



TESIS DOCTORAL

Pseudomonas aeruginosa: APORTACIÓN AL
CONOCIMIENTO DE SU ESTRUCTURA Y AL
DE LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A
SU RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

LÍDIA RUIZ MARTÍNEZ

Barcelona, Noviembre 2007



TESIS DOCTORAL

Pseudomonas aeruginosa: APORTACIÓN AL
CONOCIMIENTO DE SU ESTRUCTURA Y AL
DE LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A
SU RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Memoria presentada por Lúdia Ruiz Martínez
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona



Unidad de Microbiología
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Pseudomonas aeruginosa: APORTACIÓN AL
CONOCIMIENTO DE SU ESTRUCTURA Y AL
DE LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A
SU RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

MIQUEL VIÑAS CIORDIA, Catedrático de Microbiología del *Departament de Patologia i Terapèutica Experimental* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona y, TERESA VINUESA AUMEDES, Doctora en Medicina y cirugía por la Universidad de Barcelona y Profesora titular del *Departament de Patologia i Terapèutica Experimental* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICAN,

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. LÍDIA Mª RUIZ MARTINEZ y titulada **“*Pseudomonas aeruginosa*: APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE SU ESTRUCTURA Y AL DE LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A SU RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS”** ha sido realizada bajo nuestra dirección en la Unidad de Microbiología de este departamento.

Que la mencionada Tesis Doctoral cumple, según nuestro criterio, todas las condiciones formales y conceptuales para que pueda ser defendida delante del tribunal correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente en L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, el día veinticinco de Septiembre de 2007.

Firmado Prof. Dr. Miquel Viñas Ciordia

Dra. Teresa Vinuesa Aumedes

*In schweren Zeiten
ist die Vorstellungskraft
wichtiger als das Wissen*

Albert Einstein

*No se lo que pareceré a los ojos del mundo, pero a los míos es como si hubiese
sido un muchacho que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto
encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa, mientras el
inmenso océano de la verdad se extendía, inexplorado frente a mí...*

Isaac Newton

A mi familia

A Javi

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizada esta etapa de mi vida, me gustaría dar las gracias a todas las personas que lo han hecho posible, aunque hacerlo con palabras deja atrás muchos sentimientos que no pueden expresarse...

En primer lugar, y no porque sea lo correcto, agradecer al Prof. Miquel Viñas, director de esta Tesis, primero, la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación, y después toda la confianza que ha depositado en mi durante todos estos años, y toda la ayuda que me ha ofrecido (que siempre ha sido toda de la que disponía, de eso estoy segura), no sólo en la elaboración de la Tesis, sino en hacer posible mi permanencia en su grupo. También quisiera agradecer a la Dra. Vinuesa, no sólo la ayuda que me ha brindado como co-directora de la Tesis, sino el apoyo moral que siempre me ha ofrecido y por contagiarme sus ganas de hacer cosas, gracias por ser también mi amiga.

Al Prof. Carles Solsona, Jefe del Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, por facilitar mi trabajo poniendo a mi disposición todos los recursos posibles.

A todos aquellos que dejando en un segundo plano lo profesional, habéis contribuido a hacer mi día a día más agradable dentro de la *Universitat* desde la administración del Campus Rosaura, Isabel Gil y Mariví, gracias por hacerme ver que a la vida hay que plantarle cara y mirar siempre hacia delante, gracias por contagiarme vuestro coraje y fortaleza.

A todos mis compañeros del laboratorio, porque ellos entienden toda la emoción que esto comporta. Blanca, en la primera etapa, quien me enseñó a tener un poco más de confianza en mi misma (y a realizar algunos cálculos, ¡para qué nos vamos a engañar!). César, compañero inseparable, desde el primer día, gracias por escucharme cuando lo necesitaba, aunque a veces fuese difícil hacerlo y por salvarme de tantos problemas, no sabes como te echo de menos!! En la segunda etapa, también todos habéis colaborado de una forma u otra para hacer realidad esto que esta ahora en vuestras manos, lo sabéis: gracias Ester, Lupe y Jana, pero sobretodo a ti Lidia, mi segunda cabeza y mi segundo par de manos, *sense tú, això si que no hagués estat possible, milions de gràcies per totes les hores que has compartit amb mi quan ja no hi quedava ningú més, per totes les converses intentant buscar explicacions de coses que ni tan sols entenem, i sobretot per confiar en mi, gràcies petita!*

Außerdem, möchte ich mich bei Professor Roland Benz für die Einladung im Biozentrum der Universität Würzburg, Deutschland, bedanken; gilt auch meinen Dank für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten. Ich möchte ich mich auch bei Elke für ihre Geduld und für die Hilfe bei der Planar Lipid Bilayer bedanken. Und wie kann ich all die Leute in Würzburg vergessen?! Die Ange, den Christian, Iván, Iván, Marta, die Marie (meine "andere" Erasmus), den Matias, die Kaitly, die Moni, den Andy und die Elisabeth Knaf: vielen Dank für diese wunderbare Erfahrung und noch einmal danke, weil ohne euch hätte ich nicht die Einsamkeit überleben können. Besonders Tobi, zuerst "mein" Erasmus in Barcelona, danach einer meiner besten Freunde, danke dafür, dass ihr mich nie allein gelassen habt... Meine lieben Deutschen...

Gracias a todos mis amigos por acompañarme en la vida. Laura González, gracias por compartir mis penas y alegrías, y estar "ahí" siempre que lo necesito y, Laura Molina, por esas noches de luna en nuestros queridos y mágicos Montes gallegos...

Y sin duda el agradecimiento mayor debe ir a mi familia: mi abuela, porque contigo empezó todo; y mis padres porque siempre me habéis apoyado en todas mis decisiones sin hacer preguntas, porque siempre habéis confiado en mi, aunque yo no lo hiciera y porque siempre habéis estado dispuestos a dejarlo todo para escucharme y ayudarme. Gracias a los tres por haber sacrificado tantas cosas para hacer posible que yo siguiera el camino que en su día elegí. A mi hermano Jonathan, te quiero aunque a veces no esté para decírtelo. A Javi, ¿qué puedo decirte que no sepas ya? Gracias por estar ahí en los buenos y malos momentos, por compartir tantos años de mi vida (y los que nos quedan, ¿verdad?), por ser el pilar que me sostiene, por tu alegría inagotable...

I would like to thank FEMS and SEM, for giving me the opportunity to go to Würzburg through the FEMS Research Fellowship 2007.

Debo agradecer, también, al IDIBELL la concesión de una beca pre-doctoral, que me permitió realizar los primeros años de Tesis, y a la Fundación Josep Finestres que me ha permitido terminarla. Los aspectos experimentales han sido financiados por los proyectos SAF2002-00698 y BFU 2006-12268/BFI, cuyo investigador principal es el Dr. Miquel Viñas. También agradecer al Hospital de Bellvitge la cesión de las cepas de *P. aeruginosa*.

ÍNDICE	I
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	IV
PRESENTACIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 El género <i>Pseudomonas</i>	3
1.1.1 Descripción general	3
1.1.2 Características.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1.3 Hábitat.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.1.5 Importancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.2 Fundamentos de la genética de poblaciones bacterianas.....	13
1.2.1 La recombinación en poblaciones bacterianas	14
1.2.2 Análisis de la variabilidad.....	17
1.2.3 Las poblaciones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
1.3 La membrana externa de las bacterias gram negativas	20
1.3.1 Estructura de la membrana externa	20
1.3.2 La membrana externa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.4 Las porinas.....	23
1.4.1 Estructura de las porinas	25
1.4.2 Las porinas de <i>p. Aeruginosa</i>	27
1.4.3 La proteína OprD y su relación con la resistencia a los antibióticos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.5 Los integrones.....	37
1.5.1 Estructura	38
1.5.2 <i>Cassettes</i> génicos: estructura y función.....	39
1.5.3 Implicaciones.....	¡Error! Marcador no definido.
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1 Medios de cultivo.....	45
3.1.1. Caldo de triptona y soja (TSB).....	45
3.1.2 Luria Broth (LB)	45
3.1.3 Agar <i>Pseudomonas</i> de glutamato y almidón (GSP).....	46

3.1.4	Agar de Mueller-Hinton (MHA)	46
3.1.5	BHI (<i>Brain Heart Infusion Broth</i>) con glicerol al 10%	47
3.1.6	Medio de conservación.....	47
3.2	Cepas bacterianas	48
3.2.1	Descripción de las cepas utilizadas en el estudio de poblaciones.....	48
3.2.2	Aislamiento e identificación de cepas ambientales de <i>P. aeruginosa</i>	49
3.2.3	Descripción de las cepas utilizadas en el estudio de integrones	49
3.2.4	Descripción de las cepas utilizadas en el estudio de la porina OprD	50
3.3	Determinación de la susceptibilidad microbiana a los antibióticos	51
3.3.1	Antibiograma.....	51
3.4	Análisis de proteínas de la membrana externa.....	52
3.4.1	Aislamiento de membrana externa.....	52
3.4.2	Visualización de OMP por electroforesis en geles de poliacrilamida	53
3.4.3	Interpretación de los resultados	55
3.5	Análisis de proteínas totales	55
3.5.1.	Aislamiento de proteínas totales.....	55
3.5.2	Visualización de las muestras	55
3.6	Análisis del DNA mediante <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	56
3.6.1	Fundamento de la técnica.....	56
3.6.2	Extracción del DNA	56
3.6.3	Digestión del DNA con enzimas de restricción	58
3.6.4	Electroforesis en campo pulsante	58
3.6.5	Tinción del gel.....	59
3.6.6	Lectura e interpretación de los resultados.....	59
3.7	Análisis del DNA mediante <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD)	59
3.7.1	Fundamento de la técnica.....	59
3.7.2	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	60
3.7.3	Visualización de los resultados en geles de agarosa.....	62
3.7.4	Tinción de los geles.	62
3.7.5	Lectura e interpretación de los resultados.....	63
3.8	Análisis de la presencia/ausencia de integrones	63
3.8.1	Extracción de DNA	63
3.8.2	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	64
3.8.3	Visualización de los resultados en geles de agarosa.....	66
3.8.4	Tinción de los geles.	66
3.8.5	Lectura e interpretación de los resultados.....	66

3.9 Técnicas de extracción de DNA plasmídico.....	66
3.9.1 Extracción de DNA plasmídico (técnica convencional).....	66
3.9.2 Extracción de DNA plasmídico mediante S1-PFGE	68
3.10 Análisis del gen de la OprD	69
3.10.1 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	69
3.10.2 Visualización de los resultados en geles de agarosa.....	71
3.10.3 Tinción de los geles.	71
3.11 Técnicas de obtención, cuantificación, manipulación y visualización del DNA	71
3.11.1 Extracción de DNA	71
3.11.2 Cuantificación de DNA.....	72
3.11.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	72
3.11.4 Tinción de los geles de agarosa.....	74
3.11.5 Marcadores de peso molecular	74
3.11.6 Purificación de productos obtenidos mediante PCR.....	75
3.11.7 Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	76
3.12 Determinación de secuencias de genes.....	76
3.12.1 Obtención de las secuencias.....	76
3.12.2 Análisis de secuencias	78
3.12.3 Construcción de un modelo estructural de la OprD.....	79
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
4.1 Susceptibilidad antimicrobiana	80
4.2 Análisis de proteínas totales y OMPs	85
4.3 Análisis del dna mediante PFGE (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>).....	89
4.4 Análisis del DNA mediante RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	91
4.5 Discusión final sobre las poblaciones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estudiadas	99
4.6 Análisis de la presencia/ausencia de integrones.....	101
4.7 Estudio de las mutaciones de la porina OprD.	119
4.8 Construcción de un modelo estructural de la porina OprD	142
5. CONCLUSIONES	145
6. BIBLIOGRAFÍA	146

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
3'	Extremo 3' del DNA
5'	Extremo 5' del DNA
5x	Cinco veces concentrado
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
bp	Pares de bases del DNA
c.s.p.	Cantidad suficiente para
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i>Deoxiribonucleic Acid</i>)
dNTP	Dideoxinucleótido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
<i>et al.</i>	y colaboradores
H ⁺	Protón
HCl	Ácido clorhídrico
Kb	Kilobases (1Kb = 1000pb)
KDa	KiloDaltons (1kDa = 1000Daltons)
M	Concentración molar (mol soluto/litro solución)
mA	Miliamperios
Mgcl ₂	Cloruro de magnesio
MIC	Concentración mínima inhibitoria (<i>Minimal Inbibitory concentration</i>)
min.	Minutos
mM	Concentración milimolar (M/1000)
ml	Militros
ng	Nanogramos (10 ⁻⁹ gramos)
nm	Nanómetros (10 ⁻⁹ metros)
nt	Nucleótido
OMP	Proteínas de membrana externa (<i>Outer membrane proteins</i>)
o/n	Toda la noche (<i>overnight</i>); equivale a 10-15 h aproximadamente
ORF	Pauta de lectura abierta (<i>open reading frame</i>)

pb	Pares de bases del DNA
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electroforesis en campo pulsante (<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>)
pH	$\log 1/(H^+) = -\log [H^+]$
pmols	Picomoles (10^{-12} moles)
Psi	Presión medida en libras por pulgada cuadrada (<i>pounds per square inch</i>)
RAPD	Amplificación del DNA con <i>primers</i> aleatorios (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
s.	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante mediante gel de poliacrilamida
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	DNA polimerasa I termoresistente de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamina
Tris	Trihidroximetilaminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transporte
U	Unidad de actividad enzimática
V	Voltios
V/cm	Voltios por centímetro
v/v	Volumen por volumen
w/v	Peso por volumen
µg	Microgramo (10^{-6} gramos)
µl	Microlitro (10^{-6} litros)
µm	Concentración micromolar (10^{-6} moles)

PRESENTACIÓN

En los últimos años ha habido un incremento en la aparición de nuevas enfermedades infecciosas y en la reemergencia de otras que se consideraban ya controladas. La situación actual es preocupante porque muchos de estos nuevos agentes patógenos causan enfermedades graves. En muchas de estas infecciones, la resistencia a los fármacos se está convirtiendo en uno de los obstáculos principales para su control, con la aparición de cepas multiresistentes a los antibióticos normalmente utilizados. ¿Cuales son las claves para el éxito de estas bacterias patógenas? Para responder esta pregunta, se realizan estudios sobre los mecanismos por los cuales los microorganismos causan la enfermedad, es decir, la patogénesis. Pero también existen cuestiones importantes sobre la evolución de la patogénesis de estos microorganismos que continúan siendo una incógnita: ¿cuales son los factores que determinan la emergencia de un nuevo patógeno?, ¿cuando se desarrollan determinados clones patógenos?, ¿porqué cepas no patógenas presentan genes asociados a la virulencia?

Los estudios de genética de poblaciones contribuyen a este conocimiento, proporcionando información sobre la estructura poblacional y la naturaleza de la variación genética que existe en las poblaciones naturales ya que la cantidad de variación genética de una población es un parámetro fundamental, debido a que determina el potencial evolutivo de ésta. Los cortos períodos de generación de la mayoría de las bacterias y el enorme tamaño de sus poblaciones, hace que los cambios evolutivos sean muy rápidos. La dinámica de aparición y selección de mutantes o la importancia relativa de la mutación y de la recombinación en estas poblaciones, son efectos esenciales para comprender los cambios epidemiológicos que se producen en ellas.

Estudiar las poblaciones bacterianas también nos permite caracterizar las cepas de las especies patógenas; pero también es importante comprender las relaciones genéticas existentes entre cepas patógenas, causantes de la enfermedad, y cepas no patógenas de una misma especie bacteriana. La comparación entre ambas poblaciones puede ayudarnos a explicar los orígenes de las cepas patógenas e identificar las diferencias genéticas entre las dos. Se ha observado que, generalmente, se da una asociación aparente entre determinados clones de la bacteria, que se encuentran en pequeña proporción, y el desarrollo de una enfermedad; por tanto, esto sugiere que hay una menor diversidad en las cepas patógenas que en las de vida “libre”. Estas observaciones han sugerido que la mayoría de las bacterias presentan una estructura poblacional clonal.

Más recientemente, el aumento del número de bacterias estudiadas y la aplicación de técnicas moleculares, han dado lugar a la observación de que la estructura clonal de las poblaciones se puede “romper” por acción de la recombinación genética, aunque su papel no es igual en todas las especies bacterianas.

La transferencia horizontal de genes tiene una gran relevancia en la epidemiología de las enfermedades causadas por bacterias patógenas. Se ha observado una marcada diferencia en el grado de recombinación entre cepas patógenas y cepas no patógenas, aunque no se conocen las causas. La adquisición de material extracromosómico tiene consecuencias importantes en la evolución de las bacterias, tanto a corto plazo, por la distribución horizontal de genes de resistencia, como a largo plazo, por la adquisición de nuevos determinantes de virulencia o propiedades metabólicas que puedan producir un cambio significativo en la patogenicidad o que afecten al hábitat ecológico donde residen. Por tanto, la variación genotípica en las poblaciones de los microorganismos patógenos, plantea importantes dificultades en el control de las enfermedades infecciosas (emergencia de nuevas cepas patógenas, aparición de poblaciones de bacterias resistentes a los antibióticos, dificultades asociadas a la obtención de vacunas contra microorganismos antigénicamente diversos o variantes).

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa y cosmopolita, y es una de las principales causas de infecciones en cáncer, trasplantes, quemados y en pacientes con fibrosis quística. Estas infecciones son muy difíciles de erradicar ya que este microorganismo presenta una elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, lo que lo hace responsable de infecciones nosocomiales de difícil tratamiento y de elevada morbi-mortalidad. En los últimos años se ha observado un incremento progresivo en la incidencia de cepas resistentes a diversos antibióticos de última generación como por ejemplo el imipenem y de cepas que presentan una sensibilidad disminuida simultáneamente a diversos grupos de antibióticos como penicilinas, cefalosporinas con actividad anti-pseudomónica, quinolonas y aminoglicósidos, situación que ha agravado notablemente la dificultad terapéutica que habitualmente comportan las infecciones causadas por este patógeno.

¿Tienen las cepas patógenas que viven en el interior de los hospitales alguna relación genética con las cepas que viven libremente en el entorno de éstos? ¿Qué mecanismos de resistencia han utilizado estas cepas patógenas para “evadir” la acción de los antimicrobianos utilizados contra ellas? En este trabajo hemos tratado de hacer una aproximación a la respuesta de estas preguntas, centrándonos en las poblaciones de *Pseudomonas aeruginosa* del hospital de Bellvitge y su entorno.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL GÉNERO *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales*, que además comprende la familia *Moraxellaceae*.

La familia *Pseudomonadaceae* incluye el género *Xanthomonas*, que junto con *Pseudomonas*, forman el grupo conocido como pseudomonadales; este grupo es, tradicionalmente, conocido por los microbiólogos como un grupo patógeno de plantas, más que de animales.

Se cree que el género fue presentado por primera vez en 1895 por Walter Migula en el *Bacteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe* en una publicación que llevaba por título “*Ueber ein neues System der Bakterien*” [1], donde describía y comparaba todas las bacterias conocidas hasta el momento. La descripción inicial de *Pseudomonas* por Migula estaba basada únicamente en características morfológicas.

Dentro del género *Pseudomonas*, de todas las especies que existen, la más importante, clínicamente es *P. aeruginosa*, ya que esta especie tiene la capacidad de producir infecciones en humanos.

1.1.1 Descripción general

Pseudomonas es un género de especies capaces de utilizar un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, y capaces de vivir bajo muy diversas condiciones ambientales. Debido a esta característica, estos microorganismos son muy ubicuos, y podemos encontrarlos tanto en los ecosistemas terrestres como acuáticos y, son importantes como patógenos de plantas, animales y humanos [2,3].

El género *Pseudomonas* es bien conocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Las especies de *Pseudomonas*, en general, crecen rápidamente y presentan gran habilidad para metabolizar una amplia variedad de substratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Las cepas de las especies de *Pseudomonas* son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados, y solventes orgánicos.

Pseudomonas fue reconocida como una compleja colección de un gran número de especies descritas. Muchas de las especies que previamente fueron descritas como *Pseudomonas* han sido reclasificadas en nuevos géneros y, a pesar del reconocimiento de la heterogeneidad filogenética en las bacterias clasificadas como *Pseudomonas*, se ha iniciado una reevaluación de las características fenotípicas, las actividades metabólicas, su genética, ecología y otras características, con el fin de aportar un poco de luz a las complejas relaciones filogenéticas intragénicas.

La habilidad de diferenciar *Pseudomonas* en el sentido estricto, de las bacterias fenotípicamente similares se debe, principalmente, al desarrollo y aplicación de métodos de análisis de los microorganismos a nivel molecular. Por ejemplo se han utilizado métodos de comparación de secuencias del 16S rRNA o hibridación rRNA-DNA. De Vos *et al.* [4] propuso, y es actual y generalmente aceptado, que el género *Pseudomonas* se limite a las especies relacionadas con *P. aeruginosa* en el grupo I de homología DNA-rRNA [5] dentro de la subclase γ de las Proteobacterias [6], actualmente reorganizado como la clase de las “Gammaproteobacterias” [7].

A las especies que comprenden este grupo se las conoce como las “verdaderas *Pseudomonas*” o las “pseudomonadales fluorescentes” debido a los pigmentos fluorescentes producidos por *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y otras especies del género. Sin embargo, para añadir un poco de confusión a la complejidad de las *Pseudomonas*, no todas las especies del llamado grupo de “pseudomonadales fluorescentes” producen realmente pigmentos fluorescentes, como por ejemplo *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, o *P. stutzeri*.

1.1.2 Características

Pseudomonas spp. es un bacilo Gram negativo aerobio, no formador de esporas. Puede presentar de 1.5 a 5 μm de largo y, un diámetro de 0.5 a 1.0 μm . Las especies de este género son móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares (figura 1.1). La mayoría de células de *P. aeruginosa* presentan un único flagelo polar, aunque en algunas ocasiones se han observado algunos aislados con dos o tres flagelos. La movilidad les permite responder a estímulos químicos (quimiotaxis), así como localizar substratos en bajas concentraciones.

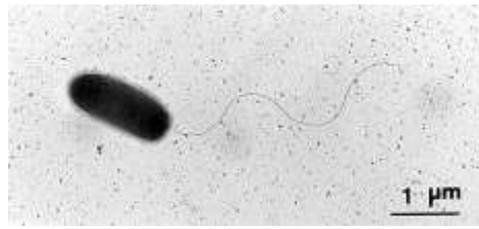


Figura 1.1 Electromicrografía que muestra la flagelación polar que presenta *P. aeruginosa*.

Es oxidasa y catalasa positiva. La mayoría de especies del género, no crecen bajo condiciones ácidas (pH 4.5 o menor). Crecen en agar MacConkey, como no fermentadores de lactosa. Poseen un metabolismo aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando el nitrato (NO_3) o la arginina como aceptores finales de electrones. Cuando crecen en medio líquido se puede observar la formación de una película superficial, que refleja la preferencia de este microorganismo por las condiciones aeróbicas. Puede degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno gas. El género *Pseudomonas* es muy versátil nutritivamente, y algunas especies pueden utilizar carbohidratos, alcoholes y aminoácidos como fuente de carbón [8].

La mayoría de especies tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos con elevado contenido de sales, y en un rango de temperaturas comprendido entre 20-42°C.

Tienen la capacidad de producir morfologías coloniales distintivas y pigmentadas. Algunas cepas forman una cápsula polisacáridica que hace que las colonias sean mucosas (típico, por ejemplo, de aislados procedentes de enfermos de fibrosis cística). El crecimiento confluyente, a menudo, presenta un brillo metálico y olor a fruta. Una característica común de las “pseudomonadales fluorescentes” es la producción de pigmentos fluorescentes bajo la luz ultravioleta de longitud de onda baja (254 nm), sobretodo cuando crecen en un medio con limitación de hierro (figura 1.2 a). La pioverdina, un pigmento fluorescente de color amarillo-verdoso, está considerado el principal tipo de sideróforo de las especies de *Pseudomonas*.

Otros pigmentos producidos por otras especies del género son la piocianina (pigmento no fluorescente de color azul-verdoso producido por la mayoría de cepas de *P. aeruginosa*), piorubina (*P. aeruginosa*, color rojo similar al óxido), oxiclolorafina (*P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, color naranja), y la clororafina (*P. chlororaphis*, color verde), entre otros. Muchos de estos pigmentos actúan como sideróforos en los sistemas bacterianos de captación de hierro [9]. La producción de pigmentos puede demostrarse cultivando estos microorganismos en medios como el medio de King B, que no contiene hierro. Este medio está también recomendado para demostrar la producción de piocianina. Las cepas no pigmentadas presentan un color gris pálido. Cuando crecen en agar sangre, normalmente presentan hemólisis (figura 1.2 b).

