disc synergy tests [11-13]. *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as a control strain.

2.3.- Clonal relationship and molecular typing of isolates

The clonal diversity of our isolates was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of genomic DNA digested with *SpeI* enzyme. Bacterial DNA embedded in agarose plugs were prepared as previously described [14]. The PFGE conditions used were two ramps at 6 V cm⁻², at 14°C and with pulse time ranging from 5 s to 15 s during 10 h and from 15 s to 45 s during other 10 h. DNA profiles were analyzed by the BioNumerics software 2.0 (Applied Maths, Belgium) choosing the Dice coefficient. Tolerance and optimization were set at 1.1% and 0.0%, respectively.

Multilocus sequence typing (MLST) was performed for *P. aeruginosa* strains by PCR and bi-directional sequencing of 7 housekeeping genes as was described in the *P. aeruginosa* PubMLST website database (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>).

2.4.-Characterization of integrons and porin OprD

The presence of integrons was studied by PCR, and subsequent sequencing, to amplify the encoding genes for integrase of types 1, 2 and 3 (*intI1*, *intI2*, *intI3*), the 3' conserved segment in class 1 integrons (*qacEΔI-sulI*) and their variable regions [15].

Mutations in *oprD* gene were analyzed in *P. aeruginosa* strains by PCR, sequencing and comparison with *P. aeruginosa* PAO1 reference strain (GenBank accession no. AE004091) [16, 17].

3.- Results

3.1.- Isolates of *Pseudomonas* spp.

Two samples of meat (3%) and 13 of vegetables (22%) contained *Pseudomonas* spp. (Table 1). A total of 20 isolates were identified from the 15 positive samples, and were classified in 8 different species (number of isolates): *P. aeruginosa* (5), *P. putida* (5), *P. nitroreducens* (4), *P. fulva* (2), *P. mosselii* (1), *P. mendocina* (1), *P. monteilii* (1) and *Pseudomonas* sp (1). The five isolates of *P. aeruginosa* were recovered from 3 samples of vegetable origin, and from one meat sample (Table 1).

3.2.- Clonal relationship and molecular typing

All 20 isolates showed different PFGE patterns. *P. aeruginosa* strains were typed by MLST in five different sequence types: ST17, ST270, ST800, and two new allelic combinations that were registered in the MLST database as ST1455 and ST1456.

3.3.- Resistance profiles

The *Pseudomonas* spp. strains recovered in this study showed the following resistance percentages: ticarcillin (85%), aztreonam (30%), cefepime (10%), IPM (10%), MEM (5%) and DOR (5%), while they were susceptible to the other tested antimicrobial agents. Only one strain (Ps149), from meat origin, was susceptible to all tested antimicrobial agents. None of them showed class A carbapenemase, MBL or ESBL phenotypes. Table 2 shows the MIC values of carbapenem agents.

3.4.- Presence of integrons and characterization of protein OprD

One IPM-resistant *P. aeruginosa* strain (Ps158) harbored a 3' conserved segment-lacking class 1 integron, regulated by a weak promoter (PcW). All PCRs performed to detect the gene cassettes behind the *intI1* gene were negative in this *intI1*-positive strain. The remaining 19 *Pseudomonas* isolates lacked integron structures.

Regarding protein OprD in the 5 *P. aeruginosa* strains, different amino acid changes were identified that were classified in three groups (Table 1). Four strains were identified in groups 1 and 2 containing several mutations in porin OprD. A new insertion sequence, designated ISPa47 by IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/>) and associated with IS630 family, was found truncating the *oprD* gene of the remaining Ps159 strain (group 3) resistant to IPM. The open reading frame (1038 bp) with transposase domain was 66% identical to TnpA of ISCARN44 (GenBank accession number CABM01000056). The ISPa47 sequence was included in GenBank database with the accession number KC502912.

