

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**“DETECCIÓN DE LOS GENES *ampC*, *ampR*, *ampD*,
ampE y *ampG* MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE
LA POLIMERASA (PCR) E IDENTIFICACIÓN POR
SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE MUTACIONES
ASOCIADAS A LA RESISTENCIA FRENTE A
ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN *Pseudomonas*
aeruginosa”.**

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARÍA GABRIELA GRANJA BASTIDAS

SANGOLQUÍ, ENERO DE 2011

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de salud de extrema importancia en el mundo, que afecta la calidad y la eficiencia de los servicios médicos. Entre las infecciones más relevantes de este tipo se encuentran aquellas causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, con elevados índices de morbilidad y mortalidad, especialmente en el medio intrahospitalario. Adicionalmente, esta bacteria presenta una alta prevalencia de resistencia a los antibióticos más comúnmente empleados para su tratamiento.

Dado que los métodos de detección de resistencia tradicionales poseen limitaciones en cuanto a tiempo de análisis e interpretación, el presente estudio pretende contribuir a la identificación temprana de mecanismos moleculares de resistencia para antibióticos β -lactámicos en *P. aeruginosa*, mediante el desarrollo de un sistema de detección molecular de los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* mediante PCR y secuenciación automática, con el fin de identificar la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia.

Para la detección de los genes de resistencia se probaron cinco sistemas de PCR convencional y dos de PCR multiplex. Los sistemas resultaron altamente específicos y sensibles, a excepción del sistema de amplificación simultánea de los genes *ampG-ampR* que presentó una baja sensibilidad analítica para uno de los ensayos.

Los datos obtenidos a partir del análisis mutacional de secuencias del gen *ampD* de 16 aislados clínicos, indicaron una correlación del 55% entre fenotipo-genotipo. Tras la evaluación de los pacientes en el transcurso de un mes de la toma, al menos el 40% las cepas que habían presentado resistencia solamente a nivel genotípico, se tornaron multiresistentes fenotípicamente.

Con estos resultados, se pudo demostrar la necesidad de disponer de análisis moleculares para la detección temprana de mecanismos moleculares de resistencia, lo cual permitirá que la terapéutica sea adecuadamente dirigida y oportuna.

ABSTRACT

Nosocomial infections are a serious health problem all around the world. Nosocomial infections affect the quality and efficiency of medical services. Among the most important infections of this type are those caused by *Pseudomonas aeruginosa*. These infections carry high rates of morbidity and mortality, especially in intensive care units patients. Additionally, the bacterium has developed high resistance rates to commonly used antibiotics schemes.

Given that available techniques for traditional microbiology antibiotic susceptibility assessment have limitations in terms of turn around times, the present study aimed to contribute to early identification of molecular mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in *P. aeruginosa*, through the development of PCR-based molecular biology systems for the *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* and *ampR* genes, coupled with automated sequencing in order to identify the presence of mutations associated with resistance in the above mentioned genes. Five conventional PCR and two multiplex PCR systems were tested. The systems were highly specific and sensitive, except for the assay for simultaneous amplification of the *ampG-ampR* genes, which demonstrated a low analytical sensitivity..

Data obtained from mutational analysis of *ampD* gene sequences from 16 clinical isolates, showed a 55% phenotype/genotype correlation. Monitoring of patients in the course of a month showed that at least 40% of the strains with resistance genotype and no resistance phenotype developed a multiresistant phenotype.

We demonstrated the value of molecular analyses in the early detection of molecular mechanisms of resistance. The assays here developed might provide guidance for the use of properly targeted and timely antibiotic therapy.

CERTIFICACIÓN

Dr. Marcelo Grijalva

Ing. Paola Párraga

Certifican:

Que el trabajo titulado “DETECCIÓN DE LOS GENES *ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampE* y *ampG* MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) E IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE MUTACIONES ASOCIADAS A LA RESISTENCIA FRENTE A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN *Pseudomonas aeruginosa*”, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple las normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a la relevancia académica y científica del trabajo presentado recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a MARÍA GABRIELA GRANJA BASTIDAS que lo entregue al ING. RAFAEL VARGAS, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 28 de Enero de 2011

Dr. Marcelo Grijalva
DIRECTOR

Ing. Paola Párraga
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, María Gabriela Granja Bastidas

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “DETECCIÓN DE LOS GENES *ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampE* y *ampG* MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) E IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE MUTACIONES ASOCIADAS A LA RESISTENCIA FRENTE A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN *Pseudomonas aeruginosa*”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 28 de enero de 2011

María Gabriela Granja Bastidas

AUTORIZACIÓN

Yo, María Gabriela Granja Bastidas

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “DETECCIÓN DE LOS GENES *ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampE* y *ampG* MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) E IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE MUTACIONES ASOCIADAS A LA RESISTENCIA FRENTE A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN *Pseudomonas aeruginosa*”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 28 de enero de 2010

María Gabriela Granja Bastidas

DEDICATORIA

“El hombre que trabaja en lo que no ama, aunque lo haga todo el día, es un desocupado”. Facundo Cabral.

A mi madre, mi dulce ángel de luz que siempre estuvo presente en cada etapa de mi formación académica, y que aún ahora me sigue acompañando y dándome la fuerza para no desfallecer en esta hermosa lucha.

A mi padre, por brindarme todos los días su ternura y entereza, por demostrarme siempre, que el amor es capaz de vencerlo todo, por creer en mí y apoyarme en cada decisión e iniciativa.

A mis sobrinos David y Danielito, porque gracias a su alegría e inocencia he podido redescubrir el verdadero significado de la vida.

A mi estrella dorada, porque aún cuando la noche estaba completamente oscura, ella continuó brillando y abrigándome con su luz.

A mis hermanas, Mónica, Cristina, Belén, Anita y Paula, por su apoyo incondicional y por darme lecciones de amor y vida que me han construido la mujer que ahora soy.

A mi tía Susana, por estar tan presente en mi vida, y brindarme los consejos de madre que tanto he necesitado, por apoyarme e impulsar mi carrera profesional.

María Gabriela Granja Bastidas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcelo Grijalva, por haberme dado la oportunidad de formarme bajo su tutoría en el laboratorio de Biotecnología Humana de la ESPE y brindarme todo su apoyo en la realización del presente proyecto.

A la Dra. Patricia Jiménez, por haber creído siempre en mí y guiarme con sus sabios consejos de profesora y amiga, hacia la realización con valentía de mis más grandes sueños.

A la Ing. Paola Párraga por proporcionarme todo el apoyo en la realización del trabajo, y por compartir conmigo su experiencia en los momentos precisos.

A todas mis amigas del laboratorio, porque cada día a su lado aprendí nuevas cosas y descubrí el significado de muchas otras. Gracias Andre por acogerme y enseñarme con tanta dedicación. Mi Gaby y Cris, gracias por haberme permitido compartir, reír, llorar, por ser tan distintas y a la vez tan iguales; gracias por brindarme los mejores momentos de mi vida estudiantil y por todo el soporte que dieron a mi investigación.

A mis amigos, Betsa, Isa, Lore, Andrés, Beto, Cata, Kte, Ani, Mafer y todas las gen, por sostenerme cuando más los he necesitado; por ser y estar, ya que sin ustedes tampoco hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A Lcda. Isabel Narváez y la Dra. Milena Mina por haber colaborado con la recolección de aislados clínicos para la realización de este trabajo y por haberme impartido sus conocimientos con tanta dedicación.

María Gabriela Granja Bastidas.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	II
ABSTRACT.....	III
CERTIFICACIÓN.....	IV
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	V
AUTORIZACIÓN	VI
DEDICATORIA.....	VII
AGRADECIMIENTOS.....	VIII
INDICE DE CONTENIDOS.....	IX
LISTADO DE TABLAS.....	XIII
LISTADO DE FIGURAS.....	XV
LISTADO DE CUADROS	XX
LISTADO DE ANEXOS	XXI
NOMENCLATURA	XXII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación del problema	1
1.3. Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Marco Teórico	3

1.4.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.4.1.1.	Descripción taxonómica, morfológica y fisiológica.....	3
1.4.1.2.	Distribución y patogénesis.....	6
1.4.1.3.	Estructura génica	6
1.4.2.	Mecanismos moleculares de resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.4.2.1.	Producción de β -lactamasas.....	9
1.4.2.1.1.	Mecanismo de sobreproducción de AmpC	10
1.4.2.2.	Bombas de expulsión	12
1.4.2.3.	Alteración de transporte: porinas de membrana.....	15
1.4.2.4.	Modificación de sitios de acción	17
1.4.3.	Diagnóstico de infección causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
1.4.3.1.	Métodos de diagnóstico tradicional.....	18
1.4.3.2.	Métodos de diagnóstico molecular	18
1.4.4.	Tratamiento de infecciones causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
1.4.5.	Detección de resistencia antimicrobiana en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.4.5.1.	Métodos de detección tradicionales.....	22
1.4.5.2.	Métodos de detección molecular.....	22
1.4.5.2.1.	<i>Extracción de ADN</i>	24
1.4.5.2.2.	<i>Diseño y análisis de cebadores</i>	24
1.4.5.2.3.	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	26
1.4.5.2.4.	<i>Secuenciación automática</i>	28
1.4.5.2.5.	<i>Análisis de secuencias</i>	29

1.5.	Sistema de hipótesis o pregunta de investigación	31
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....		32
2.1.	Participantes.....	32
2.2.	Zona de estudio	32
2.3.	Período de tiempo de la investigación	32
2.4.	Diseño	32
2.5.	Procedimientos	33
2.5.1.	Preparación y mantenimiento de suspensiones celulares a partir de cultivos puros.....	33
2.5.2.	Obtención de los controles positivos.....	33
2.5.3.	Extracción de ADN bacteriano mediante QIamp DNA Mini kit de QIAGEN	33
2.5.4.	Electroforesis en gel de agarosa.....	34
2.5.5.	Cuantificación de ADN por fluorometría.....	35
2.5.6.	Detección de los genes de resistencia: <i>ampC</i> , <i>ampD</i> , <i>ampE</i> , <i>ampG</i> y <i>ampR</i> mediante PCR convencional y PCR múltiple.....	36
2.5.6.1.	Diseño y análisis de cebadores	36
2.5.6.2.	Protocolos de PCR convencional optimizados para la detección de los genes <i>ampC</i> , <i>ampD</i> , <i>ampE</i> , <i>ampG</i> y <i>ampR</i>	38
2.5.6.3.	Protocolos de PCR múltiple optimizados para la detección de los genes <i>ampC-ampD</i> y <i>ampG-ampR</i>	42
2.5.7.	Determinación de la sensibilidad analítica	45
2.5.7.1.	Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN.....	45
2.5.7.2.	Sensibilidad analítica por conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)	46

2.5.8.	Procesamiento de aislados clínicos	47
2.5.8.1.	Secuenciación automática del gen <i>ampD</i>	48
2.5.8.2.	Análisis mutacional de secuencias	48
2.5.8.3.	Monitoreo de cepas clínicas	48
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		50
3.1	Obtención de controles positivos	50
3.2	PCR convencional para la detección de los genes <i>ampC</i> , <i>ampD</i> , <i>ampE</i> , <i>ampG</i> y <i>ampR</i>	51
3.3	PCR múltiple para la detección de los genes <i>ampC</i> - <i>ampD</i> , <i>ampG</i> – <i>ampR</i>	54
3.4	Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN	55
3.5	Sensibilidad analítica por conteo de UFC/mL	57
3.6	Procesamiento de muestras clínicas	61
3.7	Secuenciación automática del gen <i>ampD</i> y análisis mutacional de secuencias	65
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		71
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES		80
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES		82
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA		83
ANEXOS		¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1.- Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Tomado de: Álvarez, Boquet & de Fez, 1996; Baron, <i>et al.</i> , 1994.....	19
Tabla 1.2.- Antibióticos empleados en el tratamiento de la infección por <i>P. aeruginosa</i> (Autora).....	22
Tabla 2.1.- Características de los cebadores empleados en la amplificación de los genes <i>ampC</i> , <i>ampD</i> , <i>ampE</i> , <i>ampG</i> y <i>ampR</i> mediante PCR para la detección de la resistencia mediada por la sobreproducción de AmpC en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Tabla 2.2.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación del gen <i>ampC</i> en el ensayo individual de PCR convencional optimizado.....	38
Tabla 2.3.- Programación del termociclador para la amplificación del gen <i>ampC</i> en el ensayo de PCR convencional.....	39
Tabla 2.4.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación del gen <i>ampD</i> en el ensayo de PCR convencional optimizado.....	39
Tabla 2.5.- Programación del termociclador para la amplificación del gen <i>ampD</i> en el ensayo de PCR convencional.....	39
Tabla 2.6.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación del gen <i>ampE</i> en el ensayo de PCR convencional optimizado.....	40
Tabla 2.7.- Programación del termociclador para la amplificación del gen <i>ampE</i> en el ensayo de PCR bifásica.....	40
Tabla 2.8.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación del gen <i>ampG</i> en el ensayo de PCR bifásica optimizado.....	40
Tabla 2.9.- Programación del termociclador para la amplificación del gen <i>ampG</i> en el ensayo de PCR convencional.....	40
Tabla 2.10.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos optimizadas para la amplificación del gen <i>ampR</i> en el ensayo de PCR convencional optimizado.....	40
Tabla 2.11.- Programación del termociclador para la amplificación del gen <i>ampR</i> en el ensayo de PCR convencional.....	40
Tabla 2.12.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación de los genes <i>ampC-ampD</i> en el ensayo de PCR múltiple optimizado.....	43

Tabla 2.13.- Programación del termociclador para la amplificación de los genes <i>ampC-ampD</i> en el ensayo de PCR múltiple.....	43
Tabla 2.14.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación de los genes <i>ampG-ampR</i> en el ensayo de PCR múltiple optimizado.....	44
Tabla 2.15.- Programación del termociclador para la amplificación de los genes <i>ampG-ampR</i> en el ensayo de PCR múltiple.....	44
Tabla 3.1.- Concentración de ADN (ng/ μ L) de los controles positivos medidos por Fluorometría.....	51
Tabla 3.2.- Recuento de UFC y cálculo de UFC/mL en diluciones sucesivas, a partir de cultivo bacteriano en fase exponencial de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Tabla 3.3.- Información de los aislados clínicos recopilados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para la realización del análisis mutacional en el gen <i>ampD</i>	61
Tabla 3.4.- Concentración del ADN obtenido a partir de los aislados clínicos con perfil de resistencia fenotípico conocido frente a antibióticos β -lactámicos.....	63
Tabla 3.5.- Análisis de homología de secuencia nucleotídica y aminoacídica para las cepas clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> secuenciadas, empleando el software BLASTn yBLASStx (NCBI, 2010).....	66
Tabla 3.6.- Resultados del análisis mutacional del gen <i>ampD</i> , tras el alineamiento múltiple de las cepas clínicas con perfil fenotípico conocido frente a β -lactámicos, en relación a la secuencia de la cepa PAO1.....	69
Tabla 3.7.- Prevalencia de mutaciones no sinónimas relevantes encontradas en el estudio de cepas clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con perfil fenotípico conocido.....	70

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1.- El bacilo Gram negativo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Tomado de: Liberati, <i>et al.</i> , 2006.....	4
Figura 1.2.- Resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en aislamientos de pacientes hospitalizados en el 2008. Tomado de: Rednarbec, 2008.....	7
Figura 1.3.- Resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en aislamientos de pacientes de la unidad de cuidados intensivos en el 2008. Tomado de: Rednarbec, 2008.....	7
Figura 1.4.- Represión de <i>ampC</i> . Durante el proceso normal de reciclaje del peptidoglucano, 1,6- anhidromurapéptidos son removidos desde la membrana y transportados al citoplasma por la permeasa AmpG. Una vez dentro, son hidrolizados por AmpD para generar tres péptidos libres los mismos que son convertidos a UDP-muramil-N-acetil-pentapéptidos (péptidos represores) , éstos interactúan con AmpR y en conjunto se unen a la región intergénica <i>ampR-ampC</i> , creando una conformación que reprime la transcripción de <i>ampC</i> . En este estado, se producen niveles bajos de AmpC y la enzima se localiza en el espacio periplásmico confiriéndole resistencia intrínseca frente a los antibióticos β -lactámicos (Lister, <i>et al.</i> , 2009).....	13
Figura 1.5.- Derepresión de <i>ampC</i> asociada a mutaciones en <i>ampD</i> . La presencia de mutaciones que conducen a la inactivación de AmpD o a la expresión disminuída del gen que la codifica, no permite la hidrólisis de los 1,6-anhidromurapéptidos (péptidos inductores) los mismos que se acumulan en el citoplasma, y actúan tras vincularse a la proteína reguladora AmpR como inductores de la expresión de <i>ampC</i> , esto debido a la conformación que adquiere, resultanto en una sobreexpresión de la enzima en altos niveles constitutivos (Lister, <i>et al.</i> , 2009). 14	
Figura 1.6.- Organización y operación de las bombas de expulsión que confieren resistencia antimicrobiana en bacterias Gram negativas. Modificado de: Poole, 2004.....	15
Figura 2.1.- Esquema para la preparación de diluciones seriadas a partir de una solución de ADN conocida para el ensayo de sensibilidad analítica de sistemas de PCR convencional y múltiple (Autora).....	45

Figura 2.2.- Esquema para la determinación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) a partir de diluciones seriadas de cultivo puro de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Tomado de Albán, 2010.....	47
Figura 3.1.- ADN de controles positivos provenientes de la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 extraído con el kit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN). Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular de 1Kb. (Invitrogen), C1: Extracción 1, C2: Extracción 2, C3: Extracción 3, C4: Extracción 4, C5: Extracción 5, C6: Extracción 6, CN: Control negativo.....	50
Figura 3.2.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen <i>ampC</i> de 1194 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen), C1: Control positivo, C2: Control positivo, C3: Control negativo, C4: Control negativo.....	51
Figura 3.3.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen <i>ampD</i> y su región promotora de 916 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen) , C1: Control positivo, C2: Control positivo, C3: Control negativo.....	52
Figura 3.4.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen <i>ampE</i> de 1231 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen), C1: Control positivo, C2: Control positivo, C3: Control negativo.....	52
Figura 3.5.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen <i>ampG</i> de 1785 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen) , C1: Control positivo, C2: Control positivo, C3: Control negativo.....	53
Figura 3.6.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen <i>ampR</i> de 891 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen), C1: Control positivo, C2: Control positivo, C3: Control negativo.....	53

Figura 3.7.- Productos de la PCR múltiple optimizada para la amplificación simultánea de los genes *ampC* y *ampD* de 1194 y 916 pb., respectivamente, empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), C1: Control positivo, C2: Control positivo, C3: Control negativo.....54

Figura 3.8.- Productos de la PCR múltiple optimizada para la amplificación simultánea de los genes *ampG* y *ampR* de 1785 y 891 pb., respectivamente, empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), C1: Control positivo, C2: Control positivo....55

Figura 3.9.- Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN para la PCR múltiple de los genes *ampC-ampD* de 1194 y 916 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), C1-C2: Sin dilución, C3-C4: dilución 1:10, C5-C6: dilución 1:100, C7-C8: dilución 1:1000, C9-C10: dilución 1:10000, C11-C12: dilución 1: 100000, C13-C14: dilución 1: 1000000, C15: Control negativo.....56

Figura 3.10.- Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN para la PCR múltiple de los genes *ampC-ampD* de 1194 y 916 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), C1-C2: Sin dilución, C3-C4: dilución 1:10, C5-C6: dilución 1:100, C7-C8: dilución 1:1000, C9-C10: dilución 1:10000, C11-C12: dilución 1: 100000, C13-C14: dilución 1: 1000000, C15: Control negativo.....56

Figura 3.11.- Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN para la PCR múltiple de los genes *ampG-ampR* de 1785 y 891 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), C1-C2: Sin dilución, C3-C4: dilución 1:10, C5-C6: dilución 1:100, C7-C8: dilución 1:1000, C9-C10: dilución 1:10000, C11-C12: dilución 1: 100000, C13-C14: dilución 1: 1000000, C15: Control negativo.....57

Figura 3.12.- Resultados de la siembra de diluciones sucesivas a partir de cultivo puro en fase exponencial de *Pseudomonas aeruginosa*, en agar MacConkey por triplicado.....58

Figura 3.13.- Sensibilidad analítica por conteo de UFC/mL para la PCR convencional del gen *ampD* de 916 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2%,

teñido con SYBR safe. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR safe (Invitrogen). M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), C1-C2: Sin dilución, C3-C4: dilución 10^{-1} C5-C6: dilución 10^{-2} , C7-C8: dilución 10^{-3} , C9-C10: dilución 10^{-4} , C11-C12: dilución 10^{-5} , C13-C14: dilución 10^{-6} , C15-16: dilución 10^{-7} , C17-C18: dilución 10^{-8} , C19: Control negativo.....59

Figura 3.14.- Sensibilidad analítica por conteo de UFC/mL para la PCR múltiple de los genes *ampC-ampD* de 1194 y 916 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), C1-C2: Sin dilución, C3-C4: dilución 10^{-1} C5-C6: dilución 10^{-2} , C7-C8: dilución 10^{-3} , C9-C10: dilución 10^{-4} , C11-C12: dilución 10^{-5} , C13-C14: dilución 10^{-6} , C15-16: dilución 10^{-7} , C17-C18: dilución 10^{-8} , C19: Control negativo.....60

Figura 3.15.- Sensibilidad analítica por conteo de UFC/mL para la PCR múltiple de los genes *ampG-ampR* de 1785 y 891 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. M: Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), C1-C2: Sin dilución, C3-C4: dilución 10^{-1} C5-C6: dilución 10^{-2} , C7-C8: dilución 10^{-3} , C9-C10: dilución 10^{-4} , C11-C12: dilución 10^{-5} , C13-C14: dilución 10^{-6} , C15-16: dilución 10^{-7} , C17-C18: dilución 10^{-8} , C19: Control negativo.....60

Figura 3.16.- ADN obtenido a partir de aislados clínicos con perfil de resistencia fenotípico conocido frente a antibióticos β -lactámicos. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñido con SYBR safe (Invitrogen). M: High mass ladder (Invitrogen). M: Marcador de peso molecular High mass ladder (Invitrogen). C1: cepa 1696, C2: cepa 1727, C3: cepa 315, C4: cepa 1485, C5: cepa 0887, C6: cepa 2214, C7: cepa 1992, C8: cepa 1107, C9: cepa 1080, C10: cepa 1142, C11: cepa 1085, C12: cepa 865, C13: cepa 1146, C14: cepa 1160, C15: cepa 1383, C16: cepa 01300, C17: cepa 1383, C18: cepa 1571, C19: cepa 1705, C20: Control negativo...62

Figura 3.17.- Resultados de la amplificación del gen *ampD* y su región promotora a partir del ADN obtenidos de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* con perfiles conocidos de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR Safe (Invitrogen). M: Marcador de peso molecular 100 pb. (Invitrogen). C1: 1160, C2:1383, C3:01300, C4:1422, C5: 1727, C6:1571, C7:1696, C8: 1485, C9:1705, C10: Control negativo, C11: Control positivo cepa ATCC 27853.....64

Figura 3.18.- Alineamiento múltiple, análisis mutacional y árbol filogenético para las cepas con perfil fenotípico conocido frente a β-lactámicos, empleando el programa Codon Code Aligner (v. 3.7.1).....	67
Figura 3.19.- Porcentaje de cepas clínicas que presentaron mutaciones sinónimas o no sinónimas y su relación con el perfil fenotípico.....	70

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1.- Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> . Tomado y traducido de: Fick, 2000.....	8
Cuadro 1.2.- Descripción de los genes presentes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PAO1 de acuerdo a su función. Tomado y traducido de: NCBI, 2010.....	9
Cuadro 1.3.- Clasificación de β -lactamasas. Tomado y traducido de: OPS, 2004a.....	11
Cuadro 1.4.- Principales Bombas de expulsión presentes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Tomado y adaptado de: Poole, 2004.....	16

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A.- Clasificación de enzimas β -lactamasas según Ambler y Bush.....93

NOMENCLATURA

A: Adenina

AMS: Alineamiento Múltiple de Secuencia

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BHI: Brain Heart Infusion

BLASTn: Basic Local Alignment Search Tool nucleotide

BLASTx: Basic Local Alignment Search Tool protein

C: Citosina

CFI: Concentración Mínima Inhibitoria

ddNTP: Dideoxynucleótido Trifosfato

dNTP: Deoxynucleótido Trifosfato

G: Guanina

Kb: Kilo bases

MFP: Membrane Fusion Protein

MFS: Mayor Facilitator Superfamily

NCBI: National Centre for Biotechnology Information

OMF: Outer Membrane Factor

pb: pares de bases

PBP: Penicillin Binding Protein

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RND: Resistance Nodulation-Division

RT-Q-PCR: PCR en tiempo real

T: Timina

TBE: Tris Borato EDTA

Tm: Temperatura de melting

UFC: Unidad Formadora de Colonia

UV: Luz ultravioleta

V: Voltio

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Las infecciones nosocomiales causadas por *Pseudomonas aeruginosa* están asociadas a altos índices de mortalidad, especialmente tras la primera semana de hospitalización (Fick, 2000; Farías, Hernán & Chavarría, 2005; Rotstein, *et al.*, 2008). Para asegurar un buen pronóstico para el paciente, el tiempo en el cual se suministra la terapéutica adecuada es crítico, ya que se conoce que si ésta se administra dentro de las primeras 24 horas del establecimiento de la infección los índices de mortalidad pueden reducirse considerablemente (Rotstein, *et al.*, 2008).

En la actualidad, la determinación del patógeno causal de la infección, así como del perfil de resistencia, se realizan mediante técnicas de microbiología tradicionales tales como identificación bioquímica y antibiograma, las mismas que tienen limitaciones en sensibilidad y especificidad. Adicionalmente, estas pruebas pueden tomar alrededor de una semana para concluirse, tiempo en el cual el paciente se ve comprometido debido a que existe la posibilidad de que el responsable de la infección sea un patógeno multiresistente, complicando así su cuadro clínico (Farías, *et al.*, 2005; Reinhardt, *et al.*, 2007).

El empleo de técnicas de biología molecular, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación automática, facilitan la detección de material genético. Permitiendo además, el conocimiento de la secuencia específica de genes de relevancia clínica de manera rápida y sensible, por lo cual es una alternativa efectiva para la detección de mutaciones asociadas a resistencia a antibióticos comúnmente empleados en infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

1.2. Justificación del problema

P. aeruginosa es uno de los principales agentes causales de infecciones nosocomiales, Los índices de mortalidad por este tipo de infección a nivel mundial alcanzan valores alarmantes, 45% para neumonías adquiridas durante hospitalización,

60% para casos de bacteriemia y hasta 69,7% para casos de neumonía adquirida por el uso de ventilador mecánico (Fick, 2000; Farías, *et al.*, 2005; Rotstein, *et al.*, 2008). En el Ecuador, hasta el año 2008, la resistencia frente a antibióticos β - lactámicos empleados comúnmente es de 32 al 45% en pacientes hospitalizados, llegando a ser hasta del 56% para ceftazidima para pacientes en unidades de cuidados intensivos (Rednarbec, 2008).