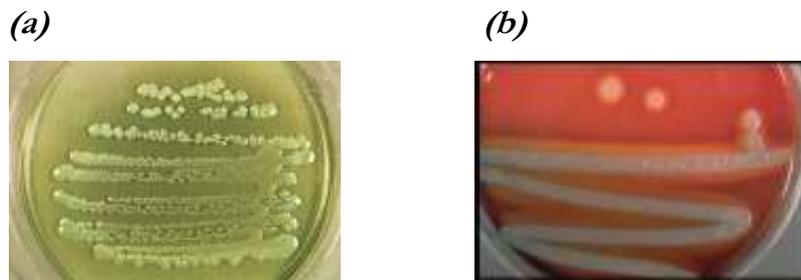


Figura 1.2 Colonias de *P. aeruginosa* crecidas en TSA (a) y en agar sangre (b).

1.1.3 Hábitat

Pseudomonas es un género verdaderamente ubicuo, lo cual parece ser consecuencia de los simples requerimientos nutritivos que posee, del rango de compuestos de carbón que utiliza, y de su gran adaptabilidad genética y metabólica.

Las especies de *Pseudomonas* pueden vivir en numerosos habitats, que van desde diversos tipos de ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos diversos de animales y plantas, incluyendo frutas y verduras; por lo tanto el hábitat primario es ambiental. Esencialmente, cualquier hábitat con un rango de temperatura de 4–42°C, un pH comprendido entre 4 y 8 y que contenga compuestos orgánicos simples o complejos, es un hábitat potencial para *Pseudomonas*, así pues, las especies de *Pseudomonas* se encuentran en suelos y aguas que presentan unas condiciones aeróbicas, mesofílicas y pH neutro.

Debido a que la mayoría de las especies de este género son aeróbicas estrictas, el oxígeno es aparentemente casi el único requerimiento obligado para la colonización de un ambiente por *Pseudomonas*.

1.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa fue aislada por primera vez de muestras ambientales por Schroeter en 1872 [10]. Debido a que las colonias de *P. aeruginosa* son pigmentadas, la denominación de la especie deriva de la palabra aeruginoso (*aeruginous*) que significa “el color del cobre oxidado”, reflejando el característico color azul-verdoso que presentan las colonias debido a la producción de pigmentos.

Como todos los miembros de esta familia es un bacilo Gram negativo aerobio, muy versátil metabólicamente, pudiendo utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Es oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42°C. Aunque se clasifica como aerobio estricto, algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente mediante desnitrificación o mediante la fermentación de compuestos como la arginina o el piruvato.

Debido a su habilidad para sobrevivir en ambientes acuosos con nutrientes mínimos, y como consecuencia de su gran versatilidad metabólica, estos organismos, han llegado a ser problemáticos en los ambientes hospitalarios, donde esta especie ha sido aislada de una elevada variedad de soluciones acuosas, incluyendo desinfectantes, jabones, fluidos de irrigación y de diálisis y, sus equipamientos [11]. Actualmente, el aislamiento de otras especies como *P. mendocina* o *P. stutzeri* esta siendo cada vez más frecuente en muestras clínicas. A parte de esta procedencia nosocomial, también podemos encontrarla en piscinas, tubos de agua caliente, soluciones de lentes de contacto, cosméticos, uñas artificiales, suelas interiores de zapatillas de deporte e, incluso, en drogas inyectables [12,13,14].

No es frecuente encontrar este microorganismo como parte de la flora bacteriana de individuos sanos, pero en caso que se encuentre, el tracto gastrointestinal es el lugar más frecuente de colonización.

Otros lugares húmedos del cuerpo también pueden ser colonizados, incluyendo la faringe, la mucosa nasal y zonas como las axilas o el perineo, de donde ha sido aislada en un 2-10% de individuos sanos. Las tasas de colonización son elevadas en individuos inmunosuprimidos u hospitalizados, particularmente aquellos que pasan largos períodos de hospitalización o que han recibido terapia antimicrobiana de amplio espectro o quimioterapia. Los lugares de colonización en estos pacientes son similares a los de individuos sanos, pero en estos casos se encuentra incluido el tracto respiratorio inferior, sobretodo en pacientes intubados [14,15].

La morfología colonial, pigmentación y propiedades de movilidad de esta especie pueden ser bastante heterogéneas. Aunque la colonia típica es alargada y plana, con el centro elevado, dándole una apariencia como de huevo frito, existen numerosas variantes, sobretodo cuando crecen formando biofilms después de que estas cepas hayan estado expuestas a estrés medioambiental, por la presencia de antibióticos, o durante infecciones crónicas de las vías respiratorias humanas. Muchas variantes de la morfología colonial presentan también alteraciones fenotípicas respecto a la resistencia a los antibióticos, la movilidad, expresión de genes de virulencia, propiedades de adherencia y formación de biofilms. La generación de estas variantes con propiedades fenotípicas diversas contribuye a la persistencia y éxito como patógeno de *P. aeruginosa*.

Un fenotipo comúnmente observado cuando estas cepas crecen en medio sólido es el mucoso, consecuencia de la sobreproducción de alginato, que es un polisacárido extracelular. Este fenotipo es muy común en los aislados procedentes de muestras de vías respiratorias de pacientes con fibrosis cística, y se correlaciona con las infecciones crónicas en estos pacientes. Los papeles potenciales de este polisacárido, incluyen el aumento de la resistencia a los antibióticos y la adherencia a las células epiteliales [16], ya que el alginato forma una matriz que es parte del biofilm que forma esta especie en las vías aéreas de los pacientes con esta enfermedad.

Como ya hemos comentado anteriormente las colonias de *P. aeruginosa* presentan un color azul-verdoso debido a la producción del pigmento piocianina, que es un compuesto redox muy activo que produce múltiples efectos citopáticos en las células de los mamíferos, y que es producido únicamente por esta especie. Otros pigmentos comunes de *P. aeruginosa* son la pioverdina y la piorubina, de los que ya hemos hablado, en apartados anteriores.

1.1.5 Importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es el patógeno humano más importante del género *Pseudomonas*, tanto respecto al número, como al tipo de infecciones causadas y a la morbilidad y mortalidad asociadas.

Aunque ésta especie se encuentra típicamente en suelos y aguas, es también un patógeno oportunista de plantas, y animales. Su implicación en las enfermedades en humanos fue reconocida por primera vez en 1882 cuando Gessard aisló *P. aeruginosa* de vendajes teñidos de un color azul-verdoso, debido a la producción de piocianina [17]. Actualmente *P. aeruginosa* es reconocida como una fuente común en las infecciones adquiridas de la comunidad y las infecciones nosocomiales.

El espectro de infecciones que puede causar, va desde una foliculitis, hasta la bacteriemia que puede comprometer la vida de los pacientes. Las infecciones más comunes implican la cornea, la piel y el tracto urinario y respiratorio, aunque en realidad las infecciones por este patógeno pueden ocurrir en todas las localizaciones anatómicas, y todas ellas pueden derivar en bacteriemia. También es particularmente importante en pacientes con quemaduras severas y fibrosis cística.

Además es la causa principal de neumonías asociadas a ventilación automática e infecciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos. Los individuos más susceptibles a las infecciones por este microorganismo son aquellos que presentan inmunodeficiencia o un epitelio pulmonar comprometido debido a la fibrosis cística, así como los que han sufrido quemados severos, ulceraciones o abrasiones mecánicas, como las producidas como resultado de la implantación de catéteres [18,19]. Estas infecciones oportunistas causadas por *P. aeruginosa* pueden ser resultado de la inmunosupresión, ya que ésta permite por un lado, que las cepas con baja patogenicidad tengan la capacidad de invadir tejidos y, por otro lado, realza una característica que hace aumentar la virulencia de estas cepas con baja patogenicidad. La inmunodeficiencia del huésped, combinada con la elevada incidencia de cepas resistentes a los antibióticos, hace que el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno se convierta en un serio reto médico.

Las infecciones por *P. aeruginosa* se pueden clasificar en agudas o crónicas. Las agudas, como las neumonías asociadas a ventilación automática, son invasivas, citotóxicas y frecuentemente resultan en una infección sistémica, shock séptico y elevada mortalidad [20,21]; en cambio las infecciones respiratorias crónicas asociadas a fibrosis cística, a pesar de que presentan elevada colonización bacteriana en los esputos, son muy poco invasivas, no citotóxicas y raramente progresan a infección sistémica [22,23], aunque debido a que estas infecciones pueden persistir durante décadas, acaban resultando en un grave deterioro del epitelio pulmonar y muerte.

La cronicidad en este tipo de infecciones, se debe principalmente a las adaptaciones específicas de *P. aeruginosa* a las vías respiratorias de los pacientes con fibrosis cística, que incluyen la formación de biofilms, la formación de cápsulas polisacarídicas y la pérdida de la expresión de muchos genes asociados a la virulencia, incluyendo flagelos, exotoxinas o el antígeno O, entre otros.

La colonización de los tejidos implica la existencia de adhesinas; las mejor caracterizadas son las adhesinas de las fimbrias, aunque otros tipos de adhesinas, incluyendo lipopolisacaridos, flagelos, proteínas de la membrana externa y alginato, también contribuyen a la adhesión de este microorganismo a superficies tanto bióticas como abióticas.

La patogénesis de este microorganismo se describe a menudo como multifactorial, ya que la virulencia no se puede atribuir a un único determinante. Los factores que se sabe juegan un papel importante en la patogénesis incluyen adhesinas, exotoxinas, proteasas, hemolisinas, y el sistema de secreción de tipo III. A pesar de esta enorme colección de factores de virulencia *P. aeruginosa* rara vez infecta personas inmunocompetentes o tejidos que no están dañados. Esto que parece contradictorio, refleja la poca capacidad de esta bacteria de colonizar o dañar epitelios intactos, y explica porqué la pérdida de la integridad epitelial, especialmente con un declive de la función inmunológica, es normalmente un requisito para las infecciones por este patógeno oportunista.

P. aeruginosa produce gran variedad de toxinas importantes muchas de las cuales pueden causar shock, inducir la muerte de células, e incluso hidrolizar proteínas estructurales de los tejidos. La toxina más potente es la exotoxina A que inhibe la síntesis proteica en las células eucariotas, una vez se ha unido al receptor presente en ellas; su expresión está inducida por las condiciones limitantes de oxígeno que se encuentran en el huésped [24] y está posiblemente implicada en la dermatonecrosis que tiene lugar en las quemaduras o en el daño tisular en las infecciones pulmonares crónicas. Además esta toxina posee actividad inmunodepresora.

La destrucción tisular asociada con las infecciones de *P. aeruginosa* también puede ser atribuida a las elastasas que hidrolizan la elastina, la laminina, el fibrinógeno, el colágeno, la transferrina e incluso, las inmunoglobulinas y algunos componentes del complemento [25], así como la proteasa alcalina que tiene como substratos ciertos componentes del complemento, la fibrina, el fibrinógeno, la laminina, y el interferón gamma [26,27]. Además también contribuyen a la destrucción de los tejidos las exoenzimas S y T, las cuales son toxinas extracelulares que producen daños en las células epiteliales con el objetivo de facilitar la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis.

Aunque la patogénesis de *P. aeruginosa* es multifactorial, el sistema de secreción de tipo III, es el mayor determinante de virulencia. Este sistema de secreción es común en muchos patógenos Gram negativos, y funciona transportando toxinas directamente desde la bacteria adherida a la célula eucariota. En las infecciones respiratorias humanas, este sistema de secreción se asocia a un incremento del riesgo de mortalidad de hasta seis veces [28], aunque en el medioambiente juega un papel importante en la supervivencia de este microorganismo tanto en el suelo, como en el agua [29]. Este sistema de secreción transporta cuatro toxinas (ExoS, ExoT, ExoU, and ExoY) implicadas en la inhibición de la fagocitosis, la promoción de destrucción tisular y el retardo de la curación de heridas [30,31,32,33]. El sistema de secreción de tipo III se expresa en respuesta a diversas señales ambientales, incluyendo bajas concentraciones de Ca^{2+} , algunos componentes presentes en el suero, y el contacto con las superficies celulares eucariotas.

La formación de biofilm también juega un papel muy importante en la patogénesis de *P. aeruginosa*, ya que permite a este microorganismo colonizar superficies, por ejemplo, instrumentos médicos como catéteres y tubos endotraqueales y, lentes de contacto, por lo que se piensa que también contribuye a la infección crónica de las vías respiratorias de pacientes con fibrosis cística. Comparados con las formas planctónicas, los microorganismos que crecen formando parte de biofilms presentan elevada resistencia a los antibióticos, a los mecanismos de eliminación mediados por el complemento, a la fagocitosis y a los biocidas. Esto hace que las infecciones dónde se han formado biofilms sean difíciles de tratar.

Además, otra de las dificultades añadidas en el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo es la limitada existencia de agentes antimicrobianos efectivos debido a la elevada resistencia intrínseca que presenta este microorganismo. Esta resistencia natural, es debida principalmente a la presencia de una membrana externa poco permeable, a una β -lactamasa AmpC inducible y a un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos que producen lo que se denomina *impermeability-mediated resistance*. Además este microorganismo tiene una elevada capacidad para adquirir resistencia, mediante diversos mecanismos, a los antibióticos denominados antipseudomónicos.

Las mutaciones en las topoisomerasas I y II producen resistencia a las quinolonas; la desrepresión de la β -lactamasa AmpC produce una reducción de la sensibilidad a las penicilinas y cefalosporinas; la alteración en las bombas de reflujo, como por ejemplo la MexAB-OprM compromete la sensibilidad de varias familias de antibióticos simultáneamente, como las penicilinas, cefalosporinas, quinolonas y meropenem. La adquisición de mutaciones en los genes que codifican la permeabilidad de la membrana externa también es muy importante en el desarrollo de la resistencia a los carbapenémicos; la pérdida de OprD, una porina utilizada por los carbapenémicos y no por otros β -lactámicos, para su penetración en la célula, se asocia con resistencia al imipenem y sensibilidad reducida al meropenem.

Actualmente, el problema de la adquisición de resistencias crece con la emergencia de los integrones que portan *cassettes* génicos que codifican genes de resistencia a los antibióticos, sobretodo carbapenemasas y acetiltransferasas.

1.2 FUNDAMENTOS DE LA GENÉTICA DE POBLACIONES BACTERIANAS

La genética de poblaciones estudia la variabilidad genética de las poblaciones naturales, intenta explicar cuales son los mecanismos por los que una especie evoluciona, y trata de responder a cuestiones específicas sobre la historia particular de esta especie y sus poblaciones.

Dentro de una determinada especie no existe homogeneidad genética absoluta, sino que diferentes poblaciones de una misma especie pueden presentar ligeras diferencias genéticas. Para la genética de poblaciones, el proceso evolutivo consiste en cambios en la constitución genética de las diferentes poblaciones de una especie. Estos cambios en la composición genética de las poblaciones son debidos a diferentes mecanismos que afectan las frecuencias génicas de la población. Los procesos que influyen en la naturaleza y velocidad de estos cambios evolutivos son:

1. **Mutación:** Es el proceso fundamental que impulsa todo cambio evolutivo. Como las tasas de mutación son muy bajas, la presión de mutación por sí sola produce cambios muy lentos en las frecuencias génicas de las poblaciones.
2. **Recombinación:** En el caso de los microorganismos implica el reemplazo de una región pequeña del cromosoma, con la región correspondiente de otro individuo de la misma especie, o, en algunos casos, de otra especie muy relacionada genéticamente.
3. **Migración:** El flujo génico de una población a otra de la misma especie puede cambiar la composición genética de una población local, en el caso en que las dos poblaciones presenten frecuencias génicas diferentes.
4. **Deriva génica:** La deriva génica al azar se basa en que las frecuencias génicas de una población pueden cambiar por razones puramente aleatorias. Dado que las poblaciones son finitas, las frecuencias génicas pueden variar de una población a otra debido a errores de muestreo. Cuanto más pequeña es la población, más grande es el efecto de la deriva genética al azar sobre las frecuencias génicas.
5. **Selección natural:** Controla los caracteres que se desvían de la media de la población, seleccionando aquellos organismos con una eficacia biológica mayor. La selección tiende a mantener un nivel óptimo asegurando los “avances” conseguidos durante generaciones y eliminando a los individuos divergentes.

Las variantes génicas generadas por los procesos de mutación, recombinación, migración y deriva génica pueden aumentar o disminuir de frecuencia, independientemente de si son o no cambios adaptativos útiles para sus portadores; pero la selección natural es el único proceso evolutivo direccional respecto a la adaptación. En el caso de las bacterias la selección natural tiene un papel muy importante porque elimina la diversidad en las poblaciones, ya que selecciona aquellas cepas mejor adaptadas. Por ejemplo, la aparición de un mutante que presenta cierta ventaja ecológica sobre el resto de individuos de la población, provoca un incremento mayor de este clon en la población, eliminando por selección periódica aquellos individuos menos adaptados y disminuyendo así la diversidad en la población.

Por tanto, si en cualquier especie bacteriana escogemos una población sometida a una fuerte presión selectiva, estaremos seleccionando poblaciones clonales. Esto es lo que sucede si únicamente analizamos poblaciones de cepas virulentas. Las especies bacterianas patógenas están constituidas por una amplia base de cepas no patógenas en las que predomina un grupo de cepas responsables de la enfermedad. En este caso, se deben analizar tanto poblaciones de cepas patógenas como de no patógenas, para poder determinar la estructura poblacional correcta de la especie bacteriana. Pero, en aquellas poblaciones que presentan frecuentemente fenómenos de recombinación, se producen intercambios genéticos que son transferidos rápidamente a diferentes fondos genéticos, y la diversidad de la población se mantiene.

A partir de la variabilidad genética detectada en las poblaciones como resultado de estos procesos, los estudios de genética de poblaciones establecen modelos para explicar la estructura poblacional y la evolución de estas poblaciones.

1.2.1 La recombinación en poblaciones bacterianas

Es importante conocer el papel de la recombinación genética en las poblaciones bacterianas, ya que la transferencia horizontal de genes tiene una enorme relevancia para la epidemiología de las infecciones causadas por bacterias patógenas; sin embargo, el conocimiento existente sobre la importancia real de los mecanismos de recombinación (conjugación, transformación y transducción) es muy escaso.

El conocimiento de la naturaleza y la frecuencia de recombinación es importante para determinar la estructura genética de las poblaciones bacterianas. Si no existiese recombinación cromosómica en las bacterias, sus poblaciones tendrían una estructura clonal, donde la variación genética vendría dada, fundamentalmente, por la mutación; esto implicaría que las poblaciones naturales de bacterias serían mezclas de líneas evolutivas más o menos independientes y, como consecuencia, los diferentes alelos en los *loci* estudiados, no estarían asociados al azar sino que serían más frecuentes determinadas combinaciones de alelos. En estas circunstancias decimos que existe un **desequilibrio de ligamiento**. Si, en cambio, la recombinación cromosómica fuese muy frecuente, no tendríamos que esperar asociación entre alelos, ya que las diferentes combinaciones estarían deshechas por la acción de esta recombinación. En estas circunstancias decimos que los alelos se encuentran en **equilibrio de ligamiento**.

En el caso de las bacterias, el intercambio genético no es frecuente, pero su frecuencia es suficiente para crear y romper asociaciones de alelos en diferentes *loci*. Según Maynard-Smith [³⁴], si la tasa de recombinación es únicamente diez veces superior a la de mutación, la recombinación rompe de manera efectiva todas las asociaciones preexistentes de alelos en los diferentes *loci*. Además la recombinación fomenta la evolución adaptativa proporcionando determinadas combinaciones adaptativas de alelos que pueden ser intercambiadas entre diferentes especies bacterianas, como resistencia a antibióticos, *cassettes* de virulencia, fijación de nitrógeno, etc.; y dado que el intercambio genético, es poco frecuente, queda garantizada la integridad de su conjunto de adaptaciones aunque la variabilidad que se introduce sea por recombinación.

Los diversos estudios realizados a numerosas especies bacterianas han demostrado que, en su mayoría, se encuentran determinadas combinaciones de alelos que se repiten con una frecuencia más elevada de la esperada. Esto es debido a que la recombinación genética, aunque presente en la población, no es suficiente para romper las asociaciones entre alelos, y presentan desequilibrio de ligamiento. Estas características han llevado a la mayoría de autores a postular que las poblaciones bacterianas tendrían una estructura clonal, y que por lo tanto, la tasa de recombinación de segmentos cromosómicos no es suficientemente elevada como para romper las asociaciones clonales o introducir el azar en los genomas; pero en determinadas especies, como *Neisseria gonorrhoeae* y *Helicobacter pylori*, la recombinación ha originado asociaciones al azar de alelos, de manera que estarían en equilibrio de ligamiento.

También se ha observado que la recombinación es común en genes metabólicos implicados en vías centrales (*housekeeping genes*) de algunas bacterias, y que los niveles observados de desequilibrio de ligamiento entre alelos pueden ser debidos algunas veces a una estructuración ecológica o geográfica de la población, y no a una baja tasa de recombinación.

Analizando los resultados obtenidos en diversas poblaciones bacterianas, Maynard-Smith *et al.* [34] determinaron la existencia de diversos modelos de población, según su estructura genética. Estos modelos se caracterizarían por dos extremos bien determinados, el de clonalidad, correspondiente a la presencia de desequilibrio de ligamiento, y el de panmixia, correspondiente al equilibrio de ligamiento, y diferentes situaciones intermedias. Una de las situaciones intermedias, es la estructura llamada “epidémica”, en la que encontramos una asociación significativa entre *loci* (por lo tanto, estaríamos hablando de una población en desequilibrio de ligamiento), debido al reciente y explosivo aumento de tipos electroforeticos particulares; cuando este efecto es eliminado encontramos que la población es panmítica (y, por lo tanto, presenta equilibrio de ligamiento). La figura 1.3 muestra algunos tipos diferentes de estructuras poblacionales.

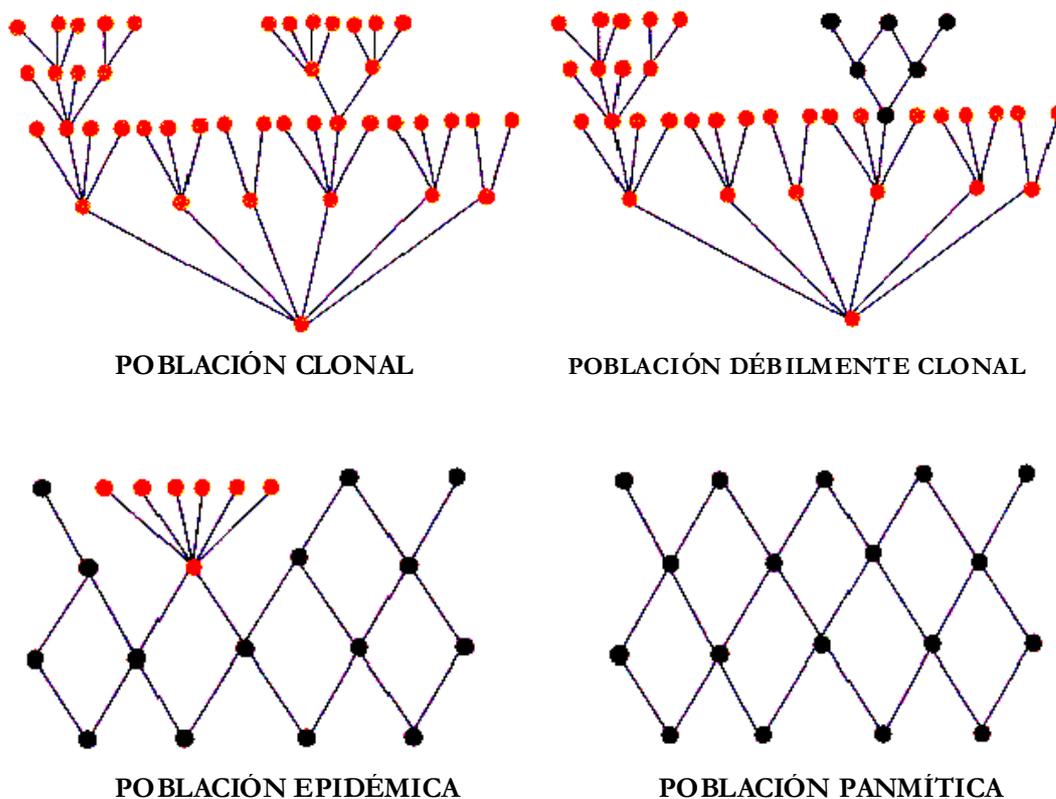


Figura 1.3 Modelos de estructuras poblacionales bacterianas.