4.- Discussion

Humans, animals, foods and the environment have been described as different reservoirs of bacteria harboring antibiotic resistance genes that could be transferred or mobilized to human pathogens [18]. Moreover, the extensive use and even the misuse of antimicrobial agents in clinic, animal production and agriculture could be a way to select and disseminate these human pathogens [18]. Among them, *P. aeruginosa* is one of the most relevant opportunist human pathogens, although there are also reports that present clinical cases caused by environmental *Pseudomonas* such as *P. mendocina* [19], *P. fulva* [20, 21], *P. mosselii* [22] or *P. monteilii* [23]. In our study, 20 *Pseudomonas* isolates (*P. aeruginosa* (5), *P. putida* (5), *P. nitroreducens* (4), *P. fulva* (2), *P. mosselii* (1), *P. mendocina* (1), *P. monteilii* (1) and *Pseudomonas* sp (1)) have been recovered from raw meat and vegetables. The vegetables were the most contaminated samples (22%). The occurrence of *P. aeruginosa* contaminating tomatoes or green pepper products in our study (5%) was lower than those percentages obtained analyzing salads or other vegetables in previous works (64.5, 44 or 19%) [7, 24, 25]. In those studies, lettuce, chicory, carrot and watercress yielded the highest frequencies of isolation. According to these results and as has been previously suggested, the vegetables cultivated in more contact with the soil may be contaminated easily with Pseudomonadales from soil, fertilizers or water used for irrigation [25].

Antibiotic susceptibility testing revealed that all the *Pseudomonas* spp. isolated in this work were susceptible to aminoglycosides, fluoroquinolones and colistin, and low resistance rates were observed for carbapenems and cefepime ($\leq 10\%$). These results contrast with the frequent reports of multi-drug-resistant *P. aeruginosa* isolated from clinical samples, and the increasing descriptions about carbapenem-resistant and MBL-producing isolates [26].

In our study, only two IPM-resistant strains were found, and none of them was a MBL producer. Regarding to Ps159 strain, the resistance to IPM was associated with the loss of porin OprD by insertion of the new *ISPa47* characterized in this study (GenBank KC502912). The inactivation of *oprD* gene expression by insertion sequence elements, leading to an increase in carbapenem resistance, has been previously reported only among clinical isolates [17, 26-29]. To our knowledge, this is the first description of an environmental isolate resistant to IPM due to the *oprD* disruption by the presence of the *ISPa47* element. On the other hand, the IPM-resistance in the Ps158 strain could not be determined in this work. The amino acid changes detected in its porin OprD were previously reported in carbapenem-susceptible *P. aeruginosa* isolates recovered from human clinical samples and from fecal samples of healthy humans [30, 31]. Patterns 1 and 2 of alterations in protein OprD might not cause porin loss; therefore other resistance mechanisms (such as overexpression of efflux systems or AmpC) must be involved in the carbapenem resistance.

Several studies have related antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* to the presence of mobile genetic elements. The prevalence of class 1 integrons is high in clinical *P. aeruginosa* isolates [32-34]. In our study, class 1 integron was found in only one out of the 20 *Pseudomonas* isolated (one out of the five isolated *P. aeruginosa* strains). The presence of integrons in these isolates is of great concern because these genetic elements are capable of spread and capture multidrug resistance gene cassettes. In addition, the dissemination of *P. aeruginosa* clones also favors the spread of antimicrobial resistance worldwide. In this sense, there are high-risk clones worldwide disseminated in several hospitals (such as ST235, ST111 and ST175) and normally associated with carbapenem-resistant strains and/or metallo-beta-lactamase producers [35, 36]. In our work, five

different sequence types: ST17, ST270, ST800, ST1455 and ST1456 have been detected. ST1455 and ST1456 are new sequence types in which the two IPM-resistant strains were ascribed. According to MLST database, the ST270 contains *P. aeruginosa* from water, soil and clinical samples, and the ST800 from sputum samples. The ST17, detected in the *P. aeruginosa* Ps153 strain recovered from a tomato sample, is known as “clone C” and has been previously associated with cystic fibrosis and other non-cystic fibrosis patients [8].

In conclusion, the prevalence of *Pseudomonas* spp. isolates from vegetables, which belong to many different clones with diverse antimicrobial susceptibility patterns, has been described in this study. This clonal diversity might be a vehicle of transmission of resistance genes to humans through food chain. Surveillance throughout the food production and consumption is needed to detect emerging resistance phenotypes. Additionally, consumers should be careful with the raw and inadequately manipulated or cooked food.

Acknowledgements

Vanesa Estepa had a pre-doctoral fellowship from the Universidad de La Rioja, Spain (grant number FPI-UR-09/16599009), during the experimental work for this study. This work was partially supported by the Instituto de Salud Carlos III of Spain (project FIS PI12/01276), and by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (project SAF2012-35474) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Part of this study was presented at the XVII SEIMC Congress (Poster 020, Zaragoza, Spain, 29-31 May 2013).

