

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *PSEUDOMONAS* SPP. RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS

Laura González López

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA



Tutor acadèmic: Albert Bordons de Porrata-Doria, Grado de Biotecnología, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, albert.bordons@urv.cat.

En cooperació amb: Centro de investigación biomédica de La Rioja (CIBIR).

Supervisor/s: María López Martínez, Investigador postdoctoral, Departamento de Microbiología molecular, mlopezm@riojasalud.es y

Beatriz Rojo Bezares, Investigador postdoctoral, Departamento de Microbiología molecular, brojo@riojasalud.es.

Septiembre 2021

Jo, Laura González López, amb DNI 16635458H, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 1 de septiembre de 2021

(signatura)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Laura González López'. The signature is written in a cursive style with a large, prominent loop at the beginning of the first name.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	1
2. DATOS DEL CENTRO	1
3. RESUMEN	2
4. PALABRAS CLAVE	3
5. INTRODUCCIÓN	3
5.1 <i>Pseudomonas spp.</i>	3
5.2 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	4
5.3 <i>Pseudomona putida</i>	5
5.4 <i>Pseudomona monteilii</i>	6
5.5 Resistencia a antibióticos	6
5.6 Mecanismos de acción de los antibióticos.....	6
5.7 Mecanismos de resistencia de los antibióticos	7
5.8 Antibióticos carbapenémicos	9
5.9 Elementos génicos de diseminación de resistencia.....	10
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	12
7. METODOLOGÍA.....	13
7.1 Preparación de medios de cultivo.....	13
7.2 Cepas de trabajo.....	13
7.3 Condiciones de cultivo	14
7.4 Tipificación molecular mediante electroforesis de campos pulsado (PFGE)	14
7.5 Determinación de la sensibilidad a antibióticos	16
7.5.1 Difusión en disco.....	16
7.5.2 Test sinérgico de doble disco.....	16
7.6 Extracción de ADN	18
7.7 Determinación de la concentración de ADN.....	18
7.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19

7.8.1	Caracterización de integrones:	20
7.8.2	Estudio de factores de virulencia.....	21
7.9	Detección de genes de resistencia mediante PCR múltiple	22
7.9.1	Detección de genes codificantes de MBL:	22
7.9.2	Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A:.....	23
7.10	Electroforesis en gel de agarosa	24
7.11	Secuenciación	24
7.12	Localización cromosómica y/o plasmídica del gen <i>bla</i>_{VIM-2}	25
7.12.1	PFGE para visualización de plásmidos (Nucleasa S1) y genoma (I-Ceul)	25
7.13	<i>Next generation sequencing</i> (NGS)	29
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
8.1	Tipificación molecular	31
8.2	Caracterización fenotípica de la resistencia a antibióticos	34
8.3	Caracterización genotípica de la resistencia a antibióticos.....	35
8.4	Detección y caracterización de integrones	35
8.5	Estudio de factores de virulencia	36
9.6.	Localización cromosómica y/o plasmídica del gen <i>bla</i> _{VIM-2}	37
9.4.	<i>Next generation sequencing</i> (NGS)	39
9.5.	Reconstrucción de plásmido.....	42
9.	CONCLUSIONES.....	42
10.	BIBLIOGRAFÍA	43
11.	AUTOEVALUACIÓN	49
12.	ANEXOS	49
12.1	Esquema del proceso de experimentación	49
12.2	Fenotipo positivo en MBL.....	51

1. ABREVIATURAS

50-CS: segmento conservado 50	MEM: meropenem
AMC: amoxicilina-ácido clavulánico	MFS: superfamilia facilitadora principal
ADN: ácido desoxirribonucleico	MGE: elementos génicos móviles
AMK: Amikacina	MH: Muller hinton agar
ARN: ácido ribonucleico	Min: minutos
ATM: Aztreonam	NET: Netilmicina
<i>attI</i> : Lugar de recombinación sitio-específico	NGS: <i>Next generation sequencing</i>
BHI: Brain heart infusión	<i>ORF</i> : <i>open reading frame</i>
BLEE: β-lactamasas de espectro extendido	<i>P</i> : <i>Pseudomonas</i>
°C: Grados centígrados	P: promotor
CAZ: Cefazidima	PABA: ácido paraaminobenzoico
CIP: Ciprofloxacina	pb: pares de bases
CLSI: <i>Clinical and laboratory standards institute</i>	PBP: proteínas de unión a penicilina
CST: Colistin sulfate	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
ds: double strain; doble cadena	PFGE: Electroforesis de campo pulsado
DOR: Doripenem	R: <i>reverse primer</i>
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	Ref.: referencia
F: <i>forward primer</i>	RV: región variable
FEP: cefepime	S: segundos
GEN: Gentamicina	SXT: Sulphamethoxazole trimethoprim
h: horas	TIC: Ticarcilina
IMP: imipenem	TOB: Tombramicina
IR: Integrones de resistencia	TZP: Piperacilina/ tazobactam
IS: Secuencias de inserción	Tn: transposon compuesto
MBL: metalo-β-lactamasas	UV: ultravioleta
	WGS: Whole-genome sequencing

2. DATOS DEL CENTRO

El Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), centro adscrito a la Fundación Rioja Salud, se ha concebido como una estructura permanente, moderna y versátil para fomentar la investigación en el ámbito de las Ciencias de la Salud en La Rioja, que pretende llevar a cabo una investigación traslacional basada en la excelencia, ejemplarizando la vocación de progreso y mejora en la calidad asistencial del Sistema

Sanitario Público, mediante la provisión de servicios de soporte avanzados que integren de forma sinérgica las actividades de investigación con los procesos asistenciales que requieran una alta demanda tecnológica.

La actividad investigadora se inició en el 2008 y actualmente cuenta con 13 Unidades de Investigación agrupadas en 6 áreas estratégicas: enfermedades infecciosas, oncología, enfermedades neurodegenerativas, resistencia a antibióticos, economía de la salud e investigación en cuidados. Además, cuenta con 4 Plataformas Tecnológicas que ofrecen apoyo a las diferentes unidades, desarrollan sus propios proyectos de investigación y permiten colaborar con otros laboratorios y con el sector privado. Estas Plataformas Tecnológicas son: genómica y bioinformática, bioética y educación médica, investigación biomédica y apoyo a la investigación clínica.

3. RESUMEN

La resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que desarrollan las bacterias mediante mutaciones en su genoma o por adquisición de material genético de otros microorganismos, pero el abuso o el uso indebido de antibióticos también son factores que favorecen la aparición de este fenómeno, resultando en altas tasas de resistencia entre bacterias, entre las que destaca el género *Pseudomonas*. En este proyecto se ha estudiado una colección de cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de carbapenemasas, aisladas durante los últimos años en el Hospital San Pedro de Logroño (La Rioja). A estas bacterias, pertenecientes a las especies *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. monteilli*, se les ha realizado una caracterización completa analizando relación clonal entre ellas, la sensibilidad a diferentes familias de antibióticos con fenotipo y genotipo, la presencia de factores de virulencia y se han caracterizado los integrones y la localización cromosómica y/o plasmídica del gen *bla_{VIM-2}*. Además, algunas de ellas se les ha secuenciado el genoma completo (WGS) y se ha realizado el análisis bioinformático, estudiando el MLST, los genes de resistencia y los elementos móviles de las cepas y, por último, se realizó la reconstrucción de un plásmido bacteriano. Se ha obtenido una alta diversidad clonal entre las cepas, todas ellas mostraron un fenotipo de multiresistencia y de producción de metalo-βlactamasas asociado a la presencia del gen *bla_{VIM-2}*. Se han encontrado 4 tipos de integrones de clase 1, con el gen *bla_{VIM-2}* en su interior. Además, en el análisis bioinformático se vio que se agrupaban en dos ST diferentes (uno para *P. putida*, no descrito previamente y otro para *P. monteilli*) todas poseían una gran variedad de genes de resistencia (entre 8 y 10) y de elementos genéticos móviles, además se agruparon filogenéticamente en dos ramas diferenciadas dependiendo de la especie.

4. PALABRAS CLAVE

Pseudomonas, patogenicidad, resistencia a los antibióticos, mecanismos de resistencia, factores de virulencia.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 *Pseudomonas* spp.

El género *Pseudomonas* está clasificado dentro del dominio *Bacteria*, en el filo *Proteobacteria*, en la clase *Gamaproteobacteria*, en el orden de Pseudomonadales y en la familia *Pseudomonadaceae* (1). Etimológicamente, "*Pseudomonas*" significa "falsa unidad", derivado del griego *pseudo* (ψευδο 'falso') y *monas* (μονάς / μονάδα 'una sola unidad') (2). Actualmente, a este género pertenecen unas 270 especies distintas, según el *Approved Lists of Bacterial Names* (<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>), y se clasifican en 7 grupos distintos basados en su secuencia 16S rARN (grupo *P. syringae*; grupo *P. chlororaphis*; grupo *P. fluorescens*; grupo *P. putida*; grupo *P. stutzeri*; grupo *P. aeruginosa* y grupo *P. pertucinogena*) (3,4).

Los miembros de este género son bacilos rectos o ligeramente curvados con flagelos polares que se agrupan dentro de las bacterias gram-negativas, además, presentan un mecanismo aeróbico estricto, aunque, en algunos casos utilizan el nitrato como aceptor de electrones (5). Son catalasa positiva, no forman esporas y pueden encontrar plásmidos en su interior (6). Otra característica del género *Pseudomonas* es la capacidad de producir pigmentos como mecanismo de virulencia, que bajo condiciones de limitación de hierro pueden actuar como sideróforos, como la pioverdina (pigmento fluorescente amarillo-verdoso), o la piocianina (pigmento no fluorescente azulado) y la piorrubina (pigmento rojo pardo) sintetizadas por *Pseudomonas aeruginosa* (7,8).

Pseudomonas es un género ubicuo capaz de colonizar numerosos nichos ecológicos, como ecosistemas terrestres, acuáticos, plantas, animales y también humanos, actuando como patógeno. Este grupo de bacterias es muy adaptable, porque presenta una gran versatilidad metabólica al ser capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos e inorgánicos (9,10).

Además, las especies de este género pueden presentar resistencia a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y disolventes orgánicos (11). La Figura 1 resume la gran variedad de especies y sus diferentes hábitats dentro del género *Pseudomonas*.

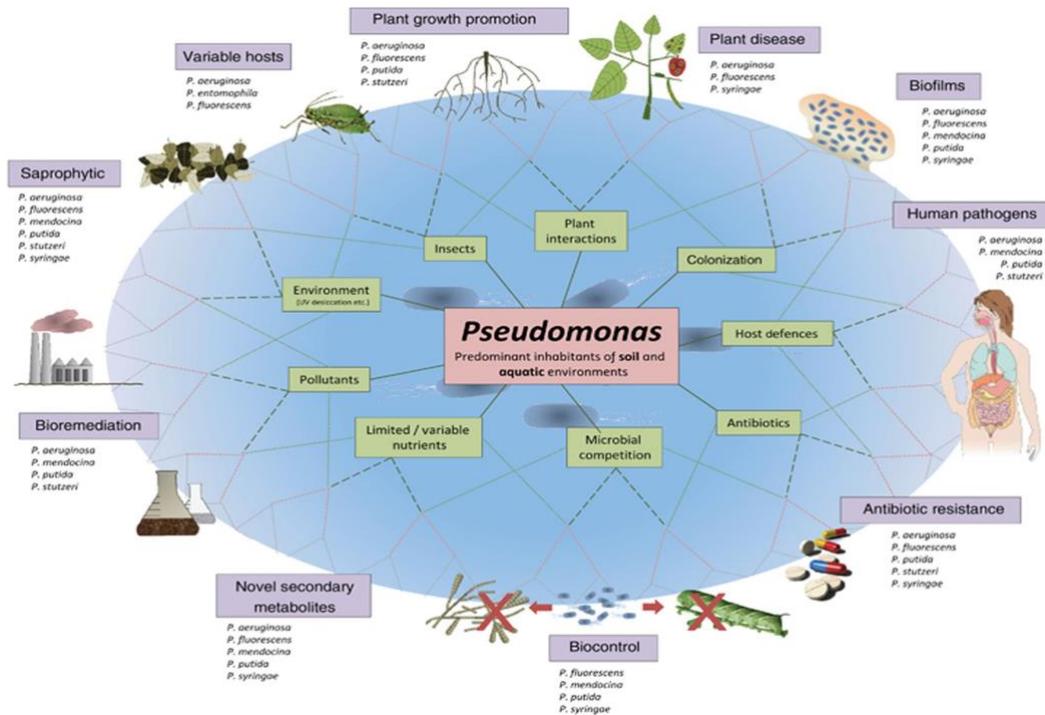


Figura 1 | Rango funcional y ambiental de *Pseudomonas* spp. Extraído de (11)

Las bacterias pertenecientes a este género pueden causar enfermedades, la más conocida y estudiada es el patógeno oportunista *P. aeruginosa*. por su gran trascendencia clínica. Este patógeno presenta resistencia a un gran número de antibióticos y forma biofilms que facilitan su resistencia frente a diversos tratamientos. También se han descrito casos de infecciones en humanos causadas por *P. putida*, *P. fluorescens* o *P. montevillii* (11).

5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es el miembro más conocido e investigado del género *Pseudomonas* (12).

Clínicamente *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista responsable de infecciones nosocomiales graves, infecciones en pacientes inmunodeprimidos, las cuales son potencialmente mortales, e infecciones crónicas en personas con fibrosis quística (13). Una de las características más preocupantes de esta bacteria es su resistencia intrínseca de resistir a varias clases de antibióticos y su extraordinaria capacidad de adquirir otras resistencias, tanto por mutaciones en el cromosoma como por transferencia horizontal de determinantes de resistencia. Por todo esto, es muy difícil encontrar alternativas terapéuticas a estas bacterias (14).

Otra característica importante de esta especie es que presentan múltiples factores de virulencia que facilitan la invasión microbiana entre los que destacan la capacidad de

producir biofilms que incrementan los niveles de resistencia, la síntesis de pigmentos, como la pioverdina y la producción de elastinas (*LasA* y *LasB*) y exotoxina A. Cabe resaltar, además, el sistema de secreción de tipo III (T3SS) responsable de la secreción de las proteínas efectoras ExoU, ExoS, ExoY y ExoT (Figura 2) (15).

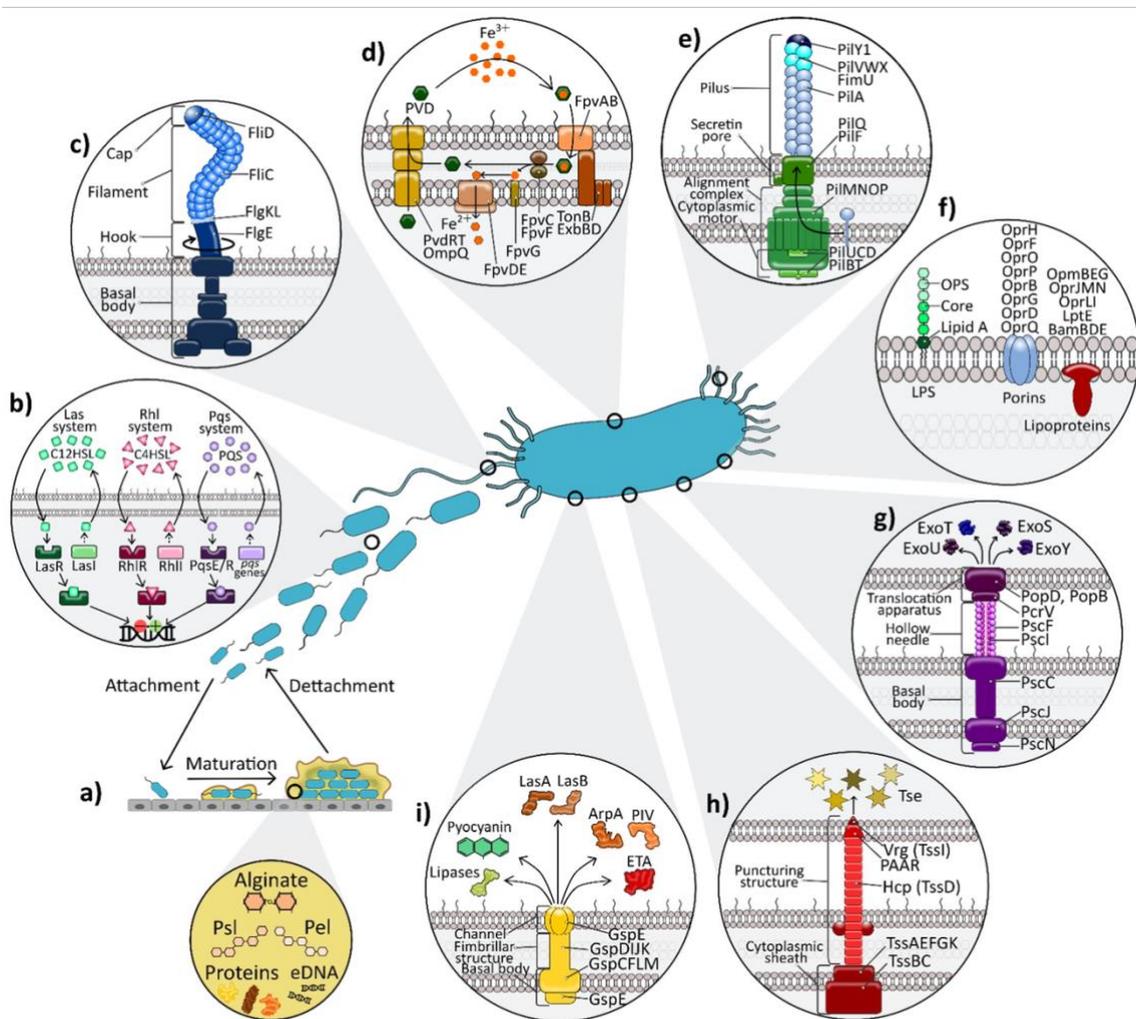


Figura 2 | Principales factores de virulencia sintetizados por *P. aeruginosa*. Extraído de: (15)

5.3 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida es una bacteria ubicua, colonizadora del suelo y saprofita de la rizosfera. El miembro más conocido de este grupo es la cepa KT2440, convertido en un modelo de laboratorio como huésped celular para la biología sintética y para la ingeniería metabólica debido a su versátil metabolismo que le permite resistir a duras condiciones ambientales y a estrés fisicoquímico. Causan infecciones en humanos, de manera muy esporádica, aunque es frecuente encontrar genes de resistencia sobre todo localizados en plásmidos (16,17).