1.2.2 Análisis de la variabilidad

Los métodos clásicos de tipado (serotipado, biotipado, fagotipado, tipado de fimbrias, etc.) han sido frecuentemente utilizados en bacteriología para los estudios taxonómicos y epidemiológicos; pero estos métodos solo detectan variaciones fenotípicas, las cuales son muy difíciles de relacionar con las variaciones alélicas, y no dan información ni de la frecuencia de los alelos, ni de los diferentes genotipos detectados en la población. Por tanto, estas técnicas no sirven para el estudio de la genética de poblaciones. Sin embargo, técnicas moleculares como la hibridación DNA-DNA y la hibridación DNA-RNA son de enorme utilidad tanto para establecer especies, como para establecer la relación que existe entre especies próximas, pero no sirven para conocer la variación genética dentro de una especie, de manera que su utilidad queda limitada a la comparación de especies genéticamente próximas.

Para el conocimiento de la estructura poblacional es necesaria la medida del grado de variabilidad genética que existe entre las diversas cepas de una población bacteriana. En la genética de poblaciones bacterianas se han utilizado dos tipos de aproximaciones para detectar esta variación genética:

- a) **variación a corto término:** en este caso, se analizan y comparan *loci* individuales o regiones del genoma que son elevadamente variables en la población. Se utilizan métodos como el ribotipado, el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP), la electroforesis de campo pulsante (PFGE) y el análisis de productos de PCR utilizando elementos repetitivos o arbitrarios como cebadores (por ejemplo el análisis del DNA mediante RAPD).

La variación que medimos con estos métodos es la que evoluciona más rápidamente, y por tanto, los resultados obtenidos son útiles para conocer la epidemiología a corto término, pero no sirven para hacer una estimación de la epidemiología a nivel global.

- b) **variación a largo término:** esta aproximación mide la variación que se acumula lentamente en la población, debido, probablemente, a que es selectivamente neutra. Estos tipos de análisis son los que se han realizado, de manera tradicional, aplicando, por ejemplo, la técnica de electroforesis de isoenzimas multilocus (MLEE).

1.2.3 Las poblaciones de *Pseudomonas aeruginosa*

Después de la observación de numerosas poblaciones de *P. aeruginosa*, muchos autores han llegado a la conclusión de que este microorganismo se extiende clonalmente. Siempre se ha asumido que las mutaciones son la fuente mayoritaria de variación genética en las bacterias, mientras que los intercambios por recombinación se han considerado como extraños. Esta visión ha variado en los últimos años, y los trabajos llevados a cabo por Maynard Smith *et al.* [34] han demostrado que las poblaciones pueden tener estructuras que van desde la panmixia, que no presentan asociación entre alelos, hasta poblaciones clonales, donde determinadas asociaciones de alelos son más frecuentes, de manera que únicamente detectamos una pequeña parte de los diversos genotipos. A pesar de que *P. aeruginosa* ha sido extensamente estudiada, **no existe un acuerdo general respecto a la estructura de la su población.**

Algunos autores defienden que es una especie muy homogénea con el 90% de las cepas pertenecientes al mismo grupo clonal (igual que ocurre en otras especies de *Pseudomonas* como *P. stutzeri* y *P. avellanae*). Kiewitz *et al.* [35] después de realizar dendrogramas de diferentes *loci* en poblaciones de *P. aeruginosa* de origen clínico y ambiental, observaron una incongruencia en sus topologías, lo que sugería que no había o que había un muy débil equilibrio de ligamiento, y por tanto presentaban una asociación no determinada al azar. En este estudio, también se observó, que las cepas que pertenecían al mismo genotipo (analizado mediante MLTS) estaban caracterizadas por que sus alelos no estaban asociados al azar, y por tanto la recombinación no era suficientemente elevada como para romper las combinaciones existentes entre los diferentes alelos. Contrariamente la frecuencia de recombinación existente entre grandes fragmentos de cromosoma en los diversos genotipos, sí era suficiente como para romper las asociaciones clonales y hacer que los diferentes genotipos estuviesen en equilibrio de ligamiento los unos con los otros. Por tanto, cada genotipo representaría una asociación de cepas estrechamente relacionadas (variantes clonales) que compartirían alelos idénticos. Esto quiere decir que los diferentes genotipos de *P. aeruginosa* pueden ser considerados como clones.

Si nos fijamos por ejemplo, en las Enterobacterias, observamos que los diversos clones están especializados en colonizar un hábitat particular, es decir, cada tipo electroforético determinado predomina en un hábitat determinado; por el contrario, en el caso de *P. aeruginosa* no existe una correlación entre clones y hábitats, sino que los clones

dominantes están distribuidos tanto en los hábitats clínicos como en los ambientales. Además, los aislados clínicos y ambientales de clones de *P. aeruginosa* no pueden diferenciarse por sus propiedades genotípicas ni quimiotaxonómicas, y son funcionalmente equivalentes en características relevantes para la virulencia y en la capacidad de colonizar y vivir en los diversos ambientes. Esto podría ser debido a la versatilidad de esta especie, que le confiere la capacidad de colonización de múltiples nichos ecológicos, sin especialización.

Denamur *et al.* [36] y Picard *et al.* [37] sugieren que las poblaciones de *Pseudomonas* son panmíticas. Estudios comparativos de secuenciación de diversos genes en poblaciones clínicas y ambientales, sugieren que *P. aeruginosa* presenta una elevada frecuencia de recombinación y una estructura poblacional que denominan *net-like population* [35]. Por otro lado, se cree que las especies bacterianas en las que la recombinación es frecuente son transformables naturalmente [38], pero contradictoriamente, parece que *P. aeruginosa* no es competente para la transformación natural. En este contexto, es interesante la aproximación hecha por Ripp *et al.* [39] que concluye que los bacteriófagos ambientales endémicos podrían ser buenos transductores en las comunidades naturales de este microorganismo.

Por otro lado, Ruimy *et al.* [40], estudiaron la diversidad genética de las poblaciones de *P. aeruginosa* causantes de neumonía, y concluyeron que esta población presenta una clonalidad epidémica con un elevado grado de recombinación, de manera que la bacteriemia y la neumonía no estarían causadas por clones específicos, sino que la población es panmítica, aún cuando existen algunos clones epidémicos que presentan una asociación significativa entre *loci*. Esta evidencia de un clon epidémico, también ha sido demostrada en poblaciones aisladas de pacientes con queratitis y el entorno de éstos.

Los estudios realizados por Pirnay *et al.* [41], también han concluido que las poblaciones de este microorganismo presentan una clonalidad epidémica donde existe una estructura superficial clonal, con recombinaciones frecuentes, en la que, ocasionalmente, surgen algunos clones epidémicos exitosos. La aparición de estos clones viene dada por selección de un gran *pool* de genotipos poco frecuentes y no relacionados, que han recombinado con elevada frecuencia. Estos clones adaptativos son abundantes y, además, presentan elevadas tasas de migración, de manera que se han extendido en la naturaleza, probablemente debido a la elevada movilidad de la población humana, de manera que se espera que predominen en las poblaciones que encontramos en los pacientes.

1.3 LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Todas las bacterias, a excepción de los micoplasmas y las clamidias, producen una pared celular, situada por encima de la membrana citoplasmática. La estructura y el funcionamiento de ésta son tan distintivos que constituyen un rasgo típico de los procariotas. La pared celular de las bacterias tiene como componente común el peptidoglicano o mureína, y da forma a la célula, la protege contra la lisis osmótica, contribuye a conferir a la bacteria cierta rigidez mecánica, e incluso, representa para muchos microorganismos, una barrera para ciertos productos químicos tóxicos y agentes biológicos. Además las bacterias Gram negativas contienen una capa adicional, conocida como membrana externa, situada por encima de la anterior. En la figura 1.4 se muestra un esquema de la disposición de las membranas en las bacterias Gram negativas.

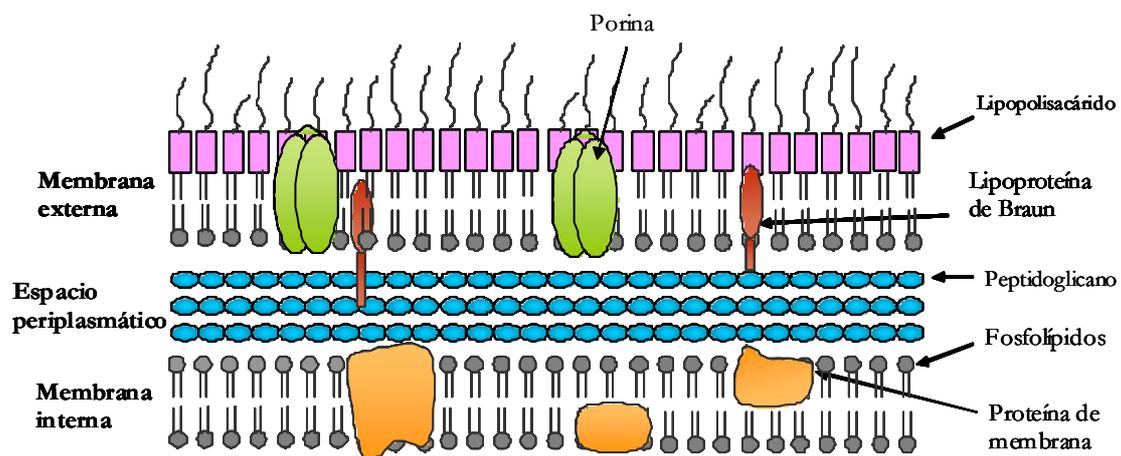


Figura 1.4 Esquema de las membranas de las bacterias Gram negativas.

1.3.1 Estructura de la membrana externa

La membrana externa es una “interficie” activa que gobierna interacciones con el medio externo en bacterias Gram negativas.

De manera similar a la membrana citoplasmática, la membrana externa está formada por una doble capa lipídica que contienen fosfolípidos y proteínas. Mientras que la membrana citoplasmática, es una estructura simétrica compuesta, principalmente, por fosfatidiletanolamina (70-80%), fosfatidilglicerol y cardiolipina, distribuidas más o menos uniformemente en sus caras externa e interna, la membrana externa es una membrana

asimétrica. La cara interna tiene una composición lipídica y proteica similar a la membrana citoplasmática, aunque enriquecida en fosfatidiletanolamina y una serie de proteínas, que no se encuentran en la membrana citoplasmática, y que tienen la capacidad de formar poros [42]. Por el contrario, la cara externa contiene grandes cantidades de un lípido único, llamado lipopolisacárido (LPS), que substituye a los fosfolípidos en esta región de la membrana, y que forma una capa muy poco permeable que dificulta el paso de un gran número de sustancias [43,44,45]. La composición química de este lípido, varía entre los diferentes grupos bacterianos Gram negativos.

La composición proteica de la membrana externa es característica y totalmente diferente a la de la membrana citoplasmática, llegando a representar el 50% de la masa de la membrana externa. Muchas de las proteínas de la membrana externa se encuentran exclusivamente en esta membrana, aunque algunas también las podemos encontrar en la membrana citoplasmática. Las proteínas mayoritarias son la lipoproteína y las proteínas formadoras de canal; por tanto la membrana externa no contiene la diversidad de proteínas hallada en la membrana celular, pero las que en ella se encuentran lo hacen de una manera muy abundante. La lipoproteína de la mureína o lipoproteína de Braun, es la proteína más abundante en enterobacterias. Esta pequeña lipoproteína (aproximadamente 7.2 Kda) tiene fundamentalmente un papel estructural, uniendo la membrana externa con la capa de peptidoglicano [46]. Las proteínas formadoras de canal, que permiten el paso de sustancias a través de esa gran barrera que representa el LPS, pueden ser agrupadas a su vez en: porinas (que trataremos detalladamente en apartados posteriores) y proteínas canal específicas de sustrato, que permiten el paso de nutrientes y, en algunos casos, la extrusión de productos de desecho. También hay proteínas, menos abundantes en la membrana, implicadas en el transporte específico de sustancias por difusión facilitada, en el reflujo de toxinas y colicinas o, encargadas del transporte activo de grandes moléculas, como los complejos de hierro quelado (Fe^{3+}) o la vitamina B_{12} .

La membrana externa tiene un papel muy importante en la fisiología de las bacterias Gram negativas, ya que les confiere resistencia frente a los factores de defensa del huésped como la lisozima, la β -lisina y diversas proteínas leucocídicas que son extremadamente tóxicas. Además esta estructura actúa como una barrera impermeable a muchos antibióticos como los macrólidos, la novobiocina, o la clindamicina, entre otros. Otra función importante de la membrana externa es que dota a las bacterias de una elevada

hidrofobicidad, importante para evitar la fagocitosis y la acción del complemento y, les proporciona la capacidad para evitar ataques específicos del sistema inmunitario de la célula huésped, alterando la constitución antigénica de la superficie [47].

1.3.2 La membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*

Se ha demostrado que *P. aeruginosa* presenta una baja permeabilidad en su membrana externa (aproximadamente un 8% de la de *E.coli*) [48], la cual está determinada por las propiedades de las porinas de este organismo. Esta propiedad surge, probablemente, de la competición por un nicho ecológico, como por ejemplo el suelo, donde muchos microorganismos producen sustancias antibióticas. Por ello, *Pseudomonas*, además de producir sus propias sustancias antimicrobianas, ha desarrollado y mantenido la habilidad intrínseca de resistir los compuestos secretados por otros microorganismos y, uno de los modos consiste en tener una membrana externa impermeable.

Existen básicamente tres tipos de resistencia en *P. aeruginosa*: intrínseca, adaptativa o inducible y mutacional. El elemento que los tres tipos de resistencia comparten es la baja permeabilidad de la membrana. Está generalmente aceptado el hecho que esta baja permeabilidad es debida a una serie de porinas con una débil efectividad, que hacen que la membrana presente un marcado límite de exclusión, permitiendo el paso de compuestos de unos 3000 Da de peso molecular, comparado con el límite de 500 Da que presenta *E.coli* [49,50]. La porina que contribuye en mayor medida a este gran límite de exclusión es la porina mayoritaria OprF, aunque también están implicadas otras porinas como la OprD o incluso, la porina inducida OprB.

La baja permeabilidad también es una característica limitante para la susceptibilidad a los antimicrobianos, a pesar de que esta característica por sí sola no es suficiente para explicar la elevada resistencia a los antibióticos que posee este microorganismo, y se sabe que existen mecanismos secundarios que contribuyen a la elevada resistencia intrínseca. Los mecanismos secundarios principales son el reflujo de los antibióticos a través de la membrana hacia el exterior celular y, una β -lactamasa inducible. Además otra consecuencia de la baja permeabilidad de la membrana externa es que muchos substratos tienen que utilizar vías especializadas para atravesar esta membrana y además lo tienen que hacer en

una tasa que permita el crecimiento del microorganismo. *P. aeruginosa* presenta gran diversidad de porinas que permiten “aumentar” la permeabilidad de la membrana.

1.4 LAS PORINAS

Como hemos comentado anteriormente, la permeabilidad de la membrana externa de los Gram negativos a diferentes nutrientes es debida, en gran parte, a unas proteínas a las que se les ha dado el nombre genérico de porinas. Estas proteínas se denominan así porque constituyen canales o poros relativamente inespecíficos que permiten la difusión pasiva de iones y pequeñas moléculas hidrofílicas. El nombre de porina fue propuesto por primera vez por Nakae el año 1976, cuando trabajando en el laboratorio de Hiroshi Nikaido descubrió la primera proteína formadora de canal no específica. Actualmente, se han aislado y caracterizado numerosas porinas, presentes en familias muy diferentes de Gram negativos y en algunos grupos de bacterias Gram positivas de paredes particulares [51].

La función principal de las porinas es la de actuar como canales y permitir el paso, a través de la membrana externa, de sustancias hidrofílicas de una medida inferior a 600Da aproximadamente, ya que el poro puede presentar una apertura máxima de 10-12 Å. Son, por tanto, canales pasivos que permiten el transporte en proporción a la concentración de gradiente entre el exterior y el interior bacteriano, y no presentan, en general, una especificidad por el sustrato [42,52].

Las porinas realizan esta función ya que forman canales llenos de agua que permiten el influjo de pequeñas moléculas hidrofílicas como azúcares, aminoácidos, péptidos pequeños, iones inorgánicos y antibióticos como β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglicósidos, cloramfenicol y algunas quinolonas y, el reflujo de productos tóxicos como drogas o solventes orgánicos. Este flujo de solutos es independiente de energía. Los canales presentan un diámetro de poro que oscila entre 0.6 y 2.3 nm y que limita la entrada de sustancias [53]. Estos límites de exclusión de porinas han sido medidos mediante solutos radiactivos y son de 600 Da para *E. coli*, de 800 Da para *S. typhimurium* y de 500 Da para *P. aeruginosa* [54,55].

Pero la función de las porinas no es únicamente la de permitir el paso de sustancias a través de la membrana externa, sino que pueden tener otras funciones. En primer lugar, juegan un papel muy importante en la resistencia a los antibióticos, modulando la variación en el tamaño de poro, variando su expresión o, incluso, cambiando de carga y perturbando la difusión normal del antibiótico. Son también receptores de bacteriófagos o bacteriocinas, diana de anticuerpos del sistema inmunitario o punto de unión de componentes de la cascada del complemento, con lo que pueden actuar como efectoras en la patogénesis o estimular la respuesta inmunológica [51].

En general, las porinas son proteínas sustrato inespecíficas aunque pueden presentar cierta selectividad iónica, mayoritariamente catiónica, y en contadas ocasiones, aniónica. De todas maneras, la selectividad iónica no es absoluta porque en el interior del canal existen tanto aminoácidos cargados positivamente (preferentemente localizados cerca de donde se unen los monómeros para formar el trímero) como negativamente.

M.H. Saier *et al.* [56] establecieron cuatro grupos de proteínas transportadoras: canales, *carriers*, transportadores activos primarios y transportadores secundarios. Las porinas pertenecen al primer grupo que se subdivide a su vez en cinco subclases según su estructura, función y origen filogenético: canales tipo α , toxinas proteicas y peptídicas, Holinas, canales no sintetizados ribosómicamente, y porinas. A su vez las porinas pueden dividirse en cinco tipos [57]: generales o no específicas, porinas sustrato-específicas, porinas de reflujo (también llamadas *efflux porins* o *channel-tunnels*), porinas dependientes de “compuertas” (*gated-porins*) y proteínas de membrana externa no formadoras de poro (*poreless outer membrane proteins*). A las porinas de los dos primeros grupos tradicionalmente se las denomina porinas “clásicas” o típicas.

Las porinas generales o no específicas permiten la difusión de moléculas hidrofílicas en relación a su peso molecular, de manera que son las responsables de los límites de exclusión de la membrana externa; en cambio las porinas sustrato-específicas presentan lugares de unión para ciertos tipos de solutos y su síntesis está inducida bajo condiciones especiales de crecimiento, junto con la síntesis del sistema de transporte de la membrana interna, y la de los enzimas necesarios para la degradación o fermentación del soluto [58].

Las porinas *channel-tunnel* forman parte de los sistemas de reflujo y presentan una estructura diferente al resto de proteínas de la membrana externa, ya que el trímero forma un único poro a diferencia de las otras proteínas en que cada monómero forma su propio poro; además en este tipo de porinas, el dominio insertado en la membrana (el barril formado por láminas β) se extiende hacia el espacio periplasmático en forma de hojas α antiparalelas, en lo que se denomina dominio del túnel, que en su parte central presenta un tercer dominio, el dominio ecuatorial, que está formado por una mezcla de estructuras α y β [59]. Las *gated porins* se abren y se cierran para permitir el paso de moléculas relativamente grandes como sideróforos que contienen hierro y, por último, las proteínas de membrana externa no formadoras de poro o *poreless Omp*, están formadas por unos barriles de láminas β pequeños que no forman un poro en su conformación nativa y funcionan, además, como anclajes de la membrana (figura 1.5).

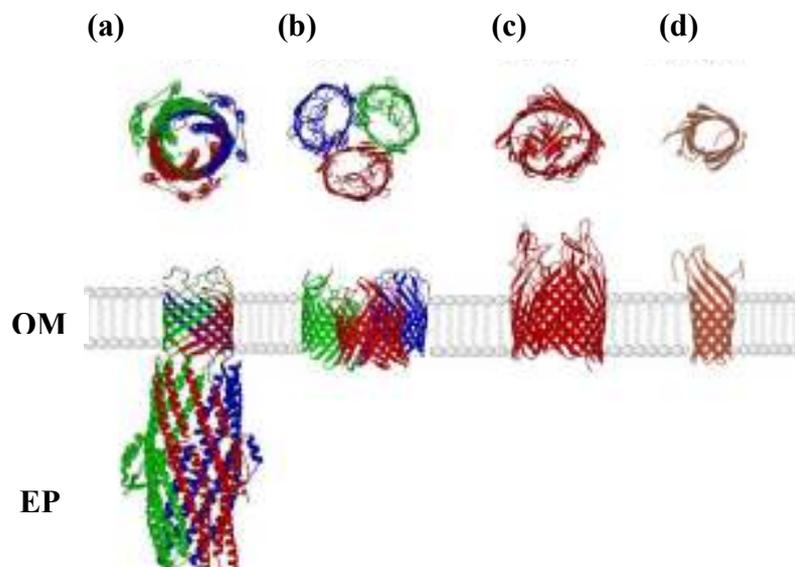


Figura 1.5 Modelos de poro que forman (parte superior) y del modo de inserción en la bicapa (parte inferior) de: una porina de reflujo (a), una porina típica (b), una *gated porin* (c) y una *poreless Omp*. OM, membrana externa; EP, espacio periplasmático [60].

1.4.1 Estructura de las porinas

Las porinas son generalmente asociaciones triméricas; cada monómero presenta un peso molecular que oscila entre 28 y 48 kDa [53]. Pero, a parte de estas porinas triméricas, denominadas “porinas clásicas”, hay un grupo de porinas monoméricas que también presentan actividad formadora de poros; este es el caso de la OprF de *P. aeruginosa* y la proteína OmpA de *E. coli*.

Las porinas presentan dos características muy diferentes del resto de proteínas de membrana. En primer lugar, tienen una composición de aminoácidos más polar que la mayoría de las proteínas de membrana y, en segundo lugar, son ricas en estructuras en láminas- β , a diferencia de la mayoría de proteínas de membrana, con dominios transmembranales hidrofóbicos y estructuras en hélice- α [61]. Esta estructura β está presente únicamente en la membrana externa de bacterias, cloroplastos y mitocondrias.

El estudio de las porinas de diversas especies ha revelado que las porinas típicas forman tres canales llenos de agua. Cada monómero contiene de 250 a 450 aminoácidos y está constituido por 16 láminas- β antiparalelas que forman un cilindro o barril con cortos giros en la cara periplásmica y largos *loops* en la cara externa de la célula (figura 1.6). Estas láminas- β están inclinadas fuertemente (de 30-60°) en relación con el eje del barril [62], la inclinación incrementa el diámetro del barril. El contacto entre los monómeros está estabilizado mediante interacciones polares hidrofóbicas, y además el *loop* 2 tiende a curvarse sobre el barril de la subunidad vecina, jugando un importante papel en la estabilización de la estructura (figura 1.7).

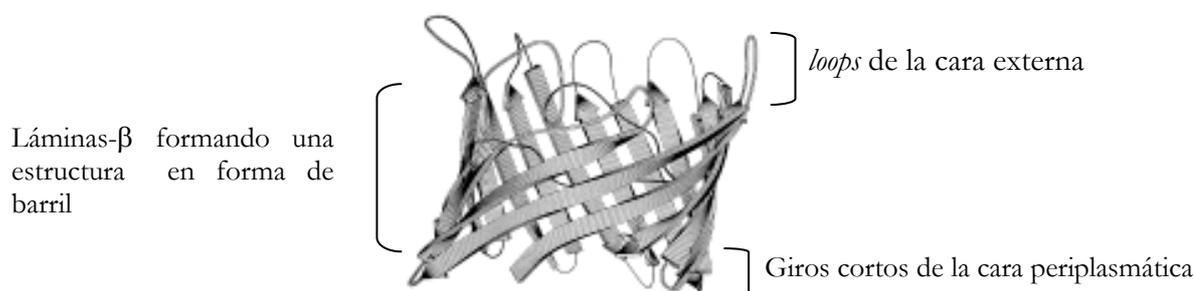


Figura 1.6 Esquema de las principales partes de una porina. Se puede observar en él la inclinación de las láminas- β que forman el barril [63].