References

- 1.- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol* 2010; 12:2385-2397.
- 2.- Henry DA and Speert DP. *Pseudomonas*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Volume 1. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, and Warnock DW (eds.). Washington: ASM Press, 2011, pp. 677-691.
- 3.- Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, Sanchez MB, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2013; 4:103.
- 4.- Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011; 19: 419–26.
- 5.- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L and Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:4783-4788.
- 6.- Mehri I, Turki Y, Chair M, Chérif H, Hassen A, Meyer JM, Gtari M. Genetic and functional heterogeneities among fluorescent *Pseudomonas* isolated from environmental samples. *J Gen Appl Microbiol* 2011; 57:101-114.
- 7.- Allydice-Francis K and Brown PD. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *Int J Microbiol* 2012; 426241.
- 8.- Kidd TJ, Ritchie SR, Ramsay KA, Grimwood K, Bell SC, Rainey PB. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PLoS One* 2012; 7:e44199.

- 9.- Lane DJ. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*, Stackebrandt ER, and Goodfellow M (eds.). Chichester (UK): John Wiley and Sons, 1991, pp. 115-175.
- 10.- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd Informational Supplement. (M100-S23). Wayne, PA. 2013.
- 11.- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-878.
- 12.- Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008; 46:4083-4086.
- 13.- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:88–91.
- 14.- Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med* 1998; 15:33-50.
- 15.- Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3996-4001.
- 16.- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Pérez JL, Oliver A. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:4329-4335.

- 17.- Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. FEMS Microbiol Lett 2004; 236:137-143.
- 18.- Rolain JM. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. Front Microbiol 2013; 4:173.
- 19.- Nseir W, Taha H, Abid A, Khateeb J. *Pseudomonas mendocina* sepsis in a healthy man. Isr Med Assoc J 2011; 13:375-376.
- 20.- Almuzara MN, Vazquez M, Tanaka N, Turco M, Ramirez MS, Lopez EL, Pasteran F, Rapoport M, Procopio A, Vay, CA. First case of human infection due to *Pseudomonas fulva*, an environmental bacterium isolated from cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 2010; 48:660-664.
- 21.- Seok Y, Shin H, Lee Y, Cho I, Na S, Yong D, Jeong SH, Lee K. First report of bloodstream infection caused by *Pseudomonas fulva*. J Clin Microbiol 2010; 48:2656-2657.
- 22.- Giani T, Marchese A, Coppo E, Kroumova V, Rossolini GM. VIM-1-producing *Pseudomonas mosselii* isolates in Italy, predating known VIM-producing index strains. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:2216-2217.
- 23.- Bogaerts P, Bouchrouf W, Lissoir B, Denis O, Glupczynski Y. IMP-13-producing *Pseudomonas monteilii* recovered in a hospital environment. J Antimicrob Chemother 2011; 66:2434-2440.
- 24.- Correa CM, Tibana A, Gontijo Filho PP. Vegetables as a source of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a University and Oncology Hospital of Rio de Janeiro. J Hosp Infect 1991; 18:301-306.

- 25.- Wright C, Kominos SD, Yee RB. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31:453-454.
- 26.- Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, Castillo FJ, Torres C, Sáenz Y. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int J Med Microbiol* 2014; 304:405-414.
- 27.- Diene SM, L'homme T, Bellulo S, Stremler N, Dubus JC, Mely L, Leroy S, Degand N, Rolain, JM. ISPa46, a novel insertion sequence in the *oprD* porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42:268-271.
- 28.- Evans JC and Segal H. A novel insertion sequence, ISPa26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3776-3777.
- 29.- Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, d'Ostuni V, Fusté E, Vinuesa T, Viñas M. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Microbiol* 2011a; 14:51-58.
- 30.- Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Sáenz Y. Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: antimicrobial susceptibility and global genetic lineages. *FEMS Microbiol Ecol* 2014 (*in press*).
- 31.- Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Domínguez MA, Moncalián G, Oliver A, Martínez-Martínez L, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas*

- aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:1703-1713.
- 32.- Martínez 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.
- 33.- Odumosu BT, Adeniyi BA, Chandra R. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12:29.
- 34.- 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 Agents*, 2011b; 38:398-402.
- 35.- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moya 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; 56:6349-6357.
- 36.- Garcia-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 high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol* 2011; 49:2905-2910.

Table 1.- Characteristics of *Pseudomonas* spp. isolates recovered from 121 food samples of vegetal (n=59) and animal origin (n=62).