5.4 Pseudomona monteilii

Pseudomonas monteilii (grupo *P. putida*) era considerado un contaminante ambiental sin potencial de virulencia, sin embargo, hoy en día se ha visto que son responsables de infecciones nosocomiales oportunistas y han surgido diferentes cepas resistentes a múltiples fármacos como los carbapenémicos (18,19)

5.5 Resistencia a antibióticos

Según la Organización mundial de la salud los **antibióticos** son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas en seres humanos, animales y plantas (20).

La resistencia es una herramienta que le permite a los microorganismos sobrevivir, adaptarse al entorno y competir con otros microorganismos.

Las resistencias a los antibióticos se producen debido al mal uso de los mismos. El antibiótico no induce la resistencia, pero sí actúa ejerciendo una presión selectiva que elimina las cepas sensibles, seleccionando aquellas con genes de resistencia. Aquellos microorganismos que sobreviven dispersarán la resistencia mediante la multiplicación clonal y transferencia horizontal de genes (21).

Hoy en día este hecho es una de las mayores amenazas a la que se enfrenta la sociedad, debido a que afecta tanto a la salud mundial como a la seguridad alimentaria y el desarrollo (20).

5.6 Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antibióticos actúan por diferentes mecanismos y presentan blancos en diferentes regiones de la célula atacada como se observa en la Figura 3. Estas regiones de ataque antibacteriano son principalmente (22,23):

- **Pared bacteriana:** se centran sobre todo en inhibir su síntesis, debido a que interfieren en la síntesis de peptidoglicanos, lo que lleva a la lisis bacteriana. Pertenecen a este grupo: β -lactámicos, glucopéptidos, bacitracina y estreptograminas.
- **Membrana bacteriana:** son péptidos catiónicos que presentan actividad detergente, que destruyen la proporción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram negativas. Por ejemplo, las polimixinas, las anfotericina B y la nistatina.
- **Síntesis de proteínas:** afectan a su síntesis en diversos niveles. Por ejemplo, los aminoglucósidos y aminociclitolos actúan a nivel de la porción 30 S del ribosoma, haciendo que la proteína sintetizada presente errores y sea inactiva. Las tetraciclinas, también se unen a la porción 30 S del ribosoma. El cloranfenicol, el tianfenicol y el

florfenicol inhiben la transpeptidasa actúan a nivel de la porción 50 S del ribosoma, impidiendo la síntesis de proteínas. Y las lincosamidas y los macrólidos inhiben la translocación, uniéndose a la porción 50 S.

- **Metabolismo de ácidos nucleicos:** presentan diferentes sitios de acción. Las fluoroquinolonas y la novobiocina inhiben una topoisomerasa y la girasa, e impiden el superenrollamiento de las cadenas de ADN. Los nitroimidazoles impiden la reparación del ADN. Y los nitrofuranos, impiden la lectura codónica ADN-ARN mensajero.
- **Bloqueo de la síntesis de ácido fólico:** las sulfamidas inhiben la incorporación del PABA, las sulfonas, la pirimetamina, la trimetoprima y las diaminopirimidinas inhiben la dihidrofolato reductasa e impiden el paso de ácido fólico a folínico, necesario para la síntesis de bases púricas y pirimidínicas.

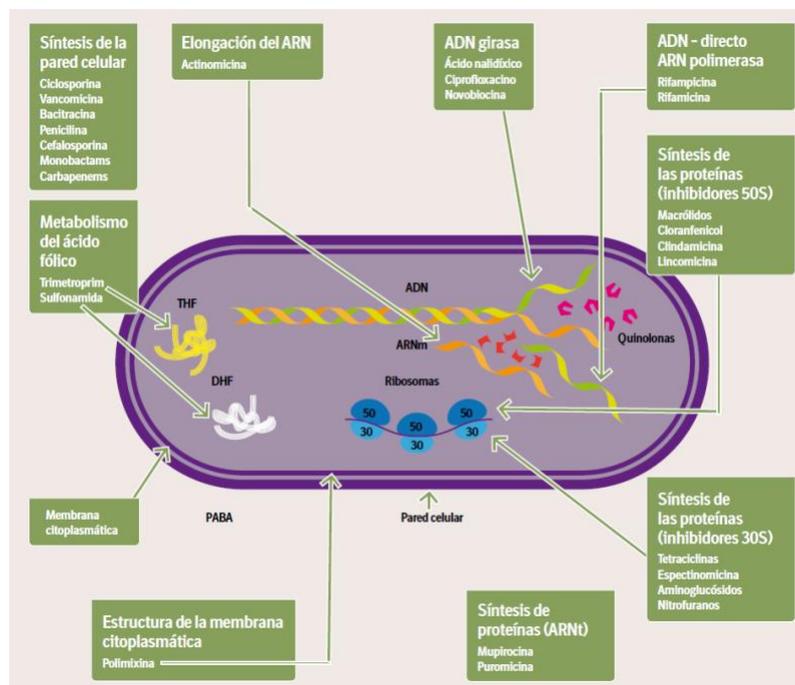


Figura 3 | Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, conjuntamente con algunos ejemplos de antimicrobianos que actúan a esos niveles. Extraído de: (24)

5.7 Mecanismos de resistencia de los antibióticos

En la Figura 4 se muestran los mecanismos que poseen las bacterias para resistir a los diferentes antibióticos. Los más comunes son (25,26):

- **Alteración de la permeabilidad de la membrana** mediante, por ejemplo, pérdida de porinas en la pared celular lo cual impide la entrada del antibiótico al interior de la bacteria. Se trata de una resistencia a antibióticos como los carbapenémicos.
- **Inactivación enzimática del antibiótico**, como en el caso de las β -lactamasas, que son proteínas con actividad enzimática capaces de romper enlaces químicos de

compuestos β -lactámicos, generando así resistencia a antibióticos como la penicilina o las ampicilinas.

- **Expulsión activa del antibiótico** mediante bombas de expulsión que son proteínas ubicadas en la transmembrana que exportan el antibiótico al exterior de la célula mediante gasto energético, con esto se obtiene resistencia al cloranfenicol o las quinolonas.
- **Hiperproducción o modificación de la diana de acción mediante:**
 - **Enzimas que modifican químicamente a la enzima y la inactivan** y así se evita que puedan reconocer la diana, como en el caso de los aminoglucósidos.
 - **Mutaciones en la diana específica del antibiótico** haciendo que sea irreconocible por el antibiótico, como la mutación en enzimas como la ADN girasa o la topoisomerasa VI, haciendo que la célula sea resistente a las quinolonas.
 - **Mutaciones en los ribosomas** en las regiones donde interaccionan con antibióticos como la tetraciclina, haciendo que la síntesis proteica pueda seguir funcionando con normalidad.
 - **Mutaciones en la estructura del liposacárido (LPS)** impidiendo su unión con antibióticos como la polimixina, inhibiendo su desestabilización.
- **Desvíos alternativos** algunas enzimas son capaces de ganar una actividad enzimática perdida o mutar debido a la acción antibiótica, haciendo que la célula pueda sobrevivir debido a que se crea un desvío de la ruta normal.

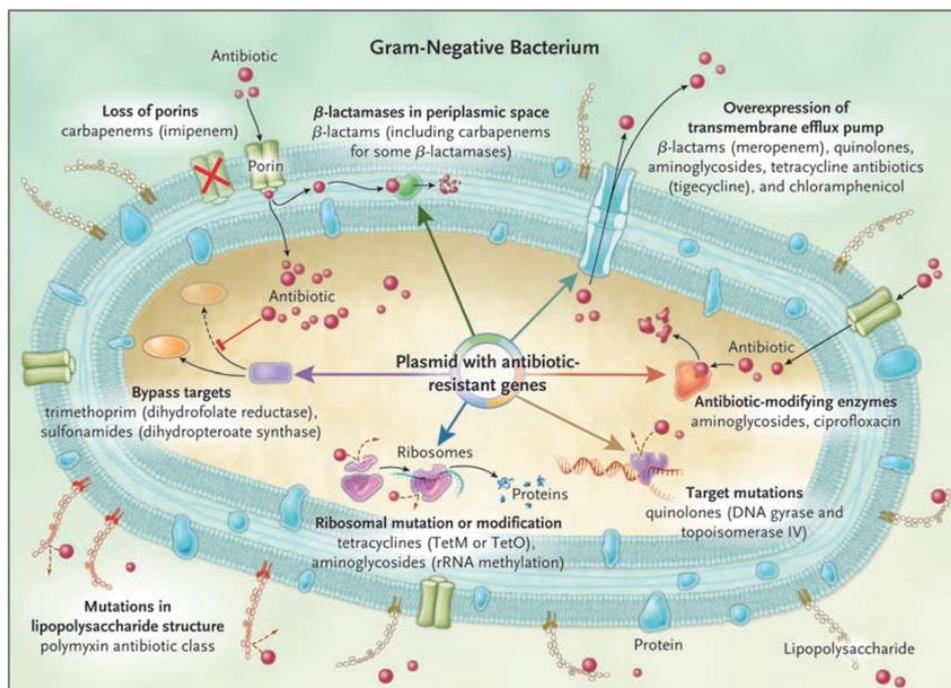


Figura 4 | Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas y antibióticos afectados.

Extraído de: (25)

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

5.8 Antibióticos carbapenémicos

Los carbapenémicos son antibióticos de amplio espectro dentro del grupo de los β -lactámicos. Estos agentes actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse e inactivar las proteínas de unión a penicilina (PBP), provocando la lisis bacteriana. Estos antibióticos son unos de los más utilizados a nivel mundial y más eficaces, debido a que suelen ser resistentes a la hidrólisis de las β -lactamasas. Su estructura contiene un anillo β -lactámico que presenta un átomo de carbono en la posición 1, en sustitución del átomo de azufre que comúnmente tienen la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas (Figura 5). También presenta una insaturación entre el carbono 2 y 3 del anillo pentamérico. Los más conocidos son el imipenem, el meropenem, el ertapenem y el doripenem (27,28).

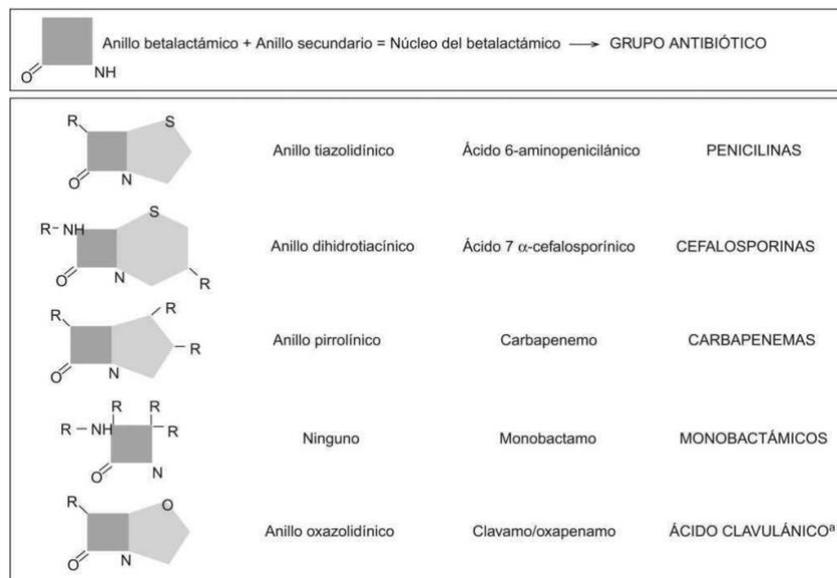


Figura 5 | Estructura química de los β -lactámicos. Extraído de: (29)

La propagación de bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos sigue evolucionando rápidamente por todo el mundo, siendo una de las causas más importantes de infecciones hospitalarias. Dentro de este grupo de bacterias resistentes a carbapenémicos se encuentran bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*,

Acinetobacter baumannii (y *Enterobacterias*, las cuales se agrupan, de acuerdo con la OMS, dentro de patógenos críticos que requieren investigación y un urgente desarrollo de medicamentos (30).

En el caso de *Pseudomonas* existen diferentes mecanismos de resistencia frente a este grupo de antibióticos, los cuales son: 1. Alteración de la permeabilidad de membrana externa, como por ejemplo la pérdida de la porina OprD, 2. Hiperexpresión de bombas de expulsión activas intrínsecas, 3. Inactivación enzimática a través de carbapenemasas como las metalo- β -lactamasas (MBL) que incluyen las enzimas VIM e IMP 5. Hiperproducción de la β -lactamasa cromosómica AmpC inducible. Además, en bacterias Gram negativas la resistencia suele ser consecuencia de la asociación de varios de estos mecanismos (31).

5.9 Elementos génicos de diseminación de resistencia

Las bacterias tienen la capacidad de adquirir genes por transferencia horizontal que con frecuencia se localizan en elementos genéticos móviles y movilizables (EGM), como integrones, transposones, secuencias de inserción, islas genómicas, fagos, plásmidos y elementos conjugativos integradores (ICE). Estos elementos permiten la diseminación de mecanismos de resistencia entre bacterias de la misma o distinta especie (32). Estos EGMs son fragmentos de DNA capaces de codificar las proteínas necesarias para mediar el movimiento de DNA entre genomas, desempeñando un papel importante en la evolución de las especies. Además, en un mismo elemento genético pueden hallarse varios genes implicados en la resistencia a distintas familias de antibióticos (33).

Los tres elementos genéticos móviles más característicos de las especies bacterianas son:

- 1. Plásmidos:** son moléculas de ADN extracromosómicas generalmente circulares, autorreplicantes y transferibles de un organismo a otro mediante conjugación (34).
- 2. Elementos génicos transponibles:** Son secuencias de DNA que tienen la capacidad de cambiar de posición dentro del genoma. Dentro de este grupo existen diferentes tipos de elementos transponibles que incluyen: 1) las secuencias de inserción (IS) que contienen una transposasa flanqueada por dos secuencias repetidas invertidas. y 2) los transposones compuestos (Tn) que contienen en la región central de genes que pueden conferir resistencia a antibióticos y está flanqueada por dos secuencias IS, en orden directo o inverso (35,36).
- 3. Integrones:** es una unidad genética que incluye los componentes de un sistema de recombinación sitio-específico que es capaz de capturar, movilizar y expresar estructura llamadas casetes génicos. Estos casetes génicos se caracterizan por presentar una

secuencia específica (*attC*) que reconocida por la integrasa se une por recombinación sitio-específica a la secuencia *attI* del integrón. Los genes casetes pueden formar estructuras circulares que portan las secuencias ORF (open reading frame) de un gen de resistencia seguido por un sitio *attC* que permite el intercambio. En algunos casetes génicos existe un promotor que actúa como un sistema de clonación natural y como vector de expresión (37). La estructura básica de los integrones consta de:

- el gen *int1* situado en el extremo 5' conservado (5'-CS), que codifica una integrasa de la familia tirosina-recombinasa que está implicada en la integración y liberación de casetes génicos
- attI*, que es un sitio de recombinación sitio-específico, reconocido por la integrasa, en donde se integra el casete génico
- P_c*, promotor que permite la expresión de los casetes génicos aguas abajo que está inversamente relacionado con la capacidad de la integrasa para escindir e integrar nuevos genes. Además, *P_c* puede combinarse con un segundo promotor denominado *P2* que si se encuentra activo incrementa la fuerza del *P_c* (38). Y *P_{int1}*, promotor que permite la expresión de la integrasa (39).

La integrasa permite la interacción entre *attC* del casete génico y el *attI*, uniéndolos y facilitando su integración o escisión de la región variable del integrón como se muestra en la Figura 6 (40). Estos elementos se dividen en integrones de resistencia (IR) que forman parte normalmente de transposones y plásmidos y contienen habitualmente genes de resistencia a antibióticos y superintegrones (SI) que suelen contener genes asociados a funciones adaptativas y se localizan en el cromosoma (41). Hasta el momento se han descrito 5 clases de IR, pero mayoritariamente los de clase 1, 2 y 3 se han detectado en *Pseudomonas*, principalmente los de clase 1 (42).

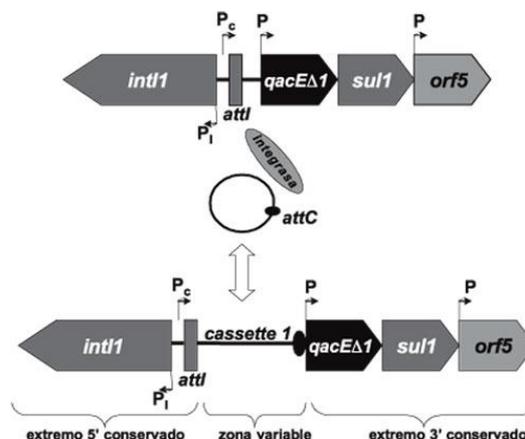


Figura 6 | Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de casetes genéticos de resistencia. Extraído de: (39)

Los integrones de clase 1 normalmente contienen el segmento 5' conservado (5'-CS) que incluye al gen *int1* y el sitio adyacente de recombinación *attI*, además del segmento

3' conservado (3'-CS) que contiene el gen *qacEΔ1* (resistencia a detergentes) truncado por el gen *sul1* (resistencia a sulfonamidas) y a veces puede contener los genes *orf5* u *orf6* de función desconocida. Sin embargo, la región 3'-CS puede ser diferente, incluso hay autores que han descrito la ausencia del gen *sul1* en el 10% de los integrones de clase 1 (39). Hipotéticamente, el origen de los integrones de clase 1 se podría deber a la generación de un ancestro formado por la adquisición del gen *int1* y la secuencia *att1* por parte de un transposón de la familia Tn5053, dando lugar al Tn402, el cual contiene una región de transposición *tni* completa (*tniR/C,tniQ,tniB,tniA*) siendo un transposón funcional y un integrón. Por esta razón, los integrones de clase 1 derivados del Tn402 tienen la facilidad de diseminarse entre distintas especies de bacterias. (43) Este proceso de divergencia se resume en la Figura 7.

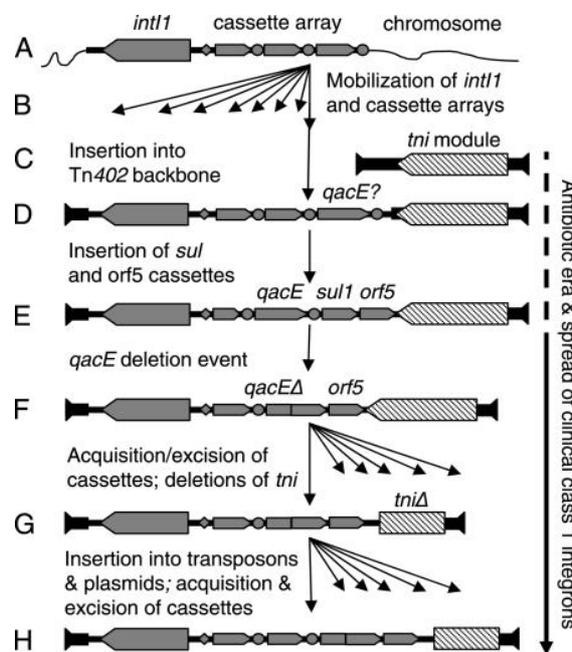


Figura 7 | Modelo de origen y divergencia de los integrones de clase 1. Extraído de: (43)

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Dado que la caracterización molecular de *Pseudomonas* spp. resistentes a carbapenémicos es un estudio de gran interés en la lucha contra la resistencia a antibióticos, la **hipótesis** del trabajo es estudiar cuáles son los mecanismos de resistencia o virulencia presentes en estas bacterias para ayudar a encontrar posibles alternativas para acabar con ellas, ayudando a paliar este problema de salud pública mundial.

Por ello, los **objetivos** de este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar la relación clonal.
2. Determinar los fenotipos de resistencia a un amplio número de antimicrobianos.

3. Caracterizar los mecanismos implicados en la resistencia a antibióticos carbapenémicos.
4. Detectar los elementos genéticos móviles (integrones/plásmidos) implicados en la diseminación de la resistencia a carbapenémicos.
5. Estudiar la presencia de factores de virulencia en las cepas.
6. Detectar la localización cromosómica/plásmidica del gen *bla_{VIM-2}*.
7. Realizar el análisis informático de los genomas de las cepas obtenidos mediante secuenciación masiva (WGS, Whole-genome sequencing), determinando el resistoma, viruloma y moviloma de dichas cepas.

7. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos mencionados anteriormente se ha llevado a cabo, el siguiente proceso de experimentación (Anexo 1):

7.1 Preparación de medios de cultivo

- **Medio Brain Heart Infusion Broth** (BHI líquido): Se suspendieron 37 g de medio en 1 L de agua destilada, se calentó y agitó la mezcla hasta que se diluyó todo el contenido (se dejó hervir durante 1 minuto (min)). Después, se distribuyó el medio en tubos de ensayo (3 mL) y se esterilizaron en el autoclave a 121 °C.
- **Medio Brain Heart Infusion Agar** (BHI agar): Se suspendieron 52 g de medio en 1 L de agua destilada, se calentó y agitó la mezcla hasta que se diluyó todo el contenido (se dejó hervir durante 1 min). Después, se esterilizó el medio en el autoclave a 121 °C y se distribuyó en placas de Petri.
- **Muller Hinton Agar** (MH agar): Se suspendieron 38 g de medio en 1 L de agua destilada, se calentó y agitó la mezcla hasta que se diluyó todo el contenido (se dejó hervir durante 1 min). Después, se esterilizó en el autoclave a 121 °C y se distribuyó en placas de Petri.

7.2 Cepas de trabajo

Se trabajó con las siguientes cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas durante el periodo 2016-2020 en el Hospital San Pedro de Logroño (La Rioja):

Tabla 1 | Cepas de *Pseudomonas* spp. analizadas.

Especie	Cepa
<i>P. monteilli</i>	Ps1139, ^b Ps1169, Ps1177, Ps979, Ps1108, Ps1115, Ps1130
<i>P. aeruginosa</i>	^a Ps1149
<i>P. putida</i>	^a Ps1163, Ps1167, ^b Ps1176, Ps708, Ps712, Ps960, Ps1105, Ps1109

^a mismo paciente, ^b mismo paciente.

Todas provienen de muestras de orina, con excepción de la cepa Ps712 que proviene de muestra de heces.

7.3 Condiciones de cultivo

A las cepas guardadas a -20°C en un medio con leche desnatada, les realizó un **pase de aislamiento por agotamiento por estrías** sobre el medio BHI agar en placa de Petri. Para ello, se cogió una pequeña cantidad de muestra de bacteria mediante un asa de siembra y se repartió sobre la mitad de la superficie de cultivo, a continuación, se cambió de asa y se cogió la muestra de la siembra anterior y se repartió por un cuarto de la placa, después, con una nueva asa de siembra se cogió muestra de la siembra previamente realizada y se esparció por el último cuarto de la placa libre. Por último, se incubaron las placas 24 horas (h) a 37°C. Con esta técnica lo que se consigue es aislar una colonia bacteriana a partir de un elevado número de bacterias. A continuación, se seleccionó una colonia bacteriana del aislamiento por agotamiento por estrías y se realizó un **pase en masa**. Este método se basa en coger una única colonia y cubrir toda la placa de Petri con un asa de siembra, como todas las bacterias provienen de la misma colonia, se consideran clones. Por último, se incubaron las placas a 37°C durante 24 h.

7.4 Tipificación molecular mediante electroforesis de campos pulsado (PFGE)

Para obtener la relación clonal entre las cepas de *Pseudomonas* se utilizó la técnica de PFGE.

1. Preparación de insertos

A partir de un cultivo puro de 24 h en placa de agar BHI se inocularon varias colonias en 3 mL de BHI líquido, y se incubaron a 37°C durante 24 h. Después, se cogió 1 mL en un eppendorf y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min, se tiró el sobrenadante y al precipitado se le añadió 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)), se resuspendió y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min. A continuación, el precipitado se resuspendió en 1 mL de TE.

Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BIO-RAD) al 1,5% en buffer TE y se mantuvo a 56°C. Después, se mezclaron 0,5 mL de la suspensión bacteriana con 0,5 mL de agarosa y se distribuyó en los moldes, preparando 3 insertos por aislado y se dejó solidificar.

2. Lisis de insertos

Los insertos solidificados se pusieron en tubos de 15 mL y se añadieron 3 mL de buffer de lisis (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarcosil, 1 mg/mL proteinasa K, pH 8) y se dejó incubar durante 6 h en un baño de agua con agitación a 56°C. Después, se tiró el buffer

de lisis y se preparó otro buffer de lisis con una concentración de proteinasa K de 0.1 mg/ml y se dejó en agitación durante toda la noche.

3. Lavado de insertos

Tras eliminar el buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados: 1) 10 mL de agua destilada estéril durante 10 min a 56°C en agitación; 2) 10 mL de TE/tiourea cada 30 min a 56°C en agitación (tres veces); 3) 10 mL de TE/tiourea durante 30 min, a temperatura ambiente. Después, se añadió nuevo buffer de TE/tiourea y se guardaron los insertos a 4°C para próximas aplicaciones.

4. Digestión de insertos

Para la digestión se empleó la mitad de un inserto de cada cepa de estudio y 10 U de la enzima de restricción *SpeI* (Takara). El volumen final de buffer de digestión fue de 100 µl para cada inserto el cual contenía: 1 µL de *SpeI* (10000 U/ µL), 10 µL de buffer (10X) y 89 µL de H₂O destilada estéril. Los insertos se dejaron incubar durante toda la noche a 37°C.

5. Preparación del gel de agarosa

Se preparó un gel al 1% de agarosa (agarosa D-5, Condalab) en TBE 0.5X. Una vez se ha solidificado el gel, se rellenaron los pocillos con los insertos digeridos dejando el primero y último para el marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker de BioLabs, New England) y se sellaron los pocillos con agarosa a 56°C.

6. Electroforesis

Este paso se realizó en una cubeta de electroforesis de campos pulsados CHER-DR II (BioRad) con 2 L de TBE 0,5X suplementado con tiourea 75 µM (para evitar la degradación del ADN). Las condiciones de electroforesis fueron: a) rampa lineal pulsada de 5 s a 15 s a 14 °C durante 10 h; b) rampa lineal pulsada de 15 s a 45 s a 14 °C durante 10 h. Ambas con un ángulo de 120°, una bomba a 70 y un gradiente de voltaje de 6 V/cm.

7. Tinción del gel y visualización

Se tiñó el gel en una solución acuosa de 300 ml de bromuro de etidio (30 µl/300 ml) durante 30 min. A continuación, se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con el captador de imágenes (BioRad). Seguidamente, se destiñó el gel con H₂O miliQ durante 30 min y se fotografió de nuevo.

8. Análisis de los patrones de PFGE

Los patrones se compararon y se clasificaron en indistinguibles, estrechamente relacionados, posiblemente relacionados o diferentes según las directrices propuestas por (44). Por otro lado, se realizó un análisis informático de los geles mediante el software GelJ (45) usando el coeficiente Dice y la clasificación por método UPGMA.

7.5 Determinación de la sensibilidad a antibióticos

7.5.1 Difusión en disco

Para determinar la sensibilidad a diferentes antibióticos, se utilizó la técnica de **difusión en disco o antibiograma**. Para ello, a partir de un cultivo puro en placa de 24h se realizó una suspensión bacteriana en solución salina estéril al 0,9% consiguiendo un 0,5 McFarland. A continuación, se introdujo un hisopo estéril en la suspensión bacteriana y se frotó por toda la superficie de la placa de Petri. Después, se colocaron los discos de antibióticos (Tabla 2). Por último, se incubaron las placas a 37 °C durante 20-24h. Se midió el diámetro del halo de inhibición (mm) de las placas y se comparó con los parámetros estandarizados del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para *Pseudomonas* spp. con el objetivo de determinar la resistencia o sensibilidad a los antibióticos utilizados en las cepas testadas. En la Tabla 2 se muestran los puntos de corte (mm) de los antibióticos según el CLSL del 2021:

Tabla 2 | Puntos de corte (mm) según el CLSI del 2021 de los antibióticos utilizados.

Antibiótico	Contenido del disco	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Amikacina (AMK)	30 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Aztreonam (ATM)	30 µg	≥ 22	16-21	≤ 15
Ticarcilina (TIC)*	75 µg	≥ 24	16-23	≤ 15
Piperaciclina-tazobactam (TZP)	100/10 µg	≥ 21	15-20	≤ 14
Doripenem (DOR)	10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15
Imipenem (IMP)	10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15
Meropenem (MER)	10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15
Gentamicina (GEN)	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Netilmicina (NET)	30 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Tobramicina (TOB)	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≥ 25	19-24	≤ 18
Colistina (CST)	10 µg	≥ 11	-	≤ 10

*Según CLSI 2016

7.5.2 Test sinérgico de doble disco

Para la detección de producción de metalo-β-lactamasa (MBL), β-lactamasa de espectro extendido (BLEE) y la presencia de AmpC inducible se utilizó la técnica del

test sinérgico de doble disco. Para ello, se repitió el proceso anterior, colocándose los discos en una posición determinada según el experimento:

- **Detección de MBL:** Se colocó un disco de imipenem (IMP) (10 µg) + un disco con 6 µl de ácido etilendiaminotetraacético (0,5 M y pH 8,0) (EDTA, Panreac) + un disco de meropenem (MEM) (10 µg) a 2 cm de distancia de centro a centro de cada disco. El EDTA es un agente quelante que atrapa los iones Zn^{2+} y las MBL necesitan este cofactor para llevar a cabo su reacción enzimática. Por lo que al colocar el EDTA se inhibirá la acción de la enzima MBL. Por lo tanto, cuando el organismo presenta actividad MBL se observa una sinergia en el halo de inhibición cerca del disco de EDTA, debido a que se inhibe la acción de la enzima. Sin embargo, esta prueba debe ser verificada mediante el uso de PCR para detectar los genes responsables de este mecanismo de resistencia (46).

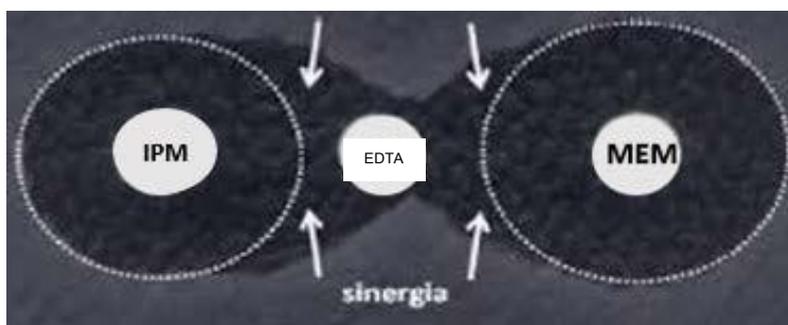


Figura 8 | Test sinérgico de doble disco positivo para MBL. Extraído de: (47)

- **Detección de BLEE:** Se colocó un disco de cefepime (FEP) (30 µg) + un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) (10 µg) separados a 2 cm de distancia de centro a centro del disco. En la cepa productora de BLEE se observará una sinergia (48).



Figura 9 | Test sinérgico de doble disco positivo para BLEE.

- **Presencia de AmpC inducible:** Se colocó un disco de ceftazidima (CAZ) (30 µg) + un disco de IMP (10 µg) + un disco de piperacillin/ tazobactam (TZP) (100/10 µg) separados a 2 cm de distancia de centro a centro de cada disco. Se detecta que el organismo produce una β -lactamasa inducible cuando se observa un antagonismo entre CAZ y TZP (49).



Figura 10 | Test sinérgico de doble disco positivo para AmpC inducible. Extraído de: (49)

7.6 Extracción de ADN

Se **extrajo el DNA** mediante el método InstaGene™ Purification matriz (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del comercial.

1. A partir de un cultivo puro en placa se recogió un asa de siembra y se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril.
2. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min.
3. El precipitado se resuspendió en 200 μ L de la resina comercial de extracción (InstaGene Matrix, Bio-Rad) y se incubó en un baño de agua a 56°C durante 30 min.
4. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 10 segundos (s) y se mantuvieron a 100°C durante 8 min. Después, se agitaron con un vórtex 10 s y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 3 min.
5. El sobrenadante, que es donde se encuentra el DNA obtenido, se traspasó a un eppendorf limpio y estéril. Se conservó a 4°C.

7.7 Determinación de la concentración de ADN

Para determinar la **concentración de ADN** extraído en el paso anterior se utilizó el método espectrofotométrico (NanoDrop® ND-1000, NanoDrop Technologies). Se trata de un método muy sensible y por lo tanto requiere poca cantidad de muestra (3 μ l). Para equilibrar el espectrofotómetro y ajustar el blanco se utilizó agua miliQ. Una vez equilibrado se añadió la muestra y se midió la concentración y pureza de esta. La lectura a 260 nm nos indicó la concentración del ADN, para lo que se considera que una unidad de absorbancia ($A_{260}=1$) corresponde aproximadamente a una concentración de 50 μ g/ μ L de dsADN. Por otro lado, el cociente entre la lectura a 260 y 280 indicó la pureza del ADN obtenido, cuando esta cantidad es pura el cociente estará entre 1,8 y 2,0, mientras que si existe contaminación por proteínas la relación será inferior a 1.8 y si es contaminación por ARN el cociente será superior a 2.0.

Cuando la concentración obtenida de las muestras en el NanoDrop fue superior a 1000 µg/µl, se diluyeron para poder trabajar con ellas. La dilución fue de 1/10 en agua miliQ estéril.

7.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La **PCR** es una técnica rápida y económica que se utiliza para amplificar pequeños fragmentos de ADN mediante el uso de secuencias de ADN cortas denominadas cebadores que se unirán a nuestro fragmento de interés (50). En nuestro caso se ha utilizado para la detección de genes de virulencia y la caracterización de integrones. Los reactivos utilizados para esta técnica se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3 | Reactivos utilizados durante la PCR y volúmenes adicionados para preparar la mezcla de PCR.

Componente PCR	Concentración en stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Tampón de reacción NH ₄ (Bioline)	5X	5 µL	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1,5 µL	1,5 mM
Mezcla de dNTPs (Sigma)	10 mM	1 µL	0,2 mM
Cebador <i>forward</i> (F) (Sigma)	25 µM	1 µL	0,5 µM
Cebador <i>reverse</i> (R) (Sigma)	25 µM	1 µL	0,5 µM
BioTaq ADN polimerasa (Bioline)	5U/ µl	0,3 µL ^a	1,5 U
H ₂ O miliQ	-	30,2 µL	-
ADN	-	10 µL	-
Volumen total		50 µL^b	

^aEn aquellas PCRs con fragmentos superiores a 1500 pb se empleó 0,5 µL (2,5U) de BioTaq ADN polimerasa (Bioline).

^bSi se trata de una PCR múltiple este volumen variará, debido a que hay más de una pareja de cebadores.

El mix de PCR para todas las muestras se preparó bajo la campana de flujo en tubos eppendorf de 1,5 mL estériles, donde se fueron añadiendo los componentes uno a uno por separado en cantidad suficiente para el número de muestras que se quería estudiar. A continuación, en cada tubo de PCR (0,2 mL) se adicionaron 40 µl de PCR mix y 10 µl del ADN (fuera de la campana). En todas las reacciones se incluyó un control positivo que contenía el ADN de un organismo que contiene nuestra secuencia a amplificar y un

control negativo que no contenía ADN, el cual es sustituido por H₂O miliQ. Las PCR se realizaron en termocicladores T1 y T3000 Thermocycler (Biometra®). Las secuencias de cebadores, el tamaño del amplicón y las condiciones de PCR se describen en cada uno de los apartados siguientes:

7.8.1 Caracterización de integrones:

Para determinar la presencia de **integrones** en el interior del genoma bacteriano se utilizó la técnica de PCR. Primero se buscaron las estructuras básicas que determinan la presencia de integrones como el gen de la integrasa tipo 1 (*intl-1*) (51), los genes *QacEΔ1sul1* (52). Además, se realizó una PCR con cebadores que codifican en la región 5'-CS (Int1-centro) y en la 3'-CS (RV-R) para ver la presencia y el tamaño de los posibles integrones (53). Los cebadores y condiciones de las PCRs se agrupan en la Tabla 4.

Tabla 4 | Secuencia de los cebadores y condiciones de la PCR utilizado en la PCR de Int-1, QacEΔ1-Sul1 e Int-1-RV.

Diana	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño del amplicón
^a <i>Intl1</i>	intl1-F: GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG intl1-R: ACATGCGTGTAATCATCGTCG	480 pb
^a <i>QacEΔ1-Sul1</i>	Qac-F: GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG Sul-R: GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	1125 pb
^b <i>Intl1-RV</i>	Int1-centro-F: CGAAATCCAGATCCTTGACCC RV-R: AAGCAGACTTGACCTGA	Variable

^a**Condiciones:** 1 ciclo: inicio 94°C 5 min, 30 ciclos: desnaturalización 94°C 30 s, annealing 62°C 30 s, elongación 72°C 1 min, 1 ciclo: elongación final: 72°C 8 min.

^b**Condiciones:** 1 ciclo: inicio 94°C 5 min, 35 ciclos: desnaturalización 94°C 1 min, annealing 55°C 1 min, elongación 65°C 8 min, 1 ciclo: elongación final: 72°C 8 min.

Para caracterizar los genes que se encuentran dentro de los integrones de clase 1 de nuestras cepas se utilizó la técnica de **Mapeo por PCR**, que consiste en el uso de varios cebadores tanto para la amplificación como para la secuenciación de fragmentos solapados de la región variable con la finalidad de obtener el integrón entero (54). Para ello se utilizaron los cebadores y condiciones de la Tabla 5.

Tabla 5 | Secuencia de los cebadores y condiciones de la PCR utilizado en la PCR de RV.

Diana	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño del amplicón
RV- vim	RV-F: GGCATCCAAGCAGCAAG Vim-R: CGAATGCGCAGCACCAG	Variable
vim-RV	Vim-F: GATGGTGTGGTTCGCATA RV-R: AAGCAGACTTGACCTGA	Variable
vim -bel	Vim-F: GATGGTGTGGTTCGCATA BEL-R: CAGAAGCAATTAATAACGCC	Variable
aac(6')-lb - vim	aac(6')-lb-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA Vim-R: CGAATGCGCAGCACCAG	Variable
Intl1centro- aac(6')-lb	intl1centro-F: CGAAATCCAGATCCTTGACCC aac(6')-lb-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	Variable
vim -Tn402- tniC	Vim-F: GATGGTGTGGTTCGCATA Tn402-TniC-R: CGATCTCTGCGAAGAAGCTCG	Variable
aac(6')-lb - sul1	aac(6')-lb-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA SUL1-R: GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	Variable
bel -sul1	BEL-F: CGACAATGCCGCAGCTAACC SUL1-R: GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	Variable
dfrII-vim	DfrII-F: GATCACGTGCGCAAGAAATC Vim-R: CGAATGCGCAGCACCAG	Variable
dfrII - aac(6')- lb	DfrII-F: GATCACGTGCGCAAGAAATC aac(6')-lb-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	Variable

Condiciones: 1 ciclo: inicio 94°C 5 min, 35 ciclos: desnaturalización 94°C 1 min, annealing 55°C 1 min, elongación 65°C 8 min, 1 ciclo: elongación final: 72°C 8 min.

7.8.2 Estudio de factores de virulencia

Para el estudiar la presencia de **factores de virulencia** se realizaron diferentes PCRs. En la Tabla 6 se recogen los cebadores y las condiciones de las diferentes PCRs realizadas.

Tabla 6 | Secuencia de los cebadores y condiciones de las PCRs de factores de virulencia.

Diana	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño del amplicón	Temperatura de alineamiento	Ref.
--------------	---------------------------	----------------------------	------------------------------------	-------------

<i>exoU</i>	F: ATGCATATCCAATCGTTG R: TCATGTGAACTCCTTATT	2000 pb	55°C	(55)
<i>exoS</i>	F: GCGAGGTCAGCAGAGTATCG R: TTCGGCGTCACTGTGGAT	118 pb	60°C	(56)
<i>rhII</i>	F: CTTGGTCATGATCGAATTGCTC R: ACGGCTGACGACCTCACAC	625 pb	60°C	(57)
<i>rhIR</i>	F: CAATGAGGAATGACGGAGGC R: GCTTCAGATGAGGCCAGC	730 pb	60°C	(57)
<i>lasI</i>	F:CGGGTATCGTACTAGGTGCATCA R: GACGGGAAAGCAGGAACTT	605 pb	60°C	(57)
<i>lasR</i>	F:CGGGTATCGTACTAGGTGCATCA R: GACGGGAAAGCCAGGAACTT	1100 pb	60°C	(55)
<i>exlA</i>	F: GACCAGCCAGGTGAACG R: CTCCGCCGCCCTGGCGTC	497 pb	60°C	(58)

Condiciones: 1 ciclo: inicio 94°C 5 min, 30 ciclos: desnaturalización 94°C 30 seg, annealing X°C 30 seg, elongación 72°C 1 min, 1 ciclo: elongación final: 72°C 8 min.

7.9 Detección de genes de resistencia mediante PCR múltiple

La **PCR múltiple** es una técnica molecular que se utiliza para la amplificación de múltiples dianas en un solo experimento de PCR, usando múltiples pares de cebadores en una mezcla de reacción (59). En nuestro caso se han utilizado para la detección de genes responsables de los mecanismos de resistencia a antibióticos.

7.9.1 Detección de genes codificantes de MBL:

Para confirmar la presencia de genes que codifican para **MBLs** se realizó una PCR multiplex (60). La mezcla de la reacción se realizó siguiendo la Tabla 7, utilizando los cebadores y condiciones de amplificación de la Tabla 8.

Tabla 7 | Cantidades añadidas de los reactivos utilizados en la PCR múltiple.

Componente PCR	Concentración en stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
KAPA Taq HotStart Buffer	5X	5 µL	1X
MgCl ₂ KAPA	25 mM	1,5 µL	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,5 µL	0,2 mM
Cebador <i>forward</i>	25 mM	0,5 µL	0,5 mM
Cebador <i>reverse</i>	25 mM	0,5 µL	0,5 mM

Taq (KAPA)	5 U/ µl	0,1 µL	0.5 U
H ₂ O miliQ	-	7,9 µL	-
ADN	-	5 µL	-
Total		25 µL	

Tabla 8 | Secuencia de los cebadores y condiciones de la PCR utilizado en la PCR múltiple de MBL.

Diana	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño del amplicón
<i>Sim</i>	F: TACAAGGGATTCGGCATCG R: TAATGGCCTGTTCCATGTG	570 pb
<i>Gim</i>	F:TCGACACACCTTGGTTCTGAA R: AACTTCCAACCTTGCCATGC	477 pb
<i>Vim</i>	F: GATGGTGTGGTGGTGCATA R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	390 pb
<i>Spm</i>	F: AAAATCTGGGTACGCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	271 pb
<i>Imp</i>	F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC ^a R: CCAAACYACTASGTTATCT ^a	188 pb

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

Condiciones: 1 ciclo: inicio 94°C 5 min, 36 ciclos: desnaturalización 94°C 30 s, annealing 52°C 40 s, elongación 72°C 50 s, 1 ciclo: elongación final: 72°C 5 min.

7.9.2 Detección de genes codificantes de carbapenemasas de clase A:

Para confirmar la presencia de genes que codifican para **carbapenemasas de clase A** se realizó una PCR multiplex (61). La mezcla de la reacción se realizó siguiendo la Tabla 7, utilizando los cebadores y condiciones de amplificación de la Tabla 9.

Tabla 9 | Secuencia de los cebadores y condiciones de la PCR utilizado en la PCR múltiple de Carbapenemasa de clase A.

Diana	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño del amplicón
<i>KPC^a</i>	F: GTATCGCCGTCTAGTTCTGC R: GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC	638 pb
<i>SME^b</i>	F: ACTTTGATGGGAGGATTGGC R: ACGAATTCGAGCATCACCAG	551 pb
<i>IMI (NMC)^c</i>	F: TGCGGTCGATTGGAGATAAA R: CGATTCTTGAAGCTTCTGCG	399 pb
<i>GES^d</i>	F: GCTTCATTACGCACTATT R: CGATGCTAGAAACCGCTC	323 pb

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

^b Variantes del gen *SME* capaz de detectar: de *SME-1* a *SME-3*.

^c Variantes del gen *IMI* y *NMC* capaz de detectar: de *IMI-1* a *IMI-3* y *NMC-A*.

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

Condiciones: 1 ciclo: inicio 94°C 5 min, 25 ciclos: desnaturalización 94°C 30 s, annealing 52°C 40 s, elongación 72°C 1 min, 1 ciclo: elongación final: 72°C 7 min.

7.10 Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los fragmentos amplificados por PCR se realizó una **electroforesis** horizontal en gel de agarosa. Para la preparación del gel se utilizó una concentración de agarosa (Agarosa D1 baja EEO, Propadisa) en el rango de 1-2% (m/v) dependiendo del tamaño del amplicón esperado, después se diluyó en tampón TBE 1X y se calentó en el microondas hasta que la disolución quedó completamente transparente. El tampón TBE 1X se preparó a partir de TBE 5X compuesto por: 54 g/L tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Pacreac), 25,5 g/L ácido bórico (Panreac) y 20 mL EDTA (0,5 M pH 8; Pacreac). Posteriormente, se vertió la mezcla en un molde y se esperó hasta su solidificación. A continuación, se colocó el gel en una cubeta de electroforesis que contenía tampón TBE 1X y se cargó el gel. En el primer pocillo se puso el marcador de peso molecular: si el tamaño del amplicón era >1000pb se cargaron 3 µl de Hyperladder III (Biolader) pero si el tamaño del amplicón era <1000 bp se cargaron 3 µl Hyperladder IV (Bioline), en los demás pocillos se cargaron 10 µl de DNA amplificado con 3 µl de tampón de carga (4 g de sacarosa (Panreac), 0,025 g de bromofenol (Panreac) y 0,025 g xilenocianol (Sigma) en 10 mL de H₂O destilada). Luego, se dejó que migrara el gel a 140 V durante 40 min y se tiñó por inmersión en una disolución de bromuro de etidio (10 mg/mL, Sigma) durante 30 min. Por último, se visualizó el gel con un transiluminador ultravioleta (BioRad).

7.11 Secuenciación

La **secuenciación** de los fragmentos amplificados mediante PCR se llevó a cabo para conocer la estructura concreta de los integrones, Para ello, se enviaron a secuenciar los productos de las PCRs realizadas para los fragmentos RV-VIM y VIM-RV y así conocer la estructura de los integrones. Únicamente se eligieron para la secuenciación aquellas cepas donde en la PCR se había obtenido un producto limpio, es decir que en el gel de agarosa aparecía una única banda.

1. Reacción de secuenciación

El método utilizado para la secuenciación fue la secuenciación Sanger, que sirve para determinar la secuencia de nucleótidos del ADN. Para ello, se utilizaron los mismos

cebadores que para las PCRs y se realizó en un servicio externo a través de la empresa GENEWIZ.

2. Análisis de las secuencias

Una vez se obtienen las secuencias nucleotídicas se utilizan diferentes herramientas informáticas para el tratamiento de las secuencias:

- Programa Chromas (Chromas 1.51, Australia), para analizar los cromatogramas y para obtener las secuencias en formato FASTA.
- Biomodel (<http://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/massager.htm>), para limpiar las secuencias y obtener las secuencias inversas complementarias.
- Web EMBL del European Bioinformatics Institute (EBI) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para alinear las secuencias para obtener el amplicón.
- Base de datos blast del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar los genes que hay en la secuencia de ADN obtenida.

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

Para determinar la **localización cromosómica y/o plasmídica del gen *bla*_{VIM-2}** de las cepas de *Pseudomonas* spp. que contenían ese gen se utilizó la técnica de Southern blotting.

7.12.1 PFGE para visualización de plásmidos (Nucleasa S1) y genoma (I-Ceul)

Se utilizan los insertos ya preparados del protocolo de PFGE propuesto en el apartado 7.4.

1. Digestión de insertos

Se realizaron dos restricciones del DNA con dos enzimas diferentes: **nucleasa S1** (160U/ µl; Takara) que corta los plásmidos contenidos en el organismo, linealizándolos y permitiéndonos ver el número y tamaño de estos en un gel de electroforesis en campos pulsados e **I-Ceul** (5000 U/ml; New England, Biolabs) cuya diana de restricción se encuentra en el 23S rARN del cromosoma del organismo. Para la digestión se emplean las condiciones descritas en la tabla 10.

Tabla 10 | Composición de las mezclas de enzimas de restricción de S1 e I-Ceul y condiciones de incubación.

Componentes	Nucleasa S1 (160 U)	I-Ceul (10 U)
Enzima	1 µL	2 µL
Buffer de reacción	200 µL	170 µL
H ₂ O destilada estéril	1800 µL	88 µL

Temperatura de incubación	37°C	37°C
Tiempo de incubación	40 min	Toda la noche

En el caso de la Nucleasa S1, tras 40 minutos se detuvo la reacción de digestión adicionando 10 µl de EDTA 0,5 M que se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después, se retiró el buffer y se echaron 100 µL de TE.

2. Preparación del gel de agarosa

Se disolvió la agarosa (Pulsed Field Certified Agarose; BioRad) al 1% en TBE 0,5X en el caso de la digestión con *I-CeuI* y al 1,5% en el caso de la digestión con Nucleasa S1 en un volumen final de 150ml. A continuación, se vertió la agarosa fundida en el molde para hacer el gel, y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Seguidamente, se rellenaron los pocillos con los insertos dejando el primero para el marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker de BioLabs, New England) y se sellaron los pocillos con agarosa a 56°C.

3. Electroforesis

Este paso se realizó en una cubeta de electroforesis de campos pulsados CHER-DR II (BioRad) con 2 L de TBE 0,5X suplementado con tiourea 75 µM. Las condiciones de electroforesis para ambas reacciones de restricción se agrupan en la Tabla 11:

Tabla 11 | Condiciones de electroforesis para los insertos digeridos con Nucleasa S1 y *I-CeuI*.

Reacción	Nucleasa S1	I-CeuI
Gradiente de voltaje	6 V/cm	6 V/cm
Rampa lineal pulsada	1-30 s	50-90s
Tiempo	16 h	22 h
Temperatura	14°C	14°C
Ángulo	120	120

4. Tinción del gel y visualización

Se tiñó el gel en una solución acuosa de 300 mL de bromuro de etidio (30 µl/300 ml) durante 30 min. A continuación, se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con el captador de imágenes (BioRad). Seguidamente, se destiñó el gel con H₂O miliQ durante 30 min y se fotografió de nuevo.

5. Preparación de sondas para la hibridación

Se llevó a cabo la preparación de las sondas *bla*_{VIM-2} y 16S rARN para la hibridación. Para ello se utilizó el kit (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche) y se siguieron las

especificaciones del comercial. Las cantidades de cada reactivo añadidas se muestran en la Tabla 12 y los cebadores y condiciones de la Tabla 13.

Tabla 12 | Reactivos utilizados en la PCR de sondas de hibridación.

Componente PCR	Volumen por tubo
PCR buffer	5 µL
PCR DIG mix	5 µL
Cebador <i>forward</i> (F) (Sigma)	5 µL
Cebador <i>reverse</i> (R) (Sigma)	5 µL
Enzima	0,75 µL
H ₂ O miliQ	24,25 µL
ADN	5 µL
Total	50 µL

Tabla 13 | Cebadores empleados para las sondas de hibridación y condiciones de la PCR.

Diana	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplicón
<i>bla_{VIM-2}</i>	F: ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG R: CTAACAACGACTGCGCG	801 pb
16S <i>rARN</i>	F: AACTGGAGGAAGGTGGGGAT R: AGGAGGTGATCCAACCGCA	371 pb

Condiciones: 1 ciclo: inicio 94°C 12 min, 35 ciclos: desnaturalización 94°C 30 s, annealing 60°C 30 s, elongación 72°C 30 s, 1 ciclo: elongación final: 72°C 10 min.

6. Preparación del Southern Blot

Una vez que terminó la electroforesis, se lavó el gel en H₂O destilada para eliminar el bromuro de etidio durante 5 min con agitación a temperatura ambiente. Luego se añadió solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M+NaOH 0.5M) durante 15 min en agitación a temperatura ambiente, y posteriormente se añadió la solución neutralizante (Tris-HCl 0.5M +NaCl 1.5M) durante 15 min en agitación a temperatura ambiente. Y se terminó con un lavado de H₂O destilada durante 5 min.

A continuación, se preparó el montaje de transferencia del DNA a la membrana de nailon, para ello primero se colocó un soporte donde se pusieron los siguientes elementos uno encima de otro: papel absorbente whatman (chromatography paper 3 MM CHr Whatman), el gel, la membrana de nailon (nylon membrane, positively charged, ROCHE), papel de filtro, papel/servilleta absorbente (Blot Absorbent filter paper, BioRad) y peso para facilitar la transferencia. Seguidamente, se añadió en la bandeja

SSC (20X) (NaCl 3M+ Citrato sódico 0.3 M pH 7) que actuaba como conductor del medio al gel y permitió la transferencia del DNA del gel a la membrana de nailon. Este montaje de la Figura 11 se dejó toda la noche a temperatura ambiente.

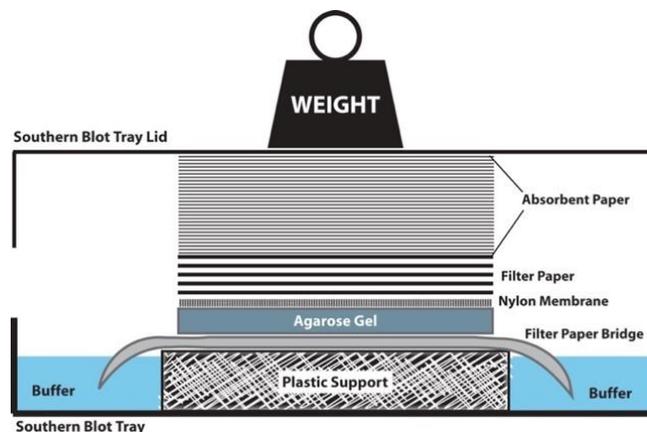


Figura 11 | Montaje de transferencia por método de Southern Blot. Extraído de: (62)

7. Prehibridación

Se desmontó el montaje de transferencia y la membrana se marcó para saber dónde estaba el ADN. A continuación, se puso la membrana en una bandeja con 50 mL de SSC 2X, se secó en papel, se fijó el DNA con luz UV durante 4 min y se lavó con H₂O destilada para eliminar los restos de sales.

Después, se metió la membrana en el tubo de hibridación con 50 mL de solución de prehibridación compuesta por SSC 5X, N-Lauryl sarcosine 0,1%, SDS 0,02%, Salmon Sperm 75 µg/ml (salmon sperm DNA, Invitrogen) y Block stock solution 1X (Kit DIG Wash and block buffer set, Roche,) y se puso en el horno de hibridación durante 2 h a 68°C.

8. Hibridación con sondas específicas

Una vez transcurrido el tiempo se añadieron 10 µL de la sonda en 100 µL de la solución de prehibridación, se incubaron a 100°C durante 10 min y se añadieron al tubo de hibridación dejándolo durante toda la noche a 68°C.

9. Revelado y detección

Se lavó la membrana dos veces con 60 mL de SSC 2X+SDS 0,1% durante 5 min a 68°C en el horno de hibridación, después se lavó dos veces, durante 15min, con 50 mL de SSC 0,1X +SDS 0,1%. A continuación, se realizó la etapa de lavado con 50 ml de washing buffer 1X (DIG wash and block buffer set, Roche) durante 5 min, después la etapa blocking donde se incubó la membrana con 50 ml de una mezcla de blocking solution 1X (DIG wash and block buffer set, Roche) + ácido málico buffer 1X (DIG wash and block buffer set, Roche) durante 30 min. Seguidamente, se realizó la etapa del conjugado donde se añadió el anticuerpo para marcar a la sonda con 50 mL de blocking solution +ácido málico + 8 µl del anticuerpo (anti-digoxigenin Fab fragments, Roche)

durante 30 minutos. Después, se lavó dos veces con 100 mL de washing buffer 1X durante 30 min. A continuación, en la etapa de detección se añadió el detection buffer 1X (DIG wash and block buffer set, Roche) durante 3 min. todas estas incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y en agitación.

Tras finalizar los lavados, se realizó el siguiente paso, en oscuridad, se puso la membrana en un plástico y se le adicionaron 2 mL de detection buffer + 10 µl de CDP-star (Roche) que se repartieron por toda la membrana. A continuación, se dejó 5 min a temperatura ambiente y después 15 min en la estufa a 37°C.

Por último, se colocó la membrana en un plástico en la oscuridad y se visualizó en el ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-RAD).

10. Stripping de membrana

Una vez visualizada la membrana, se eliminó la sonda para poder realizar otras hibridaciones, para ello se lavó dos veces a 37°C durante 15 min con NaOH 0.2M + SDS 0,1% y una vez con SSC 2X. Finalmente, se guardó la membrana en un plástico a 4°C.

7.13 Next generation sequencing (NGS)

A partir de las muestras de ADN genómico obtenido de las cepas de *Pseudomonas* spp. se realizó una **secuenciación del genoma completo**. La preparación de la librería genómica y la secuenciación se llevaron a cabo en la Plataforma de Genómica y Bioinformática del CIBIR. Los pasos para la obtención y el análisis de la secuenciación masiva se muestran en la Figura 12. A partir de los archivos obtenidos en .fa o .gbk/.gb de las secuencias se utilizaron las siguientes herramientas y bases de datos para analizar las diferentes características genéticas de las cepas de estudio:

- Base de datos K-merFinder: identificación de la especie (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/KmerFinder/>)
- Base de datos Resfinder: detección de genes de resistencia a antibióticos (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)
- Base de datos MGE: identificación de elementos móviles como plásmidos, IS o Tn. (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>)
- Base de datos MLST: detección de la secuencia tipo de las cepas del grupo *P. putida*, mediante asignación de los alelos de 8 genes *house keeping* (*argS*, *gyrB*, *ileS*, *nuoC*, *ppsA*, *recA*, *rpoB*, *rpoD*) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>)
- Programa NDtree: construcción de árboles filogenéticos (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/NDtree/>)

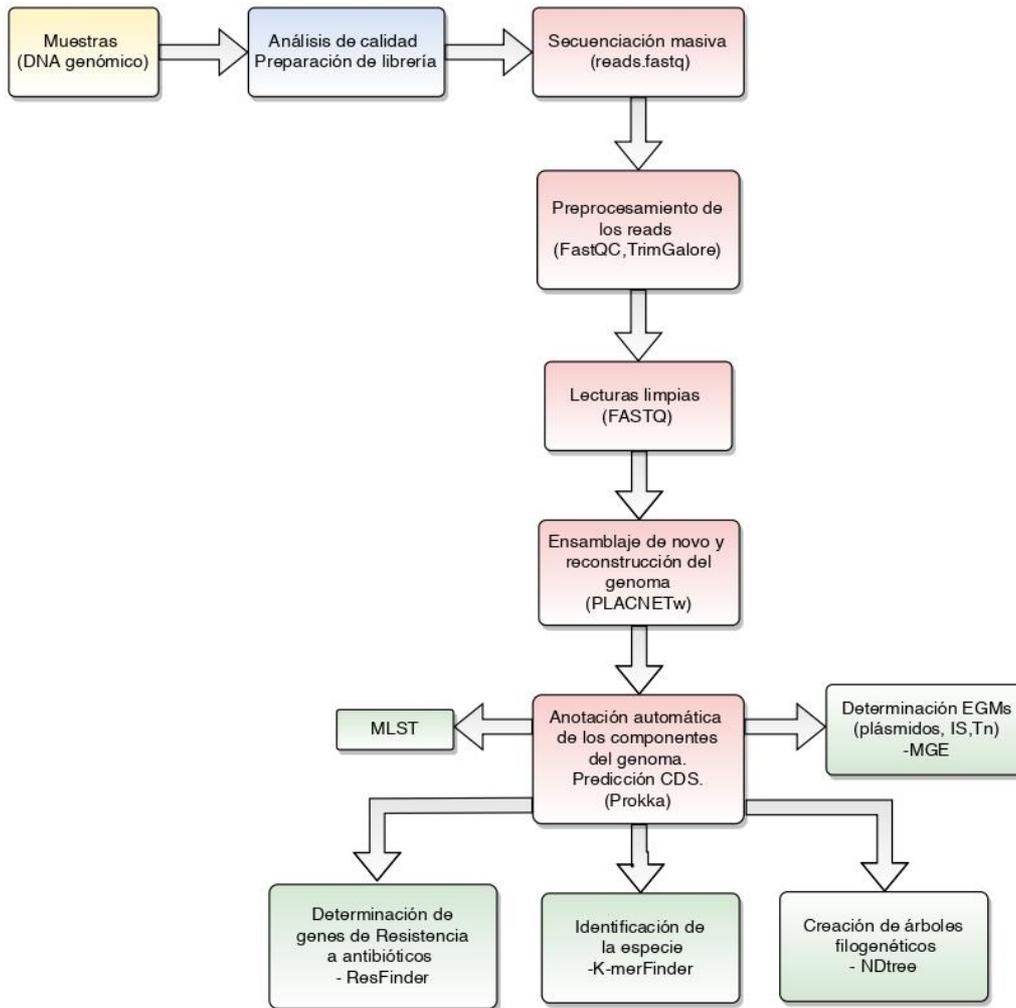


Figura 12 | Esquema de los pasos de la obtención y el análisis de las cepas de *Pseudomonas* mediante NSG.

Por otro lado, se realizó una reconstrucción de un plásmido que contenía la cepa Ps708. Para ello primero se realizó un blast con la secuencia en formato .fa del plásmido utilizando la Base de datos blast del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar a que plásmido se parecía más. Después, se realizó un alineamiento con el programa Mauve (63) para detectar los nodos contenidos en ambos plásmidos y se hizo un reordenamiento de nuestros plásmidos de estudio mediante solapamientos. Seguidamente anotaron todos los genes que contenían ambos plásmidos mediante la herramienta Artemis (64) y por último se creó una figura de comparación lineal de ambos genomas mediante la aplicación Easyfig (65).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han estudiado 16 cepas del género *Pseudomonas*, de las especies que a continuación se puntualizan: *P. aeruginosa* (1 cepa), *P. monteilii* (7 cepas) y *P. putida* (8 cepas), obtenidas del Hospital San Pedro de Logroño (La Rioja). Todas estas cepas han sido caracterizadas mediante la metodología explicada en el apartado anterior y se han obtenido los siguientes resultados:

8.1 Tipificación molecular

Para estudiar la relación clonal de 16 cepas de *Pseudomonas* se ha utilizado la técnica de biología molecular PFGE. La Figura 13 muestra los 16 patrones procedentes de las cepas junto a dos marcadores de peso molecular.

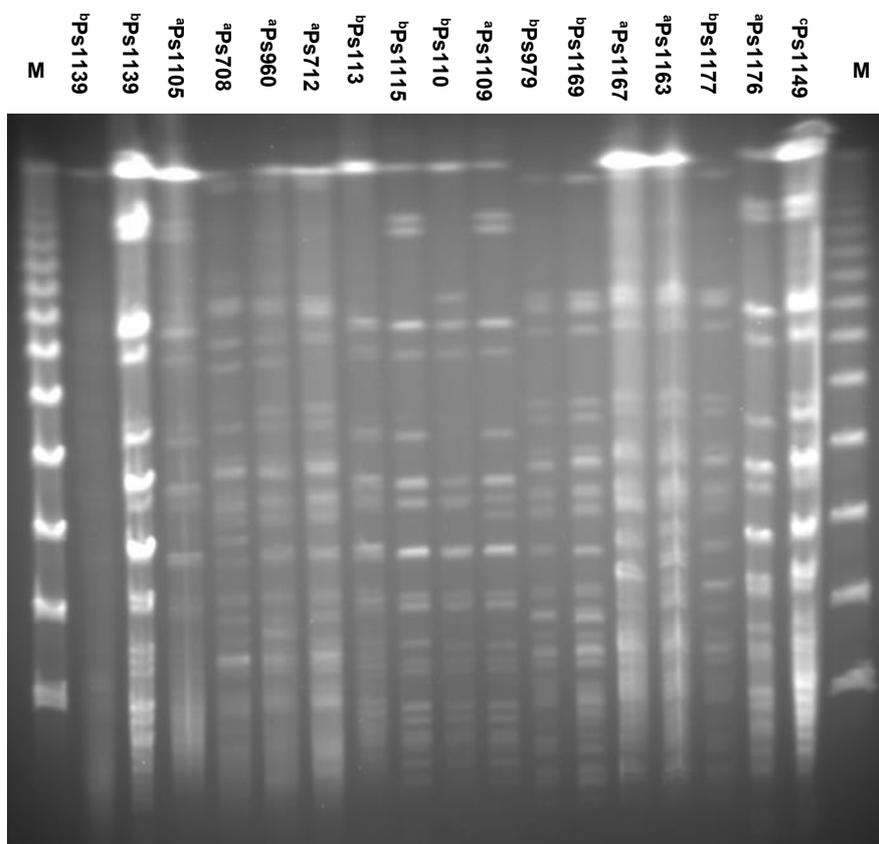


Figura 13 | Gel de PFGE de las cepas de estudio. **M** representa el marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFG). ^a *Pseudomonas putida*, ^b *Pseudomonas monteilii* y ^c *Pseudomonas aeruginosa*.

Tras el análisis PFGE de las cepas de *Pseudomonas* spp., se dividieron en dos grupos según su especie en *Pseudomonas monteilii* y *Pseudomonas putida*. Mediante el software GelJ, se realizó un dendograma, usando el coeficiente de Dice de similitud y un 1.0 de tolerancia, además se ha establecido el punto de corte de un 90% de similitud

para considerar la existencia de relación clonal entre las cepas. En las Figuras 14 y 15 se observa la variabilidad clonal de las cepas de la misma especie.

Como se puede observar en la Figura 14 existe una elevada variedad clonal en las cepas de *P. putida* debido a que únicamente hay dos cepas que forman parte de un mismo patrón de PFGE (Ps1167 y Ps1163), mientras que las demás tuvieron patrones de PFGE diferentes (87,5% de las cepas fueron diferentes). Por otro lado, el 57% de las cepas de *P. monteilii* eran diferentes (Figura 15). En la Figura 15, se puede observar dos patrones formados por cepas indistinguibles o estrechamente relacionadas: patrón P1 (Ps1169, Ps1177, Ps979) y el P2 (Ps1139, Ps1115). Es destacable que las cepas con un mismo patrón de PFGE pertenezcan a diferentes pacientes, pudiendo haberse producido una transferencia de cepas entre estos pacientes.

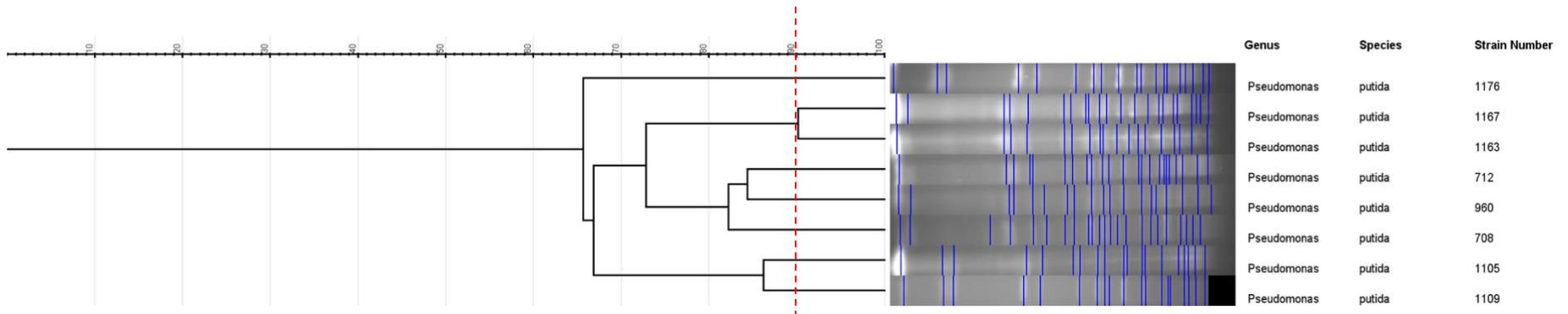


Figura 14 | Dendrograma de las 8 cepas de *Pseudomonas putida*. La línea roja punteada marca el 90% de similitud entre las cepas de *P. putida*.

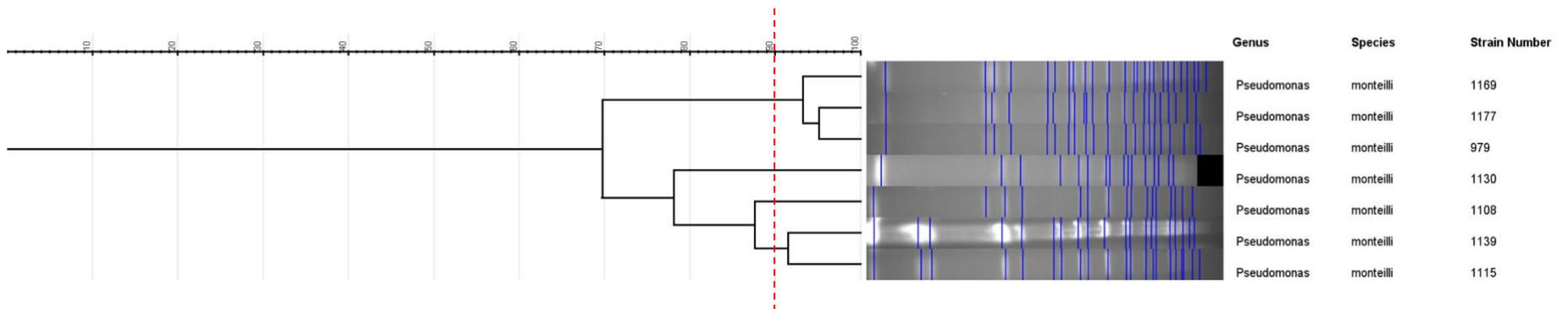


Figura 15 | Dendrograma de las 7 cepas de *Pseudomonas monteilli*. La línea roja punteada marca el 90% de similitud entre las cepas de *P. monteilli*.

8.2 Caracterización fenotípica de la resistencia a antibióticos

Para analizar el fenotipo de resistencia de las cepas de *Pseudomonas* a 12 antibióticos antipseudomónicos (Tabla 2), se utilizó la técnica de difusión en disco. En la Figura 16 se muestran el número de cepas resistentes a estos antibióticos separadas por especies.

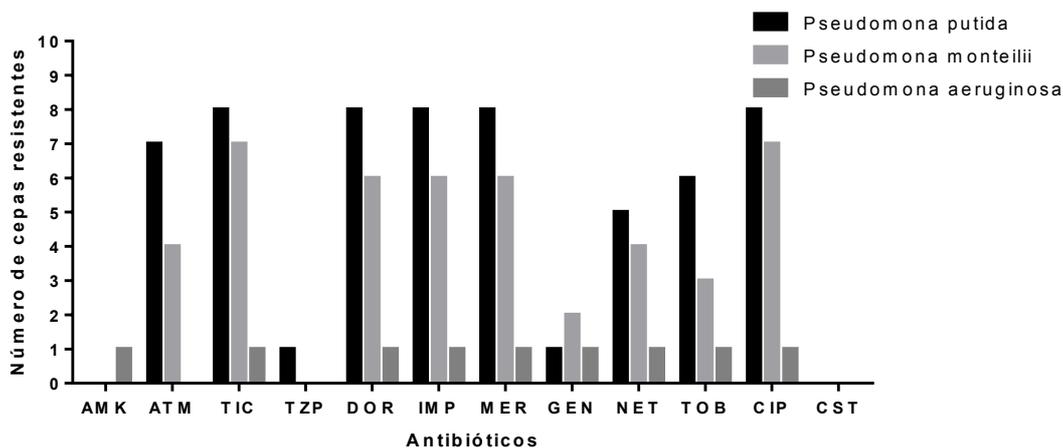


Figura 16 | Número de cepas resistentes a los distintos antibióticos antipseudomónicos testados en este estudio.

Las 8 cepas de *P. putida* presentaron un porcentaje de resistencia a los antibióticos testados de: ATM (87.5%), TIC (100%), TZP (12.5%), DOR (100%), IMP (100%), MER (100%), GEN (12.5%), NET (62.5%), TOB (75%), CIP (100%). En un estudio que se realizó entre 2010-2017 en China central sobre los perfiles de resistencia de la infección por *P. putida* se observó que los resultados concordaban con nuestro estudio con una resistencia de un 88.6% a ATM. Por otro lado, la resistencia a AMK fue mayor en este estudio con un 86.4% y mayor frente GEN con un 56.8%, si lo comparamos con nuestras cepas de *P. putida* que fueron sensibles a amikacina (66). Los porcentajes de resistencia detectados en *P. monteilii* fueron: ATM (52.1%), TIC (100%), DOR (85.7%), IMP (100%), MER (100%), GEN (28.6%), NET (57.1%), TOB (42.9%), CIP (100%). Y la cepa de *P. aeruginosa* presentó resistencia a los antibióticos AMK, TIC, DOR, IMP, MER, GEN, NET, TOB y CIP.

Por otra parte, es destacable que un 100% de las cepas de estudio presentaron MDR, debido a que fueron resistentes al menos a un agente en tres o más categorías de familias de antimicrobianos (67).

Como se observa en los resultados, estas especies presentan una importante resistencia intrínseca a varias familias de antibióticos, lo que confirma el aumento de cepas hospitalarias resistentes a antibióticos que hacen que sea más difícil su tratamiento.

Por otro lado, todas las cepas del estudio presentaron fenotipo MBL positivo (Anexo 2). Este fenotipo hace que sean resistentes a un gran número de antibióticos β -lactámicos, como se ha visto en la técnica de difusión en disco. Por otro lado, no se observó fenotipo ni AmpC inducible ni BLEE en ninguna de las cepas.

8.3 Caracterización genotípica de la resistencia a antibióticos

Mediante la PCR multiplex de MBL se confirmó la presencia del gen *bla_{VIM}* en todas las cepas estudiadas, que mediante secuenciación confirmó que se trataba de la variante *bla_{VIM-2}*.

La PCR multiplex de carbapenemasas de clase A fue negativa para todas las cepas estudiadas.

8.4 Detección y caracterización de integrones

En la Tabla 14 se muestran las estructuras de los integrones de las cepas de estudio. Todas las cepas estudiadas contenían integrón y la secuencia de la integrasa, *intI1*, reveló que todos los integrones eran de clase 1, además se detectó que un 28,7% de las cepas de *P. monteilii*, un 75 % de las cepas de *P. putida* además de la cepa de *P. aeruginosa* contenían el segmento conservado 3' (*qacE Δ 1-sul1*), mientras que el resto contenían el gen *tniC* de la región de transposición del Tn402, flanqueando la región variable 3' del integrón. Los experimentos de PCR con diferentes parejas de cebadores y la secuenciación Sanger expusieron una gran variedad de tamaños y genes dentro de la región variable de cada integrón. Tanto las cepas *P. putida* como las *P. monteilii*, mostraron dos tipos de estructuras en las regiones variables de sus integrones de clase 1. La estructura RV llamada A relacionada con la región Tn402 se encontró en el 71,4% de las cepas *P. monteilii* y en el 25% de *P. putida* y cuya región variable estaba compuesta por: el gen ***dfrB1b*** que codifica para la enzima dihidrofolato reductasa, relacionada con la resistencia trimetoprim, el gen ***aacA4*** que confiere resistencia a tobramicina, amikacina, netilmicina y kanamicina, el gen ***bla_{VIM-2}*** que codifica para una metalo- β -lactama. La estructura RV llamada B se detectó en el 28,6% de las cepas de *P. monteilii* y en el 62,5% de *P. putida*, esta estructura contiene el gen ***bla_{VIM-2}***, el gen ***aacA4*** y el gen ***bla_{BEL}*** que codifica para una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE). Por otro lado, *P. aeruginosa* contenía un integrón de clase 1 con los mismos casetes génicos que el integrón de la *P. monteilii*, sin embargo, cambiaba el orden de los genes *bla_{VIM-2}* y *aacA4* (estructura RV llamada C). Y, por último, únicamente una cepa de *P. putida* albergaba un integrón de clase 1 cuya región variable (RV D) contenía los genes *bla_{VIM-2}* y el gen *bla_{BEL}*.

Tabla 14 | Estructura de los integrones presentes en las cepas de estudio.

Cepa	Integrón	Estructura región variable
^b Ps1139, ^b Ps1177, ^b Ps979, ^b Ps1108, ^b Ps1115, ^a Ps1176, ^a Ps1109		A
^b Ps1169, ^b Ps1130, ^a Ps1163, ^a Ps1167, ^a Ps712, ^a Ps960, ^a Ps1105		B
^c Ps1149		C
^a Ps708		D

^a *Pseudomonas putida*, ^b *Pseudomonas monteilli* y ^c *Pseudomonas aeruginosa*.

8.5 Estudio de factores de virulencia

El estudio de virulencia de las 16 cepas de *Pseudomonas* se llevó a cabo por PCR para el análisis de la presencia/ausencia de 7 genes codificantes de factores de virulencia presentes en *Pseudomonas* relacionados con el sistema *Quorum Sensing* (*lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR*), el sistema T3SS (*exoU*, *exoS*) y la toxina formadora de poros (*exIA*). En la Tabla 15 se resumen los patrones de virulencia de las cepas de estudio:

Tabla 15 | Listado de virulotipos obtenidos de las cepas de *Pseudomonas* estudiadas.

Cepa	Genes de virulencia							Virulotipo
	<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>rhII</i>	<i>rhIR</i>	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>exIA</i>	
^a Ps1163, ^a Ps1167, ^a Ps1176, ^a Ps708, ^a Ps712, ^a Ps960, ^a Ps1105, ^a Ps1109, ^b Ps1139, ^b Ps1169, ^b Ps1177, ^b Ps979, ^b Ps1108, ^b Ps1115, ^b Ps1130	-	-	-	-	-	-	-	V1
^c Ps1149	-	+	-	-	+	+	-	V2

^a *Pseudomonas putida*, ^b *Pseudomonas monteilli* y ^c *Pseudomonas aeruginosa*.

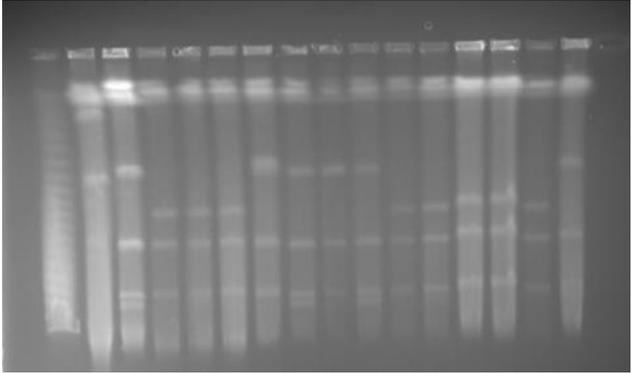
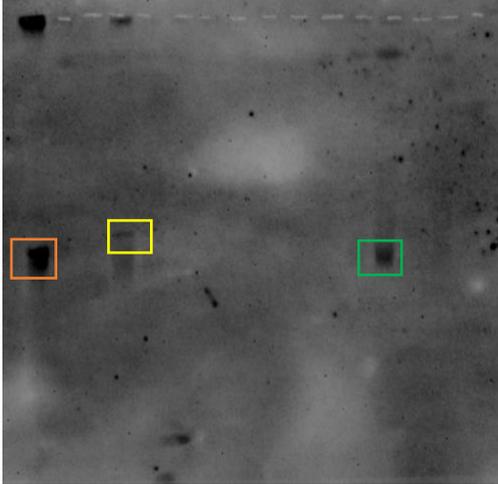
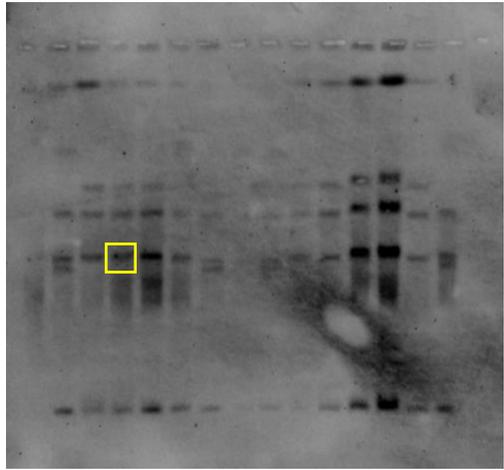
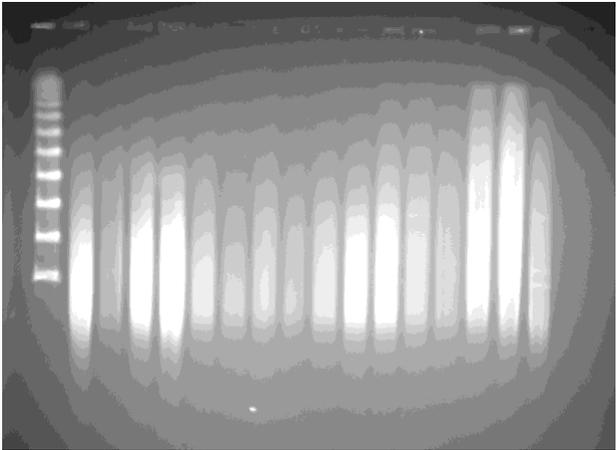
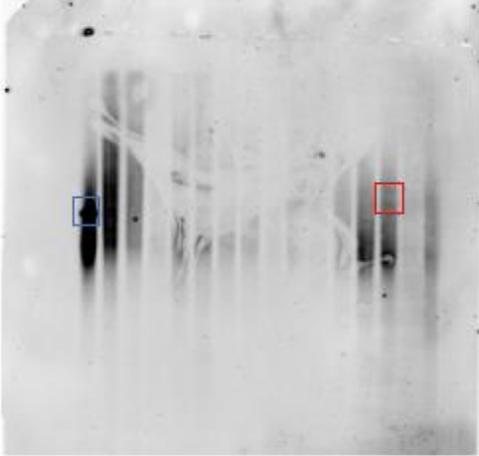
Como se observa en la Tabla 16 únicamente se detectaron dos virulotipos en las cepas estudiadas. Todas las *P. putidas* y *P. monteilii* pertenecieron al V1, debido a que no presentaron ningún gen de virulencia en su genoma. La cepa de *P. aeruginosa* perteneció al V2 debido a que presentó los genes de virulencia *exoS*, relacionado con el sistema T3SS y los genes *lasI* y *lasR* con el sistema *Quorum sensing*. Esto se debe a que estos genes pertenecen al grupo de factores de virulencia de *P. aeruginosa* y no de *P. putida* o de *P. monteilii*, aunque algunos de ellos, como el gen *exIA* si ha sido detectado en otras especies, entre ellas *P. putida* (68).

9.6. Localización cromosómica y/o plasmídica del gen *bla_{VIM-2}*

Todas las cepas de este estudio son portadoras del gen *bla_{VIM-2}*. Para determinar la localización del mismo cromosómica y/o plasmídica, se realizó un *Southern blotting* con las enzimas de restricción *S1* y *I-CeuI* y se hibridó con sondas específicas para los genes *bla_{VIM-2}* y *16SrARN* (marcador de localización cromosómica). En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos del Southern Blot

- La cepa Ps1149 (*P. aeruginosa*) presenta una banda en la membrana *I-CeuI* cuando se hibrida la sonda del gen *bla_{VIM-2}* (Tabla 16, recuadro naranja). Esta banda no aparece en la membrana al hibridar con la sonda del *16SrARN*, por lo que se deduce que no se encuentra localizado en el cromosoma. Por otro lado, en la membrana *S1*, cuando se hibrida la sonda del gen *bla_{VIM-2}*, aparece otra banda (Tabla 16, recuadro azul) que nos indica que la cepa contiene un plásmido que presenta en su interior el gen *bla_{VIM-2}*. Además, comparándolo con el marcador de peso molecular se deduce que tiene un tamaño entre 145 y 97Kb.
- La cepa Ps1167 (*P. putida*) muestra una banda en la membrana *I-CeuI*, cuando se hibrida la sonda del gen *bla_{VIM-2}* (Tabla 16, recuadro amarillo), que también está presente en la membrana *I-CeuI*, cuando se hibrida la sonda del gen *16SrARN*, indicando que el gen *bla_{VIM-2}* es de origen cromosómico. Esto concuerda con el hecho de que no se obtenga banda al hibridar la sonda del gen *bla_{VIM-2}* en la membrana obtenida al digerir con nucleasa *S1*.
- La cepa Ps708 (*P. putida*) presenta una banda en la membrana *I-CeuI*, cuando se hibrida la sonda del gen *bla_{VIM-2}* (Tabla 16, recuadro verde), la cual no aparece en la membrana *I-CeuI*, cuando se hibrida la sonda del gen *16SrARN*, indicando que no es cromosómica. Además, al hibridar la sonda del gen *bla_{VIM-2}* en la membrana *S1* aparece otra banda (Tabla 16, recuadro rojo) confirmando la presencia de un plásmido que contiene el gen *bla_{VIM-2}*. Además, comparándolo con el marcador de peso molecular se ve que presenta un tamaño entre 145 y 97Kb.

Tabla 16 | Geles y membranas del *Southern blotting*. Los geles se cargaron de izquierda a derecha siguiendo este orden: Ps1149, Ps1176, Ps1163, Ps1167, Ps1169, Ps979, Ps1109, Ps1108, Ps1115, Ps1130, Ps712, Ps960, Ps708, Ps1105, Ps1139.

Enzima	Gel	<i>bla</i> _{VIM-2}	16S
<i>I-CeuI</i>			
S1			-

9.4. Next generation sequencing (NGS)

La secuenciación del genoma bacteriano es fundamental para hacer una comparación con las pruebas que se han realizado en el laboratorio y poder verificar todo el estudio realizado. En nuestro caso se ha empleado para las siguientes tareas:

Se ha utilizado la secuenciación masiva para confirmar las especies de las cepas de estudio, a través de la Base de datos K-merFinder y se ha observado que todas ellas correspondían con la especie proporcionada desde un principio. Además, se realizó un árbol filogenético, donde también se ha comprobado este hecho. Como se muestra en la Figura 17 se generan dos ramas diferenciadas según la especie de las cepas, *P. putida* o de *P. monteilli*.

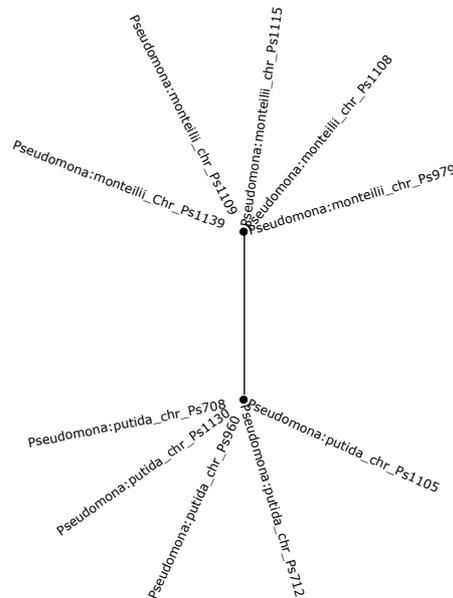


Figura 17 | Árbol filogenético de las cepas de estudio realizado con el programa *NDtree*.

Por otro lado, para obtener el MLST de cada una de las cepas se hizo uso de la web de MLST *Pseudomonas putida group*, donde se observó que todas las cepas de *P. putida* pertenecían a la misma secuencia tipo (ST139) que se adscribió como una nueva ST debido a que contenía una nueva variable del gen *recA* (*recA_106*) nunca antes designada en la web. Por otro lado, las cepas de *P. monteilli* pertenecieron a la ST114.

Asimismo, mediante el análisis bioinformático y a través de la Base de datos Resfinder se ha estudiado la presencia de genes de resistencia en el genoma bacteriano, tanto cromosómico como plasmídico, Los resultados obtenidos han sido:

- Ps708: todos los genes de resistencia se encontraban localizados en el plásmido y no en el cromosoma. En el plásmido estaba el integrón D por lo que poseía todos los genes de resistencia que este comprendía. Además, poseía tres genes que le confieren resistencia a los aminoglucósidos como son el gen *aac(6')-Ib3* que codifica para aminoglucósido acetiltransferasa y los genes *aph(6)-Id*, *aph(3')-Ia*, que codifican para dos aminoglucósidos-fosfotransferasas.
- Ps712, todos los genes de resistencia se encontraban localizados en el plásmido, el cual contenía el integrón B con sus genes de resistencia. Además, tenía los siguientes genes que le conferían resistencia a aminoglucósidos: *aph(6)-Id*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib* y *ant(2'')-Ia*, este último codifica para un aminoglycoside adenyltransferase.
- Ps960, Ps1105 y Ps1130 todos los genes de resistencia se encontraban localizados en el cromosoma. Dentro del cromosoma se encontraba el integrón B con sus genes de resistencia. También los genes de resistencia a aminoglucósidos: *aph(3')-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id*.
- Ps979 y Ps1108, no presentan plásmidos por lo que los genes de resistencia se encuentran todos localizados en el cromosoma, que además contiene el integrón A con sus genes de resistencia (*dfrB1*, *bla_{VIM-2}*). Igualmente, tenía los genes de resistencia a aminoglucósidos; *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, el gen *dfrA15* que codifica para una dihidrofolato reductasa que da resistencia al antibiótico trimetoprim, el gen *cmIA1* que codifica para la bomba de salida de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS) y confiere resistencia a cloranfenicol y el gen *qacE* que confiere resistencia a compuestos de amonio cuaternario (desinfectantes).
- Ps1109, Ps1115 y Ps1139, no presentan plásmidos por lo que los genes de resistencia se encuentran todos localizados en el cromosoma, donde se halla el integrón A, los genes de resistencia a aminoglucósidos *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id*, el gen *qnrVC6* que confiere resistencia a las quinolonas, el gen *tet(G)* que codifica para la bomba de salida de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS) que confiere resistencia a la tetraciclina, el gen *dfrA15* relacionado con la resistencia a trimetoprim, *cmIA1* relacionado con la resistencia a cloranfenicol que codifica para la bomba de salida de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS) y los genes *sul1* y *qacE*, que confieren resistencia a sulfonamidas y compuestos de amonio cuaternario, respectivamente.

Por último, se realizó un estudio de los elementos genéticos móviles que contenían las cepas tales como secuencias de inserción (IS), plásmidos y transposones (Tn). Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 17.

En la Tabla 17, se muestra un resumen de todos los datos obtenidos mediante NGS.

Tabla 17 | Tabla resumen de características genéticas obtenidas del estudio bioinformático de las cepas de estudio.

CEPAS	Indetificación sp (K-mer)	MLST	Resfinder	MGE (IS, Plásmidos,Tn)
chr_Ps708	<i>Pseudomonas putida</i>	ST139	-	-
chr_Ps712	<i>Pseudomonas putida</i>	ST139	-	-
chr_Ps960	<i>Pseudomonas putida</i>	ST139	<i>aph(3')-Ia, ant(2'')-Ia, aac(6)-Ib3,aph(3'')-Ib,aph(6)-Id, sul1, bla_{BEL-1}, bla_{VIM-2}, qacE</i>	ISKpn4 (ant(2'')-Ia)
chr_Ps979	<i>Pseudomonas monteilii strain</i>	ST114	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib,sul1 dfrA15,dfrB1, cmlA1, bla_{VIM-2}, qacE</i>	Tn5046, ISPst3, IS6100 (bla _{VIM-2}), ISUnCu4
chr_Ps1105	<i>Pseudomonas putida</i>	ST139	-	ISPst3
chr_Ps1108	<i>Pseudomonas monteilii strain</i>	ST114	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, sul1, dfrA15,dfrB1, cmlA1, bla_{VIM-2}, qacE</i>	Tn5046, ISPst3, ISUnCu4, IS6100 (bla _{VIM-2})
chr_Ps1109	<i>Pseudomonas monteilii strain</i>	ST114	<i>qnrVC6, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, tet(G), sul1, dfrB1, dfrA15, cmlA1, bla_{VIM-2}, qacE</i>	ISUnCu4, Tn5046, ISPst3, IS6100 (bla _{VIM-2})
chr_Ps1115	<i>Pseudomonas monteilii strain</i>	ST139	<i>qnrVC6,aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, tet(G), dfrB1, dfrA15, sul1, cmlA1, bla_{VIM-2}, qacE</i>	ISUnCu4, Tn6061, Tn5046, ISPst3, IS6100 (bla _{VIM-2})
chr_Ps1130	<i>Pseudomonas putida</i>	ST139	<i>aph(6)-Id,ant(2'')-Ia, aph(3'')-Ib, aac(6)-Ib3, aph(3')-Ia, sul1, bla_{VIM-2}, bla_{BEL-1}, qacE</i>	IS6100, ISKpn4 (ant(2'')-Ia), ISPst3, ISUnCu4
chr_Ps1139	<i>Pseudomonas monteilii strain</i>	ST114	<i>qnrVC6, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, tet(G), sul1, dfrB1, dfrA15, cmlA1, bla_{VIM-2}, qacE</i>	ISUnCu4, ISPst3, IS6100 (bla _{VIM-2}), Tn5046, Tn6061 (tet(G))
pPs708_1	<i>Pseudomonas putida</i>		<i>aac(6)-Ib3, aph(6)-Id, aph(3')-Ia, sul1, sul2, bla_{BEL-1}, bla_{VIM-2}, qacE</i>	ISPst3, ISUnCu4
pPs712_1	<i>Pseudomonas putida</i>		<i>ant(2'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(3')-Ia, aph(6)-Id, aac(6)-Ib3, sul1, bla_{VIM-2}, bla_{BEL-1}, qacE</i>	ISPst3, ISUnCu4, ISKpn4 (ant(2'')-Ia)
pPs960_1	<i>Pseudomonas putida</i>		-	ISPst3, Tn5046, ISUnCu4
pPs1105_1	<i>Pseudomonas putida</i>		<i>aph(3'')-Ib, aph(3')-Ia, ant(2'')-Ia, aph(6)-Id, aac(6)-Ib3, sul1, bla_{VIM-2}, bla_{BEL-1}, qacE</i>	ISUnCu4, ISKpn4 (ant(2'')-Ia), IS6100, Tn5046, ISPst3
pPs1130_1	<i>Pseudomonas putida</i>		-	-

9.5. Reconstrucción de plásmido

El plásmido p708 fue comparado con el plásmido pJ20133-VIM de la cepa de *P. monteilii* QJ20133 (GenBank: MN310371.1), debido a que en el blast presentaba el mayor porcentaje de similitud.

La comparación de ambos plásmidos se muestra en la Figura 18, donde se observa que se parecen principalmente en la región *backbone* y en el integrón, aunque el plásmido p708 presenta el gen *bla_{BEL1}*, mientras que el plásmido pJ20133-VIM no lo contiene.

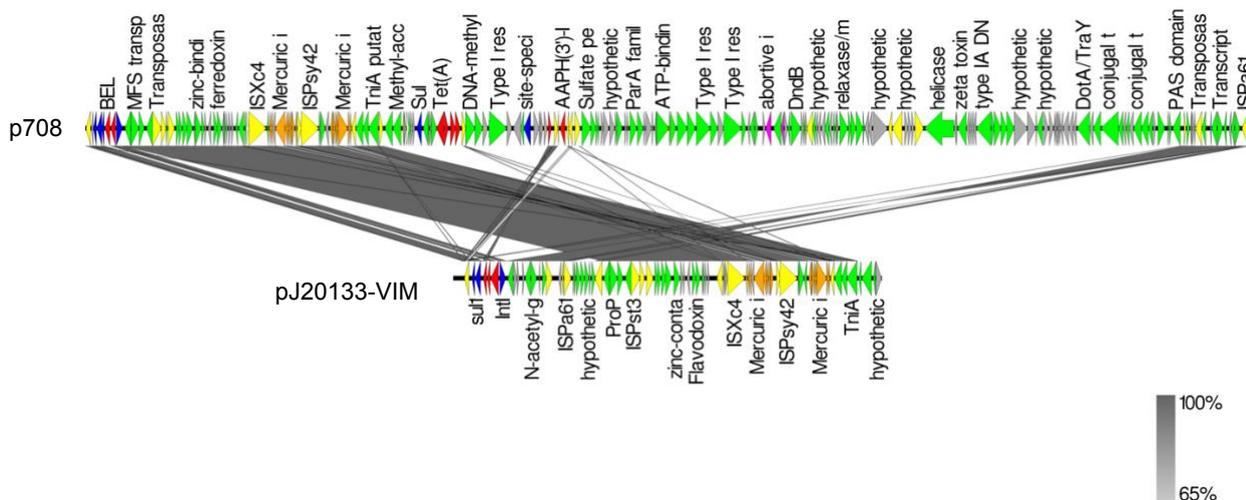


Figura 18 | Comparación del plásmido p708 y pJ20133-VIM. En rojo se indica los genes de resistencia, en azul los genes de la estructura del integrón (*IntI*, *QacE*, *Sul*), en gris las *hypothetical proteins*, en naranja el operón mercurio, en cian los genes relacionados con la movilidad y en verde los genes de la estructura del plásmido (secuencias anotadas con Artemis (64) y figura realizada con EasyFig(65)).

9. CONCLUSIONES

1. El análisis de PFGE refleja una alta diversidad clonal entre las cepas de *Pseudomonas putidas* y las cepas de *Pseudomonas monteilii*.
2. Todas las cepas de *Pseudomonas* % presentaron un fenotipo de multiresistencia.
3. La totalidad de las cepas *Pseudomonas* presentaron fenotipo y genotipo MBL conteniendo el gen *bla_{VIM-2}* en su genoma.
4. Únicamente la cepa de *P. aeruginosa* albergaba genes de virulencia (*lasI*, *lasR* y *exoS*).
5. Se han detectado cuatro estructuras de integrones de clase 1 en las cepas de *Pseudomonas* spp., todas ellas con el gen *bla_{VIM-2}* en su interior.
6. En las cepas de *Pseudomonas* se evidenció que las cepas Ps1149 (*P. aeruginosa*) y Ps708 (*P. putida*) contenían el gen *bla_{VIM-2}* en un plásmido y la cepa Ps1167 (*P. putida*) lo contenía en el cromosoma.

7. El análisis bioinformático confirmó las especies de las cepas de estudio, Todas las cepas de *P. putida* fueron adscritas al nuevo ST139.
8. Todas las cepas de *Pseudomonas* contenían entre 6 y 10 genes de resistencia diferentes, que conferían resistencia a diferentes familias de antibióticos y además presentaban un gran arsenal de elementos móviles (transposones, plásmidos y secuencias de inserción).

Analizando estos datos se deduce que la transferencia de genes horizontal mediante plásmidos u otros elementos móviles es un factor clave en la diseminación de resistencias y la aparición de bacterias multiresistentes. Por lo que, la caracterización de estos mecanismos es fundamental para un seguimiento epidemiológico preciso en los hospitales y para la búsqueda de alternativas terapéuticas para estas cepas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Taxonomy browser (*Pseudomonas*) [Internet]. [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=286>
- (2) Palleroni NJ. The pseudomonas story. *Environmental Microbiology*. 2010 Jun;12(6):1377–83.
- (3) Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018 Jan 1;57:106–16.
- (4) Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000 Jul;50(4):1563–89.
- (5) Acuña JMB, Timmis KN, Jahn M, Jahn D. Protein complex formation during denitrification by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Biotechnology*. 2017;10(6):1523.
- (6) *Pseudomonas* - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Aug 31]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68011549>
- (7) Matthijs S, Tehrani KA, Laus G, Jackson RW, Cooper RM, Cornelis P. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environmental Microbiology*. 2007 Feb;9(2):425–34.
- (8) Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*. 2004;10(12):599–606.
- (9) Edward R. B. Moore Brian J. Tindall Vitor A. P. Martins Dos Santos Dietmar H. Pieper Juan-Luis Ramos Norberto J. Palleroni. *The Prokaryotes*. 2006; 646–793.

- (10) Jun S-R, Wassenaar TM, Nookaew I, Hauser L, Wanchai V, Land M, et al. Diversity of *Pseudomonas* Genomes, Including *Populus*-Associated Isolates, as Revealed by Comparative Genome Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016; 82(1):375.
- (11) Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable . Vol. 35, *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford Academic. 2011; 652–680.
- (12) Paz-Zarza VM, Mangwani-Mordani S, Martínez-Maldonado A, Álvarez-Hernández D, Solano-Gálvez SG, Vázquez-López R, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*. 2019;36(2):180–9.
- (13) Khalifa ABH, Moissenet D, Thien HV, Khedher M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique*. 2001;69(4):393–403.
- (14) Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa* : new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease* . 2013;67(3):159–73.
- (15) Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(6):3128.
- (16) Volke DC, Calero P, Nikel PI. *Pseudomonas putida*. *Trends in Microbiology*. 2020 Jun;28(6):512–3.
- (17) Nikel PI, de Lorenzo V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic Engineering*. 2018 Nov 1;50:142–55.
- (18) Aikaterini Barka, Hilde Jansens, Elisabeth Elst, Marek Wojciechowski. A *Pseudomonas monteillii* unilateral inguino-femoral granulomatous lymphadenitis in a two-year-old girl. A case report - PubMed. *Acta Clin Belg*. 2020;1–3.
- (19) Penn R, Steehler MK, Sokohl A, Harley EH. Nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis-A review and proposed classification system. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2011 Dec;75(12):1599–603.
- (20) Resistencia a los antibióticos [Internet]. [cited 2021 Aug 31]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- (21) Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 2010;74(3):417.
- (22) Fernando Paredes, Juan José Roca. Acción de los antibióticos. *Perspectiva de la medicación antimicrobiana*. *Offarm*. 2004;23:116–24.

- (23) Jorge O. Errecalde. Uso De Antimicrobianos En Animales De Consumo. FAO Produccion y sanidad animal 2004; 162.
- (24) Antibióticos | Solomamitis [Internet]. [cited 2021 Aug 31]. Available from: <https://www.solomamitis.com/academia-solomamitis/contenido-acad%C3%A9mico/antibi%C3%B3ticos>
- (25) Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. The New England journal of medicine. 2010 May 13;362(19):1804.
- (26) Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology. 2017 Jul 1;33(3):300.
- (27) El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, ahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. European journal of medicinal chemistry. 2017;131:185–95.
- (28) Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative Review of the Carbapenems. Drugs. 2007;67(7):1027–52.
- (29) Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2009 Feb 1;27(2):116–29.
- (30) AJ B. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. Current opinion in infectious diseases. 2019;32(6).
- (31) Nicolau CJ, Oliver A. PUBLICACIÓN OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2010
- (32) Wagner A. Cooperation is Fleeting in the World of Transposable Elements. PLOS Computational Biology. 2006 Dec;2(12):e162.
- (33) Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa - Mechanisms, epidemiology and evolution. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2019 May 1;44.
- (34) Plasmids - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Aug 31]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010957>
- (35) Anthony JF Griffiths, Jeffrey H Miller, David T Suzuki, Richard C Lewontin, and William M Gelbart. Transposable Genetic Elements in Prokaryotes. New York. 2000.
- (36) Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. W. H. Freeman; 2000.
- (37) Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Molecular microbiology. 1995;15(4):593–600.

- (38) Jové T, Re S da, Denis F, Mazel D, Ploy M-C. Inverse Correlation between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons. *PLOS Genetics*. 2010 Jan;6(1):e1000793.
- (39) González R G, Mella M S, Zemelman Z R, Bello T H, Domínguez Y M. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista médica de Chile*. 2004 May;132(5):619–26.
- (40) Coque-González MT. Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005 May 1;23(5):251–3.
- (41) Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002 Jan 1;292(2):115–25.
- (42) Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009 Jul ;33(4):757–84.
- (43) Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, et al. The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology*. 2008 Jul ;190(14):5095.
- (44) Tenover FC, Arbeit RD, Goering R v, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(9):2233.
- (45) Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*. 2015 Aug 26 ;16(1).
- (46) José Perozo Mena, Maribel Josefina Castellano González, Tutaya Chávez Kathyuska, Eliana Ling Toledo, Naillet Arraiz. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasmera*. 2013; 41.
- (47) Alba Bellés. Epidemiología y caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenems en *Pseudomonas aeruginosa* de muestras clínicas y de portadores fecales. 2017.
- (48) Delfín Álvarez Almanza. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Habanera de Ciencias Médicas*. 2010;9.
- (49) Dianny Del Valle Martínez Rojas. Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. *Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2009;29.
- (50) Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internet]. [cited 2021 Aug 31]. Available from: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>

- (51) Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel *aad* Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(6):1568.
- (52) Y. Sáenz, L. Vinué, E. Ruiz, S. Somalo, S. Martínez, B. Rojo-Bezares, M. Zarazaga, C. Torres. Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Veterinary microbiology*. 2010 ;144(3–4):493–7.
- (53) David H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, T. J. White. Persing DH. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. 1993.
- (54) Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004 Oct ;48(10):3996.
- (55) Petit SM, Lavenir R, Colinon-Dupuich C, Boukerb AM, Cholley P, Bertrand X, Freney J, Doléans-Jordheim A, Nazaret S, Laurent F, Cournoyer B. Lagooning of wastewaters favors dissemination of clinically relevant *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in microbiology*. 2013 Oct;164(8):856–66.
- (56) Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Aug 1;41(8):3526–31.
- (57) Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology*. 2004 Sep;53(Pt 9):841–53.
- (58) Elsen S, Huber P, Bouillot S, Couté Y, Fournier P, Dubois Y, et al. A Type III Secretion Negative Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Employs a Two-Partner Secreted Exolysin to Induce Hemorrhagic Pneumonia. *Cell Host & Microbe*. 2014 Feb 12;15(2):164–76.
- (59) Mahony JB, Chernesky MA. Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Molecular Methods for Virus Detection*. 1995;219–36.
- (60) Matthew J Ellington, James Kistler, David M Livermore, Neil Woodford. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007 Feb;59(2):321–2.
- (61) Sang Sook Hong, Kyeongmi Kim, Ji Young Huh, Bochan Jung, Myung Seo Kang, Seong Geun Hong. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases - PubMed. *Ann Lab Med*. 2012;5:359–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22950072/>

- (62)** Experimentation kits, southern blot analysis | VWR [Internet]. [cited 2021 Aug 31]. Available from: <https://es.vwr.com/store/product/4525683/experimentation-kits-southern-blot-analysis>
- (63)** Aaron E Darling, Bob Mau, Nicole T Perna. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. PLoS One. 2010.
- (64)** Tim Carver, Simon R Harris, Matthew Berriman, Julian Parkhill, Jacqueline A McQuillan. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. Bioinformatics (Oxford, England). 2012 Feb;28(4):464–9.
- (65)** Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. Bioinformatics (Oxford, England). 2011 Apr;27(7):1009–10.
- (66)** Tan G, Xi Y, Yuan P, Sun Z, Yang D. Risk factors and antimicrobial resistance profiles of *Pseudomonas putida* infection in Central China, 2010–2017. Medicine. 2019 Nov 1;98(44):e17812.
- (67)** Zowalaty ME el, Thani AA al, Webster TJ, Zowalaty AE el, Schweizer HP, Nasrallah GK, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. 2015 Oct 6;10(10):1683–706.
- (68)** Reboud E, Basso P, Maillard AP, Huber P, Attrée I. Exolysin Shapes the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clonal Outliers. Toxins. 2017 Sep 11;9(11).

11. AUTOEVALUACIÓN

Estoy muy contenta de haber tenido la oportunidad de poder realizar estas prácticas debido a que me han permitido aumentar mi conocimiento como biotecnóloga. Lo primero me han servido para mejorar técnicas y conocimientos adquiridos durante mis estudios en la Universidad Rovira i Virgili como la PCR, electroforesis, extracción de DNA, antibiogramas, así como para conocer nuevas técnicas como el Southern blot o la PFGE. Aunque, de lo que más he aprendido ha sido de la parte de bioinformática donde la mayoría de los programas no los había utilizado nunca y creo que es una herramienta fundamental que se debe conocer en nuestra carrera.

Durante las prácticas he tenido en todo momento la ayuda de mis tutoras María y Beatriz, me he sentido muy a gusto trabajando con ellas y estoy realmente agradecida por todos los conocimientos que me ha inculcado. Siempre que tenía algún problema o duda estaban para ayudarme a buscar la solución o me animaban a resolver los problemas yo misma y así tener más iniciativa. Con todo esto he aprendido a trabajar en equipo y a relacionarme con el personal del laboratorio. Por otro lado, también he tenido la oportunidad de trabajar de forma autónoma en el laboratorio, donde me he visto bastante ágil tanto con las técnicas que ya conocía como con las nuevas. También he aprendido a ser organizada en el laboratorio, metódica y certera y he aprendido a optimizar el uso de los recursos materiales en el laboratorio y a aprovechar el tiempo.

Este trabajo me ha ayudado a conocer más sobre la caracterización de los mecanismos que utilizan determinados patógenos bacterianos para resistir la acción de los antibióticos que es un tema que me creaba mucho interés, además, de ser un tema de actualidad y que preocupa a la sociedad de hoy en día.

Por otro lado, estas prácticas me han enseñado una pequeña muestra de lo que podría encontrarme en mi futuro laboral y me ha abierto un nuevo camino al que poder dedicarme en un futuro que antes no me planteaba.

En resumen, durante las prácticas he realizado numerosas actividades que han servido para incrementar mis conocimientos en el campo de la investigación y adquirir habilidades profesionales que pueden serme útiles en el futuro, por lo que mi valoración final es muy buena.

12. ANEXOS

12.1 Esquema del proceso de experimentación

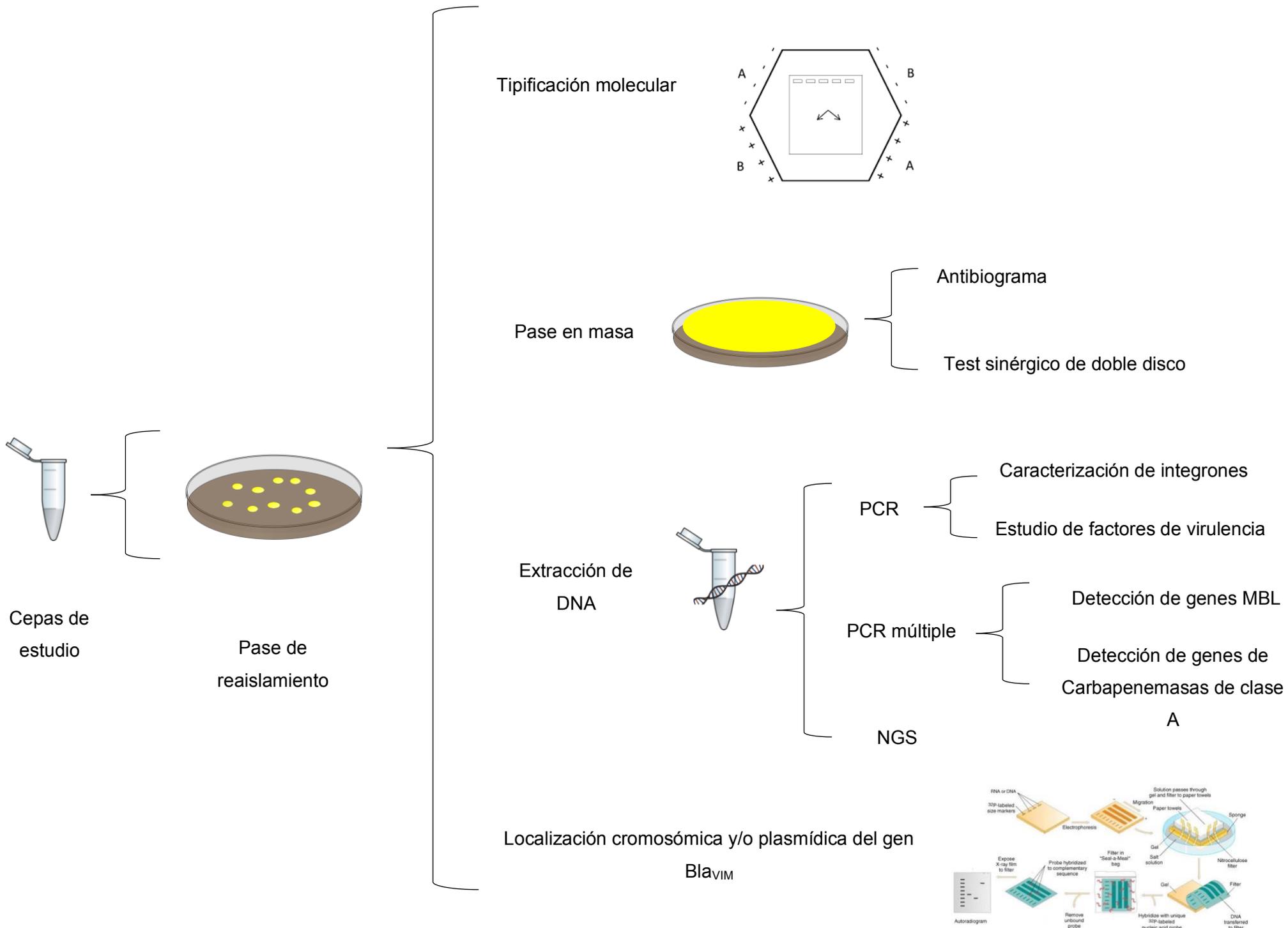


Figura 19 | Esquema del proceso de experimentación.

12.2 Fenotipo positivo en MBL

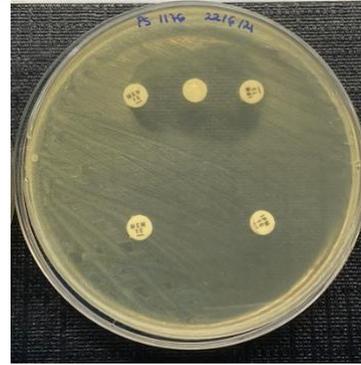
En las siguientes imágenes se muestran los fenotipos positivos de las cepas *P. putida* y *P. monteilii* de estudio.

Tabla 18 | Cepa, especie y foto del fenotipo positivo de MBL en los aislados estudiados.

Cepa	Especie	Foto positiva en MBL
Ps1139	<i>P. monteilii</i>	
Ps1163	<i>P. putida</i>	
Ps1167	<i>P. putida</i>	
Ps1169	<i>P. monteilii</i>	

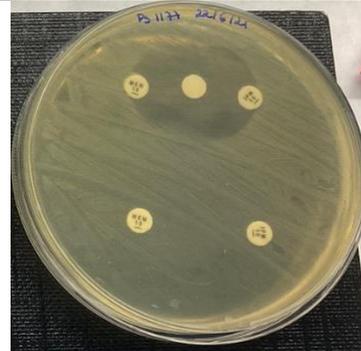
Ps1176

P. putida



Ps1177

P. monteilii



ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumna: LAURA GONZÁLEZ LÓPEZ

Nom i Cognoms del Tutor: ALBERT BORDONS

Dates de les entrevistes amb l'alumne: 1 juliol 2021 (Teams) i 20 juliol 2021 (e-correu)

Observacions i Recomanacions durant el seguiment:

Ha començat el TFG Biotec ara al juny perquè fa el Doble Grau BBM-BT i fins ara estava fent el TFG de BBM. És de la Rioja, està fent el TFG sobre resistència a antibiòtics al Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR), al grup de Microbiología Molecular, amb Yolanda Sáenz (<https://www.cibir.es/es/grupos-de-investigacion/resistencia-antibioticos/microbiologia-molecular>).

M'anirà passant el que vagi escrivint i anirem comentant el que va fent i resolent els possibles dubtes. Li recordo termini 1 setembre per a la memòria. Em pregunta si tanca la universitat durant l'estiu i li comento que la major part de dies estaré disponible.

Observacions Darrera revisió (20 juliol 2021)

Em comenta que a nivell experimental ho té força avançat. Ha detectat els fenotips de resistència dels bacteris als antibiòtics amb antibiogrames, i ha realitzat força PCRs per trobar els mecanismes implicats en la resistència. Per confirmar els resultats de les PCRs han enviat les soques a seqüenciar. També ha fet MALDI-TOF per conèixer les espècies de les soques de treball. A més, ha fet cromatografia de PFGE per veure la relació entre les diverses soques, obtenint un dendrograma de totes elles. Aquests dies està realitzant Southern blots amb sondes marcades per detectar els gens de resistència als bacteris, així com veure si presenten plasmidis.

A nivell de redacció de la memòria, l'està acabant i quedem que tot seguit me la passarà per tal de fer la darrera revisió.

Signatura del Tutor Albert Bordons



Signatura de l'Alumna Laura González



Tarragona, a 23 de juliol de 2021