El tercer *loop* (L3), que conecta las láminas 5 y 6, es especialmente largo y no está expuesto en la superficie celular sino que se pliega hacia el interior, formando una zona de constricción en la mitad de este canal que contribuye a determinar las dimensiones del canal, así como sus propiedades de permeabilidad, tales como el límite de exclusión del poro o la selectividad de iones [42]. Se cree también que L3 tiene una función estabilizadora de la integridad del poro porque en esta zona existe un fuerte campo electrostático consecuencia de los aminoácidos ácidos del L3 y de residuos básicos de la pared opuesta al *loop*.

Estos *loops* externos, están sujetos a cambios mutacionales muy rápidos, ya que interactúan con numerosos elementos del medio externo, tales como anticuerpos, componentes del sistema inmune, bacteriocinas y fagos.

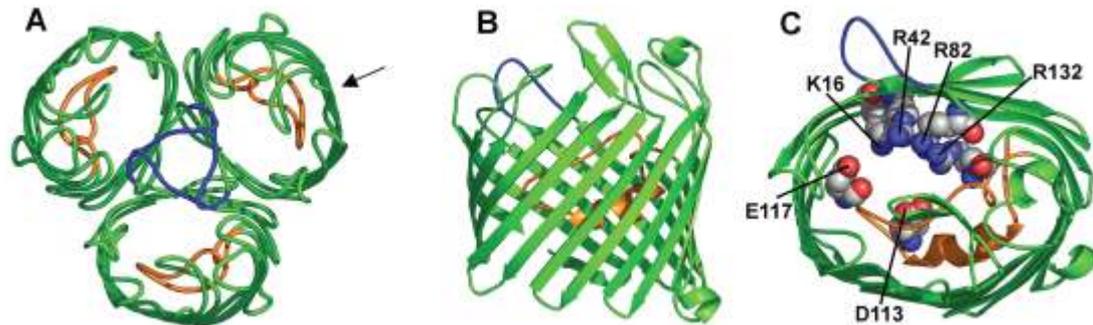


Figura 1.7 Estructura de la porina OmpF de *E.coli*. **(A)** Vista del trímero desde el exterior (perpendicular al plano de la membrana). Se observa el *loop* 2 (color azul) interactuando en cada monómero, con la subunidad vecina, y el *loop* 3 (color naranja) inclinado hacia el interior del canal. **(B)** Vista del monómero desde la bicapa (aproximadamente en la dirección que indica la flecha en el esquema A). Los *loops* 2 y 3 están coloreados igual que en A. **(C)** Vista, en uno de los monómeros, de la constricción del canal formado por el *loop* 3, donde se muestran los aminoácidos que participan en la integridad del poro: Glu117 y Asp113 del *loop* 3 y Lys16, Arg42, Arg82, y Arg132 de la pared opuesta al *loop*. [47]

1.4.2 Las porinas de *P. aeruginosa*

El conocimiento del genoma completo de *P.aeruginosa* [64] ha permitido la predicción de todas las proteínas de membrana externa de este microorganismo por homología con OMPs conocidas de la misma especie o de otras. Este conocimiento ha llevado al descubrimiento de 163 proteínas de membrana conocidas o predecidas, de las cuales 64 se agrupan en tres grandes familias de porinas: la familia de porinas específicas de la OprD, la familia de porinas dependientes de “compuertas” (*gated-porins*) de la TonB y la familia de reflujo de la OprM.

De igual manera que las porinas de otras especies, las porinas de *P.aeruginosa* contienen entre 8 y 22 hojas- β anti-paralelas que adoptan una configuración en cilindro o barril anclado en la membrana externa. Las cadenas β , están interconectadas por secuencias que forman curvas cortas en la cara peri plasmática, y curvas largas o *loops* en la cara externa de la membrana; el área central contiene un tramo de aminoácidos, el llamado *loop* 3, que se puede plegar dentro de la región interior del canal, formando una zona de constricción (figura 1.7).

La **OprF** es la proteína de membrana externa mayoritaria en *P. aeruginosa* (figura 1.8). Pertenece al grupo de **porinas generales o no específicas**. Ha sido ampliamente estudiada debido a su propuesta utilidad como componente para la fabricación de vacunas (debido a que es altamente antigénica), por su papel en la resistencia a drogas antimicrobianas y también por su función como porina. Se ha descrito como una porina multifuncional, ya que es necesaria para que la célula crezca en un medio con baja osmolaridad y además es imprescindible para el mantenimiento de la forma celular. Está formada por 16 hojas- β y el tamaño del poro obtenido mediante la técnica de *planar lipid bilayer* es controvertido, ya que se han encontrado canales de 0.36 nS y canales de 2-5 nS, lo que parece indicar que OprF podría adoptar más de una conformación variando tanto la estructura como la formación del canal. Se encuentra unida no covalentemente al peptidoglicano periplasmático a través de su dominio C-terminal. Es un miembro estructural de la familia de proteínas OmpA de *E.coli* [^{65,66,67}].

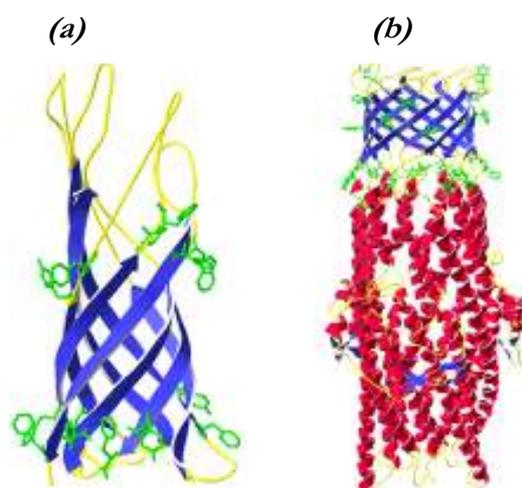


Figura 1.8 Esquema de dos de las porinas más importantes de *P.aeruginosa*, la porina general OprF (a) y la porina de reflujo OprM (b). [⁶⁸]

La mayoría de **gated-porins** de *Pseudomonas* spp. están implicadas, en la captación de hierro. Esta captación implica un paso en el cual es imprescindible la proteína de membrana interna TonB (por eso, a estas proteínas se las llama dependientes de TonB): una vez el sideróforo ha captado el hierro, el complejo interactúa con el receptor correspondiente en la membrana; esta interacción, junto con la entrada de energía a través de la proteína periplasmática TonB, permite un cambio conformacional en el receptor que hace que se abra la compuerta de las *gated-porins*, permitiendo así, el paso del complejo férrico a través de la membrana externa.

Éste es el caso de FpvA (pioverdina), que es el sideróforo mayoritario en *Pseudomonas aeruginosa*, el cual presenta elevada afinidad por el Fe^{3+} , o de los sistemas FptA (pioquelina), PfeA o Heme. Otros miembros inusuales de la familia son la OprC, implicada en la captación de Cu^{2+} en condiciones anaerobias, o la OprH, implicada en la captación de cationes divalentes como el Mg^{2+} [65].

El **reflujo activo** es el mayor sistema de resistencia intrínseca a múltiples antibióticos en *P. aeruginosa*. En bacterias Gram negativas parece que todos los sistemas de reflujo requieren tres proteínas: un transportador de reflujo situado en la membrana citoplasmática, una porina del tipo *channel-tunnel* en la membrana externa que expulsa al exterior el antibiótico y una proteína de fusión de membrana (MFP) encargada de establecer un nexo de unión entre ambas (figura 1.9). En este microorganismo los sistemas más importantes de reflujo pertenecen a la familia RND (*resistance/nodulation/cell division family*) que utilizan la fuerza protón motriz para extraer fuera de la célula agentes antimicrobianos y, por tanto no necesitan la hidrólisis de ATP.

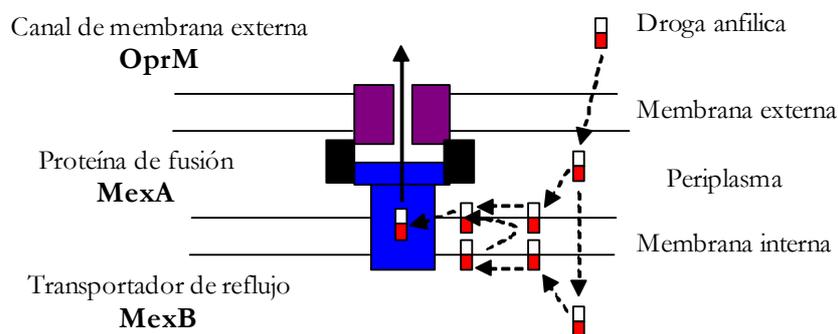


Figura 1.9 Esquema del transportador de reflujo MexAB-OprM de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa tiene 18 proteínas de membrana con una presunta implicación en el reflujo, de las cuales 11 miembros, incluyendo OprM, OprN y OprJ forman una subclase filogenética que, presumiblemente, forma parte de sistemas de reflujo de múltiples antibióticos. De las 7 restantes, una de ellas está involucrada en el reflujo de cationes como un mecanismo de detoxificación; otra, la AprF, está involucrada en la secreción de una proteasa alcalina sintetizada por *P. aeruginosa*, mediante un sistema de secreción de tipo I (AprDEF); una tercera, la OmpH es el miembro homólogo a la TolC de *E. coli* y las otras cuatro, OpmF, OpmK, OpmL y OpmM, son componentes de sistemas de secreción de tipo I, los sustratos de las cuales todavía se desconocen.

La OprM es la proteína de reflujo mayoritaria, implicada en la resistencia intrínseca a múltiples antibióticos (figura 1.8). Su delección disminuye de 10-1000 veces la susceptibilidad a antibióticos de diferentes tipos. Mutaciones en el gen *nalB* (*mexR*) pueden hacer que exista una sobreexpresión de OprM y las proteínas que forman con ella el sistema de reflujo MexAB-OprM, Mex A y Mex B, lo que proporciona resistencia a múltiples antibióticos como la tetraciclina, la norfloxacin, la ciprofloxacina, el cloramfenicol, y otras quinolonas y β -lactámicos [69]. El sistema MexAB-OprM es bastante homólogo a la AcrAB de *E.coli*. La expresión del operón *mexAB-oprM* es inducida bajo condiciones limitantes de hierro y parece estar corregulada con componentes del sistema de transporte de hierro a través del sideróforo pioverdina. Poole *et al.* [70] sugirieron que este operón estaba involucrado en la secreción de pioverdina (un agente quelante de hierro) y que esto explicaba su capacidad para conferir resistencia a antibióticos como tetraciclina, cloramfenicol y compuestos que unen hierro; pero parece, que este sistema está más relacionado con el reflujo de metabolitos secundarios que con la extrusión de pioverdina. También se cree que la OprM colabora con el sistema de reflujo de MexX-MexY, que participa en la resistencia a aminoglicósidos [71].

OprJ y OprN no se expresan en condiciones normales de crecimiento, pero pueden ser expresadas, a causa de una mutación, como parte de los operones *mexCD-OprJ* y *mexEF-OprN*, lo que confiere resistencia a múltiples antimicrobianos [69]. Las mutaciones que provocan esta sobreexpresión, se dan en el gen *nfxB*, que funciona como represor del sistema y *mexT* (*nfxC*) que funciona como activador. Las mutaciones en *mexT* coordinan una sobreexpresión del sistema MexEF-OprN y una baja expresión de OprD [72,73].

Respecto las **porinas específicas** se sabe que *Pseudomonas* tiene, por lo menos, tres: **OprB**, **OprP/O** y **OprD**. OprB es el miembro homólogo en *P. aeruginosa* más cercano a la porina específica de *E.coli* LamB, y es inducida cuando el microorganismo crece en un medio suplementado con glucosa como única fuente de carbón, de manera que se considera una porina específica para los carbohidratos en general. OprP tiene un peso molecular de 48KDa y su expresión está inducida en condiciones de baja concentración de fosfatos, de manera que está implicada en el sistema inducible de elevada afinidad al fosfato (PTS); se diferencia de la OprO porque esta última tiene una afinidad superior por el pirofosfato que por el fosfato, como en el caso de OprP. La proteína OprD fue identificada inicialmente como la porina que se perdía cuando aislados clínicos de

P. aeruginosa se hacían resistentes al antibiótico β -lactámico imipenem, pero se ha demostrado que es una porina que además, une aminoácidos básicos, dipéptidos que contienen un residuo básico, imipenem y carbapenems zwitterionicos relacionados (incluido el meropenem) [74]. Es la porina homóloga de *P. aeruginosa* más cercana a la porina OmpF de *E. coli*.

1.4.3 La proteína OprD y su relación con la resistencia a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*

El gen que codifica OprD fue mapado, en 1991, entre los minutos 71 y 75 del cromosoma de *P. aeruginosa* [75]. Este gen codifica una proteína de 420 aminoácidos, que como ya hemos comentado, permite el paso hacia el interior celular de aminoácidos básicos, pequeños péptidos que contienen estos aminoácidos, y su análogo estructural, el antibiótico β -lactámico imipenem [76,77]; también se ha comprobado, que puede facilitar la difusión de gluconato, en condiciones limitantes de crecimiento. Experimentos de competición entre substratos confirman que los aminoácidos básicos y el imipenem comparten lugares comunes de unión dentro del canal de la OprD, es por tanto, una porina específica, pero a pesar de ello, es la primera porina específica, cuya secuencia puede alinearse con miembros de la superfamilia de porinas no específicas.

Esta proteína forma parte de una familia de 19 miembros, que podría dividirse en dos subfamilias: el grupo OprD, que incluye 8 miembros implicados en el transporte de aminoácidos y péptidos, y el grupo de la OpdK que presenta 11 miembros que participan en el transporte de fuentes de carbón orgánicas. La OprD es el único miembro de esta familia implicado en el transporte de antibióticos.

Los antibióticos carbapenémicos, como el imipenem y el meropenem, representan una opción terapéutica viable para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*, ya que no son inactivados por la β -lactamasa cromosómica que presenta este microorganismo. Estas moléculas cruzan la membrana de este microorganismo a través de la porina específica OprD, aunque el meropenem lo hace en menor grado.

La estructura de los monómeros de OprD, como la de todos los monómeros de las porinas, consta de 16 láminas- β antiparalelas que forman un cilindro o barril con cortos giros en la cara periplásmica (que presentan de dos a nueve residuos) y ocho largos *loops* en la cara externa de la célula siendo, en este caso, el *loop* 3 es el más largo de todos, y el que se pliega dentro del poro formando su constricción. A falta de un modelo de la proteína basado en la cristalización, que todavía no se ha conseguido, Hancock *et al.* [78] realizaron en 1995 una predicción de la topología de la estructura de esta proteína (figura 1.11) mediante alineamiento de la secuencia de aminoácidos (figura 1.10) con miembros de la superfamilia de porinas no específicas y construyeron mutantes de diferentes regiones para observar como afectaban estas a su estructura y funcionalidad. Esta topología fue corregida, años más tarde, para los *loops* 2 a 4 [79].

```

1   atgaaagtgatgaagtggagcgcattgcactggcgggtttccgcaggtagcactcagttcgccgtggccgac
   M K V M K W S A I A L A V S A G S T Q F A V A D
73  gcattcgtcagcgatcaggccgaagcgaaggggttcacgaagacagcagcctcgacctgctgctccgcaac
   A F V S D Q A E A K G F I E D S S L D L L L R N
145  tactatattcaaccgtgacggcaagagcggcagcggggaccgcgctcgactggaccaaggttccctcaccacc
   Y Y F N R D G K S G S G D R V D W T Q G F L T T
217  tatgaatccggcttcaccaaggaactgtgggcttcggcgctgatgccttcggctacctgggctgaagctc
   Y E S G F T Q G T V G F G V D A F G Y L G L K L
289  gacggcaacctccgacaagaccggcaccggcaacctgcccgggtgatgaacgacggcgaagccgctgactac
   D G T S D K T G T G N L P V M N D G K P R D Y
361  agccgcgcccggcggcgccgtgaaggtgcgcatctccaagaccatgctgaagtggggcgagatgcaaccgacc
   S R A G G A V K V R I S K T M L K W G E M Q P T
433  gccccggtcttcgcccgtggcggcagccgctgttccgcagaccgcgaccggctccagctgcagagcagc
   A P V F A A G G S R L F P Q T A T G F Q L Q S S
505  gaattcgaagggtcgacctcgaggcaggccacttcaccgagggcaaggagccgaccaccgtcaaatcgcg
   E F E G L D L E A G H F T E G K E P T T V K S R
577  ggcaactctatgccacctacgcagggcagcagccagagcggcagatttcattggggctccgctacgcaac
   G E L Y A T Y A G E T A K S A D F I G G R Y A I
649  accgataacctcagcgcctccctgtacggcggcgaactcgaagacatctatcgccagtattacctgaacagc
   T D N L S A S L Y G A E L E D I Y R Q Y Y L N S
721  aactacaccatcccactggcatccgaccaatcgctgggcttcgatttcaacatctaccgcacaaacgatgaa
   N Y T I P L A S D Q S L G F D F N I Y R T N D E
793  ggcaaggccaagggcggcagatcagcaacaccacttgggtccctggcggcagcctacactctggatggcgcac
   G K A K A G D I S N T T W S L A A A Y T L D A H
865  actttcaccttggcctaccagaaggtccatggcgatcagccggtttgattatatcggttcggcgcgaacggc
   T F T L A Y Q K V H G D Q P F D Y I G F G R N G
937  tctggcgcaggtggcgcactcgatttccctcgccaactctgtccagttactccgacttcaacggccctggcgag
   S G A G G D S I F L A N S V Q Y S D F N G P G E
967  aaatcctggcaggtcgcgtacgacctgaacctgacctcctatggcgttccggcctgactttcatggtccgcg
   K S W Q A R Y D L N L A S Y G V P G L T F M V R
1009  tatatcaatggcaaggacatcgatggcaccagaatgtctgacaacaacgtcggctataagaactacggctac
   Y I N G K D I D G T K M S D N N V G Y K N Y G Y
1081  ggcgaggatggcaagcaccacgaaaccaacctcgaagccaagtacgtggtccagttccgggtccggccaaggac
   G E D G K H H E T N L E A K Y V V Q S G P A K D
1153  ctgtcgttccgcacccggcagcctggcaccgtgccaacgcccaccaggggcgaaggcgaccagaacgagttc
   L S F R I R Q A W H R A N A D Q G E G D Q N E F
1225  cgctgatcgtcgactatccgctgtcgatccctgtaa
   R L I V D Y P L S I L -

```

Figura 1.10 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la porina OprD de *P. aeruginosa*. Las secuencias que corresponden a los diversos *loops* se han marcado con diferentes colores: verde, L1; azul, L2; naranja, L3; negro, L4; amarillo, L5; rojo, L6; lila, L7 y marrón, L8.

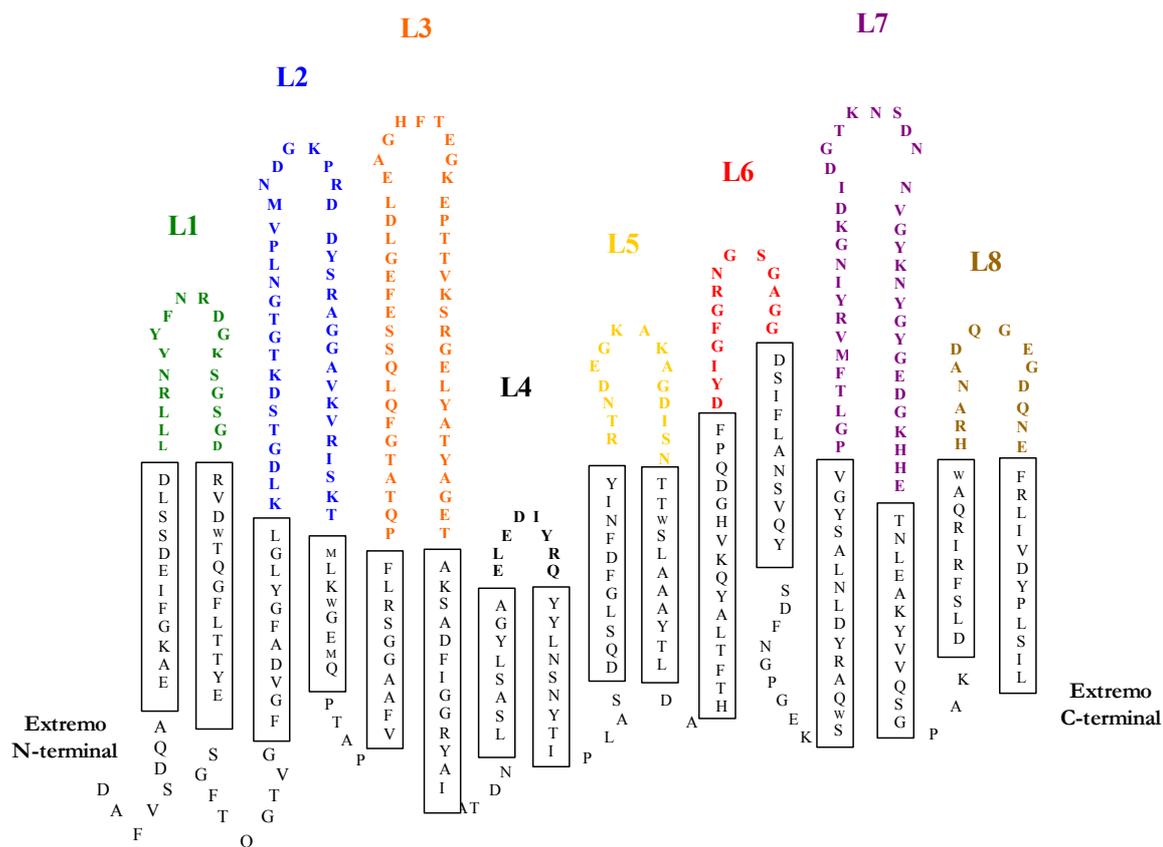


Figura 1.11 Esquema de la topología de membrana de la OprD. Las 16 láminas- β transmembranales están recuadradas, y los ocho *loops* externos están etiquetados como L1 a L8.

Se ha observado que mutaciones, concretamente deleciones de cuatro y ocho aminoácidos, de los *loops* L1, L2, L5, L6, L7 y L8, no cambian sustancialmente la conformación nativa, y las proteínas mutantes resultantes se insertan igualmente en la membrana. Por el contrario, una deleción en L3 causa una expresión disminuida de la proteína, por lo tanto esta mutación, pese a ser “tolerada” por la proteína, podría ser importante para el plegamiento de ésta, de manera que su estructura quedaría afectada de tal manera que implicaría una producción de la proteína reducida, o bien la producción de un producto inestable. Sin embargo, deleciones en el L4 no permiten una expresión estable de OprD.

Todo esto demuestra que de una manera general, se podría decir que deleciones o inserciones en las porinas, serían no disruptivas, siempre que estas ocurran en los *loops* externos; por ello en la comparación de diversas porinas de diferentes familias se observa una variación sustancial en la longitud de estos *loops*, en contraste a una elevada homología en las láminas- β .

Una posible explicación a esto, sería que la presión selectiva ambiental, causada por ejemplo por fagos o incluso por antibióticos, podría jugar un importante papel en “forzar” a ciertas regiones de estas proteínas a evolucionar a una tasa más elevada, que a otras regiones. Estos *loops* externos serían más “libres” para cambiar, sin alterar la secreción, plegamiento y función de la proteína, debido a su situación en la célula, ya que están más expuestos al medio externo. Esto no ocurriría, sin embargo, si estas mutaciones afectaran a los segmentos transmembrana, en cuyo caso se inhibe la biogénesis de la proteína.

Respecto a la relación con la susceptibilidad a los antibióticos, especialmente con el imipenem, se sabe que deleciones en L1 y L6 no tienen efectos en la susceptibilidad a los antibióticos, por lo que no estarían implicados ni en el tamaño ni en la selectividad del canal. Por el contrario deleciones en L2 y L3 hacen que la porina pierda la habilidad de unir imipenem. El L2 está implicado en la unión al imipenem, aunque no se sabe con certeza si este *loop* está implicado en estabilizar L3 que es el que contiene el verdadero lugar de unión a este antibiótico, o bien si es que L2 representaría un lugar adicional de unión, no localizado en la zona de constricción del canal [79].