La gravedad de las estadísticas antes mencionadas, sumada a la resistencia natural que *P. aeruginosa* posee frente a una gran cantidad de antibióticos, incluyendo β -lactámicos, hace que en la actualidad sea primordial el estudio a profundidad de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de resistencia. Se ha demostrado que el inicio de la terapia con antibióticos adecuados, antes de haber transcurrido 24 horas del inicio de la infección, disminuye el índice de mortalidad considerablemente. En el caso de pacientes con neumonía adquirida por el uso de ventilador mecánico, la mortalidad en un estudio bajó del 69,7% al 28,4% (Rotstein, *et al.*, 2008).

Dado que la producción de β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia frente a este tipo de antibióticos y que el mecanismo molecular más representativo para este fin es la sobreexpresión de *ampC* (Martínez & Hernández, 2001), la detección de mutaciones en los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG*, y *ampR* nos permitirá obtener datos acerca de la relación genotipo - fenotipo en cepas de *P. aeruginosa* que presenten resistencia frente a los antibióticos: piperacilina/ tazobactam, ceftazidima, cefepima y aztreonam en nuestro país. Además, se podrá establecer un sistema de detección de resistencia rápido, sensible y específico que permitirá al personal médico en general dar un diagnóstico y tratamiento oportuno y dirigido.

Finalmente, la utilización a largo plazo de esta técnica de laboratorio disminuirá el uso indiscriminado de antibióticos, evitando a su vez la diseminación de cepas resistentes en el medio hospitalario, reduciendo así costos y complicaciones tanto del paciente y sus familiares, como del hospital al utilizar el tratamiento específico.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Detectar los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e identificar mutaciones asociadas a resistencia frente a antibióticos β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Estandarizar y optimizar el protocolo de extracción de ADN a partir de cultivos puros de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Diseñar y optimizar la técnica molecular PCR para la detección de los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR*.
- Identificar mutaciones asociadas y no asociadas a la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos en los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* de *Pseudomonas aeruginosa* mediante secuenciación automática en cepas resistentes y sensibles a los antibióticos: piperacilina/ tazobactam, ceftazidima, cefepime y aztreonam.
- Analizar la relación fenotipo – genotipo de los resultados obtenidos y reportar las conclusiones.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.4.1.1. Descripción taxonómica, morfológica y fisiológica

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo perteneciente a la clase Gammaproteobacterias, familia *Pseudomonadaceae*, siendo el miembro de mayor relevancia clínica de este grupo. Su tamaño varía entre 0,5 – 0,8 por 1,5– 3,0 μm en forma de bastón con un único flagelo polar. Su respiración es de tipo aerobia estricta (Fick, 2000; Prescott, Harley, & Klein, 2002), aunque debido a su gran versatilidad y capacidad de adaptación se ha observado puede sobrevivir en condiciones de

anaerobiosis cuando la arginina se encuentra presente en medios de cultivo complejos (Fick, 2000).



Figura 1.1.- El bacilo Gram negativo *Pseudomonas aeruginosa*. Tomado de: Liberati, *et al.*, 2006.

Considerada como muy mótil, el desplazamiento de la bacteria es de tres tipos, de acuerdo a la viscosidad del medio en el que se encuentra: a) en medios líquidos la motilidad de la misma se da gracias al flagelo y se denomina “swimming”; b) para medios sólidos, o interfaces la movilidad se da por el mecanismo llamado “twitching” en donde las fimbrias o pili tipo IV permiten la adhesión y posterior infección en las células epiteliales del huésped; y c) para medios semisólidos con una cantidad de agua de 0,4 – 0,7 % (P/V) el mecanismo se denomina “swarming”, en el cual las células se vuelven alargadas y con más de un flagelo lo cual permite un movimiento concertado de las mismas, esta motilidad es la más compleja e implica la expresión de una serie de genes cuya expresión y regulación están siendo estudiadas en la actualidad (Soberón, 2003; Overhage, Bains, Brazas & Hancock 2008).

El péptidoglucano se presenta típicamente en el espacio periplásmico entre la membrana interna y externa (Soberón, 2003; Farías, *et al.*, 2005); encontrándose además en su membrana externa dos bandas de lipopolisacárido: la banda A, compuesta por un polímero de D - ramnosa producida por la mayoría de cepas, y la banda B, de estructura variable la misma que determina el serotipo de la bacteria (Fick, 2000; Soberón, 2003).

Esta bacteria produce una gran cantidad de pigmentos involucrados en mecanismos de competencia con otros microorganismos y virulencia en huéspedes humanos y animales, de los cuales se destacan los siguientes: a) piocianina, que es un pigmento no fluorescente de coloración azul verdoso exclusivo de la especie, pero generado únicamente por el 50% de las cepas clínicas, muy soluble en agua, y de olor característico a uvas; b) pioverdina, cuya fluorescencia puede ser apreciada a 400nm entre blanco y azul verdoso, y c) piorubina, las misma que posee una coloración roja pero que no es producida por muchas cepas (Farías, *et al.*, 2005; Kong, *et al.*, 2005).

Una característica muy notable que posee *P. aeruginosa* es el sistema de regulación denominado “quorum sensing”. Este le permite a la bacteria responder adecuadamente a cambios en la densidad celular mediante una expresión selectiva de determinados genes, cuyos productos cumplen funciones de virulencia tales como lisis de otros patógenos e inactivación de tejidos biológicos y agentes inmunológicos (Soberón, 2003; Kong, *et al.*, 2005).

Adicionalmente, este sistema juega un papel fundamental en la formación de los denominados “biofilms” bacterianos. Estas biopelículas son comunidades bacterianas envueltas en una matriz extracelular de exopolisacáridos, ADN y proteínas; poseen una estructura compleja que incluye canales para el intercambio de sustratos y oxígeno con la fase acuosa y la capacidad de reaccionar de una manera coordinada a la densidad celular, disponibilidad de nutrientes y las fuentes de energía presentes en el ambiente (Soberón, 2003; Moreau-Marquis, Statnton & O’Tools, 2008).

Se considera que la formación de las biopelículas es una estrategia de sobrevivencia de *P. aeruginosa* en medios hostiles, ya que le confiere resistencia frente a antibióticos y elementos de respuesta inmune, encontrándose principalmente en superficies inertes, como los tubos endotraqueales, o en tejido necrótico, así como también en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística (Giwercman, *et al.*, 1991; Soberón, 2003; Moreau-Marquis, *et al.*, 2008).

1.4.1.2. Distribución y patogénesis

Pseudomonas aeruginosa fue identificada por primera vez en 1882 en heridas cutáneas productoras de pus con coloración azul-verdosa (Farías, *et al.*, 2005). En la actualidad se conoce que la distribución de la bacteria es muy amplia, ya que gracias a la habilidad intrínseca que posee para asimilar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de nutrientes, ha sido capaz de adaptarse a múltiples ambientes y nichos ecológicos (Fick, 2000; Farías, *et al.*, 2005; Soberón, 2003; Winsor, *et al.*, 2009).

Al encontrarse presente también en el ambiente intrahospitalario, esta característica la ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, en donde es uno de los agentes causales de infecciones nosocomiales de tipo oportunista de mayor incidencia (Soberón, 2003; Qarah, *et al.*, 2008). Ello ha generado que en la actualidad éste sea el microorganismo aislado con mayor frecuencia en pacientes que poseen más de una semana de hospitalización (Qarah, *et al.*, 2008).

Las infecciones nosocomiales causadas por *P. aeruginosa* poseen altos índices de prevalencia y mortalidad especialmente tras la primera semana de hospitalización (Fick, 2000; Farías, *et al.*, 2005; Rotstein, *et al.*, 2008). Los índices de mortalidad asociados a infecciones por esta bacteria a nivel mundial alcanzan valores alarmantes que llegan a ser de 45% para neumonías adquiridas durante hospitalización, 60% para casos de bacteriemias y hasta 69,7% para casos de neumonía adquirida por el uso de ventilador mecánico (Fick, 2000; Farías, *et al.*, 2005; Rotstein, *et al.*, 2008).

Estas estadísticas, sumadas a la resistencia natural que *P. aeruginosa* posee frente a una gran cantidad de antibióticos comúnmente empleados, hace que el tratamiento de la misma sea muy complejo y que implique altos costos tanto materiales como humanos. La situación en el Ecuador hasta el año 2008 nos indica que la resistencia frente a antibióticos β - lactámicos empleados varía entre el 32 al 45% para pacientes hospitalizados (Véase Figura 1.2), mientras que para aquellos internados en la unidad de cuidados intensivos la resistencia llega a ser de hasta el 56% en el caso de ceftazidima, como se puede apreciar en la Figura 1.3 (Rednarbec, 2008).

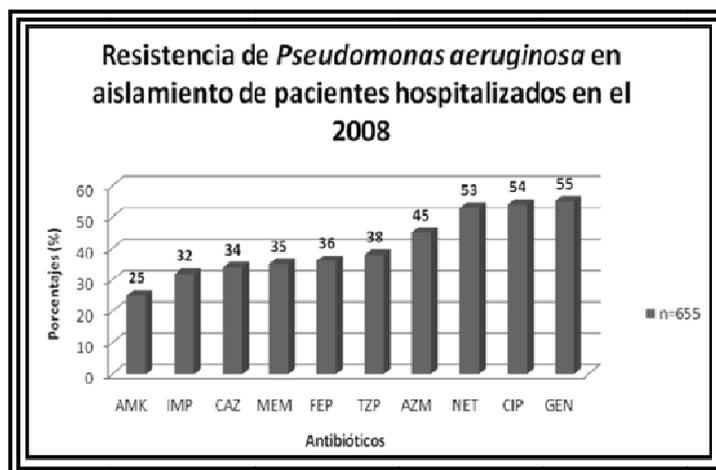


Figura 1.2.- Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en aislamientos de pacientes hospitalizados en el 2008. Tomado de: Rednarbec, 2008.



Figura 1.3.- Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en aislamientos de pacientes de la unidad de cuidados intensivos en el 2008. Tomado de: Rednarbec, 2008.

Las principales infecciones causadas por esta bacteria atacan a las vías respiratorias, tracto urinario, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, epidermis, tejido gastrointestinal, esqueleto, ojos y oídos (Qarah, *et al.*, 2008). Adicionalmente, existen grupos poblacionales que poseen una mayor sensibilidad a la infección, tales como pacientes inmunodeprimidos, incluyendo a la unidad de cuidados intensivos como punto crítico, entre los cuales aquellos con fibrosis quística, cáncer y quemaduras son los más susceptibles a contraerla (Qarah, *et al.*, 2008.; Soberón, 2007; Winsor, *et al.*, 2009).

La patogénesis de *P. aeruginosa* ocurre en tres etapas: a) adhesión bacteriana y colonización, b) invasión local, y c) diseminación y enfermedad sistémica. Tras el establecimiento de la infección, *P. aeruginosa* secreta exotoxinas del tipo A y S conjuntamente con enzimas hidrolíticas, compuestos que al entrar en contacto con los tejidos degradan las membranas celulares y las destruyen progresivamente (Qarah, *et al.*, 2008). Los factores de virulencia implicados en la patogénesis se encuentran descritos en el siguiente cuadro:

Cuadro 1.1.- Factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Tomado y traducido de: Fick, 2000.

FACTOR DE VIRULENCIA	FUNCIÓN
Lipopolisacárido	Endotoxina, es un mediador proximal para producir una gran variedad de eventos inflamatorios
Cápsula de mucopolisacárido	Limita la entrada de moléculas cargadas como antibióticos. Sirve como adhesina bacteriana a las superficies epiteliales.
Fimbrias o pili	Organelos extracelulares que actúan como adhesinas
Proteasas	Digestión enzimática de proteínas del medio incluyendo las de importancia para las defensas del huésped
Piocianina y ramnolípidos	Contribuyen a la disrupción ciliar
Fosfolipasa C (hemolítica y no hemolítica)	Disrupción de fosfolípidos en las membranas plasmáticas
Pioverdina	Crecimiento acelerado en condiciones limitadas de hierro
Exotoxina A y S	Inhiben la síntesis de proteínas
Leucocidina	Efectos citopáticos en leucocitos y cultivos celulares

1.4.1.3. Estructura génica

El genoma de *P. aeruginosa* fue completamente secuenciado en el año 2001 tomándose como base la cepa sensible PAO1 (número de acceso en NCBI: NC_002516) aislada de un paciente con otitis media; convirtiendo a esta bacteria desde entonces en uno de los microorganismos más investigados a nivel molecular. El tamaño del cromosoma circular de PAO1 es de aproximadamente 6,3 millones de pares de bases y no posee plásmidos al igual que la mayoría de aislados de esta bacteria (Soberón, 2003).

El genoma de PAO1 (Cuadro 1.2) posee un contenido de GC del 66%, y está compuesto por 5669 genes y 5 pseudogenes (NCBI, 2010). Más de la mitad de los genes de esta bacteria poseen homología y una organización muy similar a la de *Escherichia coli* y otras Enterobacterias. Sin embargo, se desconoce la función de casi el 32% de los genes previstos en el genoma, considerándose que estos poseen “actividades enzimáticas novedosas” que le otorgan la notable capacidad metabólica y de adaptación que le caracterizan (Soberón, 2003).

Cuadro 1.2.- Descripción de los genes presentes en *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1 de acuerdo a su función. Tomado y traducido de: NCBI, 2010.

DESCRIPCIÓN	NÚMERO DE GENES	PORCENTAJE EN SECUENCIA (%)
Traducción	206	3,13
Procesamiento y modificación de ARN	2	0,03
Transcripción	524	7,96
Replicación, recombinación y reparación	163	2,47
Estructura de la cromatina y dinámica	3	0,04
Control del ciclo celular, mitosis y meiosis	36	0,54
Mecanismos de defensa	74	1,12
Mecanismos de transducción de señal	342	5,19
Biogénesis de la pared celular / membrana	274	4,16
Motilidad celular	155	2,35
Tráfico intracelular y secreción	173	2,62
Modificación postraduccional, proteínas chaperonas	202	3,07
Producción y conversión de energía	338	5,13
Transporte de carbohidratos y metabolismo	256	3,89
Transporte de aminoácidos y metabolismo	591	8,94
Transporte de nucleótidos y metabolismo	112	1,70
Transporte de coenzimas y metabolismo	191	2,9
Transporte de lípidos y metabolismo	247	3,75
Transporte de iones inorgánicos y metabolismo	381	5,79
Síntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	207	3,14
Predicción de funciones generales	773	11,75
Función desconocida	488	7,42
No descritos	841	12,78

1.4.2. Mecanismos moleculares de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa presenta mecanismos moleculares de resistencia intrínseca tales como producción de β -lactamasas en niveles basales, presencia de bombas de expulsión de antibióticos, alteraciones en el transporte debido a la baja permeabilidad de las

porinas presentes en la membrana externa y cambios en los sitios de acción de antibióticos. Adicionalmente, la resistencia adquirida está dada por eventos mutacionales cromosómicos, así como por adquisición de genes de resistencia (Soberón, 2003; Gómez, *et al.*, 2005; Henrichfreise, *et al.*, 2007b). Cada uno de estos mecanismos será analizado a continuación.

1.4.2.1. Producción de β -lactamasas

Las β -lactamasas (EC.3.5.2.6) son un amplio grupo de enzimas que actúan sobre amidas, amidinas y otros enlaces carbono-oxígeno-nitrógeno (Bush, *et al.*, 1995); hidrolizan el anillo β - lactámico de los antibióticos de este tipo, impidiendo así su acción antimicrobiana en la inhibición de la síntesis del peptidoglucano que depende directamente de la integridad del mismo, dejando al fármaco con acción biológica inactiva (Flórez, *et al.*, 2005).

La producción de β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos comúnmente empleados en el tratamiento de patógenos Gram negativos (Livermore, 1995; Hawkey, 1998; Hanson & Sanders, 1999; OPS, 2004b; Flórez, *et al.*, 2005; Gómez, *et al.*, 2005). Para el caso de *P. aeruginosa*, al igual que en todos los microorganismos, la hidrólisis se produce en el espacio periplásmico (OPS, 2004a).

Existen gran variedad de estas enzimas, por lo cual han sido categorizadas por diversos autores, siendo las clasificaciones realizadas por Bush, *et al.* en 1995, así como la de Ambler en 1980 las más empleadas hasta la actualidad. La clasificación propuesta por Ambler se basa en la estructura molecular y secuencia aminoacídica, de tal forma que las enzimas que poseen como sitio activo un residuo de serina se encuentran subdivididas en los tipos A, C y D mientras que aquellas que necesitan del cofactor Zn^{2+} pertenecen al grupo B (Livermore, 1995; OPS, 2004a; Basak, Khodke & Mallick, 2009).

A su vez, la categorización de Bush y colaboradores se basa en los sustratos de hidrólisis de la enzima y el tipo de sustancia que inhibe su actividad (Bush, *et al.*, 1995; Livermore, 1995; OPS, 2004a). En el Cuadro 1.3 se pueden apreciar las principales

características de cada tipo de enzima de acuerdo a estas dos sistematizaciones. En el Anexo A se puede apreciar un esquema gráfico de estas dos clasificaciones.

Cuadro 1.3.- Clasificación de β -lactamasas. Tomado y traducido de: OPS, 2004a.

GRUPO FUNCIONAL DE BUSH, JACOBY-MEDEIROS		TIPO MOLECULAR DE AMBLER	ATRIBUTOS DE LAS β - LACTAMASAS EN EL GRUPO FUNCIONAL
GRUPO	SUBGRUPO		
1		C	AmpC β -lactamasa en bacterias Gram negativas. Los genes a menudo son cromosómicos pero pueden ser codificados por plásmidos. Confiere resistencia a todos los tipos de β -lactámicos, excepto los carbapenems (a menos que se combinen con cambios en las porinas). No son inhibidas por el ácido clavulánico.
2		A, D	La mayoría de enzimas del grupo 2 son inhibidas por el ácido clavulánico (a menos que se indique lo contrario)
	2a	A	Incluyen penicilinas estafilocócica y enterocócica. Confiere alta resistencia a las penicilinas.
	2b	A	B-lactamasas de amplio espectro, incluyen TEM-1 y SHV-1, primordialmente de bacterias Gram negativas.
	2be	A	Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) confieren resistencia a las penicilinas, oximinocefalosporinas y monobactámicos.
	2br	A	B-lactamasas tipo TEM (IRT) y una SHV que son resistentes a los inhibidores
	2c	A	Enzimas que hidrolizan la carbenicilina
	2d	D	Enzimas que hidrolizan la cloxacilina-(oxacilina), inhibidas moderadamente por el ácido clavulánico
	2e	A	Cefalosporinasas
	2f	A	Enzimas que hidrolizan los carbapenems con serina en la zona activa
3	3a, 3B, 3C	B	Metallo- β -lactamasas que confieren resistencia a los carbapenems y todos los tipos de β -lactámicos excepto los antibióticos monobactámicos. No son inhibidas por el ácido clavulánico.
4		?	Penicilinas misceláneas que no caben en otros grupos. No son inhibidas por el ácido clavulánico.

La enzima de mayor relevancia clínica en *P. aeruginosa* es la β -lactamasa tipo AmpC de origen cromosómico, la misma que al sobreexpresarse gracias a un mecanismo complejo de interacción y mutación de varios genes, otorga a esta bacteria resistencia frente a la mayoría de antibióticos β -lactámicos (Langae, *et al.*, 2000; Reisbig, *et al.*, 2003; Schmidtke & Hanson, 2006; Juan, *et al.*, 2006; Henrichfreise, *et al.*, 2007a).

A pesar de que *P. aeruginosa* produce otro tipo de enzimas β -lactamasas, tales como las BLEE o tipo AmpC de origen plasmídico, estas son muy poco frecuentes en relación a aquellas de origen cromosómico (Livermore, 1995; Campbell, *et al.*, 1997; Martínez & Hernández, 2001; Gómez, *et al.*, 2005), presentándose en apenas el 0,5-2,5% de los casos clínicos (Livermore, 1995).

1.4.2.1.1. Mecanismo de sobreproducción de AmpC

Como ya se ha mencionado, la sobreproducción de AmpC es el mecanismo de resistencia más prevalente frente a β -lactámicos en *P. aeruginosa*, encontrándose entre el 20 al 75% del total de aislados clínicos resistentes (Henrichfreise, *et al.*, 2007a; Basak, *et al.*, 2009). Los antibióticos frente a los cuales este sistema otorga resistencia son los siguientes: a) cefalosporinas de segunda generación como: cefuroxima, cefoxitina cefmetazol, b) cefalosporinas de tercera y cuarta generación como: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefotetan y cefepime, c) monobactámicos como el aztreonam, y d) penicilinas de amplio espectro como la piperacilina-tazobactam (Gómez, *et al.*, 2005; Basak, *et al.*, 2009).

La sobreexpresión del gen *ampC* “se relaciona muy estrechamente con el proceso de reciclaje de péptidoglucanos de algunas bacterias y fue inicialmente descrito para *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*) siendo posteriormente encontrado como conservado para *P. aeruginosa*” (Juan, *et al.*, 2005).

Este sistema, también conocido como mecanismo de “derepresión”¹ parcial o completa de *ampC*, involucra a los genes: *ampC*, *ampG*, *ampR*, y el operón bicistrónico *ampDE*, cuyas interacciones moleculares y eventos mutacionales permiten la sobreexpresión de la β -lactamasa tipo AmpC (OPS, 2004b; Dumas, *et al.*, 2006; Reinhardt, *et al.*, 2007) y es considerado como “el más sofisticado mecanismo de represión-derepresión descrito en el mundo bacteriano” (Juan, *et al.*, 2006).

En *P. aeruginosa* al igual que en otras bacterias, el sistema es inducible por los propios antibióticos, se conoce que la cefoxitina e imipenem son inductores fuertes

¹ Derepresión: Traducción informal del término “derepression” que significa ausencia de represión en el gen *ampC*.

mientras que antibióticos como la ceftazidima , cefepime, piperacilina y aztreonam son inductores débiles (Moya, *et al.*, 2008; Jacoby, 2009). En condiciones normales y sin inducción por antibióticos, la bacteria expresa cantidades basales de AmpC, denominándose a este estado como “represión de *ampC*”, en donde cada uno de los componentes del sistema génico juega un rol definitivo en la represión del gen *ampC*. El proceso se describe de manera detallada a continuación (Véase Figura 1.4, y 1.5).

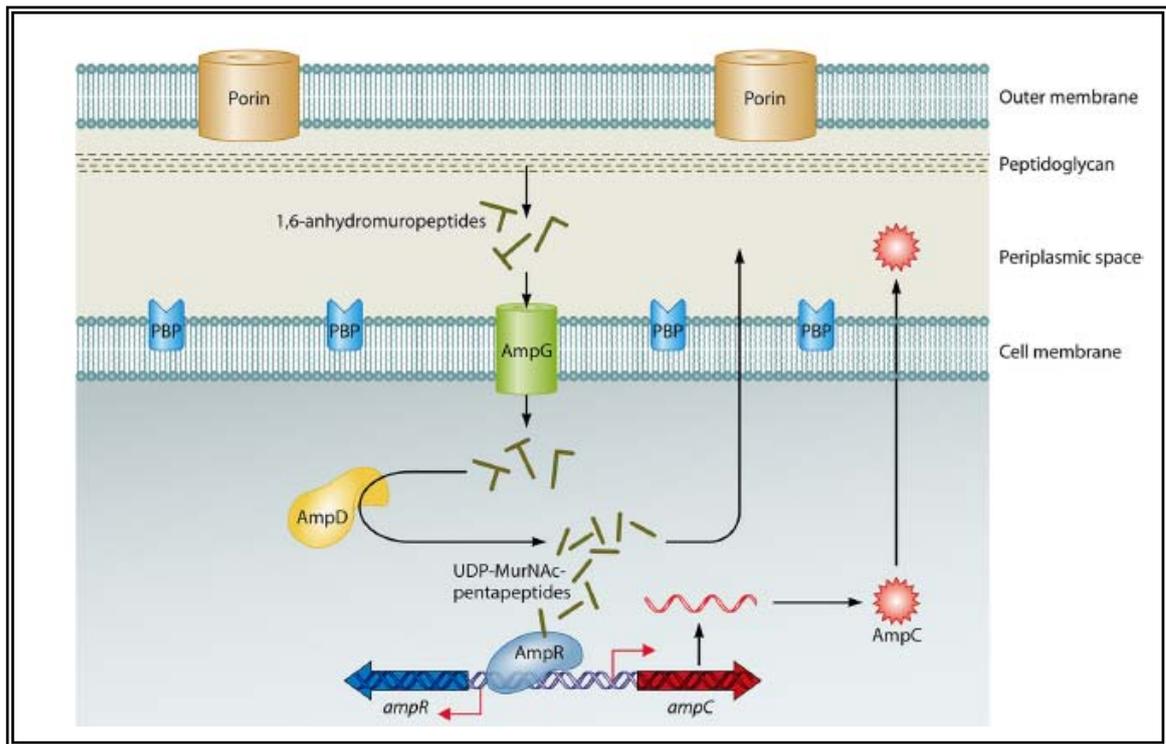


Figura 1.4.- Represión de *ampC*. Durante el proceso normal de reciclaje del peptidoglucano, 1,6-anhidromurapéptidos son removidos desde la membrana y transportados al citoplasma por la permeasa AmpG. Una vez dentro, son hidrolizados por AmpD para generar tres péptidos libres los mismos que son convertidos a UDP-muramil-N-acetil-pentapéptidos (péptidos represores) , éstos interactúan con AmpR y en conjunto se unen a la región intergénica *ampR-ampC*, creando una conformación que reprime la transcripción de *ampC*. En este estado, se producen niveles bajos de AmpC y la enzima se localiza en el espacio periplásmico confiriéndole resistencia intrínseca frente a los antibióticos β -lactámicos (Lister, *et al.*, 2009).

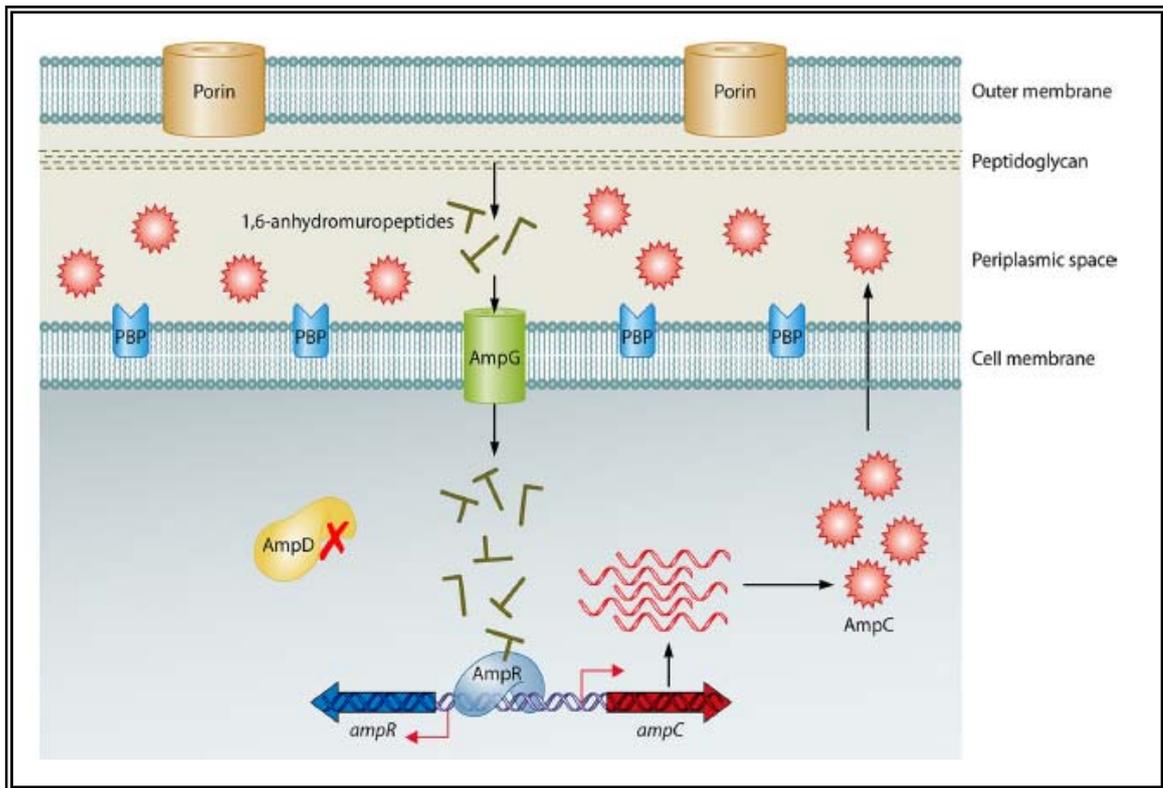


Figura 1.5.- Derepresión de *ampC* asociada a mutaciones en *ampD*. La presencia de mutaciones que conducen a la inactivación de AmpD o a la expresión disminuida del gen que la codifica, no permite la hidrólisis de los 1,6-anhidromurapéptidos (péptidos inductores) los mismos que se acumulan en el citoplasma, y actúan tras vincularse a la proteína reguladora AmpR como inductores de la expresión de *ampC*, esto debido a la conformación que adquiere, resultando en una sobreexpresión de la enzima en altos niveles constitutivos (Lister, *et al.*, 2009).

Cualquier alteración o inactivación de los componentes de este sistema génico producida por mutaciones en su secuencia, desencadenan el estado de “derepresión” y por lo tanto la sobreexpresión inducida para el sistema génico de la β -lactamasa AmpC (Juan, *et al.*, 2005; Schmidtke & Hanson, 2006; Wolter, *et al.*, 2007; Moya, *et al.*, 2008). Hasta el momento, se ha demostrado que las mutaciones asociadas a la resistencia de mayor importancia son las encontradas en los genes: *ampD* y *ampR* aunque se ha encontrado también aislados de *P. aeruginosa* productores de β -lactamasas que no poseen mutaciones en ninguno de los genes del sistema (Juan, *et al.*, 2005; Wolter, *et al.*, 2007).

El genotipo mutante de “derepresión” puede ser parcial o completo y dependiendo de su grado se presentará el nivel de resistencia fenotípica (Gómez, *et al.*, 2005; Wolter, *et al.*, 2007; Amber, *et al.*, 2008). De tal forma que las cepas con

“derepresión” parcial expresan niveles ligeramente incrementados de AmpC manteniendo cierto grado de inducibilidad por antibióticos, mientras que aquellas con “derepresión” completa presentan niveles elevados de AmpC con pérdida completa de la inducibilidad (Wolter, *et al.*, 2007; Amber, *et al.*, 2008).

1.4.2.2. Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son complejos enzimáticos compuestos por un sistema de tres proteínas: una presente en la membrana externa, en donde forma un canal, otra en la membrana interna, en donde actúa como un intercambiador droga-protón, y finalmente una en el espacio periplásmico, la cual permite la vinculación entre las otras dos (Soberón, 2003; Poole, 2004). Este mecanismo de resistencia otorga a la bacteria la capacidad de expulsar desde el citoplasma compuestos dañinos, como detergentes y sustancias antipáticas en contra a un gradiente de concentración (Gómez, *et al.*, 2005).

Las bombas de expulsión están clasificadas en dos grandes grupos según sus características estructurales: el primero, y de mayor relevancia, es el conformado por la familia de transportadores *RND* (resistance nodulation-division), y el segundo denominado *MFS* (major facilitator superfamily). En cuanto al primer grupo, su sistema tripartito está conformado por las proteínas: RND, MFP (membrane fusion protein) y OMF (outer membrane factor); mientras que el segundo grupo está compuesto por: MFS, MFP y OMF, tal como se aprecia en la Figura 1.6 (Poole, 2004; Soberón, 2003).

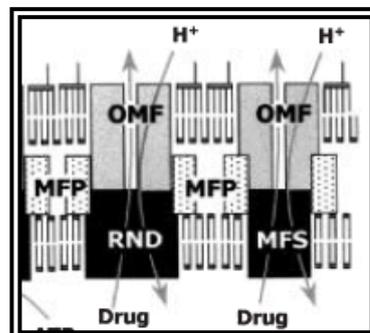


Figura 1.6.- Organización y operación de las bombas de expulsión que confieren resistencia antimicrobiana en bacterias Gram negativas. Modificado de: Poole, 2004.

Este mecanismo es inducible por antibióticos, especialmente ciprofloxacina, y se ha demostrado que la presencia de mutaciones en los genes que codifican para cualquiera de las tres proteínas que conforman el sistema ocasiona la sobreexpresión de la bomba y por lo tanto un fenotipo resistente a distintos tipos de antibióticos dependiendo de los genes que alteren su expresión (Gómez, *et al.*, 2005).

Las principales bombas de expulsión descritas para esta bacteria se encuentran expuestas en el Cuadro 1.4. La bomba *mexAB-oprM*, cuya expresión es constitutiva, incrementa su actividad con determinados eventos mutacionales que favorecen a la bacteria confiriéndole resistencia ante penicilinas, quinolonas, cefalosporinas e incluso meropenem; a su vez, la expresión de las bombas *mexCD-oprJ* y *mexEF-oprN* se encuentra silenciada y la presencia de mutaciones en estos genes le confiere a *P. aeruginosa* resistencia frente a quinolonas y algunos β -lactámicos que incluyen meropenem e imipenem. Mutaciones en la bomba *mexXY-oprM*, la misma que es inducible por los propios antibióticos, le otorgan resistencia frente a quinolonas, β -lactámicos, meropenem, y aminoglucósidos (Nakae, *et al.*, 1999; Poole, 2004; Dumas, *et al.*, 2006; Reinhardt, *et al.*, 2007 *et al.*).

Cuadro 1.4.- Principales bombas de expulsión presentes en *Pseudomonas aeruginosa*. Tomado y adaptado de: Poole, 2004.

COMPONENTES DE LA BOMBA DE EXPULSIÓN*			SITIO DE MUTACIÓN
MFP	RND	OMF	
MexA	MexB	OprM	<i>nalB, nalC, mexR</i>
MexC	MexD	OprJ	<i>nfxB</i>
MexE	MexF	OprN	<i>nfxC</i> en <i>mexT</i>
MexX	MexY	OprM	<i>mexZ</i>

* **MFP:** membrane fusion protein, **RND:** resistance nodulation-division, **OMF:** outer membrane factor.

1.4.2.3. Alteración de transporte: porinas de membrana

Las porinas son proteínas transmembranales que permiten el ingreso de compuestos a la célula mediante difusión facilitada. Uno de los mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* ocurre mediante el bloqueo o pérdida completa de la porina OprD, la cual se encarga de la difusión facilitada de los carbapenems como imipenem y meropenem, confiriéndole resistencia al bacteria en condiciones de ausencia de la porina o expresión disminuida del gen que codifica para la misma (Gómez, *et al.*, 2005; Dumas, *et al.*, 2006; *et al.* Reinhardt, *et al.*, 2007; Henrichfreise, *et al.*, 2007b).

Debido a la alta afinidad que presenta la porina OprD para el antibiótico imipenem, las cepas con mutaciones inactivantes de esta porina son seleccionadas por el uso de imipenem y su fenotipo es resistente (Gómez, *et al.*, 2005; Dumas, *et al.*, 2006; Reinhardt, *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que para que la cepa pueda presentar la resistencia a este fármaco por este mecanismo ocurre una interacción entre la inactivación de la porina y la sobreproducción de β -lactamasas de origen cromosómico las cuales lo hidrolizan muy lentamente (Livermore, 1992). Para el caso de meropenem, dado a que la afinidad de la porina OprD con el mismo es setenta veces menor en relación a imipenem, únicamente se ha detectado sensibilidad disminuida por la presencia de este mecanismo molecular de resistencia (Gómez, *et al.*, 2005; Henrichfreise, *et al.*, 2007b).

1.4.2.4. Modificación de sitios de acción

Las proteínas denominadas por sus siglas en inglés como PBP (penicillin binding protein) están implicadas en la síntesis de peptidoglucano en bacterias y son el sitio de acción de antibióticos tales como las penicilinas, de tal forma que cuando un antibiótico de este tipo ingresa y se une con gran afinidad a las mismas, las enzimas se inactivan inhibiendo la síntesis del peptidoglucano, motivo por el cual la célula muere, presentando un fenotipo resistente frente al mismo (Hawkey, 1998).

Es así, que el mecanismo de resistencia implica la modificación de los sitios blancos de unión de la penicilina PBP, de tal forma que el antibiótico ingresa a la célula pero no logra unirse al sitio objetivo o se une con menor afinidad, siendo en estas

circunstancias incapaz de inhibir su actividad y presentando por tanto resistencia frente a ese antibiótico (Hawkey, 1998).

Si bien este mecanismo es común en bacterias Gram positivas, para *P. aeruginosa* aún la situación no es clara. Como explicaban Martínez y Hernández en el 2001 “Algunos autores han relacionado la resistencia frente a imipenem con alteración en la expresión de la PBP4 pero hasta el momento no se ha demostrado la importancia de este mecanismo para esta bacteria”.

1.4.3. Diagnóstico de infección causada por *Pseudomonas aeruginosa*

1.4.3.1. Métodos de diagnóstico tradicional

Dado a que las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* poseen una amplia distribución, el aislamiento de esta bacteria puede darse a partir de una infinidad de tipos de muestras. Para la obtención de resultados reales en el diagnóstico de la bacteria y en el menor tiempo posible, deben considerarse todos los parámetros que permitan su correcta toma, manejo y procesamiento. Estos parámetros generales son: a) que el material que se utilice para la toma de la muestra sea estéril, evitándose a toda costa la contaminación externa de la muestra cuando ésta sea tomada, b) que la cantidad del material recuperado debe sea la adecuada con el fin de poder realizar todos los exámenes de laboratorio requeridos, y c) que el procesamiento se realice lo más pronto posible con el fin de que sea un reflejo cuantitativo de la situación real del paciente (Baron, *et al.*, 1994).

Dentro del diagnóstico tradicional, las muestras son sembradas en un medio de cultivo diferencial, de uso habitual en el laboratorio para el aislamiento de patógenos. Algunos de los medios más comúnmente empleados para este fin son: agar sangre, agar MacConkey y agar chocolate. Paralelamente se realiza un cultivo en medio de soporte para obtener un respaldo de la muestra clínica investigada, este medio es generalmente el caldo de tioglicolato o infusión cerebro corazón (Baron, *et al.*, 1994). Una vez inoculados, estos medios son incubados a 37° C por 24h.

Tras la identificación preliminar del patógeno en función de sus características morfológicas en el medio diferencial, (en el caso de *P. aeruginosa*, la formación de colonias alargadas con coloración verdosa y fuerte olor a frutas), se realiza la identificación final mediante la siembra en medios de cultivo para la ejecución de las pruebas bioquímicas convencionales. En la Tabla 1.1 se muestran los resultados de las pruebas en *P. aeruginosa*.

Tabla 1.1.- Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. Tomado de: Álvarez, Boquet & de Fez, 1996; Baron, *et al.*, 1994.

MEDIO	RESULTADO		SIGNIFICADO
	Reporte	Cambio de color	
TSI	K/K H ₂ S (-)	Medio alcalino, color: rojo Colonias con brillo metálico.	No existe fermentación de glucosa ni lactosa.
MR-VP	MR (-) VP (-)	No hay cambio de color al añadir el reactivo	No existe producción de ácidos, acetoina o butanediol como productos finales del metabolismo de la glucosa.
Citrato	+	De verde a azul	Utiliza citrato como única fuente de carbono.
Urea	+/-	De rosa claro a fucsia	Algunas cepas poseen la enzima ureasa, de ser así esta hidroliza la urea del medio.
SIM	H ₂ S (-) Indol (-) Motilidad (+)	No hay cambio de color	No posee enzima triptofanasa para degradar el triptófano a indol.
Lisina	-	No hay cambio de color	No descarboxilación de la lisina, no posee la enzima lisina descarboxilasa
Catalasa	+	Se observa la formación de burbujas en el medio	Posee la enzima catalasa que le da la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno
Oxidasa	+	Aparición de un color azul oscuro	Presencia de la enzima citocromooxidasa por lo cual el dimetil-parafenilen-diamin (reactivo incoloro) se oxida dando un producto de color.

Dependiendo del caso, la identificación también puede efectuarse mediante el empleo del sistema multitest API 20E (para bacilos Gram negativos), el mismo que consiste en una prueba bioquímica más completa dispuesta en un microarreglo en donde se encuentran los sustratos secos, una vez que estos son re-hidratados al colocarse una suspensión del microorganismo en cada celda, permite que la reacción bioquímica ocurra tras su incubación a 37° C por 24h, permitiendo así la identificación de *P. aeruginosa* gracias a la codificación que arroja la reacción en cada celda de la prueba (Baron, *et al.*, 1994).

Existen adicionalmente métodos automatizados, que paralelamente a la identificación de la bacteria permiten conocer su antibiograma, pero que son utilizados en casos especiales debido a lo costoso de los reactivos necesarios para la operación de los mismos, un ejemplo de esto es el bioMerieux Vitek, Inc. El cual partiendo de una muestra del microorganismo realizará un amplio set de pruebas bioquímicas relacionando los resultados con su amplia base de datos para la identificación, permitiendo de esta forma obtener resultados rápidos sin la asistencia de ningún operador (Baron, *et al.*, 1994).

1.4.3.2. Métodos de diagnóstico molecular

Debido a las limitaciones inherentes a los métodos de diagnóstico tradicionales, el desarrollo de técnicas moleculares de identificación de patógenos de relevancia clínica como *P. aeruginosa* se ha potenciado ampliamente en los últimos años. Estas metodologías han permitido superar las dificultades en cuanto al tiempo de emisión de resultados, ya que permiten la identificación de *P. aeruginosa* en tan solo un día, superando la obtención de resultados mediante el uso de pruebas convencionales que toman alrededor de ocho días. Así mismo, se ha logrado mejorar por mucho la sensibilidad y especificidad en comparación a las pruebas tradicionales llegando a exhibir valores de especificidad y sensibilidad de 100% (Cattoir, *et al.*, 2010; Baron, *et al.*, 1994).

Los principales métodos de diagnóstico molecular empleados para la identificación de *P. aeruginosa* son: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real cuantitativa (RT-Q-PCR). Estas

técnicas permiten revelar la presencia de la bacteria basadas en el principio de que una gran cantidad de ADN puede ser sintetizado a partir de un solo fragmento presente en una muestra mediante una reacción enzimática. El producto de esta reacción, que determina la presencia del microorganismo investigado, será detectado entonces gracias a la visualización del fragmento en geles de agarosa sometidos a electroforesis (PCR) o mediante la cuantificación de la emisión de fluorescencia en tiempo real de la sonda marcada radiactivamente añadida a la reacción que hibrida con el ADN de nuestro interés (RT-Q-PCR) (Baron, *et al.*, 1994; Pandero, Rivas & Sánchez, 2000; Kubista, *et al.*, 2006).

Los principales blancos genéticos empleados hasta la actualidad para la identificación de la presencia de *P. aeruginosa* en muestras clínicas son: 16S rRNA, *algD*, *oprI*, *oprL*, *toxA*, *gyrB* y *ecfX*. Sin embargo, se han observado resultados falsos positivos con 16S rRNA y *oprI*, así como falsos negativos con los genes *algD* y *toxA*, por lo cual los genes *ecfX* y *gyrB* han sido escogidos como los principales blancos en el diagnóstico molecular de este patógeno debido a la alta especificidad y sensibilidad de los ensayos evaluados en muestras de sangre (*et al.*Lavenir, *et al.*, 2007; Anuj, *et al.*, 2009; Cattoir, *et al.*, 2010).

Para superar los inconvenientes que ocasiona la obtención de falsos positivos o negativos, se han propuesto recientemente métodos de amplificación tipo dúplex mediante PCR en tiempo, que detectan a la vez los genes: *gyrB* y *ecfX* volviendo aún más sensible y específica la técnica al existir la posibilidad de encontrar resultados cruzados por la presencia de otras bacterias en la muestra (Anuj, *et al.*, 2009).

1.4.4. Tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

El tratamiento de la infección causada por *P. aeruginosa* depende en gran medida de consideraciones clínicas inherentes a cada tipo de infección. De manera general se debe procurar tratar la enfermedad lo más rápido posible con un antibiótico ante el cual la bacteria sea sensible *in vitro* con el fin de evitar la selección de cepas multiresistentes (Beherman, *et al.*, 2004).

Para el caso de pacientes cuyo sistema inmunológico sea normal o para infecciones urinarias se recomienda la utilización de un solo antibiótico, mientras que para otro tipo de infecciones graves, septicemias, infecciones en pacientes inmunodeprimidos o terapia empírica se recomienda el empleo de una combinación de dos antibióticos generalmente un β -lactámico y un aminoglucósido para garantizar al máximo el éxito de la antibioticoterapia gracias al sinergismo generado, (Jawetz, *et al.*, 2002; Beherman, *et al.*, 2004; Kayser, *et al.*, 2005; Murray, *et al.*, 2006). En la Tabla 1.2 se puede apreciar una recopilación de los principales antibióticos empleados en la terapia en infecciones por *P. aeruginosa*.

Tabla 1.2.- Antibióticos empleados en el tratamiento de la infección por *P. aeruginosa* (Autora).

TIPO	GRUPO	ANTIBIÓTICO	TERAPIA
β-lactámicos	Penicilinas de amplio espectro (anti- <i>Pseudomonas</i>)	Ticarcilina ^a	Combinada ^a
		Piperacilina ^a	Combinada ^a
		Piperacilina-tazobactam ^b	Monoterapia ^b
	Cefalosporinas	Ceftazidima ^a	Terapéutica Primaria ^a / Monoterapia ^b
		Cefoperazona ^a	Monoterapia ^b
	Carbapenemes	Imipenem ^{a,b}	ND
		Meropenem ^b	ND
	Monobactanos	Aztreonam ^{a,b}	ND
Aminoglucósidos	Grupo II de espectro ampliado	Gentamicina ^a	Combinada ^a
		Tobramicina ^a	Combinada ^a
		Amikacina ^a	ND
Quinolonas		Ciprofloxacina ^a	ND

^a Jawetz, Melnick, Butel & Morse, 2002, ^b Beherman, et al., 2004, ^c Flórez, 2005, ND: No documentado.

1.4.5. Detección de resistencia antimicrobiana en *Pseudomonas aeruginosa*

1.4.5.1. Métodos de detección tradicionales

La determinación del perfil de sensibilidad de *P. aeruginosa* frente a los antibióticos más comúnmente empleados para el tratamiento, es un punto crítico en la

elección de la terapia antimicrobiana de una infección y al ser aplicada adecuadamente, permite un mejor pronóstico.. Las técnicas tradicionales para la determinación de este perfil se encuentran completamente difundidas, siendo al presente pruebas de aplicación rutinaria en el laboratorio clínico.

La técnica clásica para la determinación de resistencia frente a antibióticos es la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante dilución del antimicrobiano en el caldo de cultivo. Ello permite la obtención de un “resultado cuantitativo de la cantidad de antibiótico que es necesaria para la inhibición de un microorganismo específico” (Baron, *et al.*, 1994). Esta metodología se basa en la realización de diluciones seriadas en repetición del agente antimicrobiano en el caldo de cultivo de tal forma que tras la incubación por 24h a 37° C es factible conocer la más baja concentración a la cual el antimicrobiano inhibe el crecimiento de la bacteria (Baron, *et al.*, 1994).

Debido a lo laborioso del método antes mencionado las casas comerciales desarrollaron kits para la determinación del CMI mediante plataformas de microdiluciones que gracias a lecturas de resultados automatizadas volvieron de mayor aplicación la técnica al laboratorio. Sin embargo, otros métodos que permiten elucidar la resistencia se aplican de forma más práctica en el laboratorio. Uno de estos métodos y quizás el más difundido es el método de difusión de disco, el mismo que es conocido regularmente como antibiograma (Baron, *et al.*, 1994).

El método de difusión de disco se basa en el principio de que al añadir un disco que posee una concentración conocida de antibiótico que es efectiva para la inhibición del crecimiento del microorganismo, este se difundirá en el medio de cultivo circularmente, de tal forma que inhibirá el crecimiento de bacterias en un halo alrededor del mismo. Conforme mayor sea este halo (valores de radio en mm.) mejor será la acción del antimicrobiano por lo tanto la bacteria será sensible frente al mismo, y a menores valores o ausencia del halo la bacteria presentará resistencia. En base a este principio existen ya los valores estandarizados que determinan el perfil fenotípico de resistencia frente a los antibióticos comúnmente empleados (Baron, *et al.*, 1994).

1.4.5.2. Métodos de detección molecular

En los últimos años con el afán de comprender de una manera más integral el perfil de sensibilidad bacteriano, científicos alrededor de todo el mundo han concentrado esfuerzos en la investigación de los mecanismos de resistencia a nivel molecular y han desarrollado métodos que permiten la investigación de estos perfiles basados en la información genotípica del patógeno.

Estos resultados presentan una información más amplia y precisa del perfil de resistencia de la bacteria, y por lo tanto su aplicación a largo plazo en el laboratorio clínico podría ser vital para hacer aún más efectiva la toma de decisiones en cuanto al tratamiento antimicrobiano. Los principales métodos que deben ser empleados para la investigación del material genético bacteriano en búsqueda de mecanismos de resistencia molecular, y en el caso de esta investigación para la determinación del mecanismo de sobreproducción de AmpC asociado a la presencia de mutaciones en los genes del sistema son: *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR*.

1.4.5.2.1. Extracción de ADN

El aislamiento de ADN es el primer paso para el estudio del mecanismo molecular de resistencia mediado por la sobreproducción de AmpC, ya que permite obtener el material genético que será procesado para la identificación de mutaciones asociadas a resistencia en los genes del sistema. El objetivo de este paso será por tanto, separar el ADN de los demás componentes celulares para obtener una “solución homogénea del mismo que represente la información genética completa contenida en una célula”. Por este motivo, el método de extracción debe ser eficiente, no debe alterar ni física ni químicamente las moléculas de ADN y debe ser rápido y simple. Los métodos de aislamiento comprenden en general cuatro pasos esenciales que son: a) lisis celular, b) desproteinización y remoción de ARN, c) concentración de ADN y d) determinación de pureza y cantidad de ADN.

La lisis celular es una de las etapas más importantes en el aislamiento de material genético. Los métodos para alcanzar este fin pueden ser químicos (detergentes), mecánicos (sonicación, agitación) o enzimáticos (proteínas que rompen

las paredes celulares). En esta etapa se obtiene el material del interior de la célula en forma libre al haberse lisado las membranas celulares y nucleares.

La desproteínización y remoción de ARN tienen como fin remover los productos no deseados del lisado, es decir proteínas y ARN. Esta remoción se facilita gracias a que las propiedades químicas y de solubilidad de las proteínas son distintas a las del ADN, siendo este hidrofílico mientras que las proteínas son parcialmente solubles en solventes orgánicos debido a su mayor hidrofobicidad. Por lo tanto, el uso de diversos tipos de solventes orgánicos permite desproteínizar el lisado al separar estos componentes en distintas fases, o mediante la formación de complejos insolubles con las proteínas o ADN que bajo este mismo principio pueden ser retirados de la solución.

Otros métodos usados para la desproteínización se basan en la utilización de enzimas que digieren las proteínas y/o columnas de sílica gel, este último se fundamenta en la capacidad que posee el ADN para unirse a superficies de sílica en presencia de altas concentraciones de sales, mientras que las proteínas por la presencia de las sales no se adsorben a esta membrana, separándolas de la solución; este método es empleado en algunos kits comerciales. En cuanto a la remoción de ARN, esta se realiza habitualmente con enzimas tipo ARNasas las cuales degradan el ARN removiéndolo del preparado.

El objetivo de la *concentración de ADN* es concentrar el ADN de alto peso molecular de la solución desproteínizada, y además remover nucleótidos, aminoácidos e impurezas de bajo peso molecular que hayan quedado después de la lisis celular. Esto se logra gracias a la precipitación del material genético con alcohol (etanol, o alcohol isoamílico) y diálisis con compuestos que absorben agua activamente.

Finalmente, *la determinación de la pureza y cantidad de ADN* es el paso en el que se evalúan los resultados. En este paso generalmente se emplean técnicas de espectrofotometría y fluorometría, que nos permiten conocer la calidad y cantidad del ADN con el que vamos a trabajar. Debido a que el ADN presenta su máxima absorbancia a 260 nm., los valores obtenidos en el rango de 0,1 – 2 representan una concentración de 0,5 a 100 µg/µL; mientras que, debido a que las proteínas presentan

una máxima absorbancia a 280 nm., la pureza del ADN puede ser determinada al establecer el radio de absorbancia A_{260}/A_{280} , (Surzycki, 2000).

1.4.5.2.2. Diseño y análisis de cebadores

Un punto crítico para el éxito de la PCR es el diseño y análisis de sus cebadores. Para este fin existen algunos programas bioinformáticos disponibles que permiten tanto el diseño (Primer BLAST) como el análisis de los parámetros óptimos para la elección de los cebadores (IDT Oligo Analyzer), estas herramientas son de gran ayuda para la detección de los genes blanco implicados en el mecanismo de resistencia por la sobreproducción de AmpC. A continuación se describen los principales parámetros que estos programas proporcionan para la acertada toma de decisiones en el diseño del ensayo de PCR:

- a) *Tamaño*: los cebadores deben ser lo suficientemente largos como para dar especificidad a la reacción y lo suficientemente cortos como para aumentar al máximo la eficiencia de la hibridación. Este tamaño se considera habitualmente entre 18 – 30 nucleótidos.
- b) *Contenido en porcentaje de GC*: de este parámetro dependerá la temperatura de melting, los valores óptimos de este porcentaje deben encontrarse entre 40 – 60% y deben ser muy similares para ambos cebadores. Se debe considerar en el diseño, que en las 5 últimas bases del cebador no pueden existir más de 3 bases G o C para que la unión de los mismos sea específica y estable a la secuencia blanco; además se recomienda que los cebadores terminen en una de estas dos bases debido a su estabilidad de unión, incrementando su especificidad (Surzycki, 2000; Arun & Saurabha, 2003; Wadsworth, 2006; Cultek, 2010; Premier Biosoft International, 2010).
- c) *Estructuras secundarias*: la presencia de estas estructuras, ya sea por interacciones inter o intramoleculares, es indeseable ya que estas van a disminuir la eficiencia de la reacción de PCR. Las interacciones que deben ser evitadas se indican a continuación:

- i. *Horquillas*: o también conocidas como “hairpins”, son interacciones intramoleculares que ocurren entre las bases del cebador, deben ser evitados cuando los valores de la variación de la energía libre de Gibbs (ΔG) son inferiores a -2 kcal/mol para la parte interna del cebador y menores a -3 kcal/mol cuando se ubican en los extremos 3' del mismo.
 - ii. *Dímeros de cebadores*: también conocidas como “primer dimers”, estas interacciones intermoleculares deben ser evitadas. Cuando se forman homodímeros, es decir uniones entre el mismo cebador, o heterodímeros, entre los dos cebadores, se tolera como máximo valores de ΔG iguales a -6 kcal/mol cuando se encuentran en la parte interna; de encontrarse en el extremo 3' se toleran valores de hasta -5kcal/mol (Premier Biosoft International, 2010).
- d) *Secuencias palindrómicas y/o repeticiones*: las repeticiones de di-nucleótidos deben ser evitadas y se tolerará un máximo de 4 en todo el cebador, para las repeticiones de nucleótidos individuales el límite de tolerancia será igualmente de 4; en cuanto a las secuencias palindrómicas estas deberán ser evitadas con el fin de garantizar la especificidad de hibridación a la secuencia blanco (Surzycki, 2000; Premier Biosoft International, 2010).
- e) *Temperatura de melting*: esta temperatura (T_m) corresponde a la temperatura a la cual el 50% del ADN bicatenario se ha disociado formando ADN monocatenario que podrá ser blanco para la hibridación de los cebadores. Por ello, la especificidad de la PCR está vinculada con esta temperatura. Los valores teóricamente óptimos de la T_m oscilan entre 52-60° C. A valores cercanos o mayores a 65 ° existe una mayor tendencia a la formación de estructuras secundarias. Por otro lado, la temperatura de hibridación, en teoría, es 5–10 ° C inferior a la T_m . El cálculo de esta temperatura puede realizarse haciendo uso de una gran variedad de fórmulas, la más sencilla es la de Wallace, descrita a continuación. Otras fórmulas, a más de considerar la composición del cebador toman en cuenta parámetros termodinámicos de la molécula (Surzycki, 2000; Wadsworth, 2006; Cultek, 2010; Premier Biosoft International, 2010).

$$T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

- f) *Análisis de homología y alineamiento de secuencias*: este análisis se lleva a cabo con el fin de evaluar la especificidad de los cebadores para el ensayo de PCR. El uso de algoritmos en programas bioinformáticos nos permite conocer si el cebador se une únicamente al blanco en el organismo deseado, o si lo hace también con otros organismos y con qué grado de homología y probabilidad. Es por tanto, un punto fundamental para la elección del cebador adecuado y puede ser llevado a cabo en programas que usan como base la información contenida en el NCBI.

1.4.5.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) permite la síntesis enzimática de gran cantidad de ADN a partir de una sola copia presente en una muestra. Esto lo hace gracias a que secuencias cortas, (10 a 30 bases) denominadas cebadores, hibridan la secuencia complementaria del sitio blanco de estudio del material genético, mientras que una enzima ADN polimerasa termoestable se encarga de adicionar dNTP'S (deoxinucleótidos trifosfato) desde el extremo 3' de los mismos, de tal forma que tras ser llevada esta mezcla a un proceso de ciclado bajo temperaturas específicas que favorecen la reacción, la enzima extenderá la secuencia entre los cebadores, obteniendo al final millones de copias del ADN blanco (Baron, *et al.*, 1994; Pandero, Rivas, Sánchez & 2000; Surzycki, 2000; Hayden, 2004).

El proceso de ciclado de temperaturas se repite de 25–30 veces en tres fases: que se describen a continuación:

- a) *Denaturación*: esta etapa se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre 94 – 95°C durante 30 a 60 segundos, tiempo tras el cual el ADN bicatenario se encuentra completamente denaturado, dando paso a las siguientes etapas que facilitan la reacción enzimática.
- b) *Hibridación*: también conocida como “annealing”, esta fase permite la unión por complementariedad de los cebadores al principio y al final de la secuencia

blanco y ocurre a una temperatura teórica de entre 50-55 °C por 30 a 60 segundos.

- c) *Extensión*: una vez que los cebadores hibridan la secuencia blanco, se inicia la reacción enzimática de adición de nucleótidos en el extremo 3' por una ADN polimerasa termoestable. La principal consideración para fijar la temperatura de esta etapa es que esta deberá ser lo suficientemente alta y cercana a la temperatura óptima de acción de la enzima pero a su vez lo suficientemente baja como para no permitir la disociación de los cebadores. La temperatura de 72°C es la más usada para este fin por un tiempo de 15 – 20 segundos para 1 Kpb. del fragmento deseado (Surzycki, 2000).

Los fragmentos resultantes de este ciclado se denominan amplicones y pueden ser visualizados por electroforesis en geles de agarosa previo a su purificación para ser secuenciados automáticamente y permitir así la detección de mutaciones asociadas a la resistencia mediada por la sobreproducción de AmpC.

1.4.5.2.4. Secuenciación automática

El método de secuenciación tradicional para diagnóstico molecular es el descrito por Sanger en 1977, el cual se fundamenta en la síntesis de fragmentos de ADN. Esto ocurre gracias a la presencia de uno o más cebadores que hibridan al amplicón purificado, y a partir de los cuales, una polimerasa especialmente designada añade deoxinucleótidos (dNTP's) en el extremo 3', hasta que un terminador denominado dideoxinucleótido (ddNTP) se incorpora y completa efectivamente la síntesis de un producto de secuenciación. Este dideoxinucleótido es una molécula análoga al deoxinucleótido, pero carente del grupo hidroxilo 3' necesario para la formación del enlace fosfodiéster durante la polimerización, por lo cual interrumpe la síntesis de ADN (Surzicky, 2000; Alcorn & Anderson, 2004; Applied Biosystems, 2009). El resultado de esta reacción genera fragmentos de ADN que comparten su extremo 5', sin embargo poseen diferentes tamaños y en su extremo 3' poseen una base específica tras la incorporación del terminador ddNTP, de tal forma que al separar estos fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida es factible conocer la secuencia del fragmento de ADN estudiado (Surzycki, 2000).

Los métodos de secuenciación automática emplean este fundamento, pero identifican la secuencia de una forma automatizada gracias a la detección de fluorescencia emitida por fluorocromos añadidos a la mezcla. Cuando los fluorocromos son añadidos a los cebadores se ejecutan cuatro reacciones por separado y en cada una se encuentra el cebador marcado con un colorante fluorescente diferente y uno de los cuatro ddNTP's. A su vez, en el caso de que el marcaje se haya realizado en los ddNTP's cada uno de estos serán etiquetados con un colorante fluorescente distinto y se realiza una sola reacción. Al final de cualquiera de los dos tipos de reacciones, los productos de secuenciación son separados por electroforesis capilar lo que permitirá la detección de cada base nitrogenada gracias a la excitación de dichos fluorocromos por un rayo láser (Applied Biosystems, 2009; Alcorn & Anderson, 2004).

1.4.5.2.5. Análisis de secuencias

Una vez que se obtiene la secuencia del gen es necesario su análisis, con el fin de poder determinar la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia molecular por la sobreproducción de AmpC. Esto se logra comparando la secuencia del gen que se está investigando con secuencias de cepas patrón disponibles en bases de datos como el NCBI.

Para este fin, se efectúa un alineamiento múltiple de secuencia (AMS) empleando programas bioinformáticos como: Clustal W, Clustal X, T-coffe, entre otros, comúnmente empleados en biología molecular. Como explica Vinueza (2007), un AMS se realiza en base a la consideración de que las secuencias ingresadas poseen una relación evolutiva por la cual comparten un linaje y descienden de un ancestro común, de tal forma que al sobreponer las secuencias unas respecto a otras el resultado arrojará la máxima similitud entre ellas.

El resultado del AMS permite inferir la homología de las secuencias comparadas y su relación filogenética, así como identificar mutaciones puntuales o de inserción o supresión de nucleótidos gracias a la representación visual del programa empleado. Este resultado es además un “modelo hipotético” que explica estos eventos mutacionales a través de la evolución (Rodríguez, *et al.*, 2006).

Existen además, programas que tras el AMS permiten la edición, traducción a proteína y búsqueda automática de mutaciones, lo cual facilita el procesamiento de la información por parte del investigador. Algunos de estos programas son Bioedit, Codon Code Aligner y Jalview, los mismos que permiten obtener datos de relevancia de las secuencias investigadas así como datos en línea del NCBI.

Una vez que han sido identificadas las mutaciones y el cambio que estas producen a nivel proteico, la información debe ser procesada correlacionando toda la información genotípica con la fenotípica de cada cepa, además de comparar los resultados obtenidos con bases de datos e investigaciones que permitan comprobar la asociación de la misma a la resistencia bacteriana.

1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

Las mutaciones encontradas mediante PCR y secuenciación automática en la secuencia de los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* en *Pseudomonas aeruginosa* están asociadas a resistencia fenotípica frente a antibióticos β -lactámicos: piperacilina/ tazobactam, ceftazidima, cefepime y aztreonam.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El presente proyecto fue cofinanciado entre el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Escuela Politécnica del Ejército, en su afán de apoyar el desarrollo científico dentro del área de investigación biomédica, y la autora María Gabriela Granja Bastidas. Además, el proyecto contó con la colaboración activa del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín, el mismo que proveyó las cepas clínicas con perfil de resistencia conocido, así como la cepa control ATCC 27853.

2.2. Zona de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Escuela Politécnica del Ejército, el mismo que está ubicado en la ciudad de Sangolquí del cantón Rumiñahui, en la provincia de Pichincha (Av. Progreso S/N).

2.3. Período de tiempo de la investigación

La investigación se realizó en el transcurso de once meses, comprendidos entre Febrero - Diciembre de 2010.

2.4. Diseño

El proyecto de investigación se realizó en el marco de un diseño de tipo exploratorio-confirmatorio. La fase exploratoria comprendió el diseño y optimización de cuatro sistemas de PCR para la identificación de los cinco genes implicados en el mecanismo molecular de sobreproducción de AmpC, a partir de cultivos puros de la cepa tipo ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*, evaluándose los parámetros de amplificación hasta la determinación de las condiciones óptimas del ensayo.

En la fase confirmatoria se procesaron aislados clínicos con perfil de sensibilidad cuyas secuencias fueron analizadas mediante el empleo de herramientas

bioinformáticas con el fin de comparar el genotipo y fenotipo resistente frente a antibióticos β -lactámicos en relación a la cepa ATCC y a las secuencias disponibles de esta bacteria en el NCBI.

2.5. Procedimientos

2.5.1. Preparación y mantenimiento de suspensiones celulares a partir de cultivos puros

Se prepararon suspensiones celulares por duplicado a partir de la cepa ATCC 27853 y aislados clínicos con perfil de sensibilidad conocido, colocando tres asadas de cultivo puro en 1,5 mL de glicerol al 60% y 1,5 mL de suero fisiológico, las mismas que fueron almacenadas a -20 °C para su uso y conservación durante el desarrollo de esta investigación. Las suspensiones celulares de los aislados clínicos fueron preparadas a partir de cultivos puros suministrados por el Hospital Carlos Andrade Marín en agar sangre, manitol o Mueller Hinton dependiendo del caso; mientras que las suspensiones de la cepa ATCC 27853 se realizaron a partir de agar sangre.

2.5.2. Obtención de los controles positivos

Para la obtención de controles positivos de ADN para la optimización de los protocolos de amplificación por PCR, se utilizaron las suspensiones celulares de la cepa ATCC 27853. 100 μ L de estas fueron incubadas en 5 mL de medio líquido infusión cerebro corazón por 24h a 37°C, tras lo cual se procedió a la extracción de su ADN empleando el protocolo detallado más adelante. Cada uno de los controles de ADN con concentraciones diversas, fueron llevados a una concentración final de 15 ng/ μ L para su empleo en la estandarización de los sistemas de amplificación mediante PCR.

2.5.3. Extracción de ADN bacteriano mediante QIamp DNA Mini kit de QIAGEN

Previo la obtención del material genético fue necesaria la preparación de un medio de cultivo líquido, para lo cual se inocularon 100 μ L de la suspensión celular correspondiente en 5 ml de caldo infusión cerebro-corazón (BHI), y tras la incubación

por 18 h a 37° C se procedió a la extracción de ADN. El protocolo empleado es una modificación al procedimiento propuesto por el fabricante QIAGEN en el 2008, y constó de los siguientes pasos:

- 1) Se colocaron 2 mL de cultivo bacteriano en un microtubo. Se centrifugó el microtubo a 14000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante con cuidado de no alterar el pellet.
- 2) Se añadieron 120 µL de buffer ATL junto con 20 µL de lisozima (15 mg/ml) al pellet. Se incubó la mezcla en un termobloque con agitación a 37 °C por 60 minutos.
- 3) Se adicionaron 20 µL de proteinasa K (20 mg/ml) o proteasa (QIAGEN) a la mezcla y se homogenizó con vórtex. Se incubó la preparación a 56 °C por 60 minutos.
- 4) Se añadieron 200 µL de buffer AL y se mezcló suavemente con vórtex. Se incubó la mezcla a 70 °C por 10 minutos.
- 5) Se agregaron 200 µl de etanol frío (96- 100%) a la mezcla y se homogenizó mediante vórtex durante 15 segundos.
- 6) Se colocó la mezcla en una columna QIAamp unida a un tubo colector con cuidado de no topar los bordes de la misma. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el tubo colector con el filtrado y se lo reemplazó con uno nuevo.
- 7) Se añadieron 500 µL de buffer AW1 al interior de la columna con cuidado de no topar los bordes y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el tubo colector con el filtrado y se lo reemplazó con uno nuevo.
- 8) Se colocaron 500 µL de buffer AW2 al interior de la columna con cuidado de no mojar los bordes y se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos. Se descartó el tubo colector con el filtrado y se colocó un tubo estéril de 1.5 mL a la columna.
- 9) Se adicionaron 50 µL de buffer de elución AE en la columna con cuidado de no topar las paredes de la misma y se incubó a temperatura ambiente durante 1 a 5 minutos. Se centrifugó a 8000 rpm y se descartó la columna. El ADN eluido fue almacenado a – 80 °C.

2.5.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para la verificación del tamaño, integridad y una aproximación de la cantidad de ADN extraído fue necesaria la visualización del mismo en geles de agarosa previo a su cuantificación. El porcentaje al cual se prepara el gel depende del tamaño de la

molécula, para el caso del ADN de *Pseudomonas aeruginosa* extraído este se visualizó en un gel de agarosa al 0,8%. El procedimiento de preparación del gel se describe a continuación:

- 1) Se calculó y pesó la cantidad de agarosa grado biología molecular necesaria de acuerdo a la concentración del gel y se aforó con buffer TBE 1X hasta el volumen final considerado.
- 2) Se hidrató la solución mediante agitación en frío durante 10 minutos en una plancha con agitación. Se calentó la solución durante 1 minuto en el microondas hasta su ebullición y se agitó durante otros 5 minutos más dejando enfriar la solución.
- 3) Se realizó un segundo calentamiento hasta que la solución alcanzó nuevamente la ebullición y se tornó totalmente transparente.
- 4) Se dejó enfriar la solución en la plancha con agitación hasta que alcance una temperatura de entre 50 – 55 ° C, y se añadió bromuro de etidio (Invitrogen) o SYBR safe (Invitrogen) en relación de 0,5 µL y 1µL por cada 10 mL de buffer TBE 1X, respectivamente.
- 5) Se colocó la solución aún caliente en una cámara previamente armada de electroforesis horizontal con la peineta adecuada y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Al retirar la peineta y los contenedores se colocó el gel en una cámara de electroforesis horizontal y se cubrió el mismo con buffer TBE 1X.

Las muestras fueron cargadas en cada uno de los pocillos del gel de agarosa, tomando 10 µL del ADN aislado con 2 µL de tampón de carga (BlueJuice Loading Buffer 10X, Invitrogen). Además se cargaron 5 µL de un marcador de peso molecular de 1 Kb. (TrackIt 1 Kb DNA Ladder, Invitrogen), esta referencia permitió aproximar el peso molecular del ADN extraído. La migración electroforética se realizó a un voltaje de 100 V durante aproximadamente 1 hora. Posteriormente, se procedió a visualizar los resultados en un fotodocumentador de luz UV (BioDoc- It, UVP) que emite luz a una longitud de onda de 302 nm.

2.5.5. Cuantificación de ADN por fluorometría

Para la determinación de la cantidad de ADN extraído se utilizó el fluorómetro QubitTM conjuntamente con el kit comercial Quant-iT dsDNA HS de Invitrogen, que

detecta entre 0.01 y 100 ng/ μ L de ADN. El protocolo aplicado fue el sugerido por el fabricante (Invitrogen, 2008) y se detalla a continuación:

- 1) Se preparó la solución de trabajo, mezclando el fluoróforo con el buffer de dilución en una proporción 1:200, tomando en cuenta que el volumen final por reacción es 200 μ L.
- 2) Se elaboraron las soluciones estándar mezclando 190 μ L de la solución de trabajo con 10 μ L de cada estándar de calibración. Se mezclaron las soluciones en un vórtex por 3 segundos.
- 3) Se prepararon las pruebas mezclando la solución de trabajo con la muestra de ADN extraído. Se pueden tomar entre 1 a 10 μ L de muestra, dependiendo de su concentración y se ajusta la solución final a 200 μ L. Esta mezcla se incubó a 37 °C por 2 minutos.
- 4) Se calibra el equipo con los estándares 1 y 2 preparados anteriormente y se insertan las pruebas en el fluorómetro. Con el fin de obtener resultados más precisos se realizaron 3 lecturas de cada muestra. Finalmente, se calculó la concentración de ADN mediante la siguiente fórmula:

$$C = Qf \times \frac{200 \mu l}{X}$$

Donde C es la concentración de ADN en ng/ml, Qf es la lectura obtenida por el fluorómetro y X es la cantidad de muestra empleada en microlitros.

2.5.6. Detección de los genes de resistencia: *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* mediante PCR convencional y PCR múltiple.

2.5.6.1. Diseño y análisis de cebadores

Los cebadores empleados para la amplificación de los genes *ampD* y *ampE* fueron los definidos por Juan y colaboradores en el 2005. Sus características fueron determinadas empleando el programa IDT OLYGO ANALYZER, y están descritas en la Tabla 2.1.

Mientras que para la amplificación de los genes *ampC*, *ampG* y *ampR* se realizó un diseño de cebadores utilizando el programa PRIMER BLAST, en base a la secuencia de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*. Tras el empleo del programa IDT OLYGO ANALYZER, se escogieron los cebadores óptimos de diez opciones brindadas por el PRIMER BLAST, mediante una evaluación de parámetros, tales como: tamaño, contenido de GC, estructuras secundarias, temperatura de melting, análisis de homología y alineamiento de secuencias (Tabla 2.1).

Tabla 2.1.- Características de los cebadores empleados en la amplificación de los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* mediante PCR para la detección de la resistencia mediada por la sobreproducción de AmpC en *Pseudomonas aeruginosa*.

Gen blanco	Nombre cebador	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	% GC	Tamaño	Tm2 (°C)
<i>ampC</i> (1194 pb.)	ampC-F *	ATGCGCGATACCAGATTCCCC	57,9	54,5	22	68
	ampC-R	TCAGCGCTTCAGCGGCAC	58,09	66,6	18	60
<i>ampD</i> y promotor (916 pb.)	AD-F **	GTACGCCTGCTGGACGATG	58,4	48	19	62
	AD-R **	GAGGGCAGATCCTCGACCAG	59,5	65	20	66
<i>ampE</i> (1231 pb.)	AE-F **	GCCTGGACCCGAACGAAC	58,9	66,7	18	60
	AE-R **	TCAGAGGAACAGCGCGCAG	60,5	63,2	19	62
<i>ampG</i> (1785 pb.)	ampG-F	ATGACTCAGCAATCCTGGCGA	58,59	54,2	24	70
	ampG-R *	TCAGTGCTGCTCGGCGTTCT	58,73	60	20	74
<i>ampR</i> (891 pb.)	ampR-F *	TTGGTTCGACCCCATTTGCCG	57,92	57,1	21	66
	ampR-R	TTATCTCCCCGCGCCTCAA	57,55	60	20	64

Tm: Temperatura de melting calculada por el programa IDT OLYGO ANALYZER. **Tm2:** Temperatura de melting calculada con el empleo de la fórmula de Wallace descrita en la sección 2.4.5.2.1.

* Cebadores diseñados en Primer BLAST.

** Juan, *et al.*, 2005.

2.5.6.2. Protocolos de PCR convencional optimizados para la detección de los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR*.

Para la amplificación de los genes del sistema *ampC* por medio de una PCR convencional, se evaluaron distintas concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación. La enzima empleada para llevar a cabo la reacción fue la ADN polimerasa Go *Taq Flexi* de la casa comercial Promega. Los valores optimizados de concentraciones finales y condiciones de amplificación de los genes: *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* permitieron obtener los amplicones de: 1194 pb., 916 pb., 1231 pb., 1785 pb. y 891 pb., respectivamente. Estos valores se encuentran descritos en las Tablas 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10 y 2.11.

Se consideraron en todos los ensayos a más de los controles positivos correspondientes, un control negativo por PCR ensamblada. Todas las reacciones se completaron a un volumen final de 50 μL , para lo cual se añadieron 5 μL de ADN de *Pseudomonas aeruginosa* (15 ng / μL) en el caso de los controles positivos, y 5 μL de agua estéril grado PCR para el caso del control negativo.

Tabla 2.2.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación del gen *ampC* en el ensayo individual de PCR convencional optimizado.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
Cebador <i>ampC</i> -F	100 pmol / μL	30 pmol	0,3
Cebador <i>ampC</i> -R	100 pmol / μL	30 pmol	0,3
dNTP's (mix)	20 mM	0,4mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
Buffer	5X	1X	10
Go <i>Taq Flexi</i> ADN polimerasa	5 U/ μL	1.25 U	0,25
Agua grado PCR	-	-	30,15
VOLUMEN TOTAL			45

Tabla 2.3.- Programación del termociclador para la amplificación del gen *ampC* en el ensayo de PCR convencional.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	94	4 min.	1
Denaturación	94	1 min.	30
Hibridación	67	1 min.	
Extensión	72	1min.	
Extensión final	72	7 min.	1
Espera final	4	10 min.	1

Tabla 2.4.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación del gen *ampD* en el ensayo de PCR convencional optimizado.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
Cebador AD-F	100 pmol / μL	20 pmol	0,2
Cebador AD-R	100 pmol / μL	20 pmol	0,2
dNTP's (mix)	20 mM	0,4mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
Buffer	5X	1X	10
Go Taq Flexi ADN polimerasa	5 U/ μL	1,25 U	0,25
Agua grado PCR	-	-	30.35
VOLUMEN TOTAL			45

Tabla 2.5.- Programación del termociclador para la amplificación del gen *ampD* en el ensayo de PCR convencional.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	94	4 min.	1
Denaturación	94	1 min.	30
Hibridación	66	1 min.	
Extensión	72	1min.	
Extensión final	72	7 min.	1
Espera final	4	10 min.	1

Tabla 2.6.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación del gen *ampE* en el ensayo de PCR convencional optimizado.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
Cebador AE-F	100 pmol / μL	10 pmol	0,1
Cebador AE-R	100 pmol / μL	10 pmol	0,1
dNTP's (mix)	20 mM	0,4mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
Buffer	5X	1X	10
Glicerol	60%	5%	4,16
Go Taq Flexi ADN polimerasa	5 U/ μL	1.25 U	0.25
Agua grado PCR	-	-	26,39
VOLUMEN TOTAL			45

Tabla 2.7.- Programación del termociclador para la amplificación del gen *ampE* en el ensayo de PCR bifásica.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	94	4 min.	1
Denaturación	94	1 min.	30
Hibridación – Extensión	70	1 min. 30 seg.	
Extensión final	72	7 min.	1
Espera final	4	10 min.	1

Tabla 2.8.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación del gen *ampG* en el ensayo de PCR bifásica optimizado.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
Cebador ampG-F	100 pmol / μL	30 pmol	0.3
Cebador ampG-R	100 pmol / μL	30 pmol	0.3
dNTP's (mix)	20 mM	0,4mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
Buffer	5X	1X	10
Go Taq Flexi ADN polimerasa	5 U/ μL	1.25 U	0,25
Agua grado PCR	-	-	30,15
VOLUMEN TOTAL			45

Tabla 2.9.- Programación del termociclador para la amplificación del gen *ampG* en el ensayo de PCR convencional.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	94	4 min.	1
Denaturación	94	1 min.	30
Hibridación	63	1 min.	
Extensión	72	1min.	
Extensión final	72	7 min.	1
Espera final	4	10 min.	1

Tabla 2.10.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos optimizadas para la amplificación del gen *ampR* en el ensayo de PCR convencional optimizado.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
Cebador ampR-F	100 pmol / μL	20 pmol	0,2
Cebador ampR-R	100 pmol / μL	20 pmol	0,2
dNTP's (mix)	20 mM	0,4mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
Buffer	5X	1X	10
Glicerol	60%	5%	4,16
Go Taq Flexi ADN polimerasa	5 U/ μL	1,25 U	0,25
Agua grado PCR	-	-	26,19
VOLUMEN TOTAL			45

Tabla 2.11.- Programación del termociclador para la amplificación del gen *ampR* en el ensayo de PCR convencional.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	94	4 min.	1
Denaturación	94	1 min.	30
Hibridación	60	1 min.	
Extensión	72	1min.	
Extensión final	72	7 min.	1
Espera final	4	10 min.	1

La visualización de los amplicones se realizó en geles de agarosa al 1% cargando directamente 10 μL de la reacción de amplificación en cuya preparación se detalló en la sección 2.5.3. Para la verificación de los tamaños de los genes amplificados, se cargaron además 6 μL del marcador de peso molecular de 100 pb. (Axygen).

La migración de los amplicones se llevó a cabo a 100V durante 1 hora en una cámara de electroforesis horizontal, luego de lo cual fueron visualizados y registrados en el fotodocumentador de luz UV (BioDoc-It, UVP).

2.5.6.3. Protocolos de PCR múltiple optimizados para la detección de los genes *ampC-ampD* y *ampG-ampR*.

Con el fin de disminuir la cantidad de reactivos empleada en la detección de los genes del sistema *ampC* se llevaron a cabo varios sistemas de PCR múltiple. Las combinaciones factibles de los genes en estudio fueron las siguientes: *ampC-ampD* y *ampG-ampR*. En las Tablas 2.12, 2.13, 2.14 y 2.15 se pueden apreciar los valores de las concentraciones finales, volúmenes de reactivos por reacción y condiciones de amplificación en las reacciones de PCR múltiple optimizadas.

Se consideró en todos los ensayos a más de los controles positivos correspondientes, un control negativo por PCR ensamblada. Todas las reacciones se llevaron a un volumen final de 50 μL , para lo cual se añadieron 5 μL de ADN de *Pseudomonas aeruginosa* (15 ng / μL) en el caso de los controles positivos, y 5 μL de agua estéril grado PCR para el caso del control negativo.

Tabla 2.12.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación de los genes *ampC-ampD* en el ensayo de PCR múltiple optimizado.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
Agua grado PCR	-	-	29,25
dNTP's (mix)	20 mM	0,4mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
Buffer	5X	1X	10
Go Taq Flexi ADN polimerasa	5 U/ μL	1.25 U	0.25
BSA	0,8μg/μL	0,8 μg	1
Cebador ampC-F	100 pmol / μL	20 pmol	0,2
Cebador ampC-R	100 pmol / μL	20 pmol	0,2
Cebador AD-F	100 pmol / μL	5 pmol	0,05
Cebador AD-R	100 pmol / μL	5 pmol	0,05
VOLUMEN TOTAL			45

Tabla 2.13.- Programación del termociclador para la amplificación de los genes *ampC-ampD* en el ensayo de PCR múltiple.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	94	4 min.	1
Denaturación	94	1 min.	35
Hibridación	69	1 min.	
Extensión	72	1min.	
Extensión final	72	7 min.	1
Espera final	4	10 min.	1

Tabla 2.14.- Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación de los genes *ampG-ampR* en el ensayo de PCR múltiple optimizado.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1X (μL)
Agua grado PCR	-	-	24,85
dNTP's (mix)	20 mM	0,4mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
Buffer	5X	1X	10
Go Taq Flexi ADN polimerasa	5 U/ μL	1,25 U	0,25
DMSO	99,5%	10%	5
Cebador ampG-F	100 pmol / μL	40 pmol	0,4
Cebador ampG-R	100 pmol / μL	40 pmol	0,4
Cebador ampR-F	100 pmol / μL	5 pmol	0,05
Cebador ampR-R	100 pmol / μL	5 pmol	0,05
VOLUMEN TOTAL			45

Tabla 2.15.- Programación del termociclador para la amplificación de los genes *ampG-ampR* en el ensayo de PCR múltiple.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	94	4 min.	1
Denaturación	94	1 min.	30
Hibridación	63	1 min.	
Extensión	72	1min.	
Extensión final	72	7 min.	1
Espera final	4	10 min.	1

La visualización de los amplicones de 1194 pb. y 916 pb. de la PCR múltiple de *ampC-ampD*, así como de 1785 pb. y 1231 pb. de la PCR múltiple de *ampG-ampR* se efectuó tras cargar directamente 10 μL de la reacción de amplificación en gel de agarosa al 1%. Para la verificación de los tamaños de los genes amplificados, se cargaron además 6 μL del marcador de peso molecular de 100 pb. (Axygen).

La migración de los amplicones se llevó a cabo a 100V durante 1 hora en una cámara de electroforesis horizontal, luego de lo cual fue visualizada y registrada en el fotodocumentador de luz UV (BioDoc-It, UVP).

2.5.7. Determinación de la sensibilidad analítica

2.5.7.1. Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN

Para determinar la mínima concentración de ADN que pueden detectar los sistemas de PCR optimizados se realizó un ensayo de amplificación a partir de diluciones seriadas 1:10 que parten de una concentración de ADN conocida, como se aprecia en la Figura 2.1.

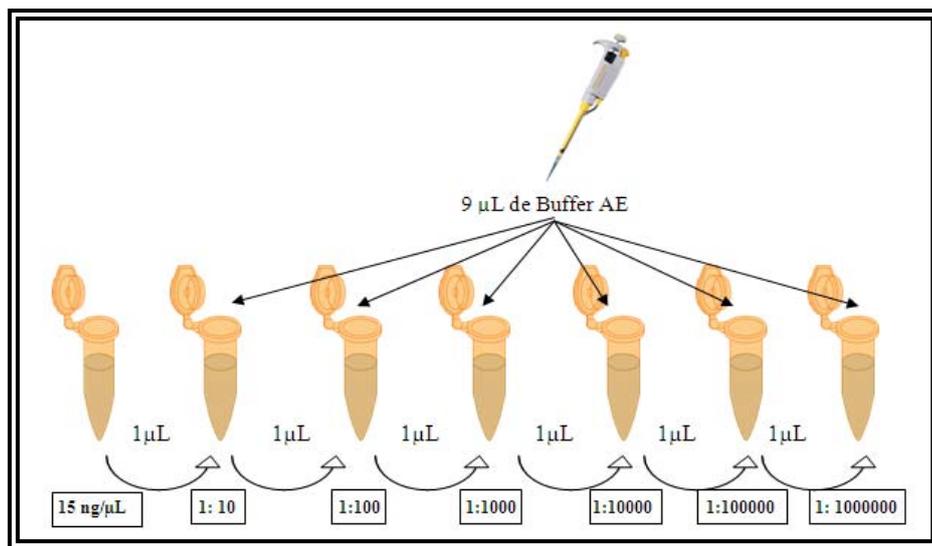


Figura 2.1.- Esquema para la preparación de diluciones seriadas a partir de una solución de ADN conocida para el ensayo de sensibilidad analítica de sistemas de PCR convencional y múltiple (Autora).

Cada una de estas diluciones fue utilizada como blanco de amplificación del sistema optimizado de PCR convencional para la amplificación del gen *ampD* y de PCR múltiple para los genes *ampG-ampR* y *ampC-ampD*. Las reacciones se realizaron por duplicado y con un control negativo de PCR por ensayo. La sensibilidad de cada sistema de PCR fue determinada por la visualización de la concentración mínima detectable de los amplicones mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% siguiendo el protocolo previamente descrito, durante 90 minutos a 100V.

2.5.7.2. Sensibilidad analítica por conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

Con el fin de determinar la mínima cantidad de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) detectables, tanto en el sistema optimizado de PCR convencional para la amplificación del gen *ampD*, así como en los sistemas de PCR múltiple para la detección de los genes *ampG-ampR* y *ampC-ampD*, se realizaron diluciones seriadas a partir de un cultivo puro en fase exponencial de *Pseudomonas aeruginosa*.

Este cultivo se obtuvo al inocular 100 μ L de suspensión celular en caldo de infusión cerebro-corazón el cual fue incubado por 18h a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial en la curva de crecimiento bacteriano. Para realizar las diluciones 1:10 se llevaron 500 μ L del caldo de Infusión Cerebro-Corazón a 4500 μ L de suero fisiológico estéril, repitiendo este paso hasta obtener la dilución 10^{-8} . Una vez que se obtuvieron los tubos de diluciones, éstas se sembraron por extensión, con la ayuda de un asa calibrada, 0.01 mL de cada tubo en medio sólido de agar MacConkey. El ensayo se efectuó por triplicado con el empleo de cajas tripetri para este fin. La Figura 2.2 esquematiza el proceso descrito.

Tras la incubación por 24h a 37 °C de las cajas tripetri de cada dilución, se procedió a contar las UFC en cada caja y se calculó las UFC/mL para cada caso. Posterior a esto, se realizó la extracción de ADN a partir de cada tubo de dilución con el protocolo descrito en la sección 2.5.2., y se usó el mismo como blanco de amplificación en los sistemas de PCR convencional y múltiple optimizados, visualizándose los resultados en gel de agarosa al 2%.

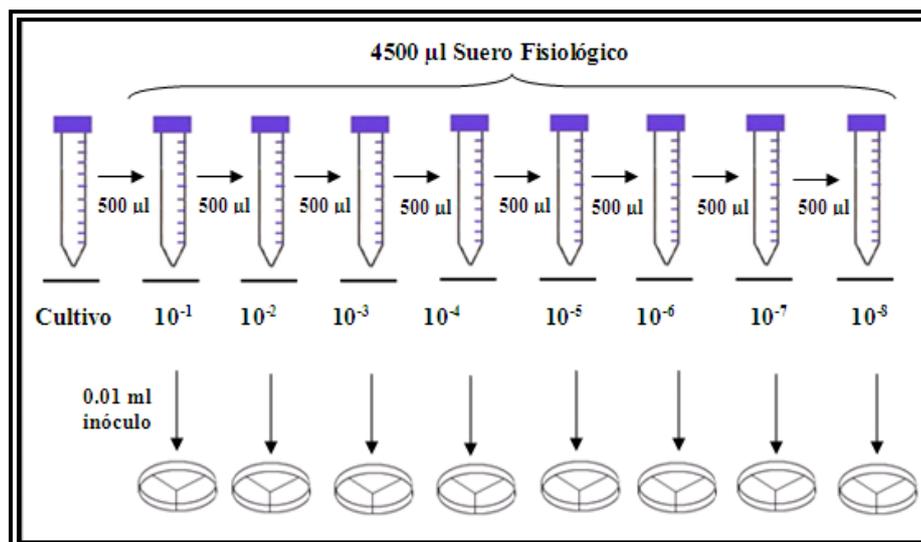


Figura 2.2.- Esquema para la determinación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) a partir de diluciones seriadas de cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa*. Tomado de: Albán, 2010.

2.5.8. Procesamiento de aislados clínicos

El procesamiento de aislados clínicos se realizó a partir de cultivos con perfil de sensibilidad conocido, los mismos que fueron conservados en suspensión bacteriana previo a la extracción, electroforesis en gel de agarosa y cuantificación del ADN con el empleo de los protocolos descritos en las secciones 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3 y 2.5.4.

Debido a que la presencia de mutaciones en el gen *ampD*, asociadas a perfiles de resistencia fenotípica, es el mecanismo que con mayor frecuencia conduce a la derepresión de *ampC*, como ya se ha mencionado, se escogió este gen para realizar la secuenciación automática a partir de cepas clínicas con perfil de sensibilidad conocida frente a los antibióticos β -lactámicos: ceftazidima, piperacilina-tazobactam, cefepime y aztreonam. Se consideraron cinco aislados clínicos con perfil fenotípico resistente y cinco con perfil de sensibilidad frente a cada uno de los antibióticos antes mencionados.

Además se secuenció la cepa ATCC 27853 y los resultados obtenidos fueron procesados conjuntamente con las cepas clínicas como se describirá a continuación.

2.5.8.1. Secuenciación automática del gen *ampD*

La purificación de los productos de PCR así como la secuenciación automática del gen *ampD* tanto de los aislados clínicos como de la cepa ATCC, fue llevada a cabo por la empresa MacroGen Inc. en Seúl-Corea. La secuenciación automática efectuada por esta empresa se basó en el método propuesto por Sanger descrito en la sección B2.4.5.2.3. Las reacciones se efectuaron en el equipo de secuenciación automática 3730XL (Applied Biosystems) haciendo uso de ddNTP's marcados con fluoróforos (BigDye Terminator, Applied Biosystems).

Debido a que el tamaño del fragmento del gen *ampD* y su promotor es de 916 pb. y que el servicio ofertado por la empresa solo cubre 850 bases legibles, se realizó una doble secuenciación por muestra utilizando los cebadores sentido (AD-F) y antisentido (AD-R) que fueron enviados conjuntamente con las muestras a Corea para este fin.

2.5.8.2. Análisis mutacional de secuencias

El alineamiento múltiple de secuencias así como la búsqueda de mutaciones se llevó a cabo gracias al empleo de las herramientas bioinformáticas Clustal X 2.0 y Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, USA), respectivamente. El análisis se llevó a cabo en base a la secuencia de la cepa estándar PAO1 (Número de acceso: NC_002516).

Tras la identificación de mutaciones en las secuencias analizadas se definió su asociación o no asociación al perfil fenotípico de resistencia, tomando como base los datos encontrados en bibliografía, así como el tipo de mutación encontrada. Y se procedió a realizar un análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos.

2.5.8.3. Monitoreo de cepas clínicas

Se procedió a realizar un monitoreo de las cepas estudiadas. Para esto, se evaluó el apareamiento de resistencia fenotípica en el transcurso de un mes de

tratamiento, considerando la información obtenida a partir de los registros provistos por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín.

En todos los casos, los pacientes fueron sometidos a un tratamiento dirigido a discreción del médico tratante, quien no poseía conocimiento de los mecanismos moleculares identificados en el análisis mutacional efectuado. Es así, que la información recopilada para cada cepa incluía distintos criterios de antibioterapia así como de estudios fenotípicos de resistencia durante la evolución del tratamiento.

Finalmente, se reportó la prevalencia de cepas que presentaron resistencia fenotípica en el tiempo evaluado, tras haber presentado un primer diagnóstico de sensibilidad fenotípica y presencia de mutaciones en *ampD* asociadas al mecanismo de derepresión de *ampC*.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Obtención de controles positivos

El ADN obtenido a partir de la cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, mediante el empleo del kit de extracción QIAmp DNA mini kit (QIAGEN), y que fue empleado como control positivo de amplificación en la optimización de la PCR, se puede visualizar en la Figura 3.1. Este material fue de alto peso molecular y no presentó bandas adicionales indicativas de degradación.

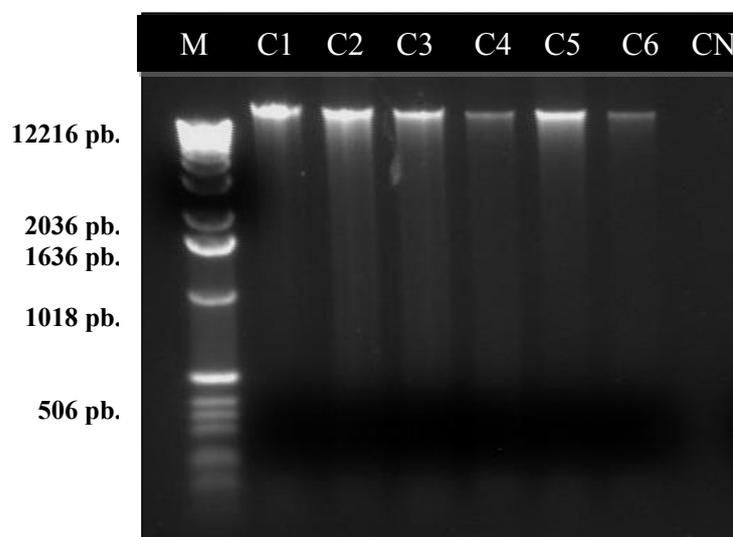


Figura 3.1.- ADN de controles positivos provenientes de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 extraído con el kit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN). Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio. **M:** Marcador de peso molecular de 1Kb. (Invitrogen), **C1:** Extracción 1, **C2:** Extracción 2, **C3:** Extracción 3, **C4:** Extracción 4, **C5:** Extracción 5, **C6:** Extracción 6, **CN:** Control negativo.

La determinación de la concentración del material genético obtenido, se realizó mediante fluorometría y los resultados se especifican en la Tabla 3.1. Todas las muestras fueron llevadas a una concentración final de 15 ng/ μ L previo a su empleo como controles positivos de amplificación.

Tabla 3.1.- Concentración de ADN (ng/ μ L) de los controles positivos medidos por fluorometría.

NOMBRE	CONCENTRACIÓN
Extracción 1	69,73
Extracción 2	75,85
Extracción 3	40,3
Extracción 4	20,72
Extracción 5	56,78
Extracción 6	25,69

3.2 PCR convencional para la detección de los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR*

Los protocolos optimizados para la amplificación mediante PCR convencional de los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR*, permitieron la visualización de los amplicones esperados de 1194 pb., 916 pb., 1231 pb., 1785 pb. y 891 pb., respectivamente, tal como se aprecia en las Figuras 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 a continuación.

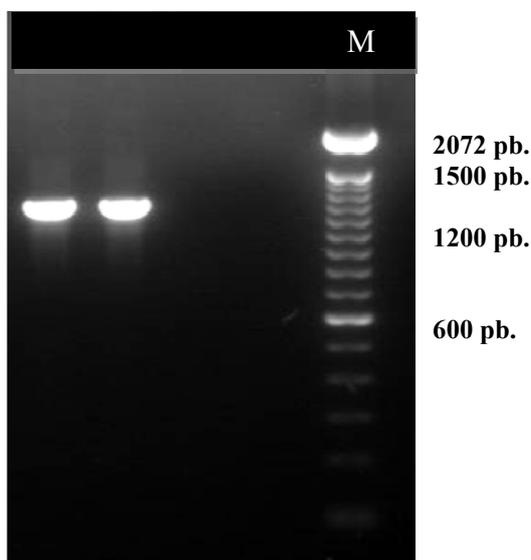


Figura 3.2.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen *ampC* de 1194 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen), **C1:** Control positivo, **C2:** Control positivo, **C3:** Control negativo, **C4:** Control negativo.

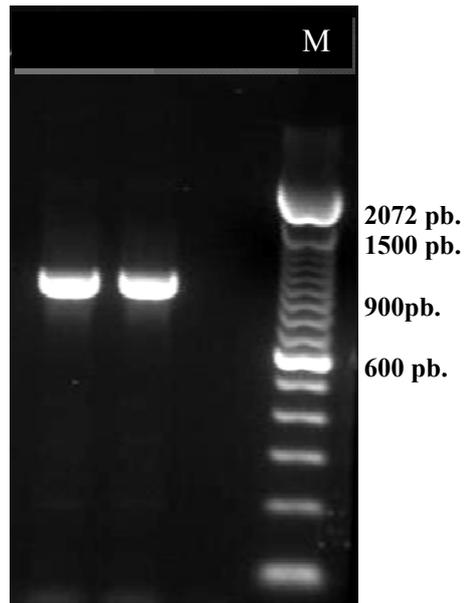


Figura 3.3.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen *ampD* y su región promotora de 916 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen) , **C1:** Control positivo, **C2:** Control positivo, **C3:** Control negativo.

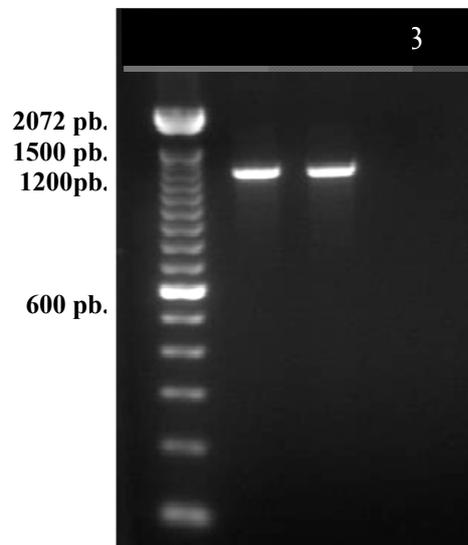


Figura 3.4.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen *ampE* de 1231 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen), **C1:** Control positivo, **C2:** Control positivo, **C3:** Control negativo.

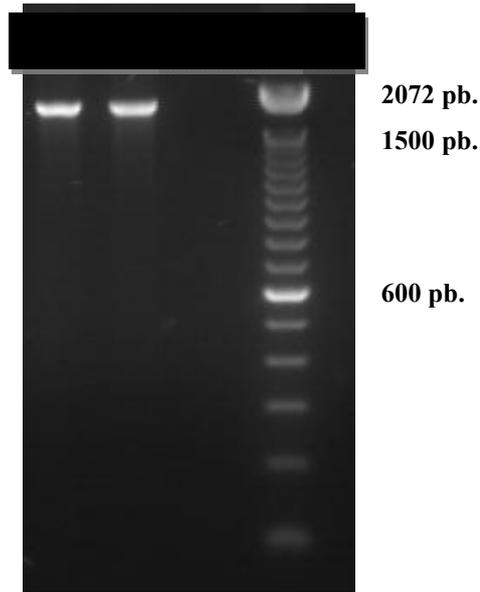


Figura 3.5.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen *ampG* de 1785 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen) , **C1:** Control positivo, **C2:** Control positivo, **C3:** Control negativo.

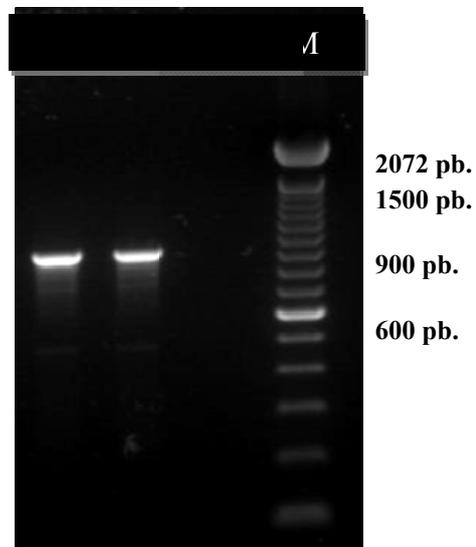


Figura 3.6.- Productos de la PCR optimizada para la amplificación del gen *ampR* de 891 pb. empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Invitrogen), **C1:** Control positivo, **C2:** Control positivo, **C3:** Control negativo.

La intensidad de los fragmentos específicos obtenidos para *ampC*, *ampD*, *ampG* y *ampR* denota una adecuada concentración de los amplicones y una alta eficiencia de los protocolos de amplificación optimizados. Adicionalmente, la igualdad de bandas que presentan los controles positivos, así como la ausencia de amplificación en el control negativo nos indicó la consistencia de los ensayos y la ausencia de contaminación en cada uno.

Para el caso del producto de la amplificación por PCR del gen *ampE*, el protocolo optimizado resultó en una amplificación inestable y poco eficiente, por lo cual este sistema fue omitido del estudio.

3.3 PCR múltiple para la detección de los genes *ampC* - *ampD*, *ampG* - *ampR*

Los sistemas de amplificación optimizados de PCR múltiple para la detección simultánea de los genes *ampC*- *ampD* y de los genes *ampG* - *ampR*, permitieron la visualización de los amplicones esperados de 1194 pb.- 916 pb., y 1785 pb.-891 pb., respectivamente, tal como se aprecia en las Figuras 3.7, y 3.8 a continuación.

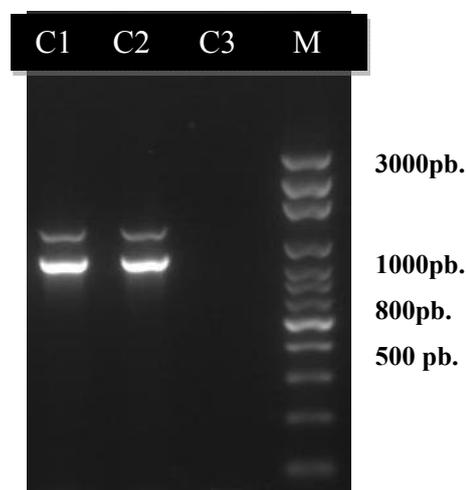


Figura 3.7.- Productos de la PCR múltiple optimizada para la amplificación simultánea de los genes *ampC* y *ampD* de 1194 y 916 pb., respectivamente, empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), **C1:** Control positivo, **C2:** Control positivo, **C3:** Control negativo.

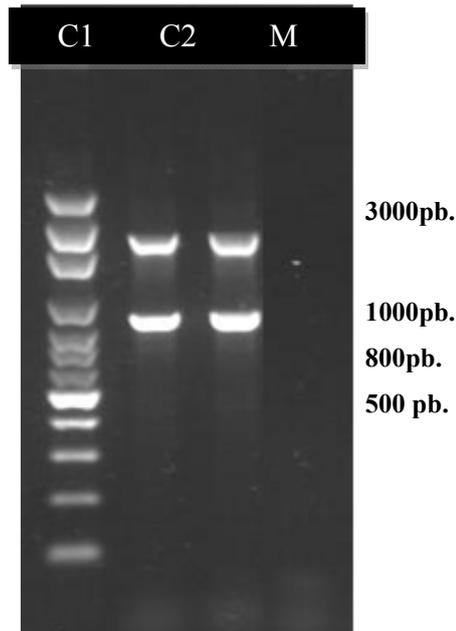


Figura 3.8.- Productos de la PCR múltiple optimizada para la amplificación simultánea de los genes *ampG* y *ampR* de 1785 y 891 pb., respectivamente, empleando controles positivos de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), **C1:** Control positivo, **C2:** Control positivo.

La intensidad de las bandas reflejó una adecuada concentración de los productos de PCR específicos en la amplificación múltiple de los sistemas *ampC-ampD* y *ampG-ampR* y una alta eficiencia de los protocolos optimizados.

Se puede apreciar además, igualdad en la dupleta de controles positivos, así como ausencia de amplificación en los controles negativos, demostrándose así consistencia y ausencia de contaminación.

3.4 Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN

Los resultados de sensibilidad analítica para la amplificación por PCR del gen *ampD* y PCR múltiple de los genes *ampC-ampD* y *ampG-ampR* se presentan en las Figuras 3.9, 3.10 y 3.11. Todos los ensayos de dilución partieron de un ADN con una concentración inicial de 15 ng/μL.

Para el caso del gen *ampD*, se puede apreciar en la Figura 3.9 que el límite de detección del sistema corresponde a la dilución 1:10000, lo cual corresponde a un valor de 1,5 pg/ μ L.

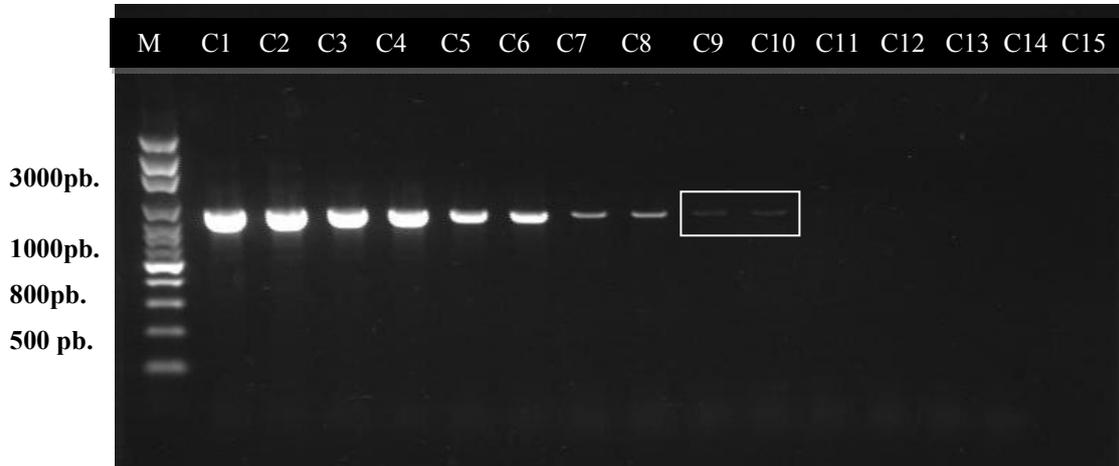


Figura 3.9.- Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN para la PCR múltiple de los genes *ampC-ampD* de 1194 y 916 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), **C1-C2:** Sin dilución, **C3-C4:** dilución 1:10, **C5-C6:** dilución 1:100, **C7-C8:** dilución 1:1000, **C9-C10:** dilución 1:10000, **C11-C12:** dilución 1:100000, **C13-C14:** dilución 1:1000000, **C15:** Control negativo.

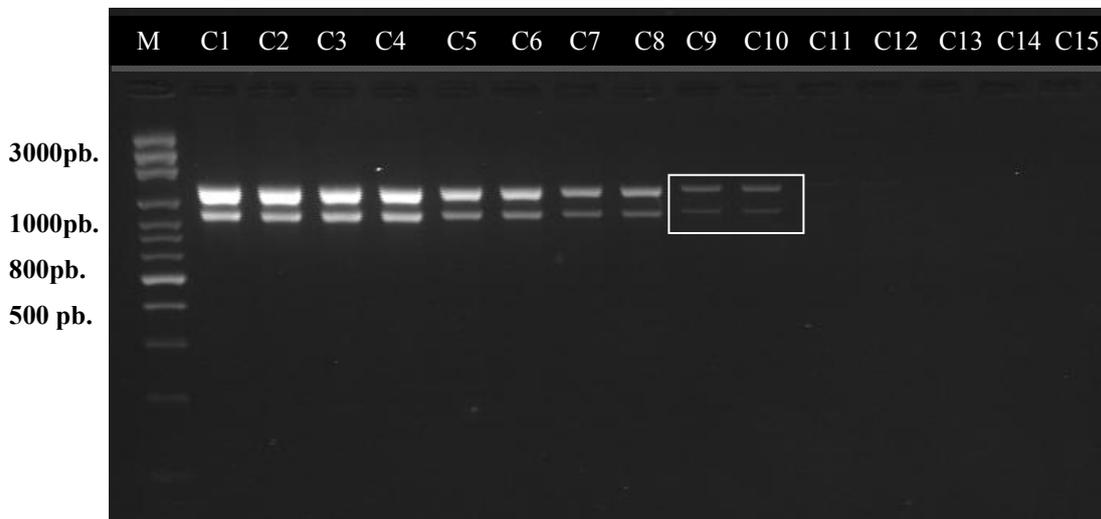


Figura 3.10.- Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN para la PCR múltiple de los genes *ampC-ampD* de 1194 y 916 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), **C1-C2:** Sin dilución, **C3-C4:** dilución 1:10, **C5-C6:** dilución 1:100, **C7-C8:** dilución 1:1000, **C9-C10:** dilución 1:10000, **C11-C12:** dilución 1:100000, **C13-C14:** dilución 1:1000000, **C15:** Control negativo.

Como nos muestra la Figura 3.10 , para el caso del sistema de amplificación por PCR múltiple de los genes *ampC-ampD*, el límite de detección correspondió a la dilución 1:10000, la cual corresponde a 1,5 pg/ μ L.

Finalmente, para el caso del sistema de amplificación de PCR múltiple de los genes *ampG-ampR*, la Figura 3.11 nos muestra que el límite de detección para este caso correspondió a la dilución 1:100000, es decir a un valor de 0,15 pg/ μ L.

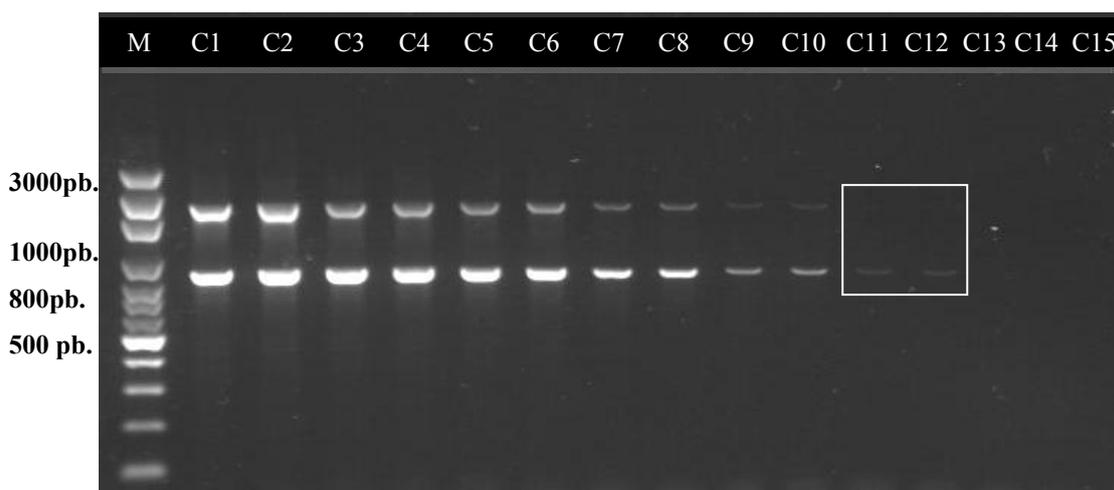


Figura 3.11.- Sensibilidad analítica por diluciones seriadas de ADN para la PCR múltiple de los genes *ampG-ampR* de 1785 y 891 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), **C1-C2:** Sin dilución, **C3-C4:** dilución 1:10, **C5-C6:** dilución 1:100, **C7-C8:** dilución 1:1000, **C9-C10:** dilución 1:10000, **C11-C12:** dilución 1: 100000, **C13-C14:** dilución 1: 1000000, **C15:** Control negativo.

3.5 Sensibilidad analítica por conteo de UFC/mL

Los resultados del conteoUFC y cálculo de UFC/mL se encuentran expuestos en la Tabla 3.2. Como se puede apreciar, los valores obtenidos están de acuerdo a la dilución realizada en orden descendiente.

A su vez, la Figura 3.12 a continuación, muestra el resultado de la siembra en caja de las diluciones sucesivas realizadas a partir del caldo de cultivo de *P. aeruginosa* en fase exponencial.

Tabla 3.2.- Recuento de UFC y cálculo de UFC/mL en diluciones sucesivas, a partir de cultivo bacteriano en fase exponencial de *Pseudomonas aeruginosa*.

DILUCIÓN	RECuento			PROMEDIO	UFC/mL
10^{-2}	NC	NC	NC	-	-
10^{-3}	NC	NC	NC	-	-
10^{-4}	NC	NC	NC	-	-
10^{-5}	102	98	112	101	10400
10^{-6}	8	13	10	10,3	1030
10^{-7}	3	2	0	1,66	166
10^{-8}	0	0	0	0	-

NC: No contable.

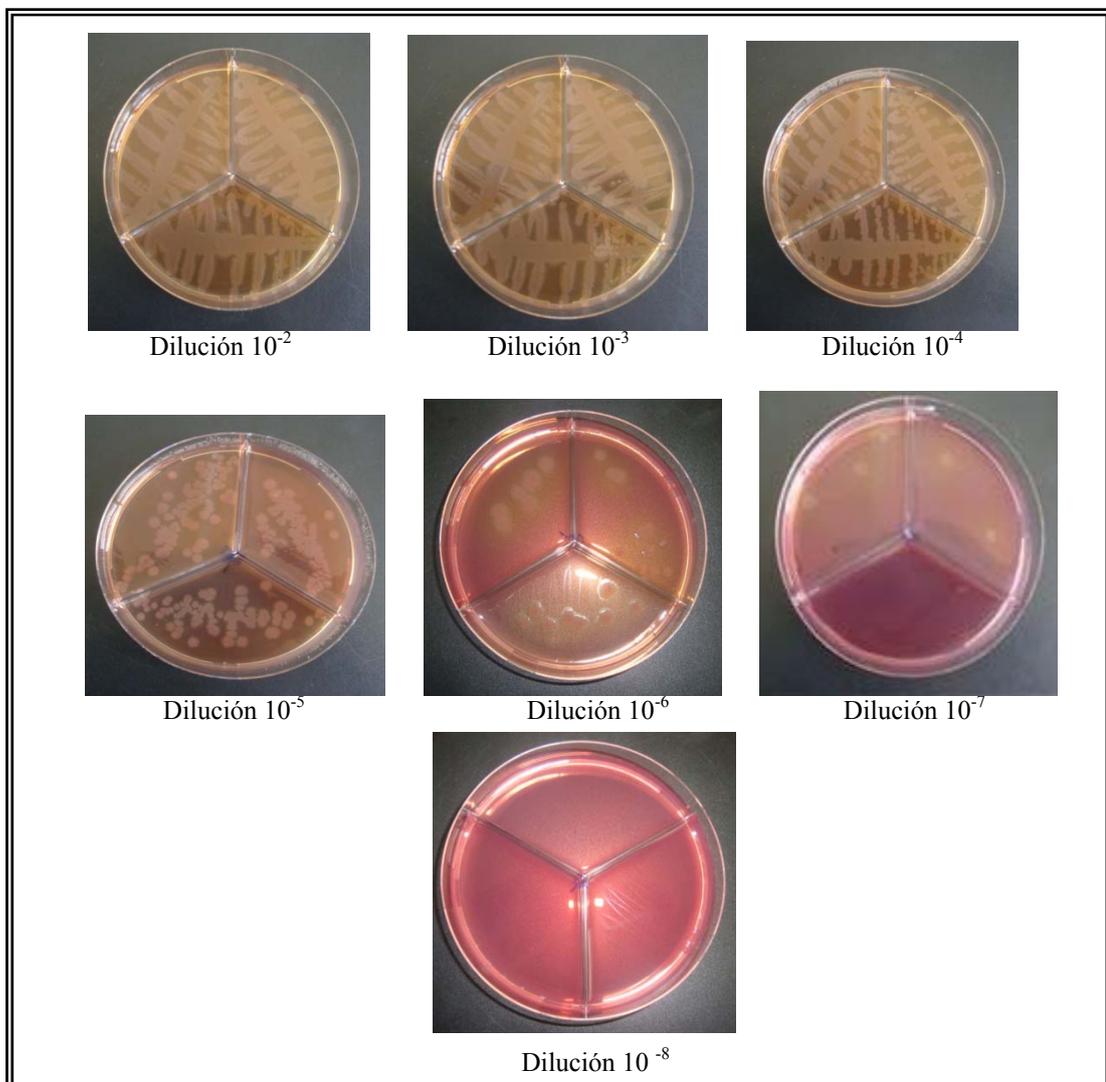


Figura 3.12.- Resultados de la siembra de diluciones sucesivas a partir de cultivo puro en fase exponencial de *Pseudomonas aeruginosa*, en agar MacConkey por triplicado.

Una vez obtenido el ADN de cada una de las diluciones, se procedió a su amplificación para determinar el límite de detección de los sistemas optimizados. Como se aprecia en la Figura 3.13, el resultado de la sensibilidad analítica por conteaje de UFC/mL para el sistema de amplificación por PCR convencional del gen *ampD*, correspondió a la dilución 10^{-7} , correspondiente a 166 UFC/mL.

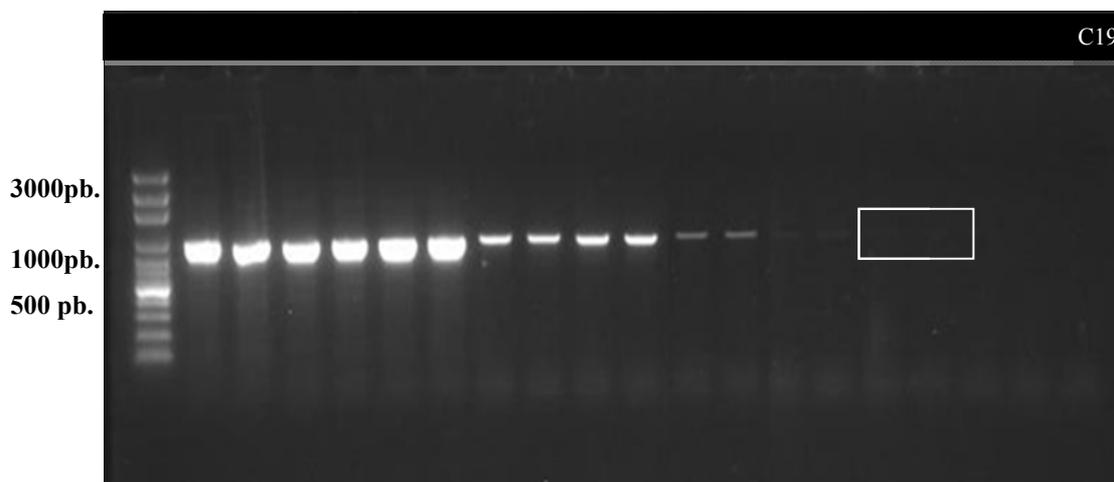


Figura 3.13.- Sensibilidad analítica por conteo de UFC/mL para la PCR convencional del gen *ampD* de 916 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR safe (Invitrogen). **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), **C1-C2:** Sin dilución, **C3-C4:** dilución 10^{-1} **C5-C6:** dilución 10^{-2} , **C7-C8:** dilución 10^{-3} , **C9-C10:** dilución 10^{-4} , **C11-C12:** dilución 10^{-5} , **C13-C14:** dilución 10^{-6} , **C15-C16:** dilución 10^{-7} , **C17-C18:** dilución 10^{-8} , **C19:** Control negativo.

De igual forma, el límite de detección del sistema de amplificación por PCR múltiple de los genes *ampC-ampD*, resultó para la dilución 10^{-7} , correspondiendo esta un valor de 166 UFC/mL, como se aprecia en la Figura 3.14.

Finalmente, la determinación de la sensibilidad analítica por este método para el sistema de amplificación por PCR múltiple de los genes *ampG-ampR*, correspondió a la dilución 10^{-4} , la cual corresponde a un valor no contable de UFC/mL, al encontrarse en crecimiento masivo, como se aprecia en la Figura 3.15.

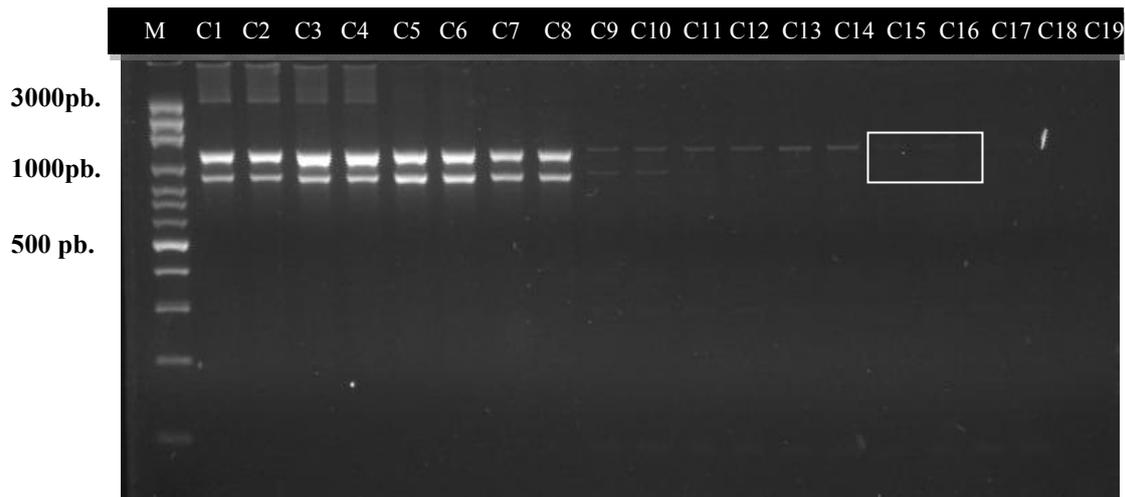


Figura 3.14.- Sensibilidad analítica por conteo de UFC/mL para la PCR múltiple de los genes *ampC-ampD* de 1194 y 916 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), **C1-C2:** Sin dilución, **C3-C4:** dilución 10^{-1} **C5-C6:** dilución 10^{-2} , **C7-C8:** dilución 10^{-3} , **C9-C10:** dilución 10^{-4} , **C11-C12:** dilución 10^{-5} , **C13-C14:** dilución 10^{-6} , **C15-16:** dilución 10^{-7} , **C17-C18:** dilución 10^{-8} , **C19:** Control negativo.

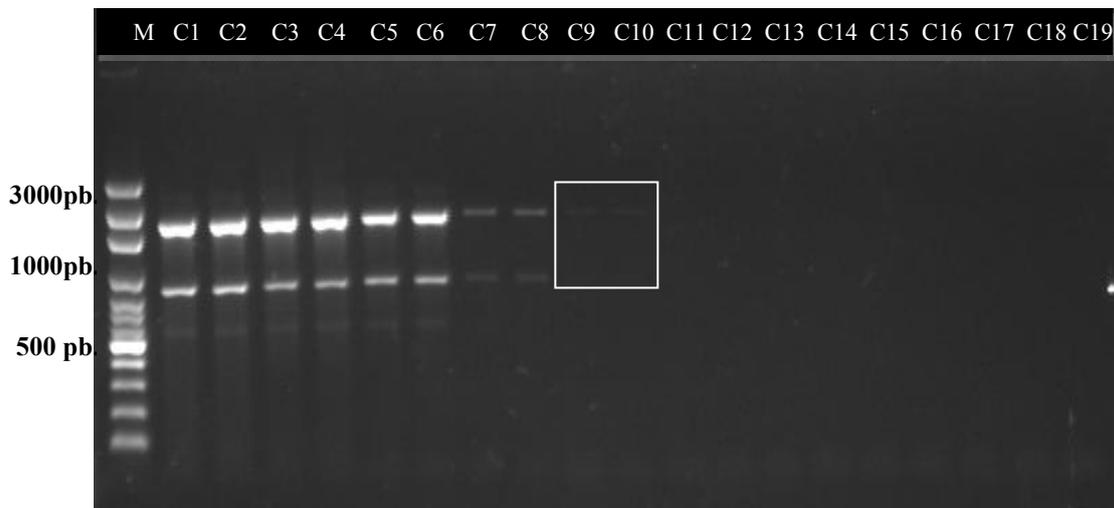


Figura 3.15.- Sensibilidad analítica por conteo de UFC/mL para la PCR múltiple de los genes *ampG-ampR* de 1785 y 891 pb., respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb. (Axygen), **C1-C2:** Sin dilución, **C3-C4:** dilución 10^{-1} **C5-C6:** dilución 10^{-2} , **C7-C8:** dilución 10^{-3} , **C9-C10:** dilución 10^{-4} , **C11-C12:** dilución 10^{-5} , **C13-C14:** dilución 10^{-6} , **C15-16:** dilución 10^{-7} , **C17-C18:** dilución 10^{-8} , **C19:** Control negativo.

3.6 Procesamiento de muestras clínicas

Los aislados clínicos provistos por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín, procedieron de distintos lugares anatómicos y servicios del centro hospitalario. En la Tabla 3.3 se puede apreciar la información general de cada cepa, en cuanto a su nombre, tipo de muestra, servicio de procedencia y el perfil fenotípico para los antibióticos estudiados en el presente estudio (ceftazidima, cefepima, piperacilina-tazobactam y aztreonam). De las 19 cepas recopiladas, 13 presentaron resistencia al menos a uno de los cuatro antibióticos β -lactámicos evaluados, y 6 cepas fueron completamente sensibles frente a los mismos.

Tabla 3.3.- Información de los aislados clínicos recopilados de *Pseudomonas aeruginosa* para la realización del análisis mutacional en el gen *ampD*.

NÚMERO	MUESTRA	SERVICIO DE PROCEDENCIA	PERFIL FENOTÍPICO			
			CAZ	FEP	ATM	TPZ
1696	Traqueal	Neurología	S	S	S	S
1727	Herida	Cirugía General	R	R	R	R
315	Herida	Oncología	I	R	R	R
1485	Cúbito izquierdo	Sala Operaciones	R	R	R	R
0887	Sangre	Unidad de Terapia Intensiva	R	R	R	R
2214	Herida	Unidad de Terapia Intensiva	S	S	S	S
1992	Herida	Traumatología	S	R	R	R
1107	Herida	Urología	S	R	R	S
1080	Oído	Pediatría	S	R	S	S
1142	Herida	Urgencias	R	R	S	R
1085	Biopsia de piel	Sala Operaciones	S	S	S	S
865	Tejido	Sala Operaciones	S	S	S	S
1146	Oído	Pediatría	S	R	S	S
1160	Herida	Medicina Interna	S	S	S	S
1422	Secreción de muslo	Infectología	S	R	R	R
01300	Colección	Unidad de Terapia Intensiva	R	R	R	R
1383	Trocáncer	Sala Operaciones	S	R	S	R
1571	Secreción Inguinal	Oncología	S	S	S	S
1705	Secreción de dorso	Sala de Operaciones	S	R	R	R

CAZ: Ceftazidima, **FEP:** Cefepima, **ATM:** Aztreonam, **TPZ:** Piperacilina-tazobactam.

R: Resistente, **I:** Resistencia Intermedia, **S:** Sensible.

El ADN obtenido a partir de los aislados clínicos se puede visualizar en la Figura 3.16. Para todos los casos, el material obtenido se encontró íntegro, y se visualizó co-extracción de ARN únicamente para la muestra 1992.

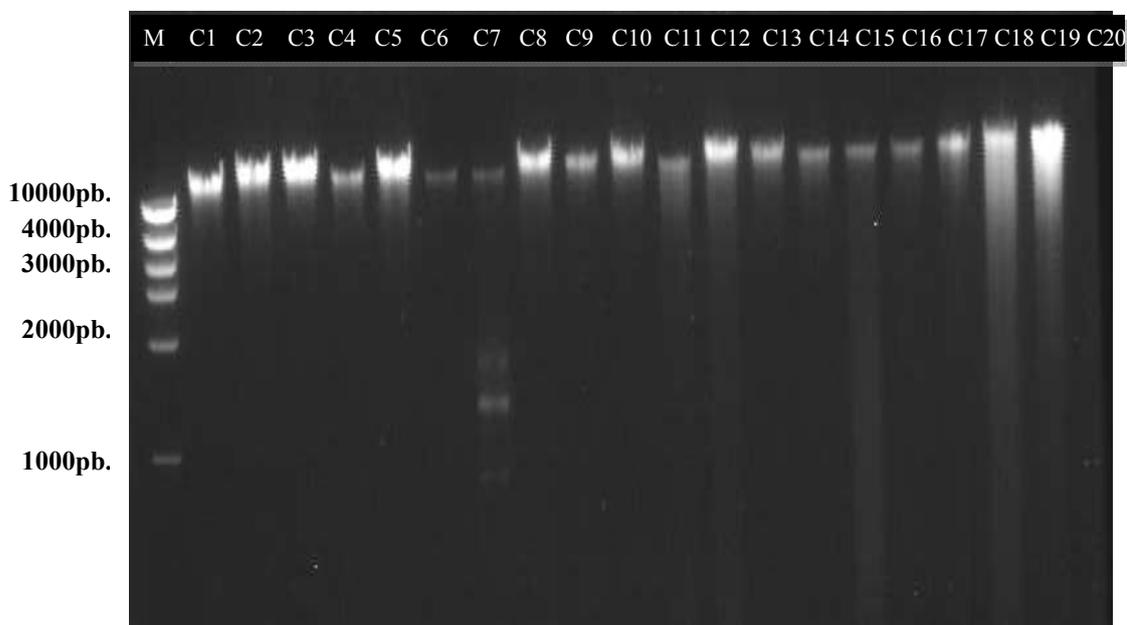


Figura 3.16.- ADN obtenido a partir de aislados clínicos con perfil de resistencia fenotípico conocido frente a antibióticos β -lactámicos. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñido con SYBR safe (Invitrogen). **M:** High mass ladder (Invitrogen). **M:** Marcador de peso molecular High mass ladder (Invitrogen). **C1:** cepa 1696, **C2:** cepa 1727, **C3:** cepa 315, **C4:** cepa 1485, **C5:** cepa 0887, **C6:** cepa 2214, **C7:** cepa 1992, **C8:** cepa 1107, **C9:** cepa 1080, **C10:** cepa 1142, **C11:** cepa 1085, **C12:** cepa 865, **C13:** cepa 1146, **C14:** cepa 1160, **C15:** cepa 1383, **C16:** cepa 01300, **C17:** cepa 1383, **C18:** cepa 1571, **C19:** cepa 1705, **C20:** Control negativo.

Las concentraciones obtenidas de este material, se encuentran especificadas en la Tabla 3.4. Pese a que la muestra 2214 presentó la concentración más baja, con un valor de 16,99 ng/ μ L, este se encontró dentro de los límites de detección del sistema de PCR, al igual que el de las demás cepas.

Tabla 3.4.- Concentración del ADN obtenido a partir de los aislados clínicos con perfil de resistencia fenotípico conocido frente a antibióticos β -lactámicos.

NÚMERO	MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/ μ L)
1	1696	118
2	1727	>120
3	315	77
4	1485	50,67
5	0087	74,40
6	2214	16,99
7	1992	27,67
8	1107	81,53
9	1080	28,07
10	1142	69,33
11	1085	54,87
12	865	88,27
13	1146	42,67
14	1160	43,13
15	1422	55,80
16	01300	43,73
17	1383	83,27
18	1571	>120
19	1705	>120

Como nos muestran las Figuras 3.16 y 3.17, el ADN proveniente de los aislados clínicos sometido a amplificación de la región promotora y el gen *ampD* completo, resultó en la producción de un amplicón específico de 916 pb. para todos los casos, con excepción de la muestra 1080 (Figura 3.16), la misma que tras ser sometida a una segunda amplificación confirmatoria mantuvo este comportamiento, por lo cual fue omitida del estudio.

A su vez, las cepas 315 y 1727 presentaron una amplificación del fragmento en una concentración por debajo de lo requerido por la empresa encargada de la secuenciación, por lo cual no fueron tomados en cuenta para este fin. Por ello fueron tomadas en cuenta las 16 cepas restantes, cuyo amplicón fue óptimo para el proceso de secuenciación, de estas 16 cepas, 10 fueron resistentes y 6 sensibles.

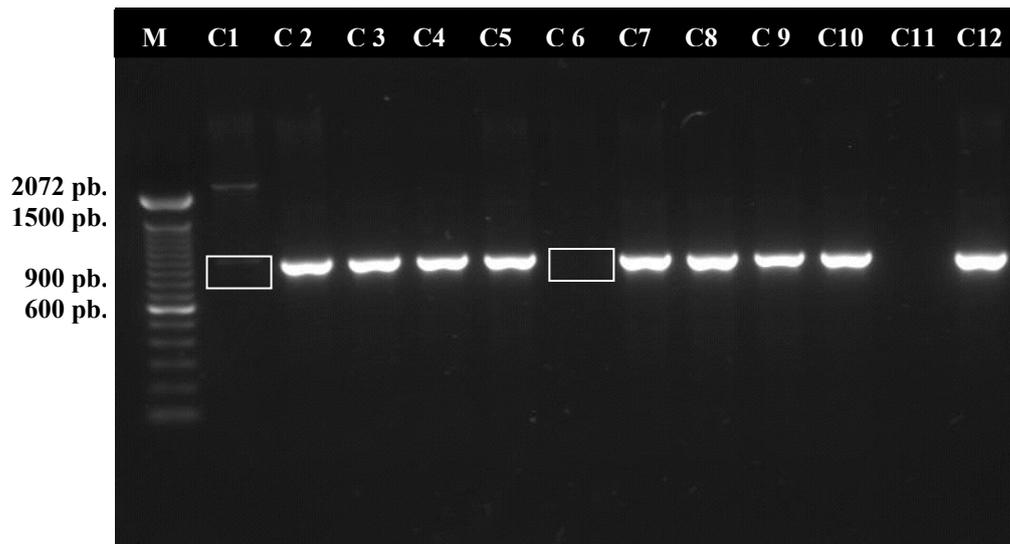


Figura 3.16.- Resultados de la amplificación del gen *ampD* y su región promotora a partir del ADN obtenidos de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* con perfiles conocidos de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR Safe (Invitrogen). **M:** Marcador de peso molecular 100 pb. (Invitrogen). **C1:** 315, **C2:**0887, **C3:**2214, **C4:**1992, **C5:** 1107, **C6:**1080, **C7:**1142, **C8:** 1085, **C9:**865, **C10:** 1146, **C11:** Control negativo, **C12:** Control positivo cepa ATCC 27853.

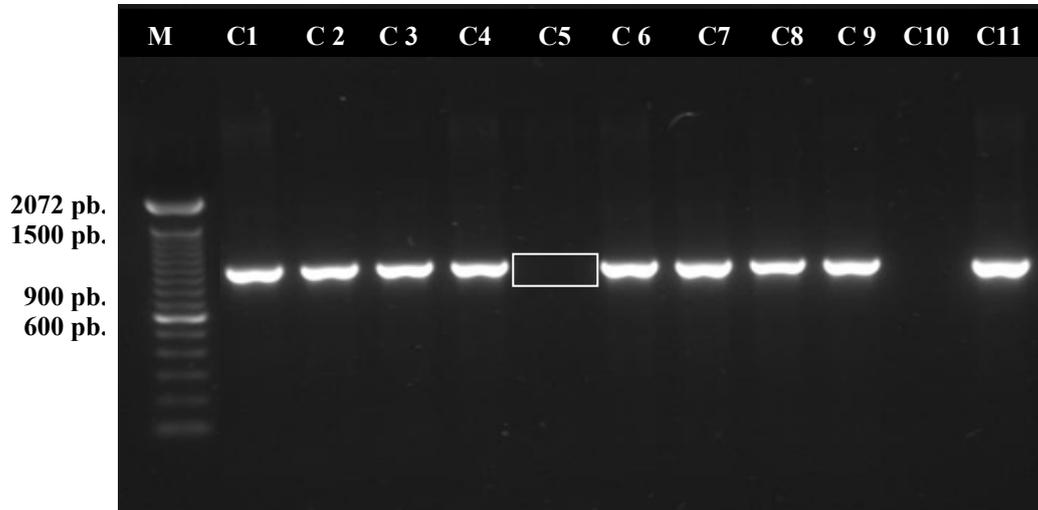


Figura 3.17.- Resultados de la amplificación del gen *ampD* y su región promotora a partir del ADN obtenidos de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* con perfiles conocidos de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR Safe (Invitrogen). **M:** Marcador de peso molecular 100 pb. (Invitrogen). **C1:** 1160, **C2:**1383, **C3:**01300, **C4:**1422, **C5:** 1727, **C6:**1571, **C7:**1696, **C8:** 1485, **C9:**1705, **C10:** Control negativo, **C11:** Control positivo cepa ATCC 27853.

3.7 Secuenciación automática del gen *ampD* y análisis mutacional de secuencias

Las secuencias del gen *ampD* y la región promotora obtenidas para cada cepa clínica fueron sometidas a alineamiento múltiple en el programa Codon Code Aligner (v. 3.7.1). Para este fin, se empleó por cada muestra una sola secuencia consenso, la misma que se obtuvo tras sobreponer la secuencia delantera y reversa complementaria de cada una.

Como se puede apreciar en la Tabla 3.5, todas las secuencias obtenidas correspondieron a *Pseudomonas aeruginosa* con un 99% de homología, y específicamente (92-99%) a la secuencia aminoacídica de AmpD (amidasa N-acetil-anhidromuramil-L-alanina) de acuerdo al análisis realizado con el empleo de la herramienta bioinformática BLASTn y BLASTx (NCBI, 2010), respectivamente.

Para la realización del análisis de secuencia se consideró únicamente las 567 pb. correspondientes al gen *ampD*, en lugar del fragmento total amplificado de 916pb., debido a que las puntuaciones de calidad del electroferograma resultaron bajas en las secuencias de los extremos.

Los resultados de este análisis se pueden visualizar en la Figura 3.18, en donde además se presenta el árbol filogenético, que pone en manifiesto el origen común de todos los aislados: la cepa PAO1 (NC_002516), secuencia que fue empleada como base para el alineamiento.

Tabla 3.5.- Análisis de homología de secuencia nucleotídica y aminoacídica para las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* secuenciadas, empleando el software BLASTn yBLASTx (NCBI, 2010).

CEPA	TAMAÑO (pb.)	BLASTn	NA	IDENTIDAD (%)	BLASTx	NA	IDENTIDAD (%)
00887 (F)	950	Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14, complete genome	CP000438.1	99	Amidasa N-acetil-anhidromuramil-L-alanina [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	NP_253212.1	93
00887 (R)	898			99			93
2214 (F)	950			99			99
2214 (R)	950			99			99
1146 (F)	891			99			93
1146 (R)	893			99			93
1160 (F)	890			99			99
1160 (R)	885			99			99
1422 (F)	950			99			93
1422 (R)	950			98			93
1696 (F)	903			99			93
1696 (R)	891			99			93
1485 (F)	903			99			93
1485 (R)	892			99			93
1992 (F)	896	Pseudomonas aeruginosa LESB58 complete genome sequence	FM209186.1	99	Amidasa N-acetil-anhidromuramil-L-alanina [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	ZP_06880712.1	93
1992 (R)	891			99			93
1107(F)	899			99			86
1107 (R)	927			99			93
1142 (F)	904			99			92
1142 (R)	882			99			92
1085 (F)	902			99			92
1085 (R)	877			99			93
865 (F)	921			99			92
865 (R)	895			99			93
1383 (F)	898			99			93
1383 (R)	950			99			93
01300 (F)	950			99			92
01300 (R)	950			99			92
1571 (F)	950			99			92
1571 (R)	894			99			93
1705 (F)	896			99			93
1705 (R)	887			99			93
ATCC (F)	906	99	92				
ATCC(R)	950	99	92				

NA: Número de acceso en NCBI.

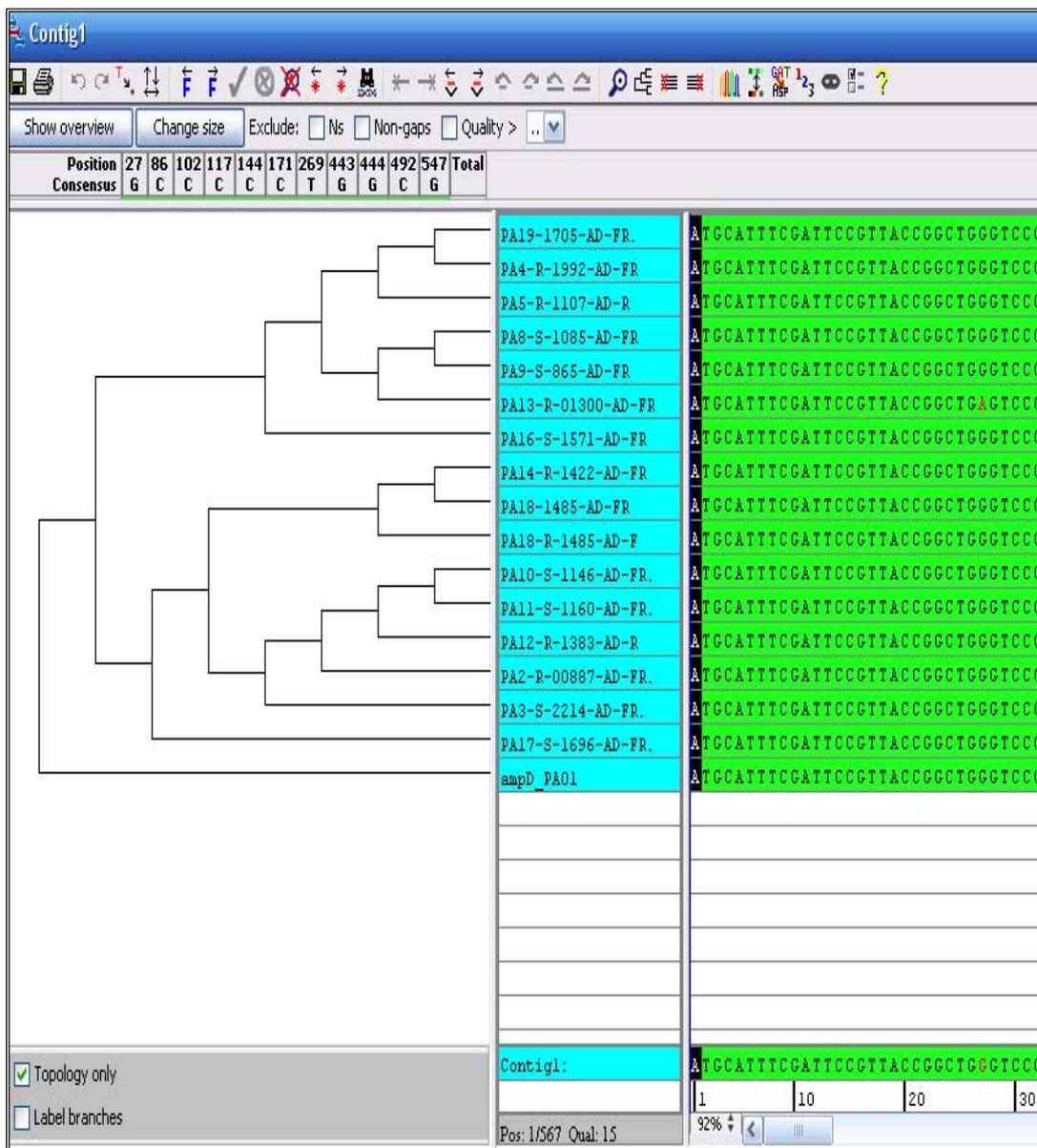


Figura 3.18.- Alineamiento múltiple, análisis mutacional y árbol filogenético para las cepas con perfil fenotípico conocido frente a β -lactámicos, empleando el programa Codon Code Aligner (v. 3.7.1).

El resultado del análisis mutacional, efectuado tras el alineamiento múltiple de las secuencias del gen *ampD* en las cepas clínicas, denotó la presencia tanto de mutaciones sinónimas como de no sinónimas de relevancia para el presente estudio.

En cuanto a las mutaciones puntuales sinónimas halladas, es decir aquellas cuya presencia no conduce a un cambio en la secuencia aminoacídica, se pudo apreciar que la sustitución C por T en las posiciones nucleotídicas 102 y 144, estuvo en todas las

cepas clínicas estudiadas. A su vez, la misma sustitución se detectó en las posiciones 117, 171 y 492 para un total de 6, 5 y 1 cepa, respectivamente. Se registró adicionalmente, la sustitución de G por A en la posición 489 para una cepa del total de aislados investigados (Véase Tabla 3.6 y 3.7).

De la misma forma, se encontraron mutaciones puntuales no sinónimas, las cuales, son de relevancia para la detección de mecanismos de resistencia, ya que conducen a un cambio en la estructura aminoacídica y dependiendo del lugar pueden asociarse directamente a la activación de mecanismos de resistencia. En este contexto, se detectaron dos mutaciones asociadas a la resistencia, descritas en bibliografía disponible. La primera fue la sustitución de G por C en la posición 443 que genera un cambio de Glicina a Alanina en la posición 148, para 8 cepas (50%) del total de la muestra, correspondiente de igual forma, al 50% de las cepas resistentes y sensibles del ensayo. La segunda fue la sustitución G por T en la posición 547, que condujo al cambio de Ácido Aspártico a Tirosina en la posición 183, presente en 4 cepas (25%) del total de los aislados y equivalente al 20% de las cepas resistentes y sensibles (Tabla 3.6 y 3.7).

A su vez, la delección de G en la posición 444, que produjo un cambio en el marco de lectura de la proteína AmpD, así como la sustitución de G por A en la posición 27, que condujo al truncamiento de la proteína por una aparición prematura de un codón de parada, son mutaciones por primera vez descritas en esta investigación con asociación al perfil de resistencia (Tabla 3.7).

Finalmente, el análisis mutacional, permitió detectar otras mutaciones sinónimas y no sinónimas en las cepas clínicas, las mismas que pueden ser visualizadas en la Tabla 3.6, pero que no se encontraban en sitios de relevancia asociados con este mecanismo de resistencia.

Tabla 3.6.- Resultados del análisis mutacional del gen *ampD*, tras el alineamiento múltiple de las cepas clínicas con perfil fenotípico conocido frente a β -lactámicos, en relación a la secuencia de la cepa PAO1.

#	CEPA	MUTACIONES NO SINÓNIMAS					MUTACIONES SINÓNIMAS				
		G→C (443) Gly148Ala	G→T (547) Asp183Tyr	del G (444) Xaa149Gly*	G→A (27) Trp9STOP*	Otras	C→T (102) Val34Val	C→T (144) Gly48Gly	C→T (117) Ser39Ser	C→T (171) Arg57Arg	Otras
1	1696						x	x			C→T (492) Arg164Arg
2	01300	X	X		X		x	x			
3	1142	X	X			C→A (213) His71Gln	x	x			G→A (489) Glu163Glu
4	1085	X	X				x	x			
5	865	X	X				x	x			
6	1571	X				C→T (86) Ala29Val	x	x			
7	1992	X					x	x	x		
8	1107	X					x	x	x		
9	1705	X					x	x	x		
10	1422						x	x	x		
11	1485						x	x	x		
12	0887						x	x	x	x	
13	1383			X			x	x		x	
14	1160			X			x	x		x	
15	2214			X			x	x		x	
16	1146						x	x		x	
17	ATCC										
18	PAO1	No presenta					No presenta				

*Mutaciones nuevas.

G: Guanina, **C:** Citosina, **T:** Timina, **A:** Adenina, **Gly:** Glicina, **Ala:** Alanina, **Asp:** Ácido Aspártico, **Tyr:** Tirosina, **Trp:** Triptófano, **Val:** Valina, **Ser:** Serina, **Arg:** Arginina, **Xaa:** Ningún aminoácido, **STOP:** Codón de pare.

Tabla 3.7.- Prevalencia de mutaciones no sinónimas relevantes encontradas en el estudio de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* con perfil fenotípico conocido.

MUTACIÓN	TOTAL DE AISLADOS (%)	AISLADOS RESISTENTES (%)	AISLADOS SENSIBLES (%)
G→C (443)	50	50	50
G→T (547)	25	20	20
Del G (444)*	18,75	10	33,33
G→A (27)*	6,25	10	0

*Mutaciones nuevas.

G: Guanina, **C:** Citosina, **T:** Timina, **A:** Adenina.

Como se aprecia en la Figura 3.19, para el total de las cepas evaluadas, el 31,25% correspondió a mutaciones de tipo sinónimas, mientras que, las mutaciones no sinónimas se presentaron en el 68,75%. De las cepas que exhibieron mutaciones no sinónimas, la correspondencia entre genotipo y fenotipo, se presentó únicamente en el 55% de las cepas evaluadas, mientras que el 45% restante no presentó esta relación, siendo las cepas fenotípicamente sensibles en realidad resistentes a nivel genético, debido a que presentaron mutaciones en el gen *ampD* asociadas a este mecanismo de resistencia.

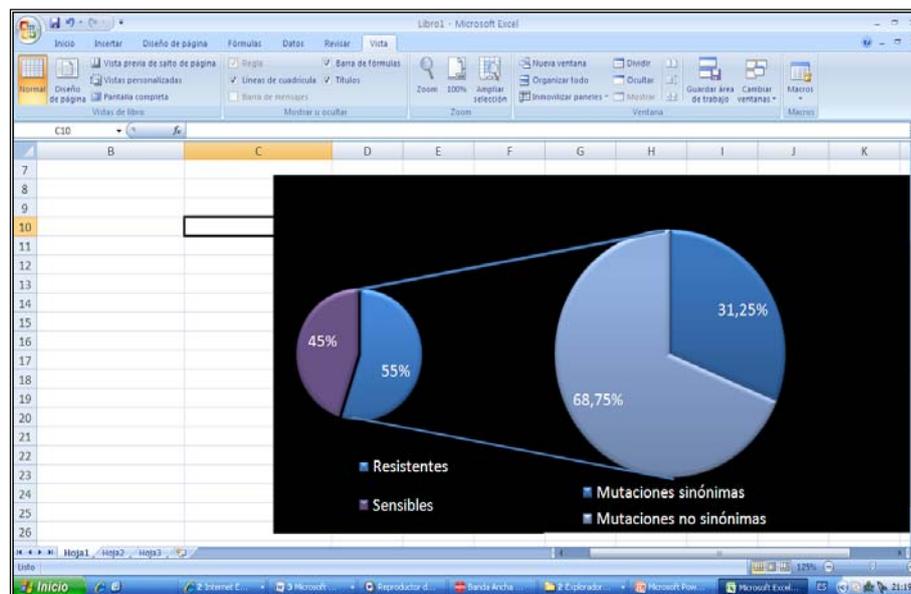


Figura 3.19.- Porcentaje de cepas clínicas que presentaron mutaciones sinónimas o no sinónimas y su relación con el perfil fenotípico.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* tienen una alta prevalencia, especialmente en el medio intrahospitalario, en donde, es el patógeno aislado con mayor frecuencia tras la primera semana de hospitalización. El índice de mortalidad asociado oscila entre el 30-69,7%, y los pacientes inmunocomprometidos son los más susceptibles a contraerla. Adicionalmente, existe una alta incidencia de cepas multiresistentes frente a los antibióticos β -lactámicos comúnmente empleados, lo cual dificulta el tratamiento de este tipo de infecciones.

En este contexto, los métodos tradicionales de diagnóstico del agente causal de infección, así como de detección de resistencia fenotípica, poseen algunos limitantes, entre ellos, el tiempo de análisis que puede ser de hasta siete días, así como la difícil interpretación del antibiograma para esta bacteria. Esto ocasiona que, en muchos casos, no exista un tratamiento dirigido y oportuno, lo cual repercute directamente en el pronóstico clínico.

La presente investigación se enfocó en la identificación temprana de mecanismos moleculares de resistencia para antibióticos β -lactámicos en *P. aeruginosa*, mediante el desarrollo de un sistema de detección molecular de los genes *ampC*, *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* mediante PCR y secuenciación automática. La presencia de mutaciones asociadas a este tipo de resistencia, permitió relacionar el fenotipo con el genotipo. A continuación se discute la información obtenida en el presente estudio a partir de cepas clínicas

En cuanto a la obtención de controles positivos de ADN, los cuales fueron empleados para la optimización de los sistemas de PCR individuales y múltiples, el material genético recuperado en distintas concentraciones que se llevó a una concentración final de 15 ng/ μ L, fue añadido en un volumen total de 5 μ L (75ng) a cada reacción de amplificación. Se escogió este valor al encontrarse dentro del rango para la optimización de PCR convencional y PCR múltiple, el cual oscila entre 15-250 ng para 50 μ L de reacción. (Henegariu, Heerema, Dlouhy, Vance & Vogt, 1997).

Durante la optimización de los sistemas individuales de PCR convencional, se consideraron las concentraciones de los reactivos, así como las condiciones de amplificación, para su estandarización. El ensayo para cada gen partió de la amplificación en condiciones estándar de PCR, a distintas temperaturas de hibridación, tomando como base la temperatura de melting calculada para cada par de cebadores empleados.

Para los cebadores que amplificaron el fragmento de 1194 pb. del gen *ampC*, *ampC-F* y *ampC-R*, la temperatura de melting (T_m) calculada fue de 68 y 60 °C, respectivamente. Para la determinación de la temperatura de hibridación se requirió de un ensayo de gradiente de temperatura (57-68°C), ya que de acuerdo a lo descrito en bibliografía, esta temperatura debe encontrarse entre 5-10 grados por debajo de la T_m de los cebadores (Wadsworth, 2006; Premier Biosoft International, 2010; Surzycki, 2000; Cultek, 2010). Para este sistema, la optimización de la PCR, concluyó de manera exitosa únicamente con la elección de la temperatura óptima, que fue de 67°C. A esta temperatura y bajo condiciones estándares de amplificación y de concentración de reactivos, se obtuvo un sistema consistente y con alta eficiencia (Véase: Tablas 2.2 y 2.3 y Figura 3.2), reflejado en la presencia de dupletas idénticas, alta concentración del amplicón generado y ausencia de contaminación en el control negativo.

En el caso de los cebadores empleados para la amplificación del gen *ampD* y su región promotora (916 pb.), descritos por Juan y colaboradores en el 2005, estos poseyeron temperaturas de melting de 62°C (AD-F) y 66°C (AD-R). El ensayo de gradiente de temperatura se efectuó entre 59-66°C, escogiéndose como temperatura óptima de hibridación la máxima ensayada, es decir 66°C, a la cual se pudo observar la menor concentración de productos inespecíficos de bajo peso molecular. El siguiente paso para su optimización entonces, fue eliminar estos productos, para lo cual se procedió a realizar un ensayo con distintas concentraciones de cebadores (10-50 pmol), seleccionándose la concentración de 20 pmol, a la cual la amplificación fue eficiente, consistente y no hubo existencia de contaminación ni presencia de productos inespecíficos (Véase Tablas 2.4 y 2.5 y Figura 3.3).

Para el gen *ampE* (1231 pb.), cuyos cebadores también fueron descritos por Juan y colaboradores en el 2005, el proceso de selección de la temperatura óptima de

hibridación, de acuerdo a lo recomendado por la bibliografía, se efectuó inicialmente entre 55-65°C, es decir por debajo de la T_m de los cebadores (60°C AE-F y 62°C AE-R). Debido a la presencia de un producto inespecífico de bajo peso molecular y muy alta concentración, fue necesario buscar una temperatura específica mayor, para lo cual se ensayaron temperaturas de entre 65- 70°C, y se escogió el límite superior. Pese a que la temperatura seleccionada era bastante alta, lo cual facilita la especificidad de la reacción, de acuerdo a lo explicado por Surzycky en el 2010, continuó la amplificación inespecífica en una concentración importante. Fue así, que como estrategia de estandarización, se procedió a realizar un ensayo de gradiente de la concentración de cebadores, escogiéndose la concentración de 10 pmol para disminuir la intensidad de la banda inespecífica. Sin embargo, el sistema se mantuvo inestable y no fue factible la completa eliminación del producto no específico, por lo cual se probó una última estrategia de optimización, la amplificación mediante PCR bifásica. Cuando la temperatura de hibridación de los cebadores, se acerca a la temperatura de extensión de la polimerasa, es factible realizar una PCR bifásica, a una temperatura de entre 60-70°C, rango en el cual se permite la eficiente hibridación de los cebadores, así como la elongación enzimática, de tal forma que se puede evitar la formación de productos inespecíficos (Hyndman & Mitsuhashi, 2003).

Con el objeto de estabilizar la reacción, mejorar la eficiencia y aumentar la especificidad de la amplificación (Henegariu, *et al.*, 1007), tras un ensayo utilizando los adyuvantes más comúnmente empleados, se decidió emplear glicerol al 5% de concentración final. El protocolo optimizado permitió obtener el amplicón específico de 1231 pb., correspondiente al gen *ampE*, en una concentración adecuada (Véase Tablas 2.6 y 2.7 y Figura 3.4). Sin embargo, la inestabilidad del sistema se mantuvo durante la realización de toda la investigación, aún con la adición del adyuvante, motivo por el cual el sistema fue eliminado del estudio..

Para el caso de la amplificación del gen *ampG* (1785 pb.), el sistema fue optimizado en condiciones estándares de PCR, a una temperatura de hibridación de 63°C, tras la realización del ensayo de gradiente de temperatura entre 63-70°C. El gradiente fue determinado en función de las temperaturas de melting de los cebadores, las cuales son de 64°C (*ampG-F*) y 74°C (*ampG-R*). Se pudo obtener un amplicón de

alta concentración, consistente y sin contaminación de los controles negativos (Véase Tablas 2.8 y 2.9 y Figura 3.5).

Finalmente, para la optimización del sistema individual de PCR para el gen *ampR* (891pb.), establecidas las *T_m* teóricas para los cebadores diseñados en 66 y 64 °C para ampR-F y ampR-R respectivamente, se escogió la temperatura óptima de hibridación a 60°C, de entre un rango de 55-64°C. Debido a la presencia de fragmentos inespecíficos, se optimizó además la concentración de cebadores, la misma que quedó fijada en 20 pmol, tras lo cual se pudo obtener una amplificación eficiente, consistente y sin presencia de contaminación (Véase Tablas 2.10 y 2.11 y Figura 3.6).

De acuerdo a lo recomendado por la guía de PCR y PCR múltiple (Biotechniques, Henegariu, *et al.*, 2007), antes de realizar la optimización de una PCR múltiple, es necesario que cada uno de los fragmentos haya sido amplificado por separado y que las concentraciones del producto de PCR generado sean similares para los protocolos optimizados. Fue así, que una vez superada esta etapa, se procedió a la estandarización de la técnica de PCR múltiple para las combinaciones de amplicones *ampC-ampD* y *ampG-ampR.*, que fueron escogidas de acuerdo al tamaño de los amplicones generados y la temperatura de optimización por separado.

Para el sistema de PCR múltiple *ampC-ampD*, se determinó que la temperatura de hibridación óptima para los dos pares de cebadores fue de 69°C, utilizando una combinación de concentración de cebadores de 5 pmol para ampC-F y ampC-R y de 20 pmol para AD-F y AD-R, empleándose además BSA (albúmina de suero bovino) en una concentración final de 0,8 µg/µL (Véase Tablas 2.12 y 2.13 y Figura 3.7). Este adyuvante fue seleccionado, tras probar otros reactivos con el fin de favorecer la eficiencia de la reacción de PCR. El resultado fue una mejor y más consistente amplificación, lo cual concuerda con lo descrito por bibliografía, que describe que para el caso de los sistemas de PCR múltiple, el uso de BSA hasta 0,8µg/µL, permite el incremento de la eficiencia de la PCR en mayor grado que cuando se emplean otros adyuvantes como el DMSO (dimetil sulfóxido) o el glicerol que a veces pueden ocasionar resultados desfavorables (Henegariu, *et al.*, 2007).

Luego de la optimización del protocolo de amplificación del sistema *ampG-ampR* se determinó que la concentración adecuada de cebadores fue de 40 pmol para *ampG-F* y *ampG-R*, y de 5 pmol para *ampR-F* y *ampR-R*. Adicionalmente, se utilizó el adyuvante DMSO en una concentración final de 10%, el mismo que demostró mejorar notablemente la eficiencia de la reacción, en relación a otros reactivos probados (Véase Tabla 2.14 y 2.15 y Figura 3.8). Debido a que en la mayoría de los casos el DMSO genera resultados conflictivos al favorecer la amplificación de algunos fragmentos y disminuir la concentración de otros, algunos autores consideran que este adyuvante no es adecuado en la PCR de tipo múltiple, a pesar de esto, se observaron resultados positivos para el este ensayo (Henegariu, *et al.*, 2007). Estos resultados se fundamentan en que la evaluación de la efectividad debe realizarse por separado para cada sistema y a que este reactivo facilita la separación de las cadenas de ADN, especialmente en las regiones ricas en GC que se encuentran presentes en la conformación de la estructura secundaria. Al añadirse DMSO en la reacción se hace más accesible el ADN blanco, mejorando por tanto la eficiencia de la reacción (Q-biogene, Inc., 2002; Henegariu, *et al.*, 2007).

En cuanto a la determinación de la sensibilidad analítica de la PCR convencional para el gen *ampD* y su región promotora, así como para las PCR múltiples de los genes *ampC-ampD* y *ampG-ampR*, se determinó, mediante diluciones seriadas de ADN, que los sistemas eran capaces de detectar cantidades mínimas de ADN, en el orden de 1,5 pg/ μ L para los dos primeros y de 0,15 pg/ μ L en el último caso (Véase Figuras 3.9, 3.10 y 3.11). Estos valores corresponden a lo esperado en una técnica de PCR, la misma que es extremadamente sensible.

Los ensayos de sensibilidad analítica de estos sistemas, por medio de conteo de UFC, establecieron que el límite de detección es de 166 UFC/mL para los sistemas *ampD* y *ampC-ampD*, lo cual concuerda con lo obtenido en ensayos similares descontaminados para bacterias Gram negativas (Albán, 2010). Sin embargo, en el caso del sistema *ampG-ampR*, el límite de detección por UFC, dio como resultado un valor cuantificable alto (crecimiento masivo) de *P. aeruginosa*, lo cual nos demuestra que el sistema no podría emplearse, bajo estas condiciones de optimización para la evaluación directa de muestras clínicas en un futuro, generándose la necesidad de mejorar este

sistema para su aplicación en futuras investigaciones (Véase Tabla 3.2 y Figuras 3.13-3.15).

El procesamiento de aislados clínicos comprendió la amplificación y secuenciación automática solamente del gen *ampD*. Este fue seleccionado entre todos los genes del sistema *ampC*, debido a que las mutaciones encontradas en el mismo son las que se asocian, en la mayoría de los casos, a la resistencia frente a β -lactámicos mediada por la des-represión de *ampC* (Juan, *et al.*, 2006; Schmidtke & Hanson, 2008; Lister, *et al.*, 2009; Reisbig, Hossan & Hanson, 2003; Langaee, Gagnon & Huletsky, 2000).

Se consiguió la exitosa amplificación del gen *ampD* y su región promotora en todos los casos, con excepción de la cepa 1080 (Véase Figura 3.16), la misma que tras ser sometida a un segundo ensayo de amplificación tampoco produjo el amplicón deseado. Al revisar la información del ADN proveniente de esta cepa (Véase Figura 3.16 y Tabla 3.4), se observó que el mismo se encontraba sin evidencia aparente de degradación y con una concentración óptima de 28,07 ng/ μ L, la cual está por encima del límite de detección del sistema de PCR (1,5pg/ μ L), por estos motivos, se decidió eliminar esta muestra del estudio en la evaluación del gen *ampD*.

Para confirmar que el patógeno pertenece a la especie *P. aeruginosa*, se sometió a la muestra a la amplificación de un fragmento del gen ADN ribosomal 16S (Cortesía Ing. Cristina Albán) y su posterior secuenciación automática, en donde se logró reconfirmar el resultado microbiológico con un 99% de homología; motivo por el cual se pensó que la cepa, probablemente contaba con la presencia de alguna mutación en la zona de hibridación de los cebadores, y por esto no fue factible la amplificación del gen *ampD*. Esta es una hipótesis que quisiéramos comprobar. En este contexto, justamente Juan y colaboradores en el 2005, describen a una cepa clínica que no amplifica al gen *ampD* con la técnica de PCR, y se logra confirmar mediante electroforesis, que ésta poseía una delección significativa de una de las regiones de hibridación de los cebadores (Juan, *et al.*, 2005).

Durante el análisis de las secuencias, se identificó la presencia de mutaciones no sinónimas asociadas a resistencia en la cepa ATCC 27853, posiblemente por su

manejo inapropiado, por lo cual no fue factible emplearla como patrón de comparación en el estudio.

Tras el alineamiento múltiple de las secuencias de origen clínico, en relación a la secuencia de la cepa PAO1, se pudieron identificar un 31,25% de mutaciones sinónimas y un 68,75% de mutaciones no sinónimas. Para el primer caso, se pudo apreciar que las sustituciones fueron de tipo transicionales, debido al cambio de bases pirimidínicas por bases pirimidínicas o en su defecto, de base purinas por bases purinas. A su vez, algunas de las mutaciones no sinónimas fueron sustituciones de tipo transversionales, ya que el cambio se dio entre una base purina o pirimidínica, y existió la modificación en el marco de lectura debido a la presencia de una delección.

Se ha demostrado que en el mecanismo de derepresión de *ampC*, mediando por la presencia de mutaciones en el regulador negativo de la transcripción *ampD*, las mutaciones pueden ser puntuales, truncamientos e inserciones largas que afectan principalmente al extremo carboxilo terminal de la proteína, así como en sitios de unión al zinc (ácido aspártico en la posición 164 y dos histidinas en las posiciones 34 y 154) y el sitio catalítico, el mismo que se encuentra próximo al extremo amino terminal, Este sitio consta generalmente de aminoácidos hidrofóbicos que son necesarios para la unión del sustrato (Schmidtke & Hanson, 2006). En este contexto, todas las mutaciones no sinónimas encontradas condujeron a cambios en la estructura de la proteína AmpD.

En cuanto a la sustitución de G por C en la posición 443, que genera un cambio de glicina a alanina en la posición 148 de la proteína (cerca al sitio de unión al zinc), esta ha sido reportada en bibliografía con una prevalencia del 55% para aislados clínicos con perfiles de multiresistencia frente a β -lactámicos (Amber, *et al.*, 2008; Langae, *et al.*, 2000). Este valor corresponde a lo determinado en el presente estudio, en donde el 50% de las cepas resistentes la presentó, siendo novedoso, el además haberla encontrado en el 50% de las cepas que eran sensibles fenotípicamente (Véase Tabla 3.7)

La sustitución de G por T en la posición 547, que condujo al cambio de ácido aspártico a tirosina en la posición 183 de la proteína AmpD (cerca al extremo carboxilo terminal), descrita por Amber y colaboradores en el 2008, tuvo una prevalencia del 25% del total de los casos, equivalente al 20% de las cepas resistentes y sensibles de este estudio.

La delección de G en la posición 444 ocasionó un cambio en el marco de lectura de la proteína, inactivándola, ya que se perdieron sitios de relevancia, como la histidina en la posición 154 necesaria para la unión del zinc a la enzima y todo el extremo carboxilo terminal que es necesario para la estructura funcional de AmpD. Por otro lado, la sustitución de G por A en la posición 27 encontrada en una cepa multiresistente, condujo al truncamiento de la proteína al insertar un codón de parada anticipado. Estas dos mutaciones son reportadas por primera vez en este estudio en asociación a la resistencia frente a β -lactámicos.

Después de relacionar el fenotipo y genotipo de las cepas empleadas en el estudio, se pudo determinar que solamente el 55% son molecularmente resistentes tanto fenotípicamente como genotípicamente. El 45% restante presentó un perfil sensible en el antibiograma y resistente por biología molecular, por lo cual no existe correlación entre la resistencia fenotípica y genotípica determinada por la presencia de mutaciones en *ampD*. Tras evaluar el progreso de los pacientes un mes después de la toma, el 40% de las cepas de *P. aeruginosa* sensibles fenotípicamente, se tornaron multiresistentes, el 20% mantuvo su perfil de sensibilidad. El 40% restante no fue posible monitorearlo por no contar con más cultivos del paciente.

El 40% de las cepas que presentaron resistencia genotípica “latente”, con perfil fenotípico sensible inicialmente, desarrollaron multiresistencia dentro un mes de monitoreo. Se presume que estas cepas, al ser sometidas a antibioterapia expresaron el mecanismo de derepresión de *ampC*, por inducción de los propios antibióticos. Cabe mencionar en este contexto, que la sobreexpresión de *ampC*, puede deberse también a que *P. aeruginosa* es una bacteria hipermutante, y se sabe que las mutaciones en el gen *ampD*, asociadas a la resistencia pueden presentarse espontáneamente entre 10^3 - 10^7 células bacterianas (Reisbig, Hossan & Hanson, 2003).

Lister y colaboradores, en el 2009, describen que este fenómeno encontrado en aislados clínicos de *P. aeruginosa* ocurre durante el tratamiento y se ha visto que tras un primer diagnóstico de sensibilidad, un 14 a 56% de los pacientes tratados con penicilinas antipseudomona, combinaciones penicilinas-inhibidor, aztreonam, y cefalosporinas de espectro extendido, lo presentan. En la presente investigación este hecho se evidenció en un 40% de cepas.

El 31,25% de las cepas no presentaron mutaciones asociadas a resistencia, únicamente mutaciones sinónimas. Dentro de este grupo el 80% de las cepas presentaba un perfil fenotípico resistente frente a los antibióticos evaluados, por lo cual la ausencia de mutaciones en el gen *ampD* nos lleva a pensar que mutaciones en los demás genes del sistema, especialmente en *ampR* y *ampG*, pudieran ser las responsables (Schmidtke & Hanson, 2003; Schmidtke & Hanson, 2008).

Los datos recopilados en esta investigación, sobre el desarrollo de resistencia por la sobreproducción de *ampC*, en cepas que fueron diagnosticadas inicialmente como sensibles, son de vital importancia, ya que se ha demostrado que un alto grado del fallo terapéutico en estas infecciones se debe a la detección tardía de este mecanismo de resistencia (Juan, *et al.*, 2005). Tam y colaboradores, en el 2009, demostraron que hay 67,5 veces más probabilidades de fallo terapéutico, cuando la infección es causada por cepas de *P. aeruginosa* con derepresión de *ampC*. Justamente estos pacientes poseen un mayor riesgo de desarrollar bacteriemias persistentes, siendo ésta la mayor justificación de continuar investigando sobre los mecanismos de resistencia en *Pseudomonas*.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. El protocolo optimizado para la obtención de material genético a partir de cultivos puros de *Pseudomonas aeruginosa*, permitió la obtención de DNA de alta calidad y concentración, facilitando la favorable amplificación de los genes de resistencia del sistema *ampC*.
2. Los sistemas optimizados de PCR convencional y PCR múltiple permiten la adecuada amplificación de los genes *ampC*, *ampD*, *ampG* y *ampR*, para la investigación del mecanismo molecular de resistencia mediado por la sobreproducción de la β -lactamasa AmpC.
3. El sistema de amplificación utilizado para la detección del gen *ampE* fue completamente inestable, por lo cual no pudo ser empleado en el presente estudio.
4. Los sistemas optimizados son específicos para *P. aeruginosa* y poseen una alta sensibilidad para la evaluación de ADN proveniente de cultivos puros. Los límites de detección fueron establecidos en 0,15 pg/ μ L para *ampG-ampR*, y de 0,15 pg/ μ L para *ampD* y *ampC-ampD*.
5. El límite de detección para la amplificación del gen *ampD* y de los genes *ampC-ampD*, fue de 166 UFC/mL, reflejando una alta sensibilidad de los sistemas de PCR convencional y multiplex. Este es un resultado importante si se piensa en una posible aplicación directa en muestras clínicas.
6. El límite de detección del sistema de amplificación por PCR múltiple de los genes *ampG-ampR* fue muy elevado, por lo cual no puede ser aplicado directamente a muestras clínicas en las condiciones actuales del sistema.
7. El análisis mediante alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas por secuenciación automática permite la identificación de mutaciones asociadas y no asociadas a la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos en el gen *ampD* de cepas clínicas con perfiles de resistencia conocidos frente a los antibióticos: piperacilina/ tazobactam, ceftazidima, cefepima y aztreonam.

8. La correlación entre el fenotipo y el genotipo para las cepas clínicas evaluadas fue del 55%, cifra que refleja la latencia del mecanismo molecular de resistencia en el restante 45% de las cepas, de las cuales al menos el 40% expresaron el mecanismo de derepresión de *ampC* durante el tratamiento.
9. Las mutaciones encontradas mediante PCR y secuenciación automática en el gen *ampC* están asociadas con la resistencia fenotípica frente a antibióticos β -lactámicos: piperacilina/ tazobactam, ceftazidima, cefepima y aztreonam.
10. La activación del mecanismo de sobreexpresión de AmpC puede ocurrir durante el tratamiento, inclusive tras un primer diagnóstico de sensibilidad fenotípica frente a antibióticos β -lactámicos comúnmente empleados como ceftazidima, cefepima, aztreonam y piperacilina-tazobactam, lo cual conduce al fallo terapéutico en los pacientes.
11. La importancia de la realización de análisis moleculares que permitan la identificación temprana de este mecanismo molecular de resistencia, radica en que puede ser detectado aún antes de su expresión fenotípica y por lo tanto permitir que la terapéutica se adecuadamente dirigida y oportuna.
12. La disponibilidad de este tipo de ensayos en la rutina de laboratorio evitaría la aplicación de terapias que resultan ineficaces y que además agravan, desde el punto de vista de salud pública, el importante problema de resistencia antibiótica.
13. La presente investigación se proyecta a una segunda fase en la cual se procederá a secuenciar el resto de genes del sistema y se evaluarán una mayor cantidad de aislados clínicos, además, de la implementación del sistema en PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión de la β -lactamasa AmpC.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Dado a que el sistema de amplificación aparentemente optimizado para *ampE*, fue completamente inestable en la presente investigación, sería fundamental el poder probar otros sistemas que permitan la adecuada detección del gen mediante PCR.
- Es necesario que el sistema de PCR múltiple para la amplificación de los genes *ampG-ampR* sea reevaluado, con el fin de mejorar su sensibilidad analítica en UFC/mL, para que este pueda ser aplicado directamente sobre muestras clínicas en la posteridad.
- Si bien el mecanismo de derepresión de *ampC* esta mediado principalmente por la presencia de mutaciones inactivantes del regulador negativo de su transcripción, el gen *ampD*, sería vital el poder concluir con la secuenciación automática de los demás genes del sistema, con el fin de poder determinar la información completa del genotipo de cada cepa.
- Se recomienda el empleo de una polimerasa con tecnología Hot Start, con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo PCR, especialmente para aquellos que emplean la técnica de amplificación mediante PCR múltiple.
- Se propone además, el trabajar de una forma activa y cooperativa entre los Hospitales y la ESPE, en la investigación de mecanismos moleculares de resistencia en patógenos oportunistas de tan alta relevancia clínica como *Pseudomonas aeruginosa*,

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Albán, C. (2010). Diseño y optimización de un sistema de amplio espectro para el diagnóstico molecular de artritis séptica basado en la amplificación del gen adn ribosomal 16s íntegro mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tesis. Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Álvarez, M., Boquet, E., de Fez, I. (1996). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Ecuador: Graficart. 2^{da} Edición.
- Amber, J., Schmidtke, A., Hanson, N. (2008). Role of *ampD* homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 52, N° 11. 3922-3927.
- Anuj, S., Whiley, D., Kidd, T., Bell, S., Wainwright, C., Nissen, M., Sloot, T. (2009). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time-PCR assay targeting the *ecgX* and the *gyrB* genes. Diagn Microbiol Infect Dis, Vol. 63, N° 2. 127-131.
- Arun, A., Saurabha, D. (2003). PCR primer design. In C., Dieffenbach, G., Dveksler (Eds). PCR Primer: A laboratory manual. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd Edition.
- Baron, E., Lance, P., Finegold, S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. USA: Mosby. 9th Edition.
- Basak, S., Khode, M., Bose, S & Mallick, S. (2009). Inducible AmpC beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a rural hospital of central India. Journal of Clinical and Diagnostic Research, Vol.3. 1921-1927.
- Beherman, Kliegman, Jenson, (2004). Tratado de Pediatría. España: Elsevier. 17^{ava} Edición.

- Bush, K., Jacoby, A., Medeiros, A. 1995. A functional Scheme for Betalactamases and its Correlation to molecular Structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 39, N° 6. 1211-1233
- Campbell, J., Ciofu, O., Hoiby, N. (1997). Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis have different β -lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the *ampC-ampR* genetic region. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol 41, N° 6. 1380-1384.
- Cattoir, V., Gilibert, A., Le Glaunec, J., Launay, N., Bait-Mérabet, L. (2010). Rapid detection of Pseudomonas aeruginosa from positive blood cultures by quantitative PCR. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, Vol. 9, N° 21. 1-5.
- Cultek. (2010). Aplicaciones: PCR, amplificación de ácidos nucleicos. España. Extraído en línea el 23 de septiembre de 2010 de: [www.cultek.com/.../Aplicaciones-PCR Amplificacion%20de%20acidos%20nucleicos%20in%20vitro.pdf](http://www.cultek.com/.../Aplicaciones-PCR%20Amplificacion%20de%20acidos%20nucleicos%20in%20vitro.pdf)
- Dumas, J., van Delden, C., Perron, K., Kohler, T. (2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in Pseudomonas aeruginosa by quantitative real time PCR. FEMS Microbiol Lett, Vol 254, 217-225.
- Farías, E., Medina, R., Chavarría, J. (2005). Neumonía nosocomial por Pseudomonas aeruginosa. Medicina Interna de México, Vol 21, N° 5, 368-379.
- Fick, R. (2000). Pseudomonas aeruginosa the opportunist: pathogenesis and disease. USA: CRC Press.
- Flórez, J., Armijo, J., Mediavilla, A. (2005). Farmacología Humana. España: Masson. 4^{ta} Edición.

- Gómez, C., Leal, A., Pérez, M., Navarrete, M. (2005). Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia, Vol. 53, N° 1. 1-8.
- Giwercman, B., Tvenstrup, J., Hoiby, N., Kharazmi, A., Costerton, W. (1991). Induction of β -Lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 35, N°5. 1008-1010.
- Hayden, R. (2004). In Vitro nucleic acid amplification techniques. In D., Persing, F., Tenover, J., Versalovic, Y., Tang, E., Unger, D., Relman & T., White (Eds). Molecular Microbiology: Diagnostic principles and practice. USA: ASM
- Hawkey, P. (1998). Molecular mechanism of drug resistance. BMJ. Vol. 317, N° 657. 1-11.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., & Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. BioTechniques Vol. 23, N°1, 504-511.
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W., Wiedeman, B. (2007a). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 51, N° 11. 4062-4070.
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Luhmer-Becker, I., Wiedeman, B. (2007b). Development of resistance in wild-type and hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Strains exposed to clinical pharmacokinetic profiles of meropenem and ceftazidime simulated in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 51, N° 10. 3642-3649.

- Hyndman, D. & Mitsuhashi, M. (2003). PCR Primer Design. En J. Bartlett & D. Stirling (Eds.), Methods in Molecular Biology, vol. 226: PCR Protocols. Totawa, NJ: Human Press Inc. 2^{da} Edición. pp. 81-88.
- Jacoby, G. (2009). AmpC β -lactamases. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 22, N° 1. 161-182.
- Jawetz, E., Melnick, J., Butel J., Morse, S. (2002). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. México: El Manual Moderno. 17^{ava} Edición.
- Juan, C., Macia, M., Gutiérrez, O., Vidal, C., Pérez, J., Oliveri, A. (2005). Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 49, No. 11, 733-738.
- Juan, C., Moya, B., Pérez, J., Oliver, A. (2006). Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high level β - lactam resistance involves three AmpD homologues. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 50, N° 5. 1780-1787.
- Kayser, F., Bienz, K., Eckert, J., Zinkernagel, R. (2005). Medical Microbiology. USA: Thieme. 10th Edición.
- Kong, K., Jayawardena, S., Dayaram, S., del Perto, A., Koh, C., Hoiby, N., Mathee, K. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB β -lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 49, N° 11. 4567-4575.
- Kubista, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, N. (2006). The

real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine-Elsevier, Vol. 27, 95-125

- Langaee, T., Gagnon, L., Huletsky, A. (2000). Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC β -lactamase expression. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 44, N° 3. 583-589.
- Lavenir, R., Jocktane, D., Laurent, F., Nazaret, S., Cournover, B. (2007). Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. J Microbiol Methods. Vol. 70, N° 1. 20-29.
- Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D., Drenkard, E., Wu, G., Wei, T., Villanueva, J., Ausubel, F. (2006). PA14 Transposon Insertion Mutant Library. Harvard Medical School. USA. Extraído en línea el 18 de Septiembre de 2010 de <http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi>
- Livermore, D. (1992). Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol. 36, N° 9. 2046-2048.
- Livermore, D. (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 8, N° 4. 557-584.
- Martínez, L., Hernández, A. (2001). Mecanismos de resistencia a las carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España. Extraído en línea el 19 de Septiembre de 2010 de <http://www.seimc.org/control/revi-bacte/psaeru.htm>

- Moreau- Marquis, S., Stanton, B., O'Toole, G. (2007). Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. A short review. Pulm Pharmacol Ther, Vol. 21, N° 4. 595-599.
- Moya, B., Juan, C., Alberti, S., Pérez, J., Oliver, A. (2008). Benefit of having multiple ampD Genes for acquiring β -lactam resistance without losing fitness and virulence in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 52, No. 10, 3694 - 3700.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2006). Microbiología Médica. España: Elsevier. 5^{ta} Edición.
- Nakae, T., Nakajima, A., Tochihiya, O., Saito, K., Yoneyama, H. (1999). Resistance to β -lactam antibiotics in Pseudomonas aeruginosa due to interplay between the MexAB-OprM Efflux Pump and β -lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 43, N° 5. 1301-1303.
- National Center of Biotechnology Information-NCBI. (2010) Pseudomonas aeruginosa PAO1 chromosome complete genome. Entrez genome. Extraído en línea el 19 de septiembre de 2010 de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=163
- National Center of Biotechnology Information-NCBI. (2009). PRIMER BLAST. Programa usado en línea el 16 de Octubre de 2009, Extraído en línea de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
- Organización Panamericana de la Salud-OPS. (2004a). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: Beta-Lactamasas. Extraído en línea el 23 de Septiembre de 2010. www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/02.pdf.

- Organización Panamericana de la Salud-OPS. (2004b). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: Organismos Gram Negativos. Extraído en línea el 23 de Septiembre de 2010. www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/12.pdf.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M., Hancock, R. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. J Bacteriol. Vol. 1. 1-33.
- Panduro, A., Rivas, A., Sánchez, L. (2000). Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En A. Panduro (Ed.). Biología Molecular en la Clínica. México: McGraw Hill. 1^{era} Edición.
- Poole, K. (2004). Review: Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clinical Microbiology Infectology, Vol. 10. 12-26.
- Primer Biosoft International. (2010). PCR primer design guidelines. USA. Extraído en línea el 23 de septiembre de 2010 de: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.htm
- Prescott, Harley, Klein. (2002). Microbiología. España: McGraw Hill-Interamericana. 5^{ta} edición.
- Qarah S., Burke A., Patibha D., Klaus-Dieter L., Madappa T. (2008). Overview: *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Medscape, eMedicine. Extraído el 23 de Enero de 2010 de: <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>.
- Q-biogene, Inc. (2002). Dimetil sulfóxido (DMSO). Extraído en línea el 31 de Diciembre de 2010 de: <http://www.qbiogene.com/products/pcr/dms0.shtml>
- Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana- Rednarbec. (2008). Reporte de Resistencia Bacterianas 2008. Ecuador. Extraído en línea el 1 de septiembre de 2010 de: <http://www.rednarbec.org/images/pdf/2008.pdf>

- Reinhardt, A., Kihler, T., Wood, P., Rohner, P., Dumas, J., Ricou, B., van Delden, C. (2007). Development and persistence of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a longitudinal observation in mechanically ventilated patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol 51, N° 4, 1341-1350.
- Reisbig, M., Hossan, A., Hanson, N. (2003). Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded *ampC* genes of *Enterobacter* origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 51, 1141-1151.
- Rodríguez, C., Sánchez, R., Sánchez, M., Fernández, J., Calera, J., de las Rivas, J. (2006). Bioinfor. Curso de Doctorado: Aplicación de la Bioinformática a la Biología Molecular. Universidad de Salamanca. España. Extraído en línea el 26 de septiembre de 2010 de: <http://imb.usal.es/bioinfor/Documentos/Texto%20explicaci%F3n.pdf>
- Rotstein, C., Evans, G., Born, A., Grossman, R., Light, B., Magder, S., McTaggart, B., Weiss, K., Zhanel, G. (2008). Clinical practice guidelines for hospital – Acquired Pneumonia and ventilator – associated pneumonia in adults. AMMI Canada guidelines. Can J Infect Dis Med Microbiol, Vol 19, N° 1, 19-53.
- Schmidtke, A., Hanson, N. (2006). Model system to evaluate the effect of *ampD* Mutations on AmpC-mediated β -Lactam resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 50, No. 6, 2030-2037.
- Sekiguchi, J., Asagi, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kasai, A., Mizuguchi, Y., Araake, M., Fujino, T., Kikuchi, H., Sasaki, S., Watari, H., Kojima, T., Miki, H., Kanemitsu, K., Kunishima, H., Kikuchi, Y., Kaku, M., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T. (2007). Outbreaks of multidrug – resistant *Pseudomonas*

aeruginosa in community hospitals in Japan. Journal of clinical microbiology, Vol. 45, N° 3, 979-989.

- Soberón G. (2003). Pseudomonas aeruginosa. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. Extraído en línea el 23 de Enero, 2010, de http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_06/Capitulo06.pdf
- Tam, V., Chang, A., Schilling, M., LaRocco, L., Gentry, O. & Garey, K. (2009). Impact of AmpC overexpression on outcomes of patients with P. aeruginosa bacteremia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. Vol 63., 279-285.
- Vinuesa, P. (2007). Bioinformática aplicada para estudios de ecología y sistemática molecular de bacteria: Alineamientos múltiples. Centro de Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Extraído en línea el 26 de Septiembre de 2010 de: http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/curso_UFLA07/PDFs/Tema3_alineamientos_multiples.pdf
- Wadsworth, G. (2006). Primer design tutorial. Buffalo State College. Department of Biology. USA. Extraído en línea el 24 de septiembre de 2010 de: <http://faculty.buffalostate.edu/wadswogj/courses/450/BIO450%20Primer%20Design%20Tutorial%202006.doc>.
- Winsor G., Van Rossum T., Lo R, Khaira B., Whiteside M., Hancock R., Brinkman F. (2009). Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. Nucleic Acids Research Vol. 37, 483- 488.

- Wolter, D., Schmidtke, A., Hanson, N., Lister, P. (2007). Increased expression of ampC in *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected with ciprofloxacin. Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol. 51, No. 8, 2997-3000.