Strain	Species	Origin (Name of sample)	Molecular typing ^a	Resistance phenotype ^b	Class 1 integron	OprD pattern ^{a,c,d}
Ps149	<i>P. aeruginosa</i>	Turkey (S89)	ST270	Susceptible	—	1
Ps153	<i>P. aeruginosa</i>	Tomato (S14)	ST17	TIC	—	2
Ps158	<i>P. aeruginosa</i>	Green pepper (S45)	ST1455 ^e	TIC, FEP, IPM, DOR	+	2
Ps159	<i>P. aeruginosa</i>	Green pepper (S45)	ST1456 ^e	IPM	—	3
Ps160	<i>P. aeruginosa</i>	Green pepper (S49)	ST800	TIC	—	2
Ps150	<i>P. putida</i>	Beef (S96)		TIC, ATM	—	
Ps152	<i>P. putida</i>	Tomato (S10)		TIC	—	
Ps154	<i>P. putida</i>	Tomato (S15)		TIC	—	
Ps155	<i>P. putida</i>	Tomato (S22)		TIC	—	
Ps164	<i>P. putida</i>	Green pepper (S57)		TIC	—	
Ps161	<i>P. nitroreducens</i>	Green pepper (S49)		TIC, ATM	—	
Ps166	<i>P. nitroreducens</i>	Tomato (S58)		TIC, ATM	—	
Ps167	<i>P. nitroreducens</i>	Tomato (S58)		TIC, ATM	—	
Ps169	<i>P. nitroreducens</i>	Green pepper (S59)		TIC, ATM	—	
Ps156	<i>P. fulva</i>	Green pepper (S25)		TIC	—	
Ps157	<i>P. fulva</i>	Green pepper (S28)		TIC	—	
Ps151	<i>P. mendocina</i>	Green pepper (S7)		ATM	—	
Ps162	<i>P. mosselii</i>	Tomato (S56)		TIC, FEP	—	
Ps168	<i>P. monteilii</i>	Green pepper (S59)		TIC	—	
Ps165	<i>Pseudomonas</i> sp.	Green pepper (S57)		TIC, MEM	—	

^aSequence type and *oprD* gene only were analyzed in the 5 *P. aeruginosa* strains.

^bSusceptible: this strain was susceptible to all 15 antipseudomonad antibiotics; TIC: ticarcillin; ATM: aztreonam; FEP: cefepime; IPM: imipenem; MEM: meropenem; and DOR: doripenem.

^cReference porin OprD of *P. aeruginosa* PAO1 strain (GenBank accession no. AE004091).

^dMutations detected in each OprD pattern: **group 1**: V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, loop L7-short (372VDSSSSSYAGL383), S403A, Q424E; **group 2**: D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, loop L7-short (372VDSSSSSYAGL383); **group 3**: truncated by IS*Pa47* (GenBank accession no. KC502912).

^eNew allelic combinations: ST1455 (*acsA15*, *aroE5*, *guaA11*, *mutL3*, *nuoD58*, *ppsA42*, *trpE9*) and ST1456 (*acsA11*, *aroE13*, *guaA109*, *mutL5*, *nuoDI*, *ppsA1*, *trpE47*).

Table 2.- Minimum inhibitory concentration of carbapenem antimicrobial agents for our *Pseudomonas* spp. strains.

Strain	Species	MIC (mg/l) ^a		
		IPM	MEM	DOR
Ps149	<i>P. aeruginosa</i>	4	0.5	0.125
Ps153	<i>P. aeruginosa</i>	4	1	0.125
Ps158	<i>P. aeruginosa</i>	8	4	0.75
Ps159	<i>P. aeruginosa</i>	>32	4	0.38
Ps160	<i>P. aeruginosa</i>	4	2	0.25
Ps150	<i>P. putida</i>	1	2	0.38
Ps152	<i>P. putida</i>	1	4	0.25
Ps154	<i>P. putida</i>	0.5	2	0.25
Ps155	<i>P. putida</i>	1	2	0.25
Ps164	<i>P. putida</i>	1	2	0.38
Ps161	<i>P. nitroreducens</i>	0.25	1	0.064
Ps166	<i>P. nitroreducens</i>	0.25	0.5	0.094
Ps167	<i>P. nitroreducens</i>	0.25	1	0.19
Ps169	<i>P. nitroreducens</i>	1	0.06	0.125
Ps156	<i>P. fulva</i>	4	2	0.25
Ps157	<i>P. fulva</i>	2	2	0.25
Ps151	<i>P. mendocina</i>	2	0.25	0.125
Ps162	<i>P. mosselii</i>	2	4	0.75
Ps168	<i>P. monteilii</i>	0.25	0.25	0.094
Ps165	<i>Pseudomonas sp.</i>	2	8	0.38

^a Abbreviations: MIC: Minimum inhibitory concentration; IPM: imipenem; MEM: meropenem; DOR: doripenem.