Sin embargo, mutaciones en L5, L7 o L8, no tienen influencia en la unión del imipenem a la proteína, aunque hacen que el microorganismo presente una susceptibilidad superior a múltiples antibióticos (entre ellos el meropenem), lo que indica que estos *loops* participan, de alguna manera, en la constricción del canal, limitando el movimiento inespecífico de moléculas a través de la OprD y haciendo que esta proteína varíe de porina específica a porina general. De esta manera, deleciones en estos *loops* resultarían en un canal más abierto, que permitiría un aumento significativo en la permeabilidad a antibióticos que normalmente son excluidos, como por ejemplo β -lactamas (cefpiroma, cefotaxima y aztreonam), quinolonas (ciprofloxacina y fleroxacima), cloranfenicol y tetraciclina. También se ha observado que la región C-terminal de la proteína, específicamente L7, modula la susceptibilidad al meropenem, cuando un acortamiento de este *loop* permite una mayor apertura del canal permitiendo el paso de este carbapenémico [80]. Esto podría ser debido a que estos *loops* se plegarían parcialmente en el canal de la OprD, restringiendo su diámetro en la entrada [81]. Pirnay *et al.* [82] observaron que mutaciones en el L7 (concretamente un cambio de aminoácido) podían provocar un cambio conformacional en él, impidiendo el paso de los carbapenems, pero no eliminando la proteína de la membrana celular.

Según todos estos datos Hancock *et al.* propusieron un modelo del paso del imipenem (y de los aminoácidos básicos) por el canal de la OprD: los *loops* externos funcionarían como un filtro primario, concentrando sustratos según su tamaño y carga, especialmente cuando estos se encuentran en bajas concentraciones. El sustrato, entraría entonces en la boca del canal, constreñido por L5, L7 y L8. Los pequeños péptidos y el imipenem, por su estructura, excederían el límite de exclusión del canal, así que residuos aminoacídicos situados en la boca del canal serían los encargados de orientarlos correctamente, para alinearlos con el eje del poro; esta función podría estar realizada por residuos que pertenecen al L2. El sustrato, entonces llegaría hacia la mitad del canal donde se encontraría con la zona de constricción, lugar en el que residuos cargados del L3 y/o L2 y de las láminas- β , se unirían a las moléculas de sustrato de una manera altamente estereoespecífica, es decir, teniendo en cuenta el tamaño, la geometría, y la carga. Una vez unidos a las estrechas zonas de constricción del canal, los sustratos podrían continuar su camino hacia la zona periplasmática, y de allí al interior celular.

Los análisis de los aislados clínicos, también demuestran todas estas observaciones realizadas *in vitro*. El tratamiento prolongado con imipenem de pacientes con infecciones causadas por *P. aeruginosa*, conduce a la aparición de mutantes resistentes al imipenem, debido, típicamente, a una pérdida de OprD [83]. La pérdida de esta proteína de las membranas puede ocurrir tanto a nivel de transcripción, como de traducción.

Mutaciones en el gen *oprD*, ya sean transiciones, duplicaciones o deleciones pueden generar un codón stop prematuro y una terminación temprana de la traducción [82], que también puede estar producida por un cambio en la pauta de lectura que genera un nuevo codón stop; además, se ha visto que algunas deleciones pueden interferir con la expresión de esta proteína a nivel transcripcional, por ejemplo deleciones que afectan al promotor, al codón de inicio y a la secuencia Shine-Dalgarno, previenen la iniciación de la transcripción [84].

En ausencia de mutaciones en el gen *oprD*, su expresión puede estar reprimida en los mutantes de tipo *nfxC* que, además superexpresan el operón *mexEF-oprN* que da lugar a la bomba de reflujo MexEF-OprN [85]. Para que esto último ocurra ha de estar implicada la proteína de regulación MexT, codificada por el gen *mexT*; esta proteína regula positivamente la expresión del operón *mexEF-oprN*, pero actúa como represor de la

transcripción de *oprD*. También se ha visto que MexT puede tener un efecto post-transcripcional causando una fuerte reducción de la producción de proteína [73]. Como resultado, estos mutantes, además de ser resistentes a los carbapenems, también lo son a las quinolonas, debido a la acción de la bomba MexEF-OprN. Además, se ha observado que en algunos aislados clínicos la represión de la expresión de *oprD* puede ocurrir por una inactivación insercional en este gen. Se ha visto que pueden existir largos insertos en el gen, que pueden corresponder, en algunos casos, a elementos genéticos móviles, denominados secuencias de inserción o IS, los cuales provocan una disrupción en el gen dando lugar a una resistencia al imipenem [86].

Por lo tanto, la resistencia al imipenem y, una susceptibilidad reducida al meropenem, en *P. aeruginosa* siempre se ha asociado a la pérdida de OprD, combinada con la actividad de la β -lactamasa cromosómica AmpC, mientras que la sobreexpresión de la bomba de reflujo MexAB-oprM es considerada la causante de la resistencia al meropenem. Recientemente, algunos autores han observado la existencia de cepas clínicas que presentan patrones de resistencia que no pueden ser explicados mediante estos mecanismos de resistencia, comúnmente aceptados [87]. Estos autores han encontrado, cepas sensibles al imipenem que, sin embargo presentan mutaciones en el gen *oprD* que dan lugar a una terminación prematura de la traducción o a un cambio de la pauta de lectura en cierto punto del gen, que vuelve a ser restablecido más tarde, también debido a una mutación. También han visto cepas con sensibilidad intermedia al imipenem que presentan cambio de la pauta de lectura que no vuelve a ser restablecido, e incluso cepas resistentes que presentan mutaciones de baja importancia respecto a la resistencia al imipenem.

Todas estas mutaciones indicarían que el imipenem presenta otra puerta de entrada a la célula y, que por tanto existiría otro mecanismo implicado en los altos niveles de resistencia a este carbapenem en ciertos aislados clínicos; de hecho, la presencia de otras porinas, diferentes de OprD, para la entrada del meropenem a las células ya ha sido propuesta [88,89] y, aunque por el momento no se han identificado, se sabe que en el genoma de *P. aeruginosa* existen 14 pautas de lectura abierta que presentan elevada homología con las porinas OprD y OprE [90].

1.5 LOS INTEGRONES

Los integrones fueron descritos por primera vez en 1980, aunque fueron definidos posteriormente por Hall y Collis [91] como elementos que contienen determinantes genéticos del sistema de recombinación lugar-específico, el cual reconoce y captura *cassettes* génicos móviles. El origen de estas estructuras es confuso y, aunque existen varias hipótesis, los investigadores no han llegado todavía a un acuerdo.

Estas estructuras participan en la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos entre cepas bacterianas, aunque son elementos defectivos en auto-transposición, es decir, por sí mismos no son elementos móviles, y se encuentran frecuentemente como parte de transposones, que pueden localizarse tanto en el cromosoma como en plásmidos conjugativos, que les sirven como vehículos para su transmisión intra e interespecífica. Por tanto, representan uno de los mecanismos existentes de transmisión de la información genética entre bacterias.

Se han diseminado ampliamente entre la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas, sobretodo *Pseudomonas* y *Vibrio*, aunque también se han descrito en algunas bacterias grampositivas como por ejemplo *Corynebacterium glutamicum*.

Existen diversas clases de integrones según la secuencia de la integrasa (*intI*), aunque los más implicados en la diseminación de la resistencia a los antibióticos y, por ello los más estudiados, son los de la clase 1, seguidos de los de clase 2 y 3. Los integrones de clase I se han aislado en múltiples géneros de Gram negativos, pero también se han encontrado en otras bacterias como *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium fortuitum* e incluso en *Enterococcus faecalis*. Los integrones de clase 2 están incluidos en la familia de transposones Tn7 y sus derivados. Este tipo de integrones ha sido encontrado en *Acinetobacter*, *Salmonella*, y *Shigella*. Los integrones de clase 3 han sido descritos en *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Klebsiella pneumoniae*. Los tres tipos de integrones pueden adquirir los mismos *cassettes* génicos.

1.5.1 Estructura

Los integrones poseen dos segmentos conservados, 5'-CS (5' conserved segment) y 3'-CS (3' conserved segment), separados por una región variable que incluye los *cassettes* génicos, que son pautas de lectura abiertas que codifican para diversas funciones (figura 1.12).

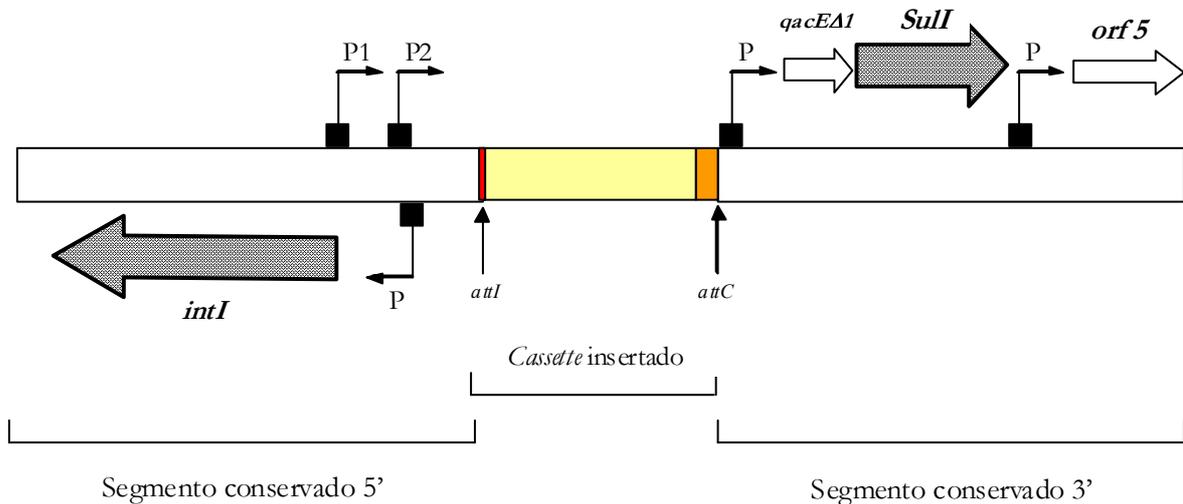


Figura 1.12 Estructura general de los integrones de clase 1. Las flechas marcan la dirección de la transcripción. P, P1 y P2, indican la posición y orientación de los diversos promotores. *attI* y *attC*, son las secuencias de reconocimiento de las integrasas para la integración de los *cassettes* génicos.

La región 5'-CS codifica el gen de la integrasa (*intI*) y además presenta tres promotores: P, que permite la expresión de esta enzima; P1 (también llamado P_{ANT}), que permite la expresión de los *cassettes* génicos insertados, que normalmente, carecen de promotor y, P2, que frecuentemente es inactivo ya que solo presenta 14nt entre las cajas -35 y -10, en vez de los 17nt óptimos. Han sido descritos por lo menos cinco promotores P1 diferentes y dos P2, que pueden estar en diversas combinaciones. A continuación del gen de la integrasa encontramos una secuencia de reconocimiento de la integrasa, para la integración de los *cassettes* denominada *attI* (*attachment site*).

El *attI1* requiere presentar como mínimo 40pb y como máximo 70pb para ser activo totalmente. Posee una región conservada de siete pares de bases en el lugar de la recombinación, la cual tiene la secuencia GT^{*}TRRRY, donde R puede ser cualquier purina e Y cualquier pirimidina, aunque las bases que se encuentran con más elevada frecuencia son GTTAGGC. Esta secuencia la comparte con una región llamada *core* situada en el *attC* de los *cassettes* génicos.

Las integrasas de los integrones pertenecientes a las clases 1-3 se denominan *IntI* 1-3 respectivamente. Éstas pertenecen a la familia de las tirosinas recombinasas, la cual se caracteriza por la presencia invariable de los aminoácidos RHRY en las regiones conservadas denominadas box 1 y Box 2. La integrasa de tipo 1 (*IntI1*) es una proteína de 337 aminoácidos que reconoce tres tipos de lugares de recombinación: *attI1*, *attC* (situada en los *cassettes* génicos) y otros lugares secundarios. La integrasa de tipo 2 (*IntI2*) presenta una secuencia de aminoácidos con una homología menor al 50% con la de *IntI*; suele ser no funcional, debido a la presencia de un codón stop interno, de manera que la integración y la escisión de *cassettes* es dependiente, en este tipo de integrones, de otro tipo de integrasa. Muchas veces, debido a que los integrones de clase 2 se encuentran en organismos que también poseen un integrón de clase 1, es la integrasa de éstos quien realiza la función [92]. Las propiedades de la *IntI3* son similares a las de la *IntI1*, y además su secuencia presenta una homología del 61% con *IntI1*. *IntI3* es capaz de reconocer diferentes *attC* e integrar los *cassettes*, así como realizar su escisión. También puede realizar la recombinación entre *attC* y lugares de recombinación secundarios, aunque a una menor frecuencia que *IntI1*.

El extremo 3'-CS, en los integrones de clase I, presenta tres pautas de lectura abiertas. La primera, *qacEΔ1*, es un derivado truncado del gen *qacE* que confiere resistencia a amonios cuaternarios. La segunda pauta de lectura corresponde al gen *sul1* que confiere resistencia a las sulfonamidas. La tercera pauta, *orf5*, no codifica ninguna función conocida hasta el momento. El extremo 3'-CS de los integrones de clase 2 y 3 no presenta una estructura tan conservada como el extremo 5'-CS, por ejemplo en el caso de los integrones de clase 2, 3'-CS presenta genes relacionados con el mecanismo de transposición de Tn7.

1.5.2 *Cassettes* génicos: estructura y función

Los *cassettes* génicos presentan tamaños y funciones variables y, sin embargo, tienen una estructura común. Consisten básicamente, en una secuencia codificante que en el extremo 3' presenta un lugar de recombinación denominado *attC*.

Los elementos *attC* son repeticiones invertidas imperfectas. El primer *attC* descrito presentaba 59pb de longitud, por ello el término “elemento 59-bp” o 59-be, se utiliza comúnmente, aunque los *attC* no son secuencias altamente conservadas y varían de 57 a 141 pb de longitud [93].

Dos secuencias de siete pares de bases denominadas *core* y *core* inverso se encuentran en los extremos de cada *attC*. El *core* se localiza en el extremo 3' del *attC*, y presenta una secuencia consenso GTT^{*}RRRY (que con mayor frecuencia es GTTAGGC); mientras que el *core* inverso está localizado en el extremo 5' y su secuencia consenso es RYYAAC (frecuentemente GCCTAAC). Además a la izquierda del *cassette* insertado, también se encuentra la secuencia consenso GTT^{*}RRRY, del *attI*, de manera que el *cassette* queda flanqueado por dos secuencias iguales (figura 1.13).

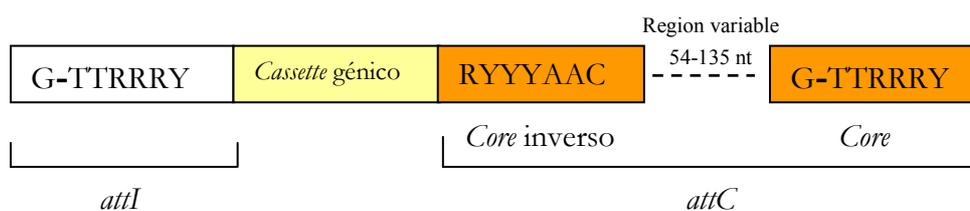


Figura 1.13 Estructura de un *cassette* génico. El *attC* está formado por el *core* y por el *core* inverso, separados por una región variable. Los extremos del *cassette* están definidos por dos *cores*, el del *attI*, a la izquierda del *cassette* y, el del *attC*, a su derecha. La recombinación tiene lugar entre la G del primer *core* y la T del segundo (en el esquema se ha marcado con un guión). R, purina; Y, pirimidina.

La integración y la escisión de los *cassettes* está mediada por la integrasa. La integración se produce por un mecanismo de recombinación lugar-específica, en el que la integrasa reconoce el *attI* del integrón y el *attC* del *cassette* y realiza la recombinación entre la G del *attI* y la T del *core*. La recombinación puede tener lugar entre *attI* y *attC*, o bien entre dos *attC*, si ya existen *cassettes* integrados en la estructura, y además puede implicar a un lugar no específico denominado lugar secundario (que generalmente presenta la secuencia GWTMW (W: T/A; M: A/C)). Esta recombinación mediante un lugar secundario ocurre con muy baja frecuencia, pero permitiría la integración de *cassettes* fuera del integrón aunque esta integración no sería reversible, es decir, al no reconstruirse de nuevo las secuencias *attC*, la escisión de los *cassettes* no volvería a ser posible.

Los *cassettes* no suelen incluir promotores, por lo que normalmente se expresan por acción de un promotor común localizado en la región 5'-CS de integrón, el P1. Dentro de un mismo integrón pueden coexistir varios *cassettes* (denominados *cassette array*), y aunque suelen insertarse en la misma dirección, lo que permite su expresión, ésta no es uniforme: los *cassettes* distales presentan una expresión reducida por la presencia de los *cassettes* más proximales, ya que las repeticiones invertidas de los *attC* previos formarían *loops* que

podrían silenciar completamente la expresión de los *cassettes* más distales, funcionando también así como terminadores de la transcripción. Esto afectaría al nivel de resistencia alcanzado por el microorganismo a los antibióticos, cuyos genes de resistencia están codificados por el *cassette array*; el mayor nivel sería adquirido cuando el *cassette* se encuentra inmediatamente después del extremo 5'-CS, y por tanto más cerca del promotor P_{ANT} [94].

La estabilidad en el orden de los *cassettes*, también es objeto de debate, ya que los análisis de los tipos de integrones predominantes en múltiples hospitales europeos parecen mostrar que son estructuras estables, pues se han encontrado combinaciones conservadas de *cassettes* génicos tanto entre aislados procedentes de orígenes diversos, como de bacterias sometidas a presión antibiótica durante largos periodos de tiempo [95]; en cambio, los estudios *in vitro* demuestran que pueden existir cambios de orden de los *cassettes* dentro del integrón, aunque aparentemente, esta reorganización se daría únicamente en condiciones ambientales específicas. Además de reorganizaciones, también pueden darse deleciones y duplicaciones de los *cassettes* [96]. La escisión de los *cassettes* génicos está también mediada por la integrasa; una vez “libre”, cada *cassette* forma un intermediario circular la integración del cual en el *attI* del mismo integrón (lugar de recombinación por el que la integrasa tiene mayor afinidad) o en lugares secundarios, llevaría a nuevas reorganizaciones de los *cassettes* génicos dentro de los integrones.

El intercambio de *cassettes* entre diferentes integrones, a penas ha sido estudiado; el único estudio realizado *in vitro* con *Salmonella enterica* como donador y varios plásmidos como aceptores demuestra que sí es posible, dependiendo del tipo de plásmido utilizado [97].

Aparentemente los *cassettes* génicos se integran al azar aunque las combinaciones más útiles para los microorganismos que las llevan son las que se seleccionan con más frecuencia por las condiciones ambientales [98].

Suelen codificar genes de resistencia para múltiples antibióticos, incluso de aquellos que, clínicamente, hace mucho que dejaron de usarse como la estreptomina y la espectinomina; también pueden codificar genes de resistencia a diversos antisépticos. Se han identificado más de sesenta *cassettes* génicos diferentes implicados en la resistencia a los antimicrobianos.

Los grupos más importantes de antibióticos a los que confieren resistencia son los β -lactámicos y los aminoglicósidos, aunque también codifican con elevada frecuencia genes relacionados con la resistencia a trimetoprim y cloranfenicol. También se han aislado pautas de lectura abiertas de las que se desconoce la función, pero asociadas a *attC* en forma de *cassettes* génicos [99].

Un integrón puede presentar desde cero *cassettes* integrados (integrón “vacío”) hasta cinco o seis de ellos. Las combinaciones de genes son múltiples, e incluso pueden existir *cassettes* repetidos dentro de un mismo integrón.

1.5.3 Implicaciones

La existencia de estructuras muy similares a los integrones y que codifican determinantes diferentes a la resistencia a antibióticos o desinfectantes (por ejemplo funciones bioquímicas o factores de virulencia) en aislados del género *Vibrio* de 1888 [100], sugiere la implicación de estas estructuras en la evolución del genoma bacteriano antes de la era antibiótica. Podrían ser estructuras que habrían proporcionado a las bacterias una rápida habilidad de adaptación, mediante la adquisición de determinantes que les conferirían una ventaja selectiva (por ejemplo, genes que les proporcionarían nuevas funciones bioquímicas o de virulencia y, posteriormente resistencia a los antibióticos). La variedad de combinaciones encontradas en los integrones, después de más de medio siglo de uso de los antibióticos, es el testamento de la flexibilidad genética y la adaptabilidad del genoma bacteriano bajo condiciones de estrés. Además esta flexibilidad permitiría una rápida adaptación a cambios impredecibles en los nichos ecológicos, permitiendo captar genes externos que les permitirían sobrevivir; del mismo modo, aquellos genes que no presentasen una función útil para el microorganismo, serían eliminados.

Estudios realizados en diversos hospitales europeos, han demostrado que los aislados integrón-positivos son estadísticamente más susceptibles de ser resistentes a los aminoglicósidos, las quinolonas y los β -lactámicos que los aislados integrón-negativos, incluso si estos determinantes de resistencia no están presentes en los integrones [101].

De igual manera que en las poblaciones ambientales, los clones bien establecidos en las poblaciones clínicas aumentan su genotipo de resistencia mediante la adquisición de nuevos genes, y uno de los mecanismos por los que esto es posible, es la adquisición de integrones; éstos son portadores de genes que facilitan el proceso de selección de organismos, en el cual no solo los clones resistentes o mejor adaptados serían seleccionados, sino que también lo serían sus estructuras genéticas que portan los genes de resistencia. Estas resistencias pueden posteriormente ser transmitidas a otros microorganismos que comparten de manera permanente o transitoria el mismo nicho ecológico. De este modo los integrones participarían en la emergencia y la persistencia de resistencia en las poblaciones clínicas, pues la presencia de genes de resistencia en clones específicos les proporciona una ventaja selectiva, que les permite competir con éxito en ambientes con elevada presión, permitiendo así su persistencia y diseminación en las poblaciones [102].

Por otro lado, la fuente de integrones en el ambiente hospitalario, es también tema de debate. Se cree que el ambiente extrahospitalario es un reservorio potencial, ya que aproximadamente el 40% de los nuevos pacientes presentan aislados que contienen, al menos, un integrón. El uso de antibióticos en granjas ha sido considerado un factor que contribuye en gran medida a la resistencia a los antibióticos, y existen estudios en los que se han identificado integrones de clase 1 en aislados procedentes de gatos, cerdos, pollos, vacas, peces, perros y otros animales de zoológico, así como en cepas de *Pseudomonas spp.* procedentes de manzanas [103]. Por tanto, los integrones no están presentes únicamente en microorganismos patógenos, sino que también han sido hallados en bacterias procedentes de muestras ambientales, tanto de agua, como de tierra. Sin embargo, a pesar de la presencia de integrones en los animales de granja, no se descarta una contribución del reservorio humano hacia los animales.

2. OBJETIVOS

La línea principal de investigación de nuestro grupo de trabajo se centra en los mecanismos moleculares de extensión de los caracteres de resistencia de las bacterias Gram negativas a los agentes antimicrobianos. La presente tesis se inscribe en el núcleo de la actividad del grupo.

Se ha pretendido explorar las relaciones existentes entre aislamientos clínicos y ambientales de *Pseudomonas aeruginosa* en relación a la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

Este objetivo de carácter general se puede subdividir en los siguientes apartados:

1. Aislar cepas ambientales y seleccionar cepas clínicas aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge.
2. Determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de los distintos aislamientos y comparar las posibles diferencias de susceptibilidad entre los grupos.
3. Explorar la contribución de las propiedades de la membrana externa a los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos.
4. Analizar la variabilidad fenotípica y genotípica de los aislados en base a la información obtenida de metodologías moleculares como: perfiles electroforéticos de las proteínas de la membrana externa (OMPs), electroforesis en campo pulsante (PFGE) y amplificación de fragmentos de DNA con cebadores aleatorios (RAPD).
5. Elaborar un modelo aproximativo de la estructura de las poblaciones de *P. aeruginosa* en el ambiente “Hospital Universitario de Bellvitge” (Hospital y entorno).
6. Estudiar la eventual presencia de integrones en los dos grupos de bacterias y determinar los genes que incorporan.
7. Estudiar las mutaciones de la proteína OprD y su relación con la resistencia a los antibióticos en las cepas estudiadas.
8. Realizar una aproximación al modelo estructural de la proteína OprD.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MEDIOS DE CULTIVO

3.1.1. Caldo de triptona y soja (TSB)

Es un medio líquido de uso general, muy nutritivo que permite el desarrollo de bacterias tanto aerobias como anaerobias, y hongos. Debido a la inclusión tanto de la triptona como de la peptona de soja, el medio favorece un buen crecimiento de muchos organismos exigentes, sin la necesidad de añadir ningún otro componente (por ejemplo suero). Casa comercial utilizada *Scharlau*.

Su *composición* en g/l es:

Peptona de caseína	17.0
Peptona de Soja	3.0
Cloruro de Sodio (NaCl)	5.0
Fosfato de potasio dibásico (KH ₂ PO ₄)	2.5
Dextrosa.	2.5

Preparación. Se disuelven 30 g de producto en un litro de agua destilada, y se calienta hasta su completa disolución. Posteriormente se ajusta el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C, y por último, se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.

3.1.2 Luria Broth (LB)

Medio nutritivo utilizado para estudios de genética molecular (extracción de DNA cromosómico y plasmídico), ya que su riqueza nutritiva y simplicidad de composición permiten modificaciones fáciles y rápidas. Casa comercial utilizada *Scharlau*.

Su *composición* en g/l es:

Peptona tríptica de caseína	10.0
Extracto de levadura	5.0

Preparación. Se disuelven 15 g de producto en un litro de agua destilada, y se calienta hasta su completa disolución. Posteriormente se ajusta el pH a 7.2 ± 0.2 a 25°C, y por último, se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.

3.1.3 Agar *Pseudomonas* de glutamato y almidón (GSP)

El medio sólido GSP Agar (*Glutamate Starch Pseudomonas Agar*) es un medio semiselectivo y diferencial para el aislamiento de *Pseudomonas-Aeromonas*. La selectividad se consigue gracias a los antibióticos (Penicilina y Pimaricina) junto al glutamato, difícil de metabolizar por los bacilos Gram negativos. La diferenciación entre *Pseudomonas* y *Aeromonas* se basa en la utilización del almidón que se detecta por el viraje de pH ácido del rojo de fenol. Casa comercial utilizada *Scharlau*.

Su *composición* en g/l es:

L (+) Glutamato sódico	10.0
Almidón soluble	20.0
Fosfato monopotásico	2.0
Sulfato de magnesio	0.50
Rojo de fenol	0.36
Agar-agar	15.00

Preparación. Se disuelven 48 g del producto en un litro de agua destilada y se lleva a ebullición. Se ajusta el pH a 7.2 ± 0.2 a 25°C y se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C. Se deja enfriar a 50°C, y se añaden 100.000 u.i de penicilina G sódica y 0.01g de pimaricina por litro y, por último, se distribuye en placas de Petri estériles.

3.1.4 Agar de Mueller-Hinton (MHA)

Medio nutritivo utilizado en los experimentos de sensibilidad a agentes antimicrobianos mediante el método de difusión en agar. Casa comercial utilizada *Scharlau*.

Su *composición* en g/l es:

Peptona	17.5
Almidón	1.5
Extracto de carne	4.0
Agar	15.0

Preparación. Se disuelven 22.5 g del producto en 1 l de agua destilada y se lleva a ebullición. Se ajusta el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C. Se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C y se distribuye en placas de Petri estériles.

3.1.5 BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) con glicerol al 10%

Medio líquido nutritivo utilizado para el crecimiento de las cepas, y como vehículo del DNA en la búsqueda de integrones. Casa comercial utilizada *Scharlau*.

Su *composición* en g/l es:

Infusión de cerebro y corazón	17.5
Peptona	10
Glucosa	2.0
Cloruro de Sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5

Preparación. Se disuelven 37.0 g del producto en 900 ml de agua destilada, se calienta hasta su completa disolución y se ajusta el pH a 7.4 ± 0.2 a 25°C. Posteriormente, se añade 10% v/v de glicerol y se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.

3.1.6 Medio de conservación

Medio utilizado para la conservación (por congelación) a largo plazo de las cepas bacterianas estudiadas, es el caldo de tripton y soja con glicerol.

Su composición es TSB y glicerol al 20%. El medio se prepara pesando 3 g de TSB que se resuspenden en 80 ml de agua destilada y, posteriormente, se añaden 20 ml de glicerol. Se mezcla bien y se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Para conservar los microorganismos a largo plazo, se realizó el siguiente procedimiento:

- Se partió de 5 ml de un cultivo en TSB incubado durante 18 horas a 37°C.
- A continuación, se centrifugó 1 ml de este cultivo en tubos *ependorf* a 8.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- El sedimento se resuspendió en 1 ml de medio de conservación.
- Se guardaron en tubos *ependorf* a -20°C hasta su utilización.

Si se parte de un cultivo en medio sólido, el crecimiento de la placa se resuspende en 1 ml de medio de conservación y se procede de la misma manera.

3.2 CEPAS BACTERIANAS

3.2.1 Descripción de las cepas utilizadas en el estudio de poblaciones

Se han utilizado un total de 40 cepas de *P. aeruginosa*, 20 de las cuales son de origen clínico y 20 de origen ambiental.

Las cepas clínicas proceden del *Servei de Microbiologia* de l'*Hospital Universitari de Bellvitge* y fueron recogidas de diferentes pacientes durante el mes de Marzo del 2003; las cepas ambientales fueron aisladas de muestras de agua y tierra del entorno hospitalario, durante los meses de Junio y Julio del mismo año. La tabla 3.1 resume el origen y la fecha de aislamiento de las cepas estudiadas.

Tabla 3.1 Relación de cepas de origen clínico y ambiental de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizadas en este estudio.

CEPAS CLÍNICAS			CEPAS AMBIENTALES		
Cepa	Fecha de aislamiento	Origen	Cepa	Fecha de aislamiento	Origen
ca	1/5/03	Orina	ea	18/6/03	Tierra
cb	1/5/03	Bronco aspirado	eb	1/7/03	Tierra
cc	5/5/03	Bronco aspirado	ec	1/7/03	Agua
cd	7/5/03	Orina	ed	7/7/03	Agua
ce	7/5/03	Espuito	ee	7/7/03	Agua
cf	7/5/03	Espuito	ef	7/7/03	Agua
cg	8/5/03	Espuito	eg	7/7/03	Agua
ch	9/5/03	Absceso	eh	7/7/03	Agua
ci	9/5/03	Bronco aspirado	ei	7/7/03	Agua
cj	12/5/03	Frotis perineal	ej	7/7/03	Agua
ck	14/5/03	Bronco aspirado	ek	11/7/03	Agua
cl	15/5/03	Espuito	el	11/7/03	Agua
cm	15/5/03	Espuito	em	15/7/03	Tierra
cn	16/5/03	Orina	en	16/7/03	Tierra
co	16/5/03	Orina	eo	17/7/03	Tierra
cp	17/5/03	Espuito	ep	18/7/03	Tierra
cq	18/5/03	Orina	eq	19/7/03	Tierra
cr	18/5/03	Orina	er	20/7/03	Tierra
cs	18/5/03	Orina	es	21/7/03	Tierra
ct	20/5/03	Orina	et	21/7/03	Tierra

3.2.2 Aislamiento e identificación de cepas ambientales de *P. aeruginosa*

Para el aislamiento de cepas ambientales se partió de muestras de agua y tierra recogidas en el entorno hospitalario, que fueron transportadas al laboratorio donde se procesaron de la siguiente manera:

- Se inoculó medio TSB (1:10) con cada una de las muestras recogidas y se incubaron durante 24 horas a 37°C (enriquecimiento de las muestras).
- Los cultivos enriquecidos se utilizaron para inocular placas de *Starch Glutamate Agar* (GSP Agar), mediante la utilización de un hisopo estéril.
- Las placas de GSP se incubaron durante 24h. a 37°C, y las colonias obtenidas fueron resembradas e identificadas.

Las colonias de color azul-violeta (presuntas *Pseudomonas spp.*) fueron aisladas e identificadas siguiendo métodos microbiológicos estándar, incluyendo: la morfología típica de bacilos cortos, por tinción Gram negativa; aerobios estrictos en el medio O/F (Oxidación/Fermentación) suplementado con glucosa; reacción positiva de la oxidasa; Kligler (no fermentadores, utilizando únicamente las peptonas); producción de pioverdina en el medio de King B [104]; reducción de Nitratos a gas Nitrógeno en el medio FN (medio fluorescencia-denitrificación); movilidad positiva en agar blando; habilidad de crecimiento en agar nutritivo a 42°C; utilización de citrato (citrato de *Simmons*); utilización de la urea (agar urea de *Christensen*) y test positivo de licuación de la gelatina.

3.2.3 Descripción de las cepas utilizadas en el estudio de integrones

Además de las cepas incluidas en el estudio de poblaciones, para el *screening* de la presencia/ausencia de integrones, se utilizó otra colección de cepas de *P. aeruginosa*. Las cepas P1, P2, P3 y P4 proceden de Portugal. Las cepas P16, P17 y P18 fueron cedidas por el *Hospital Ramón y Cajal* de Madrid. El resto de cepas proceden del *Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge*. La cepa P14 es una cepa de referencia (ATCC27853). Las parejas A-A', B-B', etc. son cepas aisladas del mismo paciente en momentos distintos y, que pese a presentar un patrón igual mediante PFGE, tienen diferente susceptibilidad a diversos antibióticos como los carbapenems. La descripción de estas cepas se recoge en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Relación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, añadidas en el estudio de integrones.

Cepa	Fecha de aislamiento	Origen	Cepa	Fecha de aislamiento	Origen
P1	2002	Portugal	19	13/5/03	Orina
P2	2002	Portugal	22	11/10/2005	Exudat Ferida
P3	2002	Portugal	26	13/5/03	Lavado
P4	2002	Portugal			boncoalveolar
P14	----	ATCC27853	30	14/5/03	Orina
P16	2002	Ramón y Cajal	A	5/5/04	Frotis rectal
P17	2002	Ramón y Cajal	A'	11/5/04	Frotis rectal
P18	2002	Ramón y Cajal	B	28/5/04	Frotis rectal
28	15/10/2005	Exudado herida	B'	4/6/04	Frotis faringeo
33	26/12/2005	Liquido pleural	C	15/6/04	Frotis rectal
69	15/01/2005	Orina	C'	23/6/04	Frotis faringeo
76	15/09/2005	Orina	D	28/6/04	Frotis rectal
77	02/08/2003	Sangre	D'	19/7/04	Frotis faringeo
87	03/07/2003	Sangre	E	4/5/2004	Frotis rectal
93	18/06/2005	Orina	E'	18/5/2004	Frotis faringeo
99	17/06/2005	Orina	F	22/6/04	Frotis faringeo
7	8/5/03	Espudo	F'	5/7/04	Frotis faringeo
17	10/5/03	Frotis herida	G	24/5/04	Frotis rectal
			G'	1/6/04	Frotis faringeo

3.2.4 Descripción de las cepas utilizadas en el estudio de la porina OprD

De las colecciones de cepas utilizadas, tanto para los estudios de poblaciones como para el *screening* de integrones, únicamente algunas fueron seleccionadas para el estudio tanto de las mutaciones en el gen OprD, como de la relación de éstas con la presencia/ausencia de la proteína OprD en su membrana externa. La descripción de estas cepas se recoge en las tablas 3.1 y 3.2.

La selección de las cepas se realizó en base al patrón de proteínas de la membrana externa, que éstas presentaban. Algunas fueron seleccionadas debido a que presentaban un patrón atípico en la porina OprD, con respecto a la relación presencia/ausencia de OprD y sensibilidad/resistencia al imipenem. Otras se seleccionaron mediante criterios clínicos para estudiar el tipo de mutaciones presentes en el gen *oprD*.

3.3 DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

3.3.1 Antibiograma

La sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos puede ser valorada *in vitro* utilizando los principios de difusión en Müller-Hinton agar.

- Se partió de un cultivo en placa del microorganismo, del cual se tomaron varias colonias que fueron resuspendidas en 2 ml de MH.
- Se mojó extensamente un hisopo estéril en el tubo y se sembró el inóculo en placas de MHA. La siembra se realizó deslizando el hisopo por toda la placa, en tres direcciones, quedando así toda la superficie uniformemente sembrada.
- Posteriormente, se depositaron los discos de los diversos antibióticos en la superficie del agar con unas pinzas estériles. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18 horas.

La lectura se realizó midiendo los diámetros de los halos de inhibición completos de crecimiento que se produjeron alrededor de los discos, y expresando los resultados en milímetros.

Para conocer la resistencia o la susceptibilidad de una cepa a los diversos antibióticos estudiados, se compararon los diámetros de los halos de inhibición con las tablas de referencia del NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards* [105]). El diámetro de inhibición fue proporcional a la susceptibilidad del microorganismo al antibiótico estudiado.

Los antibióticos utilizados en este estudio pertenecen al grupo de los recomendados por la MENSURA (Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos) como antimicrobianos que se deben estudiar por norma en *P. aeruginosa* y otros BGNF (Bacilos Gram negativos no Fermentadores), y son los siguientes: piperacilina (100 µg/disco), ceftacidima (30 µg/disco), imipenem (10 µg/disco), gentamicina (10 µg/disco), tobramicina (10 µg/disco), amikacina (30 µg/disco) y ofloxacina (5 µg/disco). Todos los discos de antibiótico son de los laboratorios *Oxoid*.

3.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA

3.4.1 Aislamiento de membrana externa

Se utilizó el método descrito por Puig *et al.* [^{106, 107}] modificado ligeramente, el cual se describe a continuación de forma breve.

- Se hizo crecer la cepa deseada en 50 ml de LB durante 18 horas.
- Se centrifugó a 8.000 x g durante 20 min. a temperatura ambiente y se resuspendió el sedimento en 5 ml de *buffer* 10 mM Tris-HCl pH 7.4.
- Posteriormente, se volvió a centrifugar la suspensión y se resuspendió en *French Buffer* a razón de 1ml cada 0.2g de peso seco de células.
- Las células en suspensión se rompieron mediante la *French Press* a una presión de 1000 Psi.
- Con el objetivo de retirar las células enteras, se centrifugó la muestra durante 20 min. a 8.000 x g.
- El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 100.000 x g durante 90 min. a 20°C para sedimentar las membranas totales.
- Con el fin de solubilizar la membrana interna, se lavó el sedimento en 0.2 ml de SDS al 2% en *buffer* 10 mM Tris-HCl pH 7.4 y se dejó reposar durante 30 min. a temperatura ambiente.
- Una vez transcurrido este tiempo, se sedimentó la membrana externa por centrifugación a 60.000 x g durante 60 min. a 20°C.
- El sedimento fue resuspendido en 50 µl de 10 mM Tris-HCl pH 7.4.

French buffer (1000ml.)

50 mM Tris pH 7.4

1M DTT (ditiotreitól)

1M MgSO₄

Se equilibra el pH a 7.4 y a continuación se añaden 0.120 g de Pefabloc.

3.4.2 Visualización de OMP por electroforesis en geles de poliacrilamida

Para visualizar las proteínas de la membrana externa se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Todas las electroforesis se realizaron en una cubeta Mini-Protean II (*Bio-Rad*). La medida de los geles fue de 100 mm de ancho, 80 mm de largo y 1 mm de grosor.

Preparación de las muestras

Se mezclan 5µl de proteína resuspendida en 10 mM Tris-HCl pH 7.4 con 5µl de solución de muestra, que nos permitirá visualizar el frente migratorio de las proteínas durante la electroforesis. Posteriormente se hierve la mezcla durante 5 minutos con el fin de desnaturizar las proteínas presentes en la muestra.

Solución de muestra:

Agua destilada	4 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS 10% (w/v)	1.6 ml
2 β-mercaptoetanol	0.4 ml
Azul de bromofenol 0.05% (w/v)	0.2 ml

Preparación del gel de poliacrilamida

La composición proteica de la membrana externa se visualizó en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli y modificado por Ames *et al.* [^{108, 109}]. Las concentraciones de acrilamida en el gel separador fueron del 12% y en el iniciador del 4%.

	Gel separador:	Gel iniciador:
Agua destilada	1.68 ml	3.05 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	1.25 ml	1.25 ml
SDS 10% (w/v)	50.0 µl	50.0 µl
Solución acrilamida/bisacrilamida	2.0 ml	0.65 ml

Ambas soluciones se desgasaron al vacío durante 15 min., con el fin de eliminar el oxígeno presente, ya que este es un potente inhibidor de la polimerización. A continuación, y para permitir la polimerización de la acrilamida/bisacrilamida, se añadieron los componentes siguientes:

	Gel separador	Gel iniciador
APS 10% (w/v)	25.0 µl	25.0 µl
TEMED	2.5 µl	5.0 µl

APS (Persulfato amónico) al 10%: Se utilizó inmediatamente después de haberse preparado.

Solución de acrilamida/bisacrilamida:

Acrilamida	29.2 g
N',N'-bis-metilenacrilamida	0.8 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

La solución se filtró y se guardó a 4°C en la oscuridad.

Recorrido de las muestras

El recorrido electroforético se realizó a voltaje variable: 10 mA (aprox.70 V) en el gel iniciador y de 15 mA (aprox.110 V) en el gel separador.

Solución de recorrido (x 5):

Tris base	15.0 g/l
Glicina	72.0 g/l
SDS	5.0 g/l
Equilibrado a un pH de 8.3	

Tinción de las muestras

- En primer lugar, se añadió solución I de Azul de *Coomassie* a los geles y se mantuvo durante una hora en agitación constante.
- Posteriormente, se decantó la solución de tinción y se añadió la solución II de fijación, manteniéndola durante una hora con dos o tres cambios de solución nueva.
- Finalmente, se rehidrató el gel con solución III. El gel se puede mantener en esta solución durante bastante tiempo.

Solución I:

Metanol	450 ml
Ácido acético	50 ml
Azul de <i>Coomassie</i>	1.0 g
Agua destilada	450 ml

Solución II: Solución compuesta por metanol, ácido acético y agua destilada en proporción 5:1:5.

Solución III: Solución compuesta por agua destilada, metanol y ácido acético en proporción 18:1:1.

3.4.3 Interpretación de los resultados

La lectura y la interpretación de los resultados se realizaron *de visu* sobre las fotografías de los geles. Dado que aquello que comparamos, en este estudio, mediante esta técnica es la posible similitud existente entre los perfiles de las proteínas de la membrana externa de una colección de cepas, para la interpretación de resultados se comparó el perfil de cada cepa con el resto de las de la serie.

Para ello, se construyó un patrón de bandas de cada cepa, y la consiguiente matriz numérica en la que se asignó un 0 si el microorganismo no poseía la banda y un 1 si el microorganismo la poseía. Una vez obtenida, esta matriz se procesó mediante el programa *NTSYS-pc Program* (Setauket, NY), con el cual se generaron dendrogramas mediante el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). [¹¹⁰]

3.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS TOTALES

3.5.1. Aislamiento de proteínas totales

Para el aislamiento de las proteínas totales se utilizó el método que se describe brevemente a continuación.

- Se hizo crecer la cepa deseada en 10 ml de LB O/N.
- Se centrifugó 1 ml del cultivo a 8.000 x g durante 5 min. a temperatura ambiente.
- Seguidamente, se resuspendió el sedimento en 100 µl de solución de muestra.
- Finalmente, se hirvieron las muestras durante 5 min.

3.5.2 Visualización de las muestras

Tanto la preparación de los geles, como el recorrido y la tinción, fueron realizadas de la misma manera que para las proteínas de membrana externa.

3.6 ANÁLISIS DEL DNA MEDIANTE Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Para la realización de la electroforesis de campo pulsante, se utilizó el método descrito por Maslow *et al.* [111] y Schwartz *et al.* [112], modificados ligeramente, que brevemente se describen a continuación. Todas las electroforesis se llevaron a cabo en una unidad CHEF-DRIII (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*).

3.6.1 Fundamento de la técnica

La técnica de electroforesis en campo pulsante se utiliza para analizar la tipificación molecular de microorganismos, es decir, reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente, y por tanto, derivados recientes de un microorganismo ancestral común. A la vez, esta técnica pretende diferenciar aislamientos no relacionados, independientemente de que pertenezcan o no a la misma especie microbiológica o taxón.

En este caso se estudio, mediante esta técnica, la relación existente entre aislamientos clínicos procedentes del *Servei de Microbiologia* de *l'Hospital Universitari de Bellvitge* y aislamientos ambientales del entorno hospitalario.

3.6.2 Extracción del DNA

- Se hace crecer el microorganismo en un medio rico a 37°C O/N.
- Se resuspende una colonia en 500µl de tampón PIV y a continuación se centrifuga durante 3 min. a 13.000 rpm.
- Se elimina el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 200µl de PIV.
- Se mezclan 100µl de la solución anterior con 100µl de agarosa fundida al 1'5% (dejándola enfriar previamente hasta 42°C aproximadamente).
- Se distribuyen gotas de 20µl de la mezcla anterior sobre vidrios lavados con alcohol 70%.
- A continuación se cubren las gotas con portaobjetos cubiertos, a su vez, de *parafilm* y lavados también con alcohol 70% (previamente se habrán colocado separadores laterales para impedir que las gotas se aplasten en exceso).
- Se deja solidificar la agarosa durante 10 min. aproximadamente, y se habrán obtenido discos de agarosa que contienen el microorganismo a estudiar.

- A fin de que se produzca la lisis celular, se introducen los discos en 1ml de tampón de lisis (ST) y se incuban a 37°C durante 5 horas.
- Posteriormente se decanta la solución ST y se substituye por una solución (ES) de proteinasa-K recién preparada.
- Se incuba todo durante 18h a 50°C.
- Se decanta la solución de proteinasa-K y se añade tampón TE.
- A continuación se disponen los tubos en un agitador orbital y se agitan suavemente durante 30-45 min.
- Finalizado el lavado, se mantienen los discos a 4°C en tampón TE, hasta su utilización.

Soluciones y tampones utilizados

Tampón PIV (1000 ml.):

Tris-HCl 1 M, pH 8	10 ml
NaCl 5M	200 ml
Agua destilada, c.s.p.	1l

Una vez mezclados todos los componentes, la solución se autoclava durante 15 min. a 121°C.

Solución de agarosa al 1'5% (100ml):

Agarosa	1.5 g
Tampón TBE x 1	100 ml

Una vez realizada la mezcla, ésta se calienta en un baño a 100°C con el fin de disolver la agarosa.

Solución básica de Lisis (ST) (100ml.):

Tris-HCl 1 M, pH 8	0.6ml
NaCl 5M	20 ml
EDTA 0.5M pH 8	20 ml
Desoxicolato Sódico 10% (w/v)	2 ml
SarKosyl 10% (w/v)	5ml

Una vez mezclados todos los componentes, la solución se autoclava durante 15 min. a 121°C.

Antes de su utilización se añaden los siguientes componentes:

5µl/ml de una solución de RNasa 10mg/ml

2µl/ml de una solución de Lisozima 50mg/ml.

Solución ES para la incubación con proteinasa-K (100ml.):

EDTA 0.5M pH 8	90 ml
SarKosyl 10% (w/v)	10ml

La solución se autoclava durante 15 min. a 121°C y se añade proteinasa-K a razón de 1 mg/ml justo antes de su utilización.

Tampón TE:

Tris-HCl 1 M, pH 7.5	10 ml
EDTA 0.5M pH 8	2 ml
Agua bidestilada, c.s.p.	1l

Una vez mezclados todos los componentes, la solución se autoclava durante 15 min. a 121°C.

Tampón TBE x 10:

Tris-HCl 890 mM, pH 7.5	108g
EDTA 0.5M pH 8	40 ml
Ácido bórico 890mM	55g
Agua bidestilada, c.s.p.	1l

Una vez mezclados todos los componentes, la solución se autoclava durante 15 min. a 121°C.

3.6.3 Digestión del DNA con enzimas de restricción

La digestión del DNA se realizó con el enzima de restricción SpeI, que es un enzima de baja frecuencia de corte. La solución de restricción debe estar recién preparada para su uso.

- En 40µl de solución SR añadimos el disco de agarosa correspondiente.
- A continuación se incuba durante 18h a 37°C en un termobloc.

Solución de restricción (SR):

2.5U por reacción del enzima SpeI
SpeI Buffer x1
0.4µl BSA (<i>Bovin Seric Albumin</i>)

3.6.4 Electroforesis en campo pulsante

- Se prepara un gel de agarosa al 1% en 0'5x TBE.
- A continuación se introduce en cada pozo del gel el disco correspondiente. También se incluyen controles de peso molecular que determinaran la efectividad de la electroforesis.
- Finalmente se separan los fragmentos de restricción durante 20h a 14°C, 6 v/cm y pulsos de tiempo con intervalos de entre 0.5 a 15 s.

Solución de agarosa al 1% (100ml):

Agarosa	1g
TBE x 1	100ml

3.6.5 Tinción del gel

La tinción de los geles se describe en el apartado 3.11.4.

3.6.6 Lectura e interpretación de los resultados

La lectura e interpretación de los resultados se llevó a cabo sobre la fotografía del gel según los criterios definidos por Tenover *et al.* [113]. Debido a que lo que comparamos mediante esta técnica es la similitud genética de una serie de cepas, para la interpretación de los resultados comparamos cada cepa con el resto de las de la serie. Cuando un microorganismo difiera del resto en más de tres bandas, se le asigna un “genotipo” propio expresado mediante números; si el número de bandas es de tres o menor lo consideramos un “subtipo” y lo expresamos como un subíndice numérico (por ejemplo, genotipo 1., significa genotipo 1, subtipo 1).

3.7 ANÁLISIS DEL DNA MEDIANTE Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Para la amplificación al azar de polimorfismos de DNA, se utilizó el método descrito por Mahenthiralingam *et al.* [114], modificado ligeramente, que brevemente se describe a continuación. Todas las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta *ecogen*.

3.7.1 Fundamento de la técnica

El método del RADP es una buena técnica para estudios de genética de poblaciones y estudios de evolución, ya que esta técnica permite obtener, de una manera efectiva, marcadores genéticos en todo tipo de organismos, con los que podemos construir mapas del genoma, obteniendo una información tipo huella dactilar de éste [115,116].

Este método identifica polimorfismos que son detectados como fragmentos de DNA, amplificados mediante la técnica de la PCR, y que están presentes en una cepa y no en otra, de manera que estos polimorfismos pueden ser utilizados para construir mapas genéticos, o establecer relaciones genéticas entre organismos.

Para llevar a cabo la técnica, en cada reacción, utilizamos un único oligonucleótido o *primer* corto (aproximadamente 10 pb, al que denominamos *10-mer*) que presenta una secuencia arbitraria de nucleótidos. Cuando dos de estos *primers* se unen al DNA en la orientación correcta para la reacción, es decir, uno de ellos en sentido invertido al otro (y además, a una distancia razonable entre ellos), se amplifica el fragmento del genoma que flanquean (Fig. 3.1). Esto ocurre en tantas ocasiones como veces se unen los *primers* correctamente, de manera que, el resultado es la amplificación de un grupo de bandas de DNA de diferentes medidas. Estos fragmentos amplificados de DNA son al azar, ya que a pesar de que las reacciones de RAPD son reacciones de PCR, las secuencias diana (secuencias a amplificar) son desconocidas, ya que los *primers* han sido diseñados al azar, por lo que además, no implica que todas las amplificaciones sean el resultado de la unión perfecta entre el *primer* y el DNA diana.

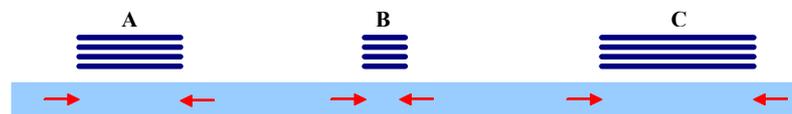


Figura 3.1 Esquema de la orientación de los *primers* en la secuencia de DNA (flechas) y de los fragmentos amplificados (A, B y C).

Algunas regiones del DNA están muy conservadas (no varían) entre individuos; estas no son útiles para utilizar métodos analíticos que utilizan el DNA para encontrar diferencias entre individuos. Alternativamente, algunas regiones tienden a variar entre individuos, de manera que serán más útiles para distinguir unos individuos de otros. Es por ello, que es conveniente la utilización de diferentes *primers*, ya que no sabemos a que tipo de regiones se nos unen.

3.7.2 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Extracción del DNA

El protocolo de extracción del DNA utilizado, se describe dentro del bloque de técnicas de obtención, cuantificación, manipulación y visualización del DNA (apartado 3.11).

Mezcla de los componentes o Mix

Para llevar a cabo la reacción preparamos la mezcla o *Mix* de todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación. Estos componentes deben estar en unas concentraciones determinadas que se describen a continuación:

Mix (volumen total: 25 µl)	
DNA	40 ng
Oligonucleótidos	40 pmols
Taq-polimerasa	1 U
Deoxinucleòsidos trifosfato	250 µM cada uno
3 mM MgCl ₂	
10 mM TRIS-HCl pH8	
50 mM KCl	
0.001 % gelatina	
Agua destilada estéril, c.s.p	25µl

Todos los productos utilizados, con excepción de los *primers*, son de *Fermentas*, (Lithuania).

Primers utilizados

Los *primers* utilizados han sido identificados por Mahenthiralingam *et al.* como *primers* que amplifican, de una manera reproducible, polimorfismos apropiados para la diferenciación de cepas de *P. aeruginosa*. Proceden de *Invitrogen* (EE.UU).

Las secuencias son:

Primer	Secuencia (5'→3')
208	ACGGCCGACC
228	GCTGGGCCGA
241	GCCCGAGCGG
270	TGCGCGCGGG

Amplificación del DNA

Una vez preparada la mezcla de elementos necesarios procedemos a la amplificación de fragmentos de DNA; esta se llevó a cabo en un termociclador *Perkin Elmer*, modelo *GeneAmp PCR system 9600*.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

4 ciclos consistentes en:	5 min. a 94°C (desnaturalización)
	5 min. a 36°C (<i>annealing</i>)
	5 min. a 72°C (extensión)
30 ciclos consistentes en:	1 min. a 94°C (desnaturalización)
	1 min. a 36°C (<i>annealing</i>)
	2 min. a 72°C (extensión)
Extensión final de un ciclo de: 10 min. a 72 °C	

En esta técnica, es importante que la temperatura de unión al DNA (*annealing*) no sea demasiado restrictiva, ya que como se ha comentado anteriormente, la secuencia de los *primers* no se ha diseñado a partir de una secuencia del DNA conocida, sino al azar.

3.7.3 Visualización de los resultados en geles de agarosa.

Para la visualización de los polimorfismos de DNA obtenidos se utilizó un gel de agarosa al 1'5% (w/v) en TAE x 1. El recorrido electroforético se realizó a 9 voltios/cm durante 3h. con el fin de separar los productos obtenidos.

Solución de agarosa al 1'5% (100ml):

Agarosa	1.5g
TAE x 1	100ml

3.7.4 Tinción de los geles.

La tinción de los geles de agarosa se describe en el apartado 3.11.4.

3.7.5 Lectura e interpretación de los resultados.

La lectura e interpretación de los resultados se llevó a cabo *de visu* sobre las fotografías de los geles, y según los criterios definidos por Tibayrenc *et al.* [117]. Debido a que lo que comparamos mediante esta técnica es la similitud genética de una serie de cepas, para la interpretación de resultados se comparó cada cepa con el resto de las de la serie. Se realizó un patrón de bandas de cada cepa, y se construyó una matriz numérica en la que se asignó un 0 si el microorganismo no poseía una banda determinada y un 1 si el microorganismo la poseía.

Una vez obtenida, esta matriz fue procesada mediante el programa NTSYS-pc Program (SetauKet, NY), el cual realizó la construcción de dendrogramas mediante el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) [118].

3.8 ANÁLISIS DE LA PRESENCIA/AUSENCIA DE INTEGRONES

Para detectar la presencia de integrones de clase I en las cepas estudiadas, se utilizó la técnica descrita por Lévesque *et al.* [119], ligeramente modificada, basada en la amplificación de los posibles *cassettes* génicos insertados en los integrones, mediante la técnica convencional de la PCR.

3.8.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA, también se siguió el protocolo utilizado por Lévesque *et al.*, el cual se describe a continuación:

- Se inoculan, con el microorganismo deseado, 10 ml de medio BHI con glicerol al 10% y ampicilina a una concentración de 20µg/ml, y se incuban O/N a 37°C.
- Se toman 200µl del cultivo, se le añaden 800µl de agua destilada estéril y se hierve durante 10 min.
- A continuación, se centrifuga la suspensión bacteriana a 7500 rpm durante 2 min.
- El sobrenadante obtenido, se utiliza directamente en la reacción de PCR.

3.8.2 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Mezcla de los componentes o Mix

Para llevar a cabo la reacción preparamos la mezcla o *Mix* de todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación. Estos componentes deben estar en unas concentraciones determinadas que se describen a continuación:

Mix (volumen total: 100 μ l)	
DNA	30 μ l suspensión
Oligonucleótidos	2.5 pmoles
Taq-polimerasa	1 U
Deoxinucleósidos trifosfato	250 μ M cada uno
3 mM MgCl ₂	
10 mM TRIS-HCl pH8	
50 mM KCl	
0.001 % gelatina	
Agua destilada estéril, c.s.p	100 μ l

Todos los productos utilizados, con excepción de los *primers*, son de *Fermentas*, (Lithuania).

Primers utilizados

Los *primers* utilizados fueron los descritos por Lévesque *et al.*, y están diseñados a partir de las secuencias de las regiones conservadas de los integrones, de manera que únicamente se amplifican los *cassettes* génicos que están integrados. Proceden de *Invitrogen* (EE.UU).

La situación de los *primers* utilizados, dentro de la estructura de los integrones, se representa a continuación en la figura 3.2.

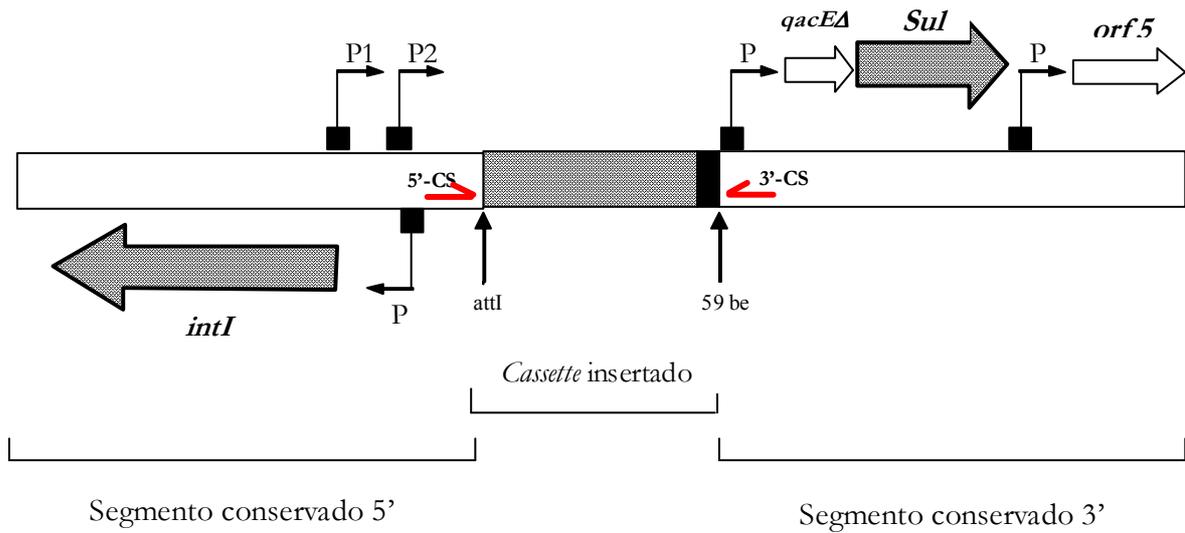


Figura 3.2 Estructura general de los integrones. 5'-CS y 3'-CS son los oligonucleótidos específicos de los segmentos conservados de 5' y 3'; las flechas rojas marcan su orientación.

Las secuencias de los *primers* son:

<i>Primer</i>	Secuencia (5'→3')
5'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG
3'-CS	AAGCAGACTTGACCTGA

Amplificación del DNA

Una vez preparada la mezcla de elementos necesarios procedimos a la amplificación de fragmentos de DNA; ésta se llevó a cabo en un termociclador *Applied Biosystems*, modelo *GeneAmp® PCR system 2700*.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Pre-desnaturalización: 12 min. a 94°C
 35 ciclos consistentes en: 1 min. a 94°C (desnaturalización)
 1 min. a 55°C (*annealing*)
 5 min*. a 72°C (extensión)

*5s. fueron añadidos a cada ciclo de extensión

Extensión final de un ciclo de: 5 min. a 72 °C

3.8.3 Visualización de los resultados en geles de agarosa.

Para la visualización de los polimorfismos de DNA obtenidos se utilizó un gel de agarosa al 0.7% (w/v) en TBE x 1 y se hizo correr a 100 voltios durante 1.30h, a fin de observar y separar los productos obtenidos.

Solución de agarosa al 0.7% (100ml):

Agarosa	0.7g
TBE x 1	100ml

3.8.4 Tinción de los geles.

La tinción de los geles de agarosa se describe en el apartado 3.11.4.

3.8.5 Lectura e interpretación de los resultados.

La lectura e interpretación de los resultados se llevó a cabo *de visu* sobre las fotografías de los geles. La aparición de fragmentos amplificados supone, por un lado la existencia de integrones capaces de incorporar *cassettes* génicos (ya que los *primers* utilizados están diseñados a partir de las regiones conservadas), y por el otro, y según el tamaño del amplificado, la presencia de éstos *cassettes*, en un número variable.

3.9 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

3.9.1 Extracción de DNA plasmídico (técnica convencional)

Para el aislamiento de DNA plasmídico se siguió una modificación del método descrito por Feliciello y Chinali [¹²⁰].

- Se hicieron crecer las cepas durante 18 h a 37°C en 10ml de medio TSB, con el antibiótico adecuado.
- Seguidamente, se centrifugó el cultivo bacteriano a 8000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante.

- Para lavar el *pellet*, se resuspendió el sedimento con 0.5 ml de solución STE fría y se centrifugó de nuevo a 8000 x g durante 5 minutos y a 4 °C.
- El sobrenadante se aspiró completamente y se resuspendieron las células en 125 µl de solución I fría.
- Se añadió a la mezcla 250 µl de solución II y se homogeneizó la muestra agitando varias veces el tubo por inversión.
- Posteriormente, se incubó en hielo unos cinco minutos para permitir la lisis celular y, transcurrido este tiempo, se añadieron 375 µl de solución III fría. La mezcla se agitó vigorosamente por inversión y se incubó en hielo durante 10 min.
- El lisado celular se centrifugó durante 10 minutos a 10000 x g y 4 °C y, el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo *eppendorf* nuevo estéril, procurando no arrastrar el sedimento.
- El DNA plasmídico se precipitó añadiendo 350 µl de isopropanol y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min., eliminando, a continuación todo el isopropanol. Una vez sedimentado, se dejó secar el DNA en la estufa a 37 °C.
- Para eliminar el RNA presente, se incubó la mezcla en presencia de 125 µl de RNAasa 10 mg/ml en solución TE y se incubó 30 minutos a 37 °C.
- Seguidamente, se volvió a precipitar el DNA plasmídico añadiendo 150 µl de isopropanol al 88 % y 0.2 M de acetato potásico y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10000 x g a temperatura ambiente durante 5 minutos, se dejó secar el sedimento y se resuspendió en 40 µl de agua destilada estéril.
- Opcionalmente, y según el grado de pureza deseado, se fenolizó en este punto el DNA plasmídico obtenido.

STE

NaCl 0.1 M
Tris-HCl, 10 mM pH 8.0
EDTA 1 mM pH 8.0

Solución I

Glucosa 0.9 g
Tris-HCl 25 mM pH 8.0
EDTA 10 mM pH 8.0

Solución II

NaOH 0.2 M
SDS 1 % (w/v)

Solución III

Acetato potásico 4 M
Ácido acético 2 M

3.9.2 Extracción de DNA plasmídico mediante S1-PFGE

- **Fundamento de la técnica**

Las técnicas comúnmente utilizadas para la purificación de plásmidos pequeños, no son eficientes para la separación de moléculas de DNA extracromosómicas muy grandes o megaplásmidos (de más de 100 kb), ya que no las separan del DNA cromosómico; además este tipo de plásmidos son demasiado grandes para ser bien resueltos en una electroforesis convencional.

La técnica de electroforesis en campo pulsante se utiliza, en términos generales, para separar grandes fragmentos de DNA. En este caso, se incubó el DNA total con el enzima nucleasa S1 que convierte los plásmidos super enrollados en moléculas lineales, mientras que no digiere el DNA cromosómico. Debido a esto los grandes plásmidos migran como bandas discretas, de las que podemos determinar su peso molecular, mientras que el DNA cromosómico, al no haber sido digerido, no puede migrar, y únicamente lo detectamos en la *zona de compresión* del gel, situada en la parte superior del gel, donde las moléculas que superan un determinado tamaño, son incapaces de separarse unas de otras.

Para la separación de megaplásmidos o plásmidos grandes mediante electroforesis de campo pulsante, se utilizó el método descrito por Zuccarelli *et al.* [¹²¹], modificado ligeramente, que brevemente se describe a continuación. Todas las electroforesis se llevaron a cabo en una unidad CHEF-DRIII (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*).

- **Extracción del DNA**

La extracción del DNA y la lisis celular, para la búsqueda de megaplásmidos se realiza del mismo modo que para el PFGE de DNA cromosómico (protocolo descrito en el apartado (3.6.2))

- **Digestión del DNA plasmídico con enzimas de restricción**

La digestión del DNA plasmídico se realizó con el enzima de restricción nucleasa S1, que es un enzima de *Aspergillus oryzae*. Procede de *Fermentas* (Lithuania).

La restricción se realizó tal y como se describe a continuación:

- En 40µl de solución SR añadimos el disco de agarosa correspondiente.
- A continuación se incubó durante 45min. a 37°C en un termobloc.

Solución de restricción (SR):

1U/200µl *Buffer* del enzima SpeI

SI nuclease Buffer x1

Esta solución debe estar recién preparada para su uso.

- **Electroforesis en campo pulsante y tinción de los geles**

La preparación de los geles se realiza del mismo modo que para el PFGE de DNA cromosómico (protocolo descrito en el apartado (3.6.4)), variando únicamente la duración del recorrido de las muestras y los pulsos de tiempo, que en este caso son de entre 45s. durante 14h y de 25s. durante 6h.

La tinción de los geles se describe en el apartado 3.11.4.

3.10 ANÁLISIS DEL GEN DE LA OprD

Con el fin de estudiar posibles mutaciones en el gen de la porina OprD, de algunos aislados, se utilizó la técnica de la PCR siguiendo la metodología descrita por Lister *et al.* ligeramente modificada [⁸⁶].

3.10.1 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Extracción del DNA

El protocolo de extracción del DNA utilizado, se describe dentro del bloque de técnicas de obtención, cuantificación, manipulación y visualización del DNA (apartado 3.11).

Mezcla de los componentes o Mix

Para llevar a cabo la reacción preparamos la mezcla o *Mix* de todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación, en unas concentraciones que se describen a continuación:

Mix (volumen total: 50 μ l)	
DNA	2 μ l dilución (1/10)
Oligonucleótidos	0.5 μ M
Taq-polimerasa	1 U
deoxinucleósidos trifosfato	200 μ M cada uno
2 mM MgCl ₂	
10 mM TRIS-HCl pH 8	
50 mM KCl	
0.001 % gelatina	
Agua destilada estéril, c.s.p	50 μ l

Todos los productos utilizados, con excepción de los *primers*, son de *Fermentas*, (Lithuania).

Primers utilizados

Los *primers* utilizados fueron los descritos por Lister *et al.*, y están diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *oprD* publicada por Yoneyama *et al.* [¹²²]. Proceden de *Invitrogen* (EE.UU).

Las secuencias de los *primers* son:

Primer	Secuencia (5'→3')
OprDSEQF1	CTACGCAGATGCGACATGC
OprDSEQR1	CCTTTATAGGCGCGTTGCC

Amplificación del DNA

Una vez preparada la mezcla de elementos necesarios se procede a la amplificación del gen *oprD*. Esta amplificación se realizó en un termociclador *Techné*, modelo *TC-312*.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Pre-desnaturalización:	10 min. a 95°C
25 ciclos consistentes en:	30s. a 95°C (desnaturalización)
	30s. a 56°C (<i>annealing</i>)
	2 min. a 72°C (extensión)
Extensión final de un ciclo de:	10 min. a 72 °C

3.10.2 Visualización de los resultados en geles de agarosa.

Para la visualización de los fragmentos amplificados se utilizó un gel de agarosa al 1.5% (w/v) en TAE x 1 y se hizo correr a 80 voltios durante 1.30h.

Solución de agarosa al 1.5% (100ml):

Agarosa	1.5g
TAE x 1	100ml

3.10.3 Tinción de los geles.

La tinción de los geles de agarosa se describe en el apartado 3.11.4.

3.11 TÉCNICAS DE OBTENCIÓN, CUANTIFICACIÓN, MANIPULACIÓN Y VISUALIZACIÓN DEL DNA

3.11.1 Extracción de DNA

- Se inoculan, con el microorganismo deseado, 10 ml de medio LB y se incuban O/N a 37°C.
- Se centrifugan los 10 ml a 7500 rpm durante 10 min.
- El *pellet* obtenido, se resuspende en 180µl de buffer ATL (DNeasy® Tissue kit. *Qiagen*, Germany).
- A continuación se procede con la extracción según las instrucciones del manual del Kit (DNeasy® Tissue kit), para obtener el DNA en 200µl de buffer AE.

3.11.2 Cuantificación de DNA

Se determinó mediante un espectrofotómetro, modelo *UV/Vis Spectrometer UV2*, de ATI UNICAM. Para determinar la concentración de DNA se midió la densidad óptica de éste (o de una dilución del mismo en agua) a 260 nm, en una cubeta de cuarzo. Se estimó el valor de la concentración considerando que un valor de $DO_{260\text{ nm}}$ igual a 1, equivale a 50 µg/ml de DNA. Asimismo, se determinó el grado de pureza del DNA, teniendo en cuenta la relación entre las densidades ópticas a 260 nm y 280 nm, y considerando un valor aceptable cuando la relación se encuentra entre 1.8 y 1.9; si el valor es superior a 2.2, la muestra presenta elevada concentración de proteínas. Así pues, los cálculos realizados fueron los siguientes:

$$\text{Concentración estimada de DNA (µg/ml)} = 50 \times \text{DO (260 nm)} \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{Pureza del DNA} = \text{DO (260 nm)} / \text{DO (280 nm)}$$

3.11.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para separar, visualizar e identificar fragmentos de DNA se utilizó como método rutinario la electroforesis de DNA en geles de agarosa, siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.* [¹²³].

La electroforesis se basa en la carga negativa que presenta el DNA a pH neutro y que condiciona su migración hacia el polo positivo cuando se somete a un campo eléctrico. Forzando el desplazamiento a través de una matriz porosa, se consigue una separación de diferentes fragmentos de DNA presentes en una mezcla heterogénea en función de su tamaño o su conformación. La velocidad de migración es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular, lo que permite valorar el tamaño de diferentes fragmentos de DNA de igual conformación frente a un patrón de tamaños adecuados. Por otro lado, existe una relación directa entre el logaritmo de la movilidad electroforética y la porosidad del gel. Variando la concentración de agarosa se puede determinar qué rango de tamaños se pretende separar con una buena resolución (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Relación entre las concentraciones de agarosa en el gel y la resolución de los pesos moleculares.

Concentración de agarosa (%)	Rango de separación eficiente de moléculas (kb)
0.3	60 - 5
0.6	20 - 1
0.7	10 - 0.8
0.9	7 - 0.5
1.2	6 - 0.4
1.5	4 - 0.2
2.0	3 - 0.1

La agarosa utilizada fue del tipo de baja electroendosmosis (*Boehringer Mannheim*), es decir, con baja densidad de carga propia que pueda distorsionar la migración del DNA. Se utilizaron, además, las soluciones TBE x 1 y TAE x 1.

Solución TBE x 5

Tris	54 g
Ácido bórico	27.5 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	20 ml
Agua destilada, c.s.p.	1 l

Solución TAE x 50

Tris	242 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 ml
Ácido acético glacial	57.1 ml
Agua destilada, c.s.p.	1 l

Las muestras se prepararon para su carga en el gel mediante la adición de solución de muestra en una proporción 1:5 del volumen total de las mismas. Esta solución actúa incrementando la densidad de la muestra, asegurando así, que ésta se introduzca en los pocillos hechos en el gel y que no difunda. La velocidad de migración de cada colorante se corresponde con un determinado tamaño de DNA en kb para cada concentración de agarosa (Tabla 3.4).

Solución de muestra (x 6)

Azul de bromofenol	0.25%	(w/v)
Xylen-cyanol	0.25%	(v/v)
Glicerol o Ficoll 400	30%	(v/v)

Tabla 3.4 Correspondencia en kb de la velocidad de migración de cada colorante de la solución de muestra para una determinada concentración de agarosa.

Concentración de agarosa (%)	Xylen-cyanol (kb)	Azul de bromofenol (kb)
0.5	12	1.5
0.8	4.5	1.0
1.0	2.4	0.6
1.5	1.9	0.39
2.5	1.0	0.15

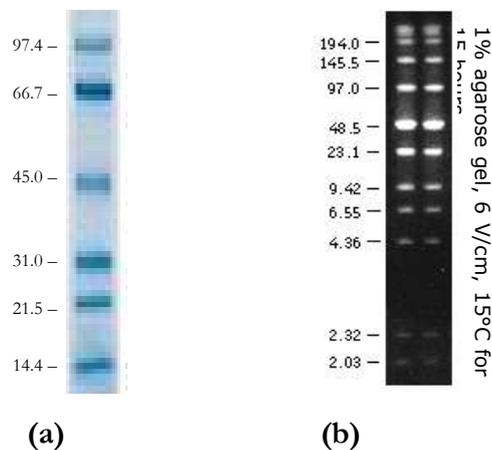
3.11.4 Tinción de los geles de agarosa

- Para la tinción de los fragmentos obtenidos, sumergimos el gel en una solución de Bromuro de Etidio durante 15-20 min. a temperatura ambiente, y protegido de la luz.
- A continuación lavamos el gel durante 10 min. en agua destilada y lo visualizamos en un transiluminador de luz ultravioleta.

Solución de Bromuro de Etidio: Solución acuosa o *buffer* de electroforesis que contiene Bromuro de Etidio en una concentración de 0.5µg/ml.

3.11.5 Marcadores de peso molecular

En todos los geles, fue incluido un marcador de peso molecular, con el fin de determinar aproximadamente, el tamaño de los productos observados. En el caso de los geles de proteínas, se utilizó el marcador *SDS- PAGE Standards, Low Range (Bio-RAD)*; para el PFGE, fue el *Low Range PFG Marker (BioLabs, Inglaterra)*; y para la observación de fragmentos de DNA se utilizaron los marcadores *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*, *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus* o *Lambda DNA/HindIII Marker*, (*Fermentas, Lithuania*) (figura 3.3).



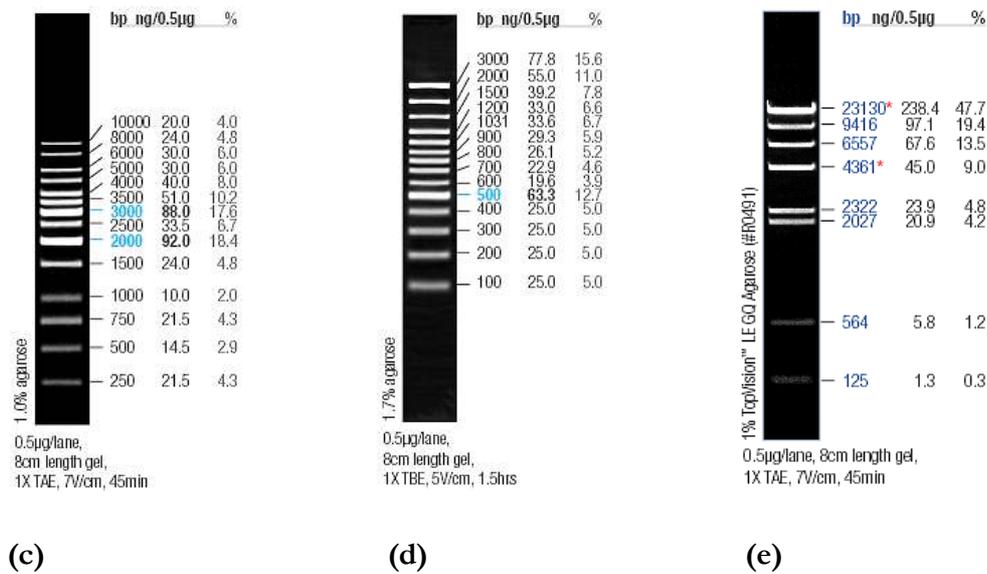


Figura 3.3 Marcadores de peso molecular utilizados. (a) *SDS- PAGE Standards, Low Range*. (b) *Low Range PFG Marker*. (c) *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*. (d) *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus*. (e) *Lambda DNA/HindIII Marker*. Los valores de (a) se expresan en KDa, y los de (b), (c), (d) y (e) en bp.

3.11.6 Purificación de productos obtenidos mediante PCR

Con el fin de separar los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR de los otros productos presentes en la reacción (sales, nucleótidos, *primers*, etc.), éstos se purificaron con el *kit* de la casa comercial QIAGEN, *MinElute PCR Purification Kit*. Éste método está basado en la utilización de columnas que presentan un polímero que retiene el DNA (de entre 70pb y 4kb), cuando éste se encuentra en determinadas condiciones salinas y de pH.

La utilización de éste método está sujeta a las especificaciones del fabricante, eluyendo finalmente el DNA en 10µl de tampón Tris-HCl 10mM pH 8.5, o bien en agua destilada estéril, con el fin de recuperar los fragmentos de DNA amplificados, altamente concentrados.

3.11.7 Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA resueltos electroforéticamente en geles de agarosa, pueden ser recuperados y purificados a partir del gel, para poder ser utilizados posteriormente. Para ello se utilizó el *MinElute Gel Extraction Kit* de QIAGEN.

La metodología utilizada fue la siguiente:

- Se prepara un gel de agarosa de bajo punto de fusión (*low melting point*) a la concentración adecuada, según el tamaño de los fragmentos a separar.
- Una vez separados mediante electroforesis, los diferentes fragmentos presentes en la muestra, y bajo iluminación ultravioleta de baja energía, se recorta la banda deseada con una hoja estéril de bisturí, intentando recoger la menor cantidad posible de agarosa que no contenga DNA.
- La pieza de agarosa recuperada, se deposita en un tubo *eppendorf* estéril y se continúa con el protocolo especificado por el fabricante, mediante el cual obtendremos el DNA altamente concentrado.

3.12 DETERMINACIÓN DE SECUENCIAS DE GENES

3.12.1 Obtención de las secuencias

Con la finalidad de obtener la secuencia de los genes amplificados en los apartados anteriores, se utilizó el método basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos fluorescentes. Para ello, y una vez purificados los fragmentos obtenidos mediante PCR, se realizó una PCR de “secuenciación” utilizando el *Kit ABI PRISM BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de *Applied Biosystems* que contiene una *Mix (Terminator Ready reaction Mix)* donde están incluidos todos los componentes necesarios para la reacción, a excepción del DNA molde y los *primers*.

Para secuenciar las dos cadenas del DNA, se realizó por separado una PCR de secuenciación para cada *primer*, con el fin de obtener en cada tubo una sola cadena, ya fuese la de orientación 5'-3', como la de orientación 3'-5'.

La mezcla de la reacción de secuenciación fue la siguiente:

<i>Terminator Ready reaction Mix</i>	4 μ l
Producto PCR (10-30 ng/ μ l)	1 μ l
<i>Primer</i> c.s.p	3.2 pmol
Agua destilada c.s.p.	20 μ l

Las condiciones de amplificación fueron:

Pre-desnaturalización:	2 min. a 96°C
25 ciclos consistentes en:	30s. a 96°C (desnaturalización)
	15s. a 50°C (<i>annealing</i>)
	4 min. a 60°C (extensión)

Los *primers* utilizados en las diversas reacciones de secuenciación, fueron los mismos que los utilizados en las reacciones de amplificación, con excepción de los *primers* internos, diseñados únicamente para poder llevar a término la secuenciación íntegra del fragmento amplificado; estos *primers* se describen en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Descripción de los *primers* internos utilizados en las diversas reacciones de “secuenciación”.

<i>Gen amplificado</i>	<i>Primer</i>	Secuencia (5'→3')	Referencia
<i>Cassettes</i> InP1	5'-IL	ACCCAACCGATTCATGC	Este trabajo
<i>Cassettes</i> InA1 e InP18	5'-A18L	GTGCAGAGAATGATCAGC	Este trabajo
	5'-A18L2	CCTCCACATCGTGGAA	Este trabajo
	5'-A18LR	TCTGTGGCGATGCACCA	Este trabajo
<i>oprD</i>	OprDSEQF1	CTACGCAGATGCGACATGC	86
	OprDSEQR1	CCTTTATAGGCGCGTTGCC	86

Debido al gran tamaño de los integrones P1, A, y P18, se necesitaron *primers* internos para poder determinar toda su secuencia. Los *primers* fueron diseñados a partir de las secuencias que previamente se iban obteniendo.

Una vez finalizada la PCR se precipitó el DNA, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

- Se mezclan los 20 µl de la reacción anterior con 64 µl de etanol al 95%, y se lleva la muestra a un volumen total de 100 µl con agua destilada estéril.
- Se mezcla bien, y se deja reposar, para que el DNA precipite, durante 15 min. A temperatura ambiente.
- A continuación se centrifuga a 14000 rpm y 4°C, durante 20 min.
- El *pellet* obtenido se lava dos veces con etanol 70%, y se deja secar a 37°C.
- Una vez seco y sin restos de etanol, se guarda a -20°C, hasta su uso para la determinación de las secuencias, que se llevaron a cabo en el *Servei de seqüenciació* de los *Serveis Científico-Tècnics* de la *Universitat de Barcelona*, en un secuenciador de DNA por electroforesis capilar *ABI PRISM(R) 3700 DNA Analyzer* de *Applied Biosystems*.

El cromatograma se visualizó y se corrigió mediante el programa ChromasPro (version1.34).

3.12.2 Análisis de secuencias

En la actualidad existen varios métodos o algoritmos para la búsqueda de secuencias, los cuales se resumen en dos grupos fundamentales: los métodos formales y los métodos aproximativos. Los métodos formales posibilitan la realización de búsquedas complejas que permiten determinar coincidencias exactas, multiplicidades, inserciones y deleciones, pero llevan más tiempo para su realización a menos que se use maquinaria especializada o se busque en una base de datos pequeña.

Por otra parte, los métodos aproximativos también permiten el mismo tipo de determinaciones, pero no garantizan encontrar las mejores comparaciones y pueden perder algunas similitudes significativas. Sus resultados requieren una interpretación más detenida antes de aceptarlos, pero son mucho más rápidos y a menudo proporcionan resultados satisfactorios. Los más utilizados son FASTA y BLAST, ambos basados en la realización de análisis comparativos entre secuencias. Estos dos algoritmos emplean distintos enfoques estadísticos al momento de comparar secuencias y sus diferencias estriban principalmente en velocidad y precisión.

En este trabajo se ha utilizado principalmente el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [124] del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) en la comparación y búsqueda de secuencias homólogas. BLAST encuentra regiones de similitud entre secuencias; el programa compara secuencias nucleotídicas o de proteínas con secuencias existentes en las bases de datos, y calcula la significancia estadística de las uniones. BLAST puede ser usado para deducir relaciones tanto funcionales, como evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes. La principal característica del BLAST es su velocidad, pudiendo tomar pocos minutos cualquier búsqueda en todas las bases de datos.

Como herramienta de ayuda se ha utilizado también el servidor de proteómica del Instituto Suizo de Bioinformática (*Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)*) o ExPASy (*Expert Protein Analysis System*), desde el cual se han traducido secuencias nucleotídicas a secuencias proteicas, o se ha accedido a otros servidores como el *CLUSTAL W* [125, 126] que crea alineamiento múltiple de un grupo de secuencias de DNA o de proteínas, empleando un alineamiento progresivo de pares de bases, lo que permite su posterior comparación. Los parámetros fijados en la alineación de las secuencias fueron los establecidos por defecto en el programa.

3.12.3 Construcción de un modelo estructural de la OprD

Para la construcción de un modelo tridimensional de la proteína OprD, se utilizó el programa *Modeller* (versión 9v2) [127], un programa para modelización estructural mediante basado en la comparación de secuencias homólogas; por tanto la calidad del modelo obtenido depende de la calidad de la secuencia que utilizamos y de su homología con el modelo con el que la comparamos. Cuando la homología entre las dos secuencias es mayor del 60% el modelo obtenido mediante modelización comparativa será suficientemente bueno.

Los archivos PDB obtenidos mediante el *Modeller*, fueron editados utilizando el programa *Pymol* [128], un sistema de gráficos moleculares que permite la rápida generación y visualización a tiempo real de gráficos y animaciones moleculares de alta calidad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos varía como consecuencia de la aparición de resistencias y la posterior selección de las cepas que las expresan. Esta resistencia puede ser originada por diversos factores como son la incapacidad del antibiótico para atravesar la envuelta celular, la capacidad del microorganismo por expulsar el antibiótico, la alteración de la diana específica para el antibiótico o, la producción, por parte de la bacteria, de una enzima que inactiva el antimicrobiano.

La resistencia al antibiótico puede ser, también, innata a todos los miembros de una especie. *P. aeruginosa* es un patógeno que presenta resistencia intrínseca a diversos agentes antimicrobianos. Inicialmente se pensó que esta resistencia intrínseca era debida al hecho que este microorganismo posee una membrana externa que presenta baja permeabilidad [129,130], pero esta propiedad de la membrana externa (OM) es insuficiente por sí misma para explicar la elevada resistencia intrínseca que presenta este microorganismo y se postuló la existencia de mecanismos secundarios que, en *P. aeruginosa*, son básicamente dos. Uno de ellos es la existencia de β -lactamasas (como la AmpC cromosómica), las cuales pueden contribuir a la resistencia intrínseca de este microorganismo a los β -lactámicos [131]. El segundo de los mecanismos que contribuyen a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* es el que se basa en los sistemas de reflujo. El sistema más importante, es el sistema MexAB-OprM, que es expresado de manera constitutiva en cepas *wild-type* y que juega un papel muy importante en la resistencia intrínseca a muchos β -lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, novobiocina, macrólidos, trimetoprim, sulfamidas, así como a algunos colorantes y detergentes [132]. También ha sido demostrado que el sistema MexXY-OprM está relacionado con la resistencia intrínseca a numerosos agentes como la tetraciclina, la eritromicina y la gentamicina, así como a fluoroquinolonas y aminoglicósidos.

La aparición de nuevos antimicrobianos ha hecho aumentar el grado de resistencia de esta especie a los antibióticos. La adquisición de resistencia a nuevos antibióticos se atribuye a una mutación cromosómica, a la expresión inducida de un gen cromosómico latente o por el intercambio de material genético a través de estructuras génicas móviles como son los plásmidos (sobretudo adquisición de β -lactamasas y enzimas modificadores

de aminoglicósidos), los transposones y los integrones (portadores, entre otros, de genes de β -lactamasas y acetiltransferasas).

Las mutaciones más importantes que causan resistencia a diversos antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* son [133]:

1. Mutaciones en el gen *gyrA*, que causa una alteración de la subunidad A de la DNA girasa y, mutaciones en los genes de las topoisomerasas II y IV. Estas mutaciones confieren resistencia a las quinolonas.
2. Mutaciones que provocan desrepresión de la expresión de la β -lactamasa AmpC, debido a una mutación en el gen *ampD*. Como consecuencia, disminuye la susceptibilidad a penicilinas y cefalosporinas.
3. Aumento de la expresión (*up-regulation*) de sistemas de reflujo constitutivos como el MexAB-OprM (mutación en el gen *nalB*) que confieren resistencia a las fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas y al meropenem.
4. *Up-regulation* de otros sistemas como MexCD-OprJ (mutación en el gen *nfxB*) y MexEF-OprN (mutación en el gen *nfxC*), que se expresan únicamente en mutantes y que en hacerlo confieren resistencia a algunas fluoroquinolonas y β -lactámicos.
5. Mutaciones que alteran la permeabilidad de la membrana, como es el caso de la mutación en el gen *oprD*, que provoca la pérdida de la porina OprD, de manera que confiere resistencia al imipenem y disminuye la susceptibilidad al meropenem.

Con el objetivo de establecer cuales eran los patrones de susceptibilidad antimicrobiana en la colección de cepas de *P. aeruginosa* a estudiar, realizamos pruebas de antibiograma en MHA utilizando diferentes antibióticos.

En la tabla 4.1 se muestran los patrones de resistencia frente a 7 antibióticos, de las cepas de *P. aeruginosa* tanto de origen clínico como ambiental. Así mismo, la tabla 4.2 muestra el número de cepas sensibles y resistentes, y los porcentajes de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos, de la población de origen clínico; la tabla 4.3 nos muestra los mismos datos en el caso de la población de origen ambiental (PIP (Piperacilina 100 μ g), CAZ (Ceftacídima 30 μ g), IMI (Imipenem 10 μ g), G (Gentamicina 10 μ g), T (Tobramicina 10 μ g), A (Amikacina 30 μ g) y OFLX (Ofloxacina 5 μ g)).

Tabla 4.1 Patrón de resistencias frente a los antibióticos ensayados (S cepa sensible, R cepa resistente).

Cepa	Pip	Caz	Imi	G	T	A	oflx
ca	S	R	R	R	R	R	R
cb	R	S	S	R	R	S	R
cc	S	S	S	S	S	S	S
cd	S	S	S	S	S	S	S
ce	S	S	S	S	S	S	S
cf	S	S	S	S	S	S	S
cg	S	S	S	S	S	S	S
ch	S	S	S	S	S	S	S
ci	S	S	S	S	S	S	S
cj	S	S	S	S	S	S	S
ck	S	S	S	S	S	S	R
cl	S	S	S	R	R	R	S
cm	S	S	S	R	R	S	R
cn	S	R	R	R	R	S	R
co	R	R	R	R	R	S	R
cp	S	S	S	S	S	S	S
cq	S	S	S	S	S	S	S
cr	S	S	S	S	S	S	S
cs	S	R	S	S	S	S	S
ct	S	S	S	S	S	S	S
ea	S	S	S	S	S	S	S
eb	S	S	S	S	S	S	S
ec	S	S	S	S	S	S	S
ed	S	S	S	S	S	S	S
ee	S	S	S	S	S	S	S
ef	S	S	S	S	S	S	S
eg	S	S	S	S	S	S	S
eh	S	R	S	S	S	S	R
ei	S	S	S	S	S	S	S
ej	S	S	S	S	S	S	S
ek	S	R	S	S	S	S	S
el	S	S	S	S	S	S	S
em	S	R	S	S	S	S	S
en	S	R	S	S	S	S	S
eo	S	S	S	S	S	S	S
ep	S	S	S	S	S	S	S
eq	S	S	S	S	S	S	S
er	S	R	S	S	S	S	S
es	S	S	S	S	S	S	S
et	S	S	S	S	S	S	S

Tabla 4.2 Número de cepas clínicas resistentes y sensibles, y porcentaje de resistentes (respecto el total de clínicas y ambientales) para cada antibiótico estudiado.

Antibiótico	Núm. cepas sensibles	Núm. cepas Resistentes	% Cepas resistentes
β-LACTÁMICOS			
Ceftacidima	16	4	20
Piperacilina	18	2	10
Imipenem	17	3	15
AMINOGLUCÓSIDOS			
Amikacina	18	2	10
Tobramicina	14	6	30
Gentamicina	14	6	30
QUINOLONAS			
Ofloxacina	14	6	30

Tabla 4.3 Número de cepas ambientales resistentes y sensibles y porcentaje de resistentes (respecto el total de clínicas y ambientales) para cada antibiótico estudiado.

Antibiótico	Núm. cepas sensibles	Núm. cepas Resistentes	% Cepas resistentes
β-LACTÁMICOS			
Ceftacidima	15	5	25
Piperacilina	20	0	0
Imipenem	20	0	0
AMINOGLUCÓSIDOS			
Amikacina	20	0	0
Tobramicina	20	0	0
Gentamicina	20	0	0
QUINOLONAS			
Ofloxacina	19	1	5

Penicilinas, Cefalosporinas y Carbapenems, pertenecen a la familia de las **β-lactamas**, que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, cuando se unen e inactivan las PBPs (*penicillin-binding-proteins*), inhibiendo la síntesis de peptidoglicano. Normalmente las resistencias que se desarrollan frente a estos antibióticos provienen de la hidrólisis del anillo β-lactámico, característico de este tipo de antibacterianos, por unos enzimas llamados β-lactamasas; este es el caso de *P. aeruginosa*. Dentro del grupo de los β-lactámicos encontramos un 10% de cepas clínicas resistentes a piperacilina, mientras que las ambientales son sensibles en su totalidad.

El **Imipenem**, tiene la particularidad de presentar un núcleo carbapenem que lo hace resistente a la acción de las β -lactamasas en general, con la excepción de las metalo- β -lactamasas (enzimas capaces de hidrolizar carbapenems). Su acción es posible debido a que puede atravesar la membrana externa a través de las porinas, que en el caso de *P. aeruginosa* es la OprD. *P. aeruginosa* posee metalo- β -lactamasas, pero el mecanismo principal de resistencia al imipenem es la pérdida de la porina OprD. En este estudio encontramos un 15% de cepas resistentes dentro de la población clínica, y ninguna en la población ambiental.

La **Ceftacidima**, una cefalosporina de tercera generación, presenta una actividad *in vitro* contra *P. aeruginosa* mayor que cualquier otra cefalosporina; sin embargo, encontramos unas frecuencias de resistencia similares en los grupos clínico y ambiental, probablemente debido a una mutación que provoca una desrepresión de la β -lactamasa cromosómica. La elevada resistencia de las cepas ambientales podría ser debida a que el tamaño de la población ambiental estudiada es pequeño o a que nuestro estudio se centra en el entorno del hospital de Bellvitge que es un entorno limitado y cabe pensar que ejerce una cierta presión selectiva.

Los **aminoglucósidos** inhiben la síntesis de proteínas. La tobramicina y la gentamicina, a diferencia de los primeros aminoglucósidos como por ejemplo la kanamicina, se unen tanto a la subunidad 30S como a la de 50S del ribosoma para llevar a cabo esta inhibición. Esto hace que se requiera más de una mutación para la adquisición de resistencias, por lo que su aparición es menos probable. Las cepas ambientales son totalmente sensibles a los tres aminoglucósidos ensayados, mientras que las clínicas presentan un 30% de resistencia a la tobramicina y la gentamicina, y un 20% en el caso de la amikacina.

El grupo de las **quinolonas**, a la que pertenece la Ofloxacina, actúa inhibiendo la síntesis del DNA mediante el bloqueo de la DNA girasa o la Topoisomerasa IV. Las quinolonas de nueva generación tienen la capacidad de unirse a varias dianas de las subunidades de la girasa, lo cual dificulta la aparición de cepas resistentes. Aún así, encontramos que un 30% de las cepas clínicas y un 25% de las ambientales eran resistentes.

Así pues, los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana nos muestran que, en general, las cepas ambientales son más susceptibles a los antibióticos ensayados. Esto puede ser debido al hecho que las cepas clínicas, están sometidas a la continua acción selectiva tanto de antibióticos como de desinfectantes, de manera que el desarrollo de resistencias es más elevado. Por tanto, las diferencias en la susceptibilidad sugieren, además, cierto grado de aislamiento ecológico entre ambas poblaciones, ya que las cepas clínicas se encontrarían en un hábitat con una elevada presión selectiva por parte de los antibióticos, y en cambio las cepas ambientales estarían en otro hábitat separado donde esta presión es mucho menor, de manera que la frecuencia de mecanismos que dan lugar a las resistencias no estaría favorecida por un entorno selectivo, sino simplemente, por errores “normales” en los procesos de replicación del DNA.

4.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS TOTALES Y OMPs

Se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, para obtener perfiles, tanto de proteínas totales como de OMPs, de las 40 cepas del estudio. Estos perfiles fueron comparados para observar el grado de variación fenotípica entre las dos poblaciones y ver si está relacionado con el grado de variación genética, y descubrir así, la importancia de la membrana externa como herramienta para aproximarnos a la estructura de las poