

Vigilancia epidemiológica y molecular de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasa en portadores fecales



Claudia Forés Lisbona

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Zaragoza 2015



Universidad
Zaragoza

Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa
Departamento de Microbiología, Medicina preventiva y Salud pública
Directores: Cristina Seral y Francisco Javier Castillo

ÍNDICE

• RESUMEN.....	1
• ABSTRACT.....	2
• INTRODUCCIÓN.....	3
1. El género <i>Pseudomonas</i>.....	3
1.1 . La especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2. Resistencia antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i>.....	4
2.1 . Características y mecanismo de acción de los antibióticos β-lactámicos.....	4
2.2 . Mecanismos de resistencia a β-lactámicos.....	5
2.2.1. Carbapenemasas.....	5
2.2.2. Alteraciones de la permeabilidad.....	6
2.2.3. Presencia de integrones.....	6
3. Factores de virulencia.....	7
3.1 . Sistema QS.....	7
3.2 . Sistema de secreción tipo III.....	8
• OBJETIVOS.....	9
• MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. Muestras estudiadas.....	9
2. Aislamientos seleccionados para el estudio.....	10
3. Determinación de la sensibilidad a los antibióticos: antibiogramas.....	10
4. Detección molecular de genes de resistencia y de genes de virulencia.....	11
4.1 . Extracción de DNA.....	12
4.2 . Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	12
4.3 . Electroforesis en geles de agarosa.....	16
• RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
1. Análisis de resistencias a antibióticos en <i>P aeruginosa</i>.....	17
2. Estudio de genes que proporcionan resistencia a antibióticos en <i>P. aeruginosa</i>.....	19
3. Estudio de genes que codifican factores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i>.....	20
• CONCLUSIONES.....	22
• CONCLUSIONS.....	23
• BIBLIOGRAFÍA.....	24

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos nosocomiales más relevantes, así como una de las principales causas de infección respiratoria crónica en pacientes con enfermedades de base, como la fibrosis quística o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Se han detectado en hospitales de todo el mundo, cepas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos, principalmente en las unidades de cuidados intensivos. La creciente prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes es un problema de salud global, debido a la limitación de las opciones de tratamiento clínico.

Su elevado nivel de resistencia intrínseca a los antibióticos, unido a su extraordinaria capacidad para desarrollar resistencias adicionales por mutaciones cromosómicas, hacen de este patógeno uno de los más difíciles de tratar.

La resistencia a carbapenémicos es el problema más complejo asociado con la multirresistencia de *P. aeruginosa*. Esta especie bacteriana presenta resistencia intrínseca a múltiples antibióticos debido a que posee una membrana externa poco permeable, una β-lactamasa AmpC inducible y bombas de expulsión de antibióticos. La resistencia a carbapenémicos se debe a la coexistencia de varios mecanismos implicados, incluyendo la producción de β-lactamasas (AmpC, metaloenzimas,...), alteraciones de la permeabilidad o de sus porinas y expresión de bombas de expulsión activa.

Así mismo, se han detectado en *P. aeruginosa* diversos sistemas de producción de factores de virulencia, entre los que se encuentran el sistema quórum (QS) y el sistema de secreción tipo III. La presencia de estos factores de virulencia se ha relacionado con una mayor patogenicidad de *P. aeruginosa*, que unida a los altos niveles de resistencia a antibióticos dificulta su control.

El porcentaje de colonización por *P. aeruginosa* en menores de 15 años no hospitalizados ha resultado ser 5,45%. Los porcentajes de resistencia a los antibióticos detectados en los 42 aislados han sido variables para los antibióticos piperacilina-tazobactam (11,9%), ticarcilina (11,9%), aztreonam (11,9%), ceftazidima (11,9%), cefepime (11,9%), gentamicina (4,8%) y ciprofloxacino (2,4%). Todos los aislados han sido sensibles a imipenem, meropenem, tobramicina, amikacina, levoflaxacino y colistina.

No se han encontrado genes de metalo-β-lactamasas ni carbapenemasas de tipo A en ninguno de los 42 aislados de *P. aeruginosa*. Tampoco se ha detectado la presencia de integrones de clase 1, 2 ó 3 ni se han observado alteraciones en el gen oprD. Por el contrario, si se ha encontrado un elevado contenido en genes de virulencia, estando presentes los genes codificantes de elastasa (*lasA*) y rhamnosiltransferasa (*rhlAB*) en todos los aislados estudiados.

Palabras clave: *P. aeruginosa*, antibióticos, resistencia a antibióticos, virulencia, PCR.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is one of the most relevant nosocomial pathogens, as well as one of the main causes of chronic respiratory infection in patients with underlying diseases, such as cystic fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease.

Multidrug resistant (MDR) *P. aeruginosa* isolates have been detected in hospitals worldwide, mainly within intensive care units. The increasing prevalence of MDR *P. aeruginosa* isolates is a global health problem, because of the limitation in clinical treatment options.

The high intrinsic antibiotic resistance of this pathogen, together with its extraordinary capacity for acquiring additional resistances through chromosomal mutations, determines a major threat for antimicrobial therapy.

Resistance to carbapenems is the most complex problem associated with multidrug resistance of *P. aeruginosa*. This pathogen has intrinsic resistance to multiple antibiotics because it has a slightly permeable outer membrane, an inducible AmpC β-lactamase and antibiotic efflux pumps. Resistance to carbapenems is due to the coexistence of several mechanisms involved, including the production of β-lactamases (AmpC, metalloenzymes,...), altered permeability or alterations of their porins and expression of efflux pumps.

It has also been detected in *P. aeruginosa* several virulence factors production systems, including the quorum system (QS) and type III secretion system. The presence of these virulence factors has been associated with increased pathogenicity of *P. aeruginosa*, which together with high levels of resistance to antibiotics difficult its control.

The percentage of colonization by *P. aeruginosa* in outpatients under 15 has proved to be 5.45%. The percentages of antibiotic resistance detected in 42 isolates have been variables for the antibiotics: piperacillin-tazobactam (11.9%), ticarcillin (11.9%), aztreonam (11.9%), ceftazidime (11.9%), cefepime (11.9%), gentamicin (4.8%) and ciprofloxacin (2.4%). All isolates were susceptible to imipenem, meropenem, tobramycin, amikacin, levofloxacin and colistin.

There have not been detected genes of metallo-β-lactamase or class A carbapenemases in any of the 42 isolates of *P. aeruginosa*. Nor it has been observed the presence of class 1, 2 or 3 integrons or alterations in the *oprD* gene. By contrast, it has been found a high content of virulence genes, being present the gene encoding elastase (*lasA*) and rhamnosyltransferase (*rhlAB*) in all the studied isolates.

Keywords: *P. aeruginosa*, antibiotic, antibiotic resistance, virulence, PCR.

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. Pertece a la clase γ-proteobacteria, orden pseudomonadales y familia *Pseudomonadaceae* (Henry & Speert, 2002).

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. (Hardalo & Edberg, 1997; Silby, et al., 2011). Con excepción de *P. luteola* y *P. oryzihabitans*, las especies de *Pseudomonas* de implicación clínica son oxidasa positivas (Henry & Speert, 2002).

Entre las características de las especies de este género también se encuentra la capacidad de producir colonias con morfologías distintivas y pigmentadas (Bonomo & Szabo, 2006; Quinn, 1998), así como pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta, a baja longitud de onda, sobre todo cuando crece en medios con limitación de hierro (Meyer, et al., 2002). Son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos (Teitzel & Parsek, 2003).

Es de gran interés por su importancia en enfermedades y por su potencial en aplicaciones biotecnológicas. Incluye un amplio abanico de especies diferentes y aun 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, pero no es la única especie presente en infecciones humanas (Lister, et al., 2009).

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. 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. 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*.



Ilustración 1. Colonias de *P. aeruginosa* crecidas en agar TSA.

Dentro de su género, *P. aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas humanos más importantes y uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales. Esta circunstancia se ve favorecida por su ubicuidad y su gran capacidad para colonizar ambientes húmedos, siendo frecuente su presencia en reservorios tanto extra como intrahospitalarios, incluyendo, entre otros, las soluciones de limpieza de lentes de contacto, desinfectantes y jabones (Juan Nicolau, et al., 2010).

P. aeruginosa es el primer causante de neumonía asociada a la ventilación mecánica en las unidades de cuidados intensivos, causando elevadas tasas de mortalidad. Sin embargo, *P. aeruginosa* puede colonizar también de forma inocua a individuos sanos (axilas, mucosa nasal, orofaringe, perine, etc). Es también notable su papel como agente etiológico de otras infecciones nosocomiales de diversa índole, entre ellas las infecciones de quemaduras extensas o heridas, así como las infecciones del tracto urinario o la bacteriemia. *P. aeruginosa* es, además, el principal causante de la infección pulmonar crónica en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, como fibrosis quística (FQ), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y bronquiectasias (Juan Nicolau, et al., 2010).

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.

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 abioticas, 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 β-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). 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 antimicrobiana en *P. aeruginosa*

2.1. Características y mecanismo de acción de los antibióticos β-lactámicos

Los antibióticos β-lactámicos se caracterizan por poseer una estructura química en forma de anillo (conocido como anillo β-lactámico), al cual se añaden diferentes radicales dando lugar a los distintos grupos existentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos e inhibidores de β-lactamasas. 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). Concretamente, impiden la síntesis del peptidoglucano o mureína por competición con las enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas responsables de la unión de las

cadenas lineales de NAG y NAM. Con ello se inhibe la transpeptidación, se desestabiliza la pared celular, y finalmente, se produce la lisis de la bacteria por la continua actuación de las autolisinas.

2.2. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos

Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en bacterias gram negativas son:

- Alteraciones de la permeabilidad: los β -lactámicos son moléculas hidrófilas que atraviesan con dificultad la barrera lipídica de la membrana de las bacterias. Este proceso se produce lentamente por difusión o está facilitado fundamentalmente por unos canales proteicos denominados porinas. La pérdida, reducción o modificación de las porinas pueden ser causa de resistencia a β -lactámicos.
- Mecanismos de expulsión: consisten en proteínas de membrana, dependientes de energía, que expulsan el antimicrobiano de la bacteria antes de que éste acceda a su lugar de actuación. La codificación de estos genes puede localizarse tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano. La coexistencia con otros mecanismos aumenta notablemente la resistencia a los antimicrobianos.
- Producción de enzimas inactivantes: fundamentalmente β -lactamasas. Este mecanismo, puede deberse bien a la hiperproducción de la β -lactamasa cromosómica e inducible AmpC, o, más recientemente, a la producción de carbapenemasas. Entre ellas, se pueden encontrar las metalo- β -lactamasas (MBL o clase B), las carbapenemasas de clase A o algunas variantes de oxacilinasas (clase D) (Oliver, 2009; Queenan & Bush, 2007).

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, 2002). La resistencia natural o intrínseca es debida a que *P. aeruginosa* presenta una membrana externa poco permeable, una β -lactamasa AmpC cromosómica e inducible y un complejo sistema de bombas de expulsión activa de antibióticos (Rodríguez-Martínez, et al., 2009).

2.2.1. Carbapenemasas

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de β -lactamasas capaces de hidrolizar el anillo carbapénémico además de otros anillos β -lactámicos hidrolizables. Existen dos tipos de carbapenemasas:

- Carbapenemasas con residuos de serina en su centro activo: carbapenemasas de clase A y D. Constituyen la mayoría de los enzimas y la unión acil-enzima es covalente.
- Metalo- β -lactamasas (MBL): carbapenemasas de clase B. Requieren de un catión divalente, el zinc, para ser activos. Esencialmente es una unión de tipo no covalente.

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 β -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).

2.2.2. Alteraciones de la permeabilidad

En la membrana externa de *P. aeruginosa* se encuentran las proteínas porinas OprD que actúan como canales específicos permitiendo la entrada por difusión de aminoácidos básicos y de pequeños péptidos, entre los que se encuentran los antibióticos carbapenémicos, aunque no la de otros antibióticos β-lactámicos.

Por tanto, uno de los mecanismos de resistencia frente a los carbapenémicos en *P. aeruginosa* es la alteración o pérdida de la porina OprD. Esta es la principal vía de entrada del imipenem (aunque también permite el paso meropenem y doripenem); y estos antibióticos deben atravesar la pared celular para ejercer su acción

Las causas más frecuentes de inactivación mutacional del gen *oprD* son la presencia de inserciones/delecciones de un único nucleótido o las mutaciones puntuales que conllevan la formación de un codón de finalización prematuro (Gutiérrez, et al., 2007).

2.2.3. Presencia de integrones

La transmisión de genes que confieren resistencia a determinados antibióticos entre diferentes especies bacterianas, es un problema siempre creciente en el ámbito de las enfermedades infecciosas, y más aún si nos referimos a infecciones nosocomiales. Muchos genes de resistencia se localizan en plásmidos y/o transposones, de forma que se pueden transferir fácilmente entre diferentes cepas y especies de bacterias. Recientemente se ha descrito otro mecanismo mediante el que estos genes pueden ser transmitidos. En este caso participan en el proceso unas piezas de material genético denominadas integrones.

Los integrones son eficaces sistemas genéticos que acumulan genes (denominados cassetes génicos), principalmente de resistencia a antibióticos, permitiendo de esta manera el reconocimiento, captación, expresión y almacenamiento de nuevos mecanismos de resistencia. El proceso de integración de estos elementos se realiza mediante una recombinación genética específica de sitio. Los integrones están constituidos por dos regiones de DNA muy conservadas, situadas en sus extremos, que se denominan 5'-CS y 3'-CS (5' y 3' conserved segments). Los elementos principales, localizados en la región 5'-CS, que permiten la captura y expresión de los cassetes génicos son: un gen que codifica una integrasa, (*intI*); un lugar de recombinación sitio-específico, (*attI*); y un promotor (Pc). Este promotor permite la expresión de los genes insertados en su interior. En algunas ocasiones se puede encontrar un segundo promotor, en una zona cercana al primero, que incrementa el grado de transcripción y expresión de los genes. En la región variable entre los extremos 5' CS y 3' CS, se pueden insertar uno o más genes de resistencia a antibióticos. Éstos pueden ser muy variados y causar resistencia por diferentes mecanismos, como en el caso de los genes de resistencia a los aminoglucósidos, que son los más abundantes en *P. aeruginosa* y de los que se han identificado tres familias diferentes, subdivididas a su vez en varios grupos. Cada uno de los genes de estas familias codifica para una proteína diferente (acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas o fosfotransferasas). En el interior del integrón también se han encontrado genes de resistencia a trimetoprim, cloranfenicol y β-lactámicos. Hasta el momento se han identificado más de 40 genes de resistencia que pueden incluirse en la estructura del integrón. Además existen fragmentos de lectura abierta (ORF) cuya

función no se conoce todavía y que también pueden representar genes de resistencia a otras clases de antibióticos.

3. Factores de virulencia en *P. aeruginosa*

Existen diversos sistemas de regulación independientes, mediante los cuales, las bacterias pueden adaptar la producción de factores de virulencia a cada estadio de la infección. La presencia de estos factores de virulencia se ha relacionado con una mayor patogenicidad de *P. aeruginosa*, que unido a los altos niveles de resistencia a antibióticos dificulta su control.

3.1. Sistema QS

La comunicación bacteriana, tanto entre microorganismos de la misma especie como de especies distintas, ocurre a través de un sistema altamente desarrollado llamado quórum sensing (QS). QS es un mecanismo dependiente de la densidad celular a través del cual las bacterias coordinan diferentes actividades incluyendo bioluminiscencia, conjugación a través de plásmidos y producción de diferentes factores de virulencia. *P. aeruginosa* posee al menos dos sistemas quorum sensing (QS) bien definidos e interrelacionados, *las* y *rhl*, regulados por los factores transcripcionales LasR y RhIR respectivamente, que controlan la producción de factores de virulencia como elastasas (LasB y LasA), alcalinproteasa (AprA), rhamnosiltransferasa (RhlAB), exotoxina A (ExoA), cianuro de hidrógeno, superóxido dismutasa, etc.

LasI es la sintasa del autoinductor del sistema QS *las* y RhII es la sintasa del autoinductor del sistema QS *rhl*. Ambos inductores consisten en derivados acilados de lactonas de homoserina. Cuando los inductores de ambos sistemas QS alcanzan niveles críticos, activan a los reguladores, que en consecuencia, potencian la transcripción de los diferentes factores de virulencia. La expresión del sistema *las* se basa en estímulos ambientales como el hierro, la osmolaridad, y la disponibilidad de nitrógeno y oxígeno. Estos genes solo se expresan cuando se alcanza una alta densidad celular. Esta transcripción controlada de genes, en el curso de una rápida adaptación a un cambio medioambiental, es esencial para la supervivencia de las bacterias y para la promover la aparición de enfermedades crónicas (Béatrice, et al., 2005).

Entre estos factores de virulencia, se encuentra la exotoxina A, una enzima ADP-ribosil transferasa que modifica al factor de elongación 2 dentro de la célula eucariota dando lugar a la muerte celular. La elastasa (LasB o pseudolisin) y proteasa alcalina (AprA o aeruginolisin) son conocidas por degradar una amplia variedad de componentes tisulares, tales como elementos proteicos de tejidos conectivos, y por escindir receptores de neutrófilos de las superficies celulares, dando lugar a la inhibición de la quimiotaxis, la fagocitosis y el estrés oxidativo (Lomholt, et al., 2001). Además, la elastasa es capaz de degradar la elastina, la transferrina, el factor de necrosis tumoral α, la interleucina 2, componentes de la cascada del complemento, inmunoglobulinas G e inmunoglobulinas A; induciendo la inhibición de la unión de las células natural killer a las células diana; y la producción de interferón gamma por las células T, proporcionando así la base para una infección sostenida. La proteasa staphylolisin, también conocida como LasA, parece jugar un papel en la patogénesis de las infecciones corneales y pulmonares. Otra toxina producida por *P. aeruginosa* es la piocianina, un metabolito secundario con la capacidad de oxidar y reducir otras moléculas. Genera especies reactivas de oxígeno afectando a la cadena de transporte de electrones, transporte vesicular, y el crecimiento celular.

La formación de biofilms también juega un papel muy importante en la patogénesis de *P. aeruginosa*. Los biofilms son comunidades altamente estructuradas unidas a superficies bióticas o abióticas y rodeadas de un glicocálix. Dentro del huésped infectado, las biopelículas bacterianas son resistentes a las defensas del huésped y al tratamiento con antibióticos. *P. aeruginosa* forma biopelículas en diferentes tejidos infectados, incluyendo los pulmones de pacientes con fibrosis quística. El desarrollo del biofilm implica etapas específicas: la iniciación, la maduración y el desapego (Costerton, et al., 1999). Los sistemas QS de *P. aeruginosa* parecen estar implicados en las tres fases.

La importancia del sistema QS en la virulencia de *P. aeruginosa* ha sido demostrada por distintos grupos de investigación. Estudios realizados por Zhu, et al., (2004), defienden que un defecto en el gen *lasI* en *P. aeruginosa* conlleva a la reducción de la infección corneal, lo que sugiere que el sistema *las* juega un papel importante en la enfermedad corneal inducida por este microorganismo. Estos descubrimientos hacen de los genes del sistema QS dianas atractivas para la terapia antimicrobiana. Estrategias o agentes capaces de bloquear la producción de LasI pueden ser de utilidad en la prevención de la queratitis por *Pseudomonas*.

Por lo tanto, dado que los sistemas QS controlan la producción de diferentes factores de virulencia, es posible que la pérdida de uno o ambos sistemas comprometa severamente la capacidad de *P. aeruginosa* de causar infecciones en seres humanos.

3.2. Sistema de secreción tipo III

Otro determinante de virulencia importante es el sistema de secreción tipo III (TTSS), mediante el cual se produce la secreción de diversos factores de virulencia directamente en el citoplasma de las células del hospedador. El sistema TTSS consiste en tres complejos proteicos separados: el aparato de secreción en sí mismo, el aparato de translocación o focalización, y las toxinas secretadas y sus chaperonas afines (Ajayi, et al., 2003). Este sistema se expresa en respuesta a diversas señales ambientales, incluyendo bajas concentraciones de calcio, algunos componentes presentes en el suero y el contacto con las superficies celulares eucariotas. Las proteínas efectoras son dos ADP-ribosiltransferasas (ExoS y ExoT), una adenililciclasa (ExoY) y un factor citolítico con actividad fosfolipasa A (ExoU). Estos efectores son capaces de alterar el curso de una gran variedad de procesos celulares para permitir la supervivencia y proliferación del patógeno, y en consecuencia el desarrollo de la infección.

ExoU ha sido caracterizada como un miembro de la familia de enzimas fosfolipasa A, poseyendo al menos actividad fosfolipasa A2. Los efectos biológicos de la expresión mínima de ExoU en levaduras pueden ser visualizados como daño en la membrana de diferentes orgánulos y fragmentación de la vacuola. En células de mamífero, la inyección directa de ExoU causa daño irreversible en las membranas celulares y muerte necrótica rápida (Sato & Frank, 2001). ExoY es una proteína adenilato ciclasa que incrementa los niveles de AMPc provocando desarreglos sobre el citoesqueleto. ExoS y ExoT son toxinas bifuncionales que poseen la capacidad de activar proteínas GTPasa y además presentan actividad ADP-ribosiltransferasa; ambas funciones se encuentran codificadas en dominios funcionalmente separables. Las dos toxinas inducen la apoptosis de células epiteliales y macrófagos y se ha visto que la toxina ExoS inhibe la actividad fagocítica de los macrófagos.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido realizar una vigilancia activa de niños colonizados intestinalmente por *P. aeruginosa*. La prevalencia se calculó de todas las muestras de heces de niños (< 15 años) con sospecha de gastroenteritis aguda enviadas al laboratorio del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa durante 5 meses.

Una vez conocida la prevalencia de colonización, se realizaron las siguientes actividades:

- Estudiar la sensibilidad de estas cepas a diferentes antibióticos, detectando posibles mecanismos de resistencia adquiridos.
- Caracterizar las enzimas implicadas en dicha resistencia, analizando la presencia de metalo-β-lactamasas (MBLs) y carbapenemasas de tipo A.
- Detectar posibles alteraciones en el gen *oprD*.
- Analizar la presencia de integrones de las clases 1, 2 y 3 que pudieran albergar dichos genes de resistencia.
- Identificar la presencia de determinados factores de virulencia presentes en *P. aeruginosa* y su posible relación entre virulencia y resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras estudiadas

Se procesaron 966 muestras de heces pertenecientes a 770 pacientes no hospitalizados entre el 1 de junio y el 31 de octubre de 2013 en la sección de Coprocultivos del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Lozano Blesa. La mayoría de las muestras pertenecían a niños con gastroenteritis aguda.

Los coprocultivos o cultivo microbiológico de heces fueron sembrados en cuatro medios de cultivo diferentes: 1) Agar MacConkey, 2) Agar Hektoen, 3) Agar CIN, y 4) Agar XLD tras enriquecimiento en medio líquido selenito, y 5) Agar CCDA (charcoal-cefazolin-deoxicholate agar) (Oxoid), medio selectivo que se utiliza habitualmente para la detección de *Campylobacter spp.* Dicho medio contiene 32 mg/L de cefoperazona (cefalosporina de 3^a generación). *Pseudomonas* es resistente a cefoperazona pudiendo utilizar este medio para recuperarlas. Todas las *Pseudomonas* que crecieron fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas.

Se sembraron tres tubos para su identificación:

1) Medio Kligler o KIA (Kligler Iron Agar). Se utiliza para realizar la prueba de la lactosa, glucosa, gas y SH2. La fermentación de la lactosa y la glucosa se detectan mediante un cambio de color de naranja a amarillo (la primera se observa en la parte superior del tubo y la segunda en la parte inferior).

2) Medio SIM. Se usa para determinar la producción de SH2, de indol (se revela con el reactivo de Erhlich) y la movilidad (se manifiesta como una turbidez en el tubo).

3) Medio lisina. Este medio se basa en la capacidad de utilización de la bacteria del aminoácido Lisina, según posea las enzimas lisina-descarboxilasa (se observa en la parte superior del tubo) y lisina-desaminasa o deshidrogenasa (en la parte inferior). El viraje a color morado será positivo, y si es a amarillo, negativo.

Se realizó la prueba de la citocromo oxidasa:

La **prueba de oxidasa** es una prueba usada en microbiología para determinar si una bacteria produce alguna de las citocromo c oxidasas. La prueba hace uso de discos impregnados con el reactivo N,N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamina (o TMFD) o N,N-Dimetil-p-fenilendiamina (o DMFD), el cual también es un indicador redox. El reactivo pasa de azul oscuro a granate al ser oxidado, y se vuelve transparente al ser reducido. Las bacterias oxidasa positiva poseen citocromo oxidasa o indofenol oxidasa (una hemoproteína). Ambas catalizan el transporte de electrones de compuestos donantes (NADH) a receptores de electrones (por lo general el oxígeno). En la prueba, el reactivo TMFD actúa como donante artificial de electrones para la enzima oxidasa. El reactivo oxidado forma el compuesto coloreado de indofenol azul. El sistema citocromo está normalmente presente solo en los organismos aerobios capaces de usar el oxígeno como acceptor final de hidrógeno. El producto final de este metabolismo puede ser agua o peróxido de hidrógeno.

2. Aislamientos seleccionados para el estudio

Se han seleccionado 42 cepas de *P. aeruginosa* para el estudio de sensibilidad a los antibióticos y de los genes de virulencia.

3. Determinación de la sensibilidad a los antibióticos: antibiogramas.

Una vez que fueron identificadas las *Pseudomonas* como *P. aeruginosa* se les realizó un estudio de las resistencias de dichas cepas a 13 antibióticos diferentes, así como de los fenotipos del gen *oprD* y de las MBL mediante el método de microdilución (MicroScan WalkAway Siemens) y a través del test de sinergia de doble disco o disco-placa

Permite determinar el grado de sensibilidad de una cepa bacteriana a una serie de antimicrobianos y así orientar al posible tratamiento de los pacientes de los que proceda la muestra, evitando o minimizando el riesgo de fracaso terapéutico. La detección de estas enzimas se basa en su capacidad de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, disminuyendo por tanto la sensibilidad de la bacteria a estos antibacterianos.

Método de microdilución:

Se diluyen diversos antimicrobianos en caldo Muller-Hinton suplementado con calcio y magnesio hasta concentraciones que abarcan el intervalo de interés clínico. Los paneles combinados de punto de corte emplean concentraciones equivalentes a los puntos de corte interpretativos de CLSI. Después de la inoculación y rehidratación con una suspensión estandarizada del microorganismo y la incubación a 35° C durante un periodo mínimo de 16 horas, la concentración mínima inhibitoria (CIM) para el microorganismo se determina por la observación de la concentración antimicrobiana más baja que presente inhibición del crecimiento.

Los antibióticos analizados en el panel de microdilución fueron los siguientes: peracilina-tazobactam, ticarcilina, aztreonam, ceftazidima, cefepime, gentamicina, ciprofloxacino, imipenem, meropenem, tobramicina, amikacina, levoflaxacino y colistina. Este método detecta las resistencias que presentan las cepas estudiadas de *P. aeruginosa* a los 13 antibióticos nombrados y permite también el estudio del fenotipo del gen *oprD* de dichas cepas, atendiendo a los resultados obtenidos de los antibióticos imipenem y meropenem.

E-test de imipenem (IP)/imipenem + EDTA (IPI):

Se prepara un inóculo de la cepa a estudio con una dilución de 0.5 en la escala de McFarland y se siembra de forma homogénea en una placa de agar Mueller-Hinton (Biomerieux). A continuación se coloca una tira rectangular impregnada con el antibiótico a estudiar: en un extremo contiene imipenem (IP) y en el otro imipenem con EDTA (IPI), a una concentración conocida. El antibiótico difundirá en un gradiente radial alrededor de la tira. La placa se incuba a 37°C durante 18 horas. El microorganismo crecerá en la placa y si es sensible al antibiótico se formará un halo de inhibición o sin crecimiento alrededor de la tira. Esa distancia se mide en mm y nos da su concentración mínima inhibitoria (CMI). Si la bacteria a estudio es resistente, se pone de manifiesto en una disminución de los halos de inhibición.

Esta técnica, además, nos permite observar el efecto sinérgico producido por la presencia de la sustancia inhibitoria EDTA. Por diferencia entre los valores de CMI de imipenem sin y con inhibidor se puede inferir la presencia de las carbapenemas.

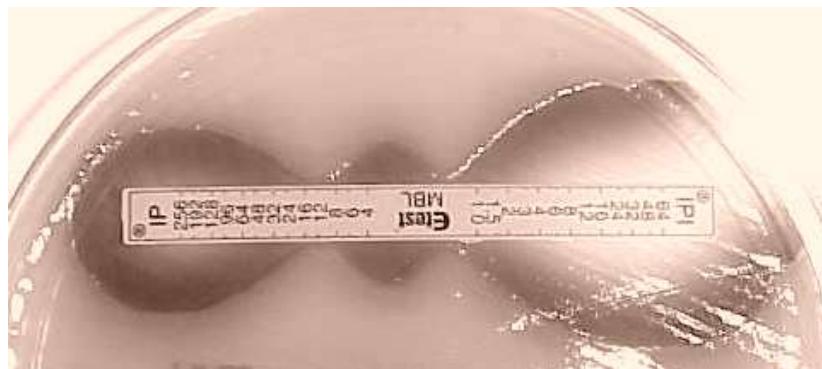


Ilustración 2. E-test de imipenem (IP)/imipenem + EDTA (IPI).

Se emplean los puntos de corte de *P. aeruginosa* propuestos por EUCAST para todas las especies de *Pseudomonas* aisladas en este trabajo.

4. Detección molecular de genes de resistencia y de genes de virulencia

La detección molecular de los genes de resistencia se realizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucléico) de forma in vitro.

El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar.

Estos fragmentos servirán como cebadores o primers para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. La técnica de PCR se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos:

4.1. Extracción de DNA

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.

1. Resuspender aproximadamente 1/2 asa de colonias en 1 ml de agua en un eppendorf para lavar las colonias.
2. Centrifugar 1 minuto a 14.000 rpm. Desechar sobrenadante.
3. Añadir 200 µl de InstaGene matrix al pellet y mezclarlo bien con la pipeta. Incubar a 56°C durante 20 minutos. InstaGene matrix consiste en una solución de perlas microscópicas cargadas negativamente que se unen a cationes divalentes como el magnesio. Es importante eliminar cationes divalentes de la solución de DNA genómico porque los cationes actúan como catalizadores de la enzima en la degradación del ADN.
4. Vortear 10 segundos y hervir (100°C) durante 8 minutos. De este modo los cationes divalentes liberados se unen a las perlas de InstaGene matrix.
5. Vortear 10 segundos. Centrifugar a 12-14.000 rpm durante 5 minutos. Permite la sedimentación y separación de las perlas.
6. Recoger el sobrenadante, que contiene el DNA genómico intacto limpio.

Al acabar la extracción se mide la concentración de DNA. En caso necesario se diluye la misma ya que el exceso de DNA inhibe la PCR.

4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que se utiliza para amplificar *in vitro* un fragmento específico de DNA que está localizado entre dos regiones de secuencia conocida. El proceso se lleva a cabo cíclicamente en un termociclador y cada ciclo está dividido temporalmente en tres fases:

- Desnaturalización: separación de las hebras de DNA.
- Hibridación: unión de los cebadores con las secuencias diana para que se inicie la síntesis de la cadena complementaria.
- Polimerización: la polimerasa sintetizará las cadenas complementarias monocatenarias.

Debido a que los productos de un ciclo completo sirven como moldes para el segundo, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de producto de DNA, obteniendo al final del proceso un número de moléculas de DNA de 2^x , siendo X el número de ciclos realizados.

La PCR requiere tres componentes básicos: el DNA molde de doble cadena del cual queremos amplificar un segmento específico, los 2 “primers” o cebadores que determinan la

región a amplificar y la DNA polimerasa. Además son necesarios desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) para producir nuevo DNA y un tampón que proporcione las condiciones adecuadas de pH y fuerza iónica. Cada muestra de DNA amplificada, tanto las correspondientes al análisis de resistencia a antibióticos como las procedentes del estudio de los genes de virulencia requiere unas condiciones de amplificación específicas.

Cebadores (5'-3')	Condiciones de amplificación			Referencia y tamaño de amplicón
<i>oprD</i> F: CTACGCAGATGCGACATGC R: CCTTTATAGGCGCGTTGCC	95°C 5 min 95°C 1 min 56°C 1 min 72°C 4 min 72°C 8 min	1 ciclo 35 ciclos 1 ciclo		Wolter, D.J. et al., (2004) y Gutiérrez, O. et al., (2007) (1561 bp)
<i>intI1</i> F: GGGTCAAGGATCTGGATTTCG R: ACATGGGTGTAAATCATCGTC	94°C 5 min. 94°C 30sg 62°C 30sg 72°C 1 min 72°C 8 min	1 ciclo 30 ciclos 1 ciclo		Mazel et al., (2000) (483 bp)
<i>intI2</i> F: CACGGATATGCGACAAAAAGGT R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C 5 min 94°C 30sg 62°C 30sg 72°C 1 min 72°C 8 min	1 ciclo 30 ciclos 1 ciclo		Mazel et al., (2000) (788bp)
<i>intI3</i> F: GCCTCCGGCAGCGACTTCAG R: ACGGATCTGCCAACCTGACT	94°C 5 min 94°C 30sg 62°C 30sg 72°C 1 min 72°C 8 min	1 ciclo 30 ciclos 1 ciclo		Mazel et al., (2000) (979bp)

Tabla 1. Condiciones PCR uniplex genes de resistencia a antibióticos.

PCR	Tamaño amplicón	Condiciones de amplificación	Referencia
GES-1 to GES-9, GES-11 to GES-15 F: GCTTCATTACCGCACTATT R: CGATGCTAGAACCGCTC	323		
IMI-1, IMI-2, NMC-A F: TGCGGTCGATTGGAGATAAA R: CGATTCTGAAGCTCTGCG	399	94°C 5 min 94°C 30sg 55°C 30sg 72°C 1 min	SG Hong, SK Hong, JY Huh, MS Kang (2010)
SME-1 to SME-3 F: ACTTGATGGGAGGGATTGGC R: ACGAATTGAGCATCACCAAG	551	72°C 7 min	
KPC-2 to KPC-10 F: GTATGCCGTCTAGTTCTGC R: GGTCGTGTTCCCTTAGCC	638	1 ciclo 25 ciclos 1 ciclo	

Tabla 2. Condiciones PCR multiplex Carbapenemasas clase A.

PCR	Tamaño amplicón	Condiciones de amplificación	Referencia
Imp F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC R: CCAAACYACTASGTTATC	188	94°C 5 min	
Vim F: GATGGTGTGGTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAAG	390	1 ciclo 94°C 30sg 52°C 40sg 72°C 50sg	Ellington, Kistler J, Livermore DM, Woodford N, (2007)
Gim	477	36 ciclos 72°C 5 min	

F: TCGACACACCTTGGTCTGAA R: AACTCCAACCTTGCCATGC			
Spm F: AAAATCTGGGTACGAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	271		
Sim R: TACAAGGGATTCCGCATCG F: TAATGCCCTGTTCCCATGTG	570		

Tabla 3. Condiciones PCR multiplex MBLs.

Cebadores (5'-3')	Condiciones de amplificación			Referencia y tamaño de amplicón
exoU F: ATGCATATCCAATCGTTG R: TCATGTGAACCTCCTTATT	94°C 3 min	1 ciclo		S.M.C. Petit et al., (2013)
	94°C 30sg			(2000 bp)
	55°C 30sg	40 ciclos		
	72°C 2 min			
	72°C 5 min	1 ciclo		
exoS F: GCGAGGTCAGCAGAGTATCG R: TTCGGCGTCACTGTGGAT	94°C 3 min	1 ciclo		Ajaiy et al., (2003)
	94°C 30sg			(118 bp)
	60°C 30sg	40 ciclos		
	72°C 2 min			
	72°C 5 min	1 ciclo		
exoY F: CGGATTCTATGGCAGGGAGG R: GCCCTTGATGCACTCGACCA	94°C 3 min.	1 ciclo		Ajaiy et al., (2003)
	94°C 30sg			(289 bp)
	60°C 30sg	40 ciclos		
	72°C 2 min			
	72°C 5 min	1 ciclo		
exoT F: AATCGCCGTCCTAACACTGCATGCG R: TGTTGCCGAGGTACTGCTC	94°C 3 min.	1 ciclo		Ajaiy et al., (2003)
	94°C 30sg			(152bp)
	60°C 30sg	40 ciclos		
	72°C 2 min			
	72°C 5 min	1 ciclo		
exoA F: GACAACGCCCTCAGCATCACCAAGC R: CGCTGGCCCATTGCTCCAGCGCT	94°C 3 min	1 ciclo		Khan and Cerniglia (1994)
	94°C 30sg			(396bp)
	60°C 30sg	40 ciclos		
	72°C 2 min			
	72°C 5 min	1 ciclo		
lasA F: CGCCATCCAACCTGATGCAAT R: AGGCCGGGGTTGTACAACGGA	94°C 3 min	1 ciclo		Lomholt et al., (2001)
	94°C 30sg			(514bp)
	60°C 30sg	40 ciclos		
	72°C 2 min			
	72°C 5 min	1 ciclo		
aprA F: ACCCTGTCTATTGTTCC R: GATTGCAGCGACAACCTGG	94°C 3 min	1 ciclo		Zhu et al., (2004)
	94°C 30sg			(140bp)
	55°C 30sg	40 ciclos		
	72°C 2 min			
	72°C 5 min	1 ciclo		
rhlAB F: TCATGGAATTGTCACAACCGC R: ATACGGCAAAATCATGGCAAC	94°C 3 min	1 ciclo		Zhu et al., (2004)
	94°C 30sg			(151bp)
	60°C 30sg	40 ciclos		
	72°C 2 min			
	72°C 5 min	1 ciclo		
rhlI F: CTTGGTCATGATCGAATTGCTC R: ACGGCTGACGACCTCACAC	94°C 3 min	1 ciclo		Schaber et al., (2004)
	94°C 30sg			(625bp)
	60°C 30sg	40 ciclos		

	72°C	2 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>rh/R</i> F:CAATGAGGAATGACGGAGGC R:GCTTCAGATGAGGCCAGC	94°C 94°C 60°C 72°C 72°C	3 min 30sg 30sg 2 min 5 min	1 ciclo 40 ciclos 1 ciclo	Schaber et al., (2004) (730bp)
<i>lasI</i> F:ATGATCGTACAAATTGGTCGGC R:GTCATGAAACGCCAGTCG	94°C 94°C 60°C 72°C 72°C	3 min 30sg 30sg 2 min 5 min	1 ciclo 40 ciclos 1 ciclo	Schaber et al., (2004) (605bp)
<i>lasR</i> F:CGGGTATCGTACTAGGTGCATCA R:GACGGGAAAGCCAGGAAACTT	94°C 94°C 60°C 72°C 72°C	3 min 30sg 30sg 2 min 5 min	1 ciclo 40 ciclos 1 ciclo	S.M.C. Petit et al., (2013) (1100bp)

Tabla 4. Condiciones PCR genes de virulencia. Todas las PCR tuvieron unas condiciones de extensión de 1 ciclo de 5 min a 72°C.

Preparación de la master-mix

Para calcular la cantidad de producto necesario para la PCR se ha de multiplicar los cálculos necesarios por muestra por el número total de muestras a estudiar, añadiendo siempre la cantidad de reactivos necesaria para dos muestras más, una para el control positivo y otra para el marcador de pesos moleculares.

- Descongelar el tampón de reacción, los nucleótidos y los primers.
- Preparación de la master-mix y repartición en los tubos de eppendorf del volumen de master-mix correspondiente en cada caso.
- Añadir la muestra (volumen DNA) a los eppendorf.
- Colocación de los tubos en el termociclador. Se establecen las condiciones de la reacción de amplificación.

Componentes (casa comercial)	Volumen por tubo (<i>oprD</i>)	Volumen por tubo (<i>intI1</i>)	Volumen por tubo (<i>intI2</i>)	Volumen por tubo (<i>intI3</i>)	Volumen por tubo (Genes vir)	Volumen por tubo (Carba A)	Volumen por tubo (MBLs)
Tampón de reacción NH₄ (Bioline)	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	2,5 µL	5 µL	5 µL
Mg²⁺ (Bioline)	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	0,75 µL	1,5 µL	1,5 µL
dNTPs mix (Promega)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	0,5 µL	0,5 µL	1 µL
Primer Fw (Sigma Aldrich)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	0,5 µL (cada primer)	0,5 µL (cada primer)	1 µL (cada primer)
Primer Rv (Sigma Aldrich)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	0,5 µL (cada primer)	0,5 µL (cada primer)	1 µL (cada primer)
BIOTAQ™DNA Polimerasa (Bioline)	0,5 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,15 µL	0,1 µL	0,3 µL
Agua miliQ estéril	30 µL	30,2 µL	30,2 µL	30,2 µL	22,2 µL	11,9 µL	22,2 µL
DNA	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	7 µL	10 µL
Volumen total	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	30 µL	50 µL

Tabla 5. Condiciones master-mix PCR uniplex genes de resistencia a antibióticos, PCR multiplex Carba A y MBL y PCR uniplex genes de virulencia.

4.3. Electroforesis en geles de agarosa

Electroforesis en geles de agarosa

Se trata de una técnica utilizada para separar, identificar y aislar fragmentos de DNA a partir de una mezcla heterogénea. Se basa en la migración unidireccional del DNA a través de una matriz porosa cuando se le aplica un campo eléctrico. A pH neutro, el DNA tiene carga negativa, lo que comporta su migración desde el polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). Los factores determinantes de la movilidad son: longitud del DNA, conformación estructural del DNA, fuerza iónica del tampón, porosidad del gel y corriente eléctrica aplicada. La visualización de los fragmentos de DNA se consigue mediante la incorporación al gel de un colorante fluorescente, el bromuro de etidio, que se intercala entre las dos cadenas de DNA. Este reactivo revela la presencia de una banda de DNA al ser iluminada con luz ultravioleta de longitud de onda corta (310 nm).

Preparación de un gel de agarosa

La agarosa, coloide natural que se extrae de las algas, es un polisacárido lineal formado por la repetición de la unidad básica agarobiosa, que comprende unidades alternadas de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa. La concentración de agarosa que se utiliza está condicionada por el tamaño de los fragmentos de DNA a separar. Los geles de agarosa se han preparado según se describe a continuación:

- a. Se mezcla la cantidad correspondiente de agarosa en TBE (Tris 0.44M, ácido bórico 0.44M, EDTA 12.5Mm pH 8) y se lleva a ebullición para su total disolución.
- b. Se deja enfriar y se añade una solución acuosa de bromuro de etidio.
- c. Se vierte la solución en una cubeta de electroforesis previamente sellada y con el correspondiente peine y se deja solidificar.
- d. Se retira el peine sin dañar los pocillos. Se coloca el gel en la cubeta de electroforesis llena de tampón TBE asegurando que cubra el gel.
- e. La muestra a incorporar en los pocillos se prepara mezclando el DNA obtenido tras la amplificación con la solución de carga. En el primer pocillo se carga con marcador de peso molecular, 100bp DNA Ladder RTU de NIPPON genetics EUROPE, que separa en un rango de 100 a 3.000 pb, el segundo con el control positivo, y el resto de pocillos con las muestras de DNA.
- f. Las condiciones de electroforesis son a 90V durante aproximadamente 1 hora y 20 minutos con el fin de que las bandas queden bien separadas y el gel se visualiza en un transiluminador con luz ultravioleta (310nm).

Gen analizado por PCR	% agarosa del gel	Control + empleado
<i>oprD</i>	0,8	Ninguno
<i>intI1</i>	1	W1058
<i>IntI2</i>	1	Co1 (28D)
<i>IntI3</i>	1	Ninguno
Genes virulencia	1	Ps359 (excepto ExoU)
Carba A	2	Ges, Imi y Kpc
MBLs	2	W37 y W891

Tabla 6. Porcentajes de agarosa y controles empleados en las PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han incluido en el estudio un total de 42 aislados de *P. aeruginosa* procedentes de 966 muestras de heces de 770 portadores sanos. El 5,45% estaban colonizados.

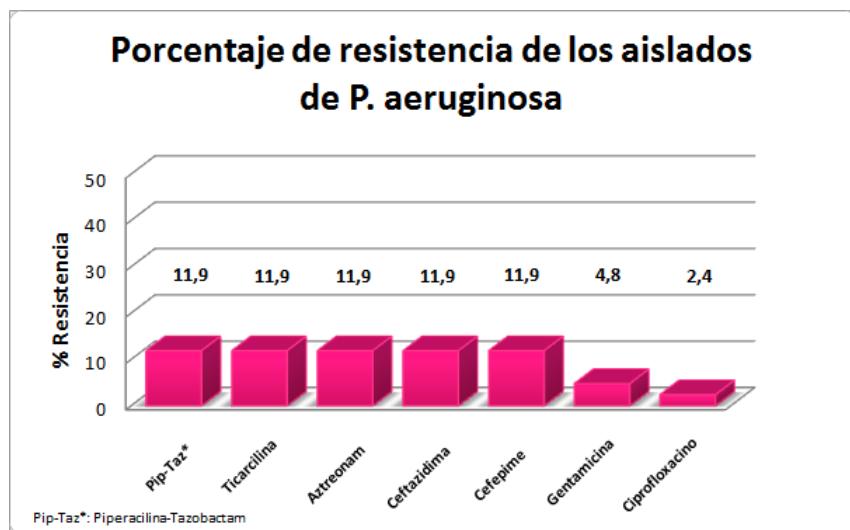
1. Análisis de resistencias a antibióticos en *P aeruginosa*.

Para estudiar la sensibilidad de estas cepas frente a distintos antibióticos y los fenotipos del gen *oprD* y de las MBL se habían realizado el método de microdilución en caldo y el E-test de sinergia con EDTA. Los resultados obtenidos del estudio de la resistencia de las cepas de *P. aeruginosa* a los 13 antibióticos testados se muestran en la siguiente tabla:

Nº CEPA (PC)	IMI	MER	PTZ	TIC	ATM	CAZ	CEP	GM	NN	AK	CIP	LVX	CL
1	8	4	<=8	16	4	4	2	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
2	<=1	<=1	<=8	32	4	2	4	8	<=2	16	1	<=1	<=2
3	<=1	<=1	<=8	32	4	2	2	8	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2
4	<=1	<=1	<=8	16	4	2	2	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
5	<=1	<=1	<=8	16	4	2	2	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
6	<=1	<=1	<=8	<=8	2	<=1	2	<=1	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
7	4	<=1	>64	16	4	<=1	4	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
8	<=1	<=1	<=8	16	4	2	4	8	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
9	2	<=1	<=8	<=8	2	<=1	2	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
10	2	4	<=8	16	>16	>32	>16	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
11	8	2	<=8	32	4	8	4	>8	4	32	<=0,5	<=1	4
12	2	<=1	<=8	<=8	2	<=1	4	8	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2
13	<=1	<=1	<=8	16	8	4	2	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
14	<=1	<=1	<=8	32	4	<=1	2	4	<=2	<=8	<=0,5	2	<=2
15	<=1	<=1	<=8	16	4	4	2	2	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2
16	<=1	<=1	<=8	32	4	2	2	4	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2
17	<=1	<=1	<=8	16	4	2	4	4	<=2	<=8	<=0,6	<=2	<=2
18	<=1	<=1	<=8	16	4	<=1	4	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
19	<=1	<=1	<=8	32	4	2	2	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
20	<=1	<=1	<=8	<=8	2	<=1	<=1	<=1	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
21	<=1	<=1	<=8	16	4	4	2	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
22	<=1	<=1	<=8	16	4	<=1	4	4	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2
23	<=1	<=1	<=8	16	4	4	2	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	4
24	<=1	<=1	<=8	<=8	2	<=1	2	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
25	<=1	<=1	<=8	16	8	4	4	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
26	<=1	<=1	16	32	4	8	4	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
27	4	<=1	<=8	32	8	<=1	2	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
28	<=1	<=1	16	32	4	8	2	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
29	<=1	<=1	<=8	16	4	<=1	2	4	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2
30	<=1	<=1	<=8	16	4	<=1	<=1	>8	<=2	<=8	>2	2	<=2
31	4	2	>64	>32	>16	>32	>16	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
32	8	4	<=8	16	4	<=1	2	4	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2
33	4	<=1	>64	>32	>16	>32	>16	4	<=2	16	<=0,5	<=1	4
34	<=1	<=1	<=8	32	8	2	2	4	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2
35	<=1	<=1	<=8	16	4	2	4	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
36	2	<=1	<=8	16	4	8	2	2	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
37	<=1	<=1	<=8	>32	4	4	4	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
38	2	<=1	16	16	8	8	4	4	<=2	16	1	<=1	<=2
39	2	<=1	>64	>32	>16	>32	>16	4	<=2	16	<=0,5	<=1	>4*
40	2	2	<=8	32	16	2	16	8	<=2	16	<=0,5	<=1	4
41	2	<=1	<=8	32	16	2	2	4	<=2	<=8	<=0,5	<=1	<=2
42	2	2	>64	>32	>16	>32	>16	8	<=2	16	<=0,5	<=1	<=2

Tabla 7. Datos obtenidos de los antibiogramas disco-placa realizados acerca de la resistencia de las 42 cepas estudiadas a distintos antibióticos. * Imipenem (IMI), meropenem (MER), piperacilina-tazobactam (PTZ), ticarcilina (TIC), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), cefepime (CEP), gentamicina (GM), tobramicina (NN), amikacina (AK), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LVX), colistina (CL).

Los porcentajes de resistencia a los antibióticos detectados en los 42 aislados fueron: piperacilina-tazobactam (11,9%), ticarcilina (11,9%), aztreonam (11,9%), ceftazidima (11,9%), cefepime (11,9%), gentamicina (4,8%) y ciprofloxacino (2,4%). Todos los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem, tobramicina, amikacina, levoflaxacino y colistina.



Gráfica 1. Porcentaje de resistencia de los aislados de *P. aeruginosa*.

En un estudio multicéntrico español sobre 1.014 cepas procedentes de 136 hospitales se comprobó que ninguno de los antimicrobianos evaluados era activo frente a todos los aislados. Las tasas de resistencia para los principales compuestos fueron: piperacilina-tazobactam 7%, meropenem 8%, amikacina 9%, tobramicina 10%, imipenem 14%, ceftazidima 15%, cefepima 17%, aztreonam y ciprofloxacino 23% y gentamicina 31% (Eliecer, et al., 2007).

En este estudio español las cepas procedían de enfermos hospitalizados, sin embargo, en nuestro trabajo los aislados procedían de niños menores de cinco años no hospitalizados. Aunque todos los aislados fueron sensibles a seis de los antibióticos testados, hubo un porcentaje de las cepas que presentaba resistencias de hasta un 11,9% para algunos de los antimicrobianos. Dados estos resultados, parece ser que estas cepas son más sensibles al tratamiento antimicrobiano que las analizadas en el estudio multicéntrico español, sin embargo hay que tener en cuenta que en ese estudio se trataban cepas clínicas, y en este caso es probable que las cepas de *P. aeruginosa* procedieran de fuentes ambientales.

P. aeruginosa compromete la selección de antibióticos apropiados para el tratamiento de distintas enfermedades, debido a su gran capacidad para desarrollar fenotipos resistentes a múltiples fármacos, incluso durante el curso del tratamiento de una infección. A pesar de que probablemente los aislamientos obtenidos en nuestro trabajo procedían de fuentes ambientales, parece ser que algunos de ellos se habían enfrentado a la presión antibiótica, dado que no eran sensibles a algunos de los antibióticos probados.

Por otro lado, el imipenem tiene la capacidad de seleccionar durante el tratamiento cepas que muestran mutaciones en la porina OprD, que demuestran disminución de la afinidad y el transporte de este antibiótico a través de esta proteína. Estas cepas mutantes muestran un aumento de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para imipenem, lo que las hace francamente resistentes a este carbapenémico. Con respecto a meropenem, estas cepas

mutantes también han demostrado un aumento de la CMI a valores, que si bien no demuestran resistencia, si revelan disminución de la sensibilidad. Observando los resultados obtenidos en el método de microdilución se puede concluir que ninguna de las 42 cepas estudiadas de *P. aeruginosa* parece presentar alteraciones en la porina, dado que todas ellas son sensibles tanto al antibiótico imipenem, como al meropenem. Sin embargo, dado que los métodos fenotípicos pueden no ser completamente sensibles ni específicos, la confirmación definitiva de estos resultados se lleva a cabo utilizando métodos moleculares, como la PCR.

También se había realizado el E-test de sinergia de EDTA para analizar los fenotipos MBLs (metalo-β-lactamasas) de las cepas de *P. aeruginosa*. Este test se basa en la capacidad del EDTA de inhibir a las carbapenemasas de tipo B (MBLs) por lo que potencia el efecto inhibitorio del antibiótico imipenem. En ninguna de las 42 placas sembradas se observó una sinergia destacable como para indicar la presencia de esas enzimas (se considera como punto de corte una disminución de la CMI de 3 o más diluciones). Por lo tanto, aparentemente estas cepas carecen de MBLs, sin embargo estos resultados se deben confirmar con un análisis por PCR.

2. Estudio de genes que proporcionan resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*.

Para estudiar posibles mecanismos de resistencia adquiridos por parte de estas cepas bacterianas se había procedido a la caracterización de las enzimas implicadas, como la presencia de metalo-β-lactamasas y carbapenemasas de tipo A, así como al estudio de posibles alteraciones en el gen *oprD* y a la presencia de integrones de las clases 1, 2 y 3 que pudieran albergar dichos genes de resistencia. Aunque para algunos de estos genes ya se había llevado a cabo una detección fenotípica, estos métodos no son completamente sensibles ni específicos y en ciertos casos tienen una difícil interpretación, con frecuencia subjetiva. Por ello también se emplean métodos moleculares como la PCR, que proporcionan resultados de forma rápida y fiable.

Pc	<i>oprD</i>	CarbaA	MBL	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	<i>intI3</i>	Pc	<i>oprD</i>	CarbaA	MBL	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	<i>intI3</i>
1	+	-	-	-	-	-	22	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	23	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	24	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	25	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	26	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	27	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	28	+	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-	29	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	30	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	31	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-	32	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	33	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	34	*	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	35	+	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	36	+	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	37	+	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	38	+	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-	39	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	40	+	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-	41	+	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	42	+	-	-	-	-	-

Tabla 8. Datos obtenidos de las PCR de los genes de resistencia a antibióticos para cada cepa estudiada de *P. aeruginosa*.

No se encontraron genes que codifican para la producción de metalo-β-lactamasas ni se observaron alteraciones en el gen *oprD* que codifica para la proteína porina, por lo tanto estos

resultados confirmaban los previamente obtenidos mediante los análisis fenotípicos realizados de sensibilidad a antibióticos. Tampoco se detectaron carbapenemas de tipo A en ninguno de los 42 aislados de *P. aeruginosa*, ni la presencia de integrones de clase 1, 2 ó 3.

En un estudio que se publicó en el año 2014 realizado en Logroño por el grupo de investigación B. Rojo-Bezares et al., se analizaba la resistencia de *P. aeruginosa* a carbapenems, mediante la caracterización de metalo-β-lactamasas, integrones de las clases 1 y 2 y de la porina OprD. Partiendo de 87 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems procedentes de pacientes hospitalizados mayores de 64 años (la mayoría de ellos en la Unidad de Cuidados Intensivos) se obtuvieron los siguientes resultados. Por un lado, se detectó el fenotipo MBL en 43 de las cepas analizadas (49,4%), y en todas estas cepas MBL+ se encontró el gen *bla_{VIM-2}*, que codifica para una carbapenemasa de tipo B (MBL). Por otro lado, el gen *oprD* fue amplificado en 82 de las 87 cepas. Los cambios de aminoácidos más frecuentes del loop L1 se identificaron en un 37,8% de las cepas (en 20 cepas productoras de MBL y 11 no productoras de MBL). Además, un total de 58 cepas (70,7%) mostraban un codón stop prematuro, debido a inserciones, delecciones o mutaciones puntuales que modificaban el tamaño esperado de la proteína porina. Por otro lado, se detectó la presencia de integrones de clase 1 en 65 de los 87 aislados, pero ninguno de ellos contenía integrones de clase 2. En 32 de estas 65 cepas se encontró la presencia de más de un integrón (49,2%). Las 43 cepas MBL+ contenían el gen *bla_{VIM-2}* dentro de los integrones de clase 1 (Rojo-Bezares, et al., 2014).

Estos datos reflejan un elevado porcentaje de adquisición de genes que proporcionan resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* en comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio. No obstante, en este artículo se están tratando cepas clínicas aisladas de personas hospitalizadas, la mayoría padecen enfermedades graves siendo necesario su ingreso en la UCI. En nuestro trabajo se estudiaban cepas de portadores no hospitalizados, y por lo tanto, estas cepas son mucho menos patógenas y no han adquirido estos mecanismos de resistencia a antimicrobianos. Sin embargo, es conveniente realizar este tipo de análisis para ir observando cómo evolucionan tanto las cepas clínicas como las cepas ambientales o no clínicas de *P. aeruginosa* y su posible adquisición de diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, en los distintos ambientes en los que se encuentran.

3. Estudio de genes que codifican factores de virulencia en *P. aeruginosa*.

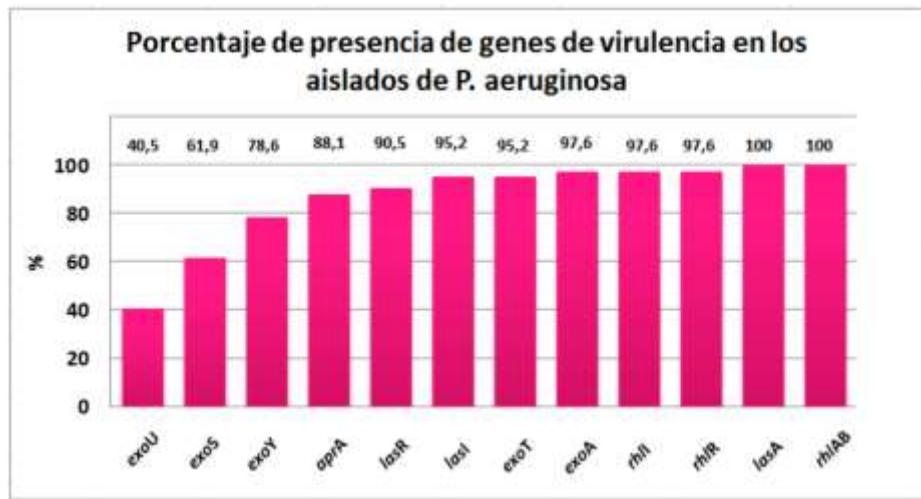
Por otro lado, se había estudiado la virulencia de estas cepas analizando la presencia de genes que codifican proteínas de virulencia que aumentan la patogenicidad de estas cepas.

Pc	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	<i>exoU</i>	<i>exoA</i>	<i>aprA</i>	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlR</i>	<i>rhlAB</i>	<i>lasA</i>
1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS
2	NEG	POS	POS									
3	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS
4	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
5	NEG	NEG	POS	POS								
6	POS	POS	POS	NEG	POS	POS						
7	NEG	NEG	POS	POS								
8	POS	POS	POS	NEG	POS	POS						
9	POS	POS	POS	NEG	POS	POS						
10	POS	POS	POS	NEG	POS	POS						
11	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS						
12	POS	POS	POS	NEG	POS	POS						
13	POS	POS	POS	NEG	POS	POS						

14	NEG	POS										
15	POS	POS	POS	NEG	POS							
16	POS											
17	POS	POS	POS	NEG	POS							
18	POS											
19	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS
20	POS	POS	POS	NEG	POS							
21	POS	POS	POS	NEG	POS							
22	POS	POS	POS	NEG	POS							
23	NEG	POS										
24	POS	POS	POS	NEG	POS							
25	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
26	POS	POS	POS	NEG	POS							
27	POS	POS	POS	NEG	POS							
28	POS	POS	POS	NEG	POS							
29	NEG	POS										
30	NEG	POS										
31	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
32	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
33	NEG	POS										
34	POS	POS	POS	NEG	POS							
35	NEG	NEG	POS									
36	NEG	NEG	POS									
37	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS
38	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS
39	POS	POS	POS	NEG	POS							
40	NEG	NEG	POS									
41	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS
42	POS	POS	POS	NEG	POS							

Tabla 9. Datos obtenidos de las PCR de los genes de virulencia para cada cepa estudiada de *P. aeruginosa*.

Los genes de virulencia detectados fueron los siguientes: *lasI* 95,2% (40/42), *lasR* 90,5% (38/42), *rhlI* y *rhlR* 97,6% (41/42), *lasA* y *rhlAB* 100% (42/42), *aprA* 88,1% (37/42), *exoA* 97,6% (41/42), *exoS* 61,9% (26/42), *exoT* 95,2% (40/42), *exoY* 78,6% (33/42) y *exoU* 40,5% (17/42). Un 43% de los aislados amplificaron todos los genes estudiados, salvo *exoU*.



Gráfica 2. Porcentaje de presencia de genes de virulencia en los aislados de *P. aeruginosa*.

En un estudio de un hospital de Portugal se analizó la sensibilidad a antibióticos y la presencia de factores de virulencia en 76 aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Se probaron los antibióticos: imipenem, meropenem, ceftazidima, cefepime, aztreonam, piperacilina, amikacina y ciprofloxacino. Se estudió fenotípicamente la producción de ramnolípidos, elastasa, proteasa, lipasa, lecitinasa y piocianina. Además se estudió la presencia de los siguientes genes de virulencia: genes *flaG*, *orfF*, *pilA* y *pilB*, asociados a motilidad; genes *lecA* y *lecB*, involucrados en la

producción de lectinas; genes *aprA*, *lasA* y *lasB*, codificantes de proteasa y elastasas respectivamente; genes *phzH*, *phzM*, *phzS*, *phzI* y *phzII*, de la ruta de biosíntesis de fenazinas; *exoA*, codificador de la exotoxina A; y *exoS*, *exoT*, *exoU* y *exoY*, codificantes de las proteínas del sistema efector secretor de tipo III (Gonçalves, et al., 2015). Los aislados de *P. aeruginosa* de ese estudio mostraron altos niveles de resistencia, con un 52.6% clasificados como multirresistentes. Más de la mitad de la población era resistente a imipenem, a aztreonam, a piperacilina y a ciprofloxacino (62,3%, 61%, 61% y 59,7%, respectivamente); 49,4% fueron resistentes a meropenem; 41,6% a ceftazidima y 40,3% a cefepima. Amikacina fue el antibiótico con mejor actividad, con una tasa de resistencia de 9,1%. Se observaron todos los genes de virulencia, excepto *flaG*. Los genes más prevalentes fueron *exoT* (89,6%) y *phzI* (80,5%); mientras que los menos prevalentes fueron *exoU* (9,1%) y *pilB* (7,8%) (Gonçalves, et al., 2015).

En este estudio se observó que la producción de ramnolípidos, implicados en la formación de biopelículas, es un buen predictor de la sensibilidad a cefalosporinas y resistencia a ciprofloxacino; se vio una expresión disminuida de ramnolípidos en aislamientos con penicilinas y cefalosporinas. Sin embargo, hay que destacar que la mayoría de los fenotipos y genes de virulencia probados no podían ser considerados como predictores estadísticamente significativos de resistencia (Gonçalves, et al., 2015).

La relación predictiva observada entre los genotipos o fenotipos de virulencia y la resistencia a antibióticos puede sugerir posibles relaciones mecánicas entre los factores de virulencia y la resistencia antimicrobiana que merecen ser exploradas. Algunos autores contemplan la posibilidad de usar compuestos que inhiben o atenúan la acción de factores de virulencia específicos como una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*. Sin embargo, esta estrategia sólo puede ser efectiva si dicho factor de virulencia está realmente presente en la célula bacteriana, en particular en cepas de resistencia a fármacos. De lo contrario, los antibióticos disponibles en la actualidad todavía permanecen como una buena opción terapéutica, ya que las bacterias pueden ser destruidas por ellos, limitando el uso de estos nuevos medicamentos únicamente cuando sea necesario. Esta es una estrategia de suma importancia para prevenir el desarrollo de resistencia a los nuevos productos farmacéuticos.

Por tanto, estos mecanismos de virulencia presumiblemente asociados con distintas resistencias a antibióticos merecen atención ya que pueden contener nuevas vías para la orientación de tratamientos farmacológicos.

CONCLUSIONES

1. Se detecta una prevalencia moderada de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras fecales de individuos sanos menores de 15 años en nuestra comunidad autónoma (5.45%).
2. La mayoría de las cepas presentan sensibilidad a gran parte de los antibióticos probados, el mayor grado de resistencia observado ha sido del 11,9% para los antibióticos β -lactámicos piperacilina-tazobactam, ticarcilina, aztreonam, ceftazidima y cefepime.
3. No se han encontrado genes de resistencia que codifiquen para metalo- β -lactamasas ni carbapenemasas de tipo A en ninguno de los 42 aislados de *P. aeruginosa*. Tampoco se ha detectado la presencia de integrones de clase 1, 2 ó 3 ni se han observado alteraciones en el gen *oprD*.

4. Por el contrario, si se han encontrado un elevado contenido de genes de virulencia, estando presentes los genes codificantes de elastasa (*lasA*) y rhamnosiltransferasa (*rhlAB*) en todos los aislados estudiados.
5. En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio de la epidemiología de *P. aeruginosa* en portadores sanos y se ha puesto de manifiesto el elevado contenido de genes codificantes de factores de virulencia en las cepas estudiadas. La presencia de estos factores está relacionada con una mayor patogenicidad de *P. aeruginosa*.
6. La relación existente entre los mecanismos de virulencia y las distintas resistencias a antibióticos merecen atención ya que pueden contener nuevas vías para la orientación del desarrollo de fármacos.
7. Es conveniente realizar un control epidemiológico de *P. aeruginosa*, realizando análisis de resistencia a antimicrobianos y presencia de genes de resistencia y virulencia para ir observando cómo evolucionan tanto las cepas clínicas como las cepas ambientales. De este modo se puede ir detectando la posible adquisición de diversos mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de estas bacterias en los distintos ambientes en los que se encuentran, y en base a los mismos ir desarrollando nuevas formas de tratamientos farmacológicos.

CONCLUSIONS

1. A moderate prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in fecal samples from healthy individuals under 15 in our region is detected (5.45%).
2. Most strains exhibit susceptibility to the majority of the antibiotics tested, the greatest degree of resistance observed was 11.9% for the beta-lactam antibiotics piperacillin-tazobactam, ticarcillin, aztreonam, ceftazidime and cefepime.
3. There are no resistance genes encoding metallo-β-lactamase or class A carbapenemases in any of the 42 isolates of *P. aeruginosa*. Nor it has been detected the presence of class 1, 2 or 3 integrons or alterations in the *oprD* gene.
4. Otherwise, it has been found a high content of virulence genes, being present the genes encoding elastase (*lasA*) and rhamnosiltransferasa (*rhlAB*) in all studied isolates.
5. In this work it has been carried out a study of the epidemiology of *P. aeruginosa* in healthy carriers and revealed the high content of genes encoding virulence factors in the strains studied. The presence of these factors are associated with increased pathogenicity of *P. aeruginosa*.
6. The relationship between the mechanisms of virulence and resistance to various antibiotics deserve attention because they may contain new avenues for drug development orientation.
7. It is convenient to conduct an epidemiological control of *P. aeruginosa*, performing analysis of antimicrobial resistance and presence of resistance and virulence genes in order to monitor how both clinical and environmental strains evolve. Thus it can be detected the possible acquisition of various mechanisms of resistance to antibiotics by these bacteria in the different environments in which they habit, and based on them get to develop new forms of drug treatment.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. Single-Nucleotide-Polymorphism Mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3526-3531.
- Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43(2): 49-56.
- Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 321-322.
- 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; 89: 15-19.
- Fresnadillo-Martínez MJ, García-García MI, García-Sánchez E, García Sánchez JE. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2010; 28(2): 53-64.
- Gude González MJ. *Epidemiología y caracterización molecular de β-lactamasas AmpC plasmídicas en enterobacterias de origen clínico*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza; 2010.
- Guerra B, Fischer J, Helmuth R. An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol* 2014; 171: 290-297.
- 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. *AAC* 2007; 51: 4329-4335.
- Hardalo C, Edberg SC. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol* 1997; 23(1) :47-75.
- Hong SG, Hong SK, Huh JY, Kang MS. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: S552.
- Juan-Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2010; 28(1): 19-28.
- Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(10): 3739-3745.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 582-610.
- Lomholt JA, Poulsen K, Kilian M. Epidemic Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infect Immun* 2001; 69(10): 6284-6295.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA *et al.* Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1568-1574.
- Meyer JM, Geoffroy VA, Baida N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, Achouak W, Palleroni NJ. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. *App Env Microbiol* 2002; 68: 2745-2753.
- Nicas TI, Iglesias BH. Production of elastase and other exoproducts by environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1986; 23(5): 967-969.

Oliver A. Impacto de la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasas en los hospitales: presente y futuro. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 255-256.

Petit CS, Rocznak-Ferguson A, Ferguson SM. Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. *J Cell Biol* 2013; 202(7): 1107-1122.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-458.

Quinn JP. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gramnegative pathogens. *Clin Infect Dis* 1998; 27(1): 117-124.

Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *AAC* 2009; 53: 4783-4788.

Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, 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.

Ruiz Martínez L. *Pseudomonas aeruginosa: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona; 2007.

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.

Sánchez A, Salso S, Culebras E, Picazzo JJ. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Esp Quimioter* 2004; 17(4): 336-340.

Sato H, Frank DW. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Molec Microbiol* 2001; 53(5): 1279-1290.

Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. Analysis of quórum sensing- deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 841-853.

Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 652-680.

Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, Davidson AG, Wong LT, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(7): 988-93.

Suárez C, Gudiol F. Antibióticos beta-lactámicos. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 116-129.

Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *App Env Microbiol* 2003; 69: 2313-2320.

Torres C, Moreno MA, Zarazaga M. Prudent use of antimicrobial agents: not just for humans. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2010; 28: 669-671.

Wolter DJ, Smith-Moland E, Goering RV, Hanson ND, Lister PD. Multidrug resistance associated with mexXY expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 43-50.

Zhu H, Bandara R, Conibear TCR, Thuruthiyil SJ, Rice SA, Kjelleberg S, Givskov M, Willcox MDP. *Pseudomonas aeruginosa* with LasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. *IOVS* 2004; 45(6): 1897-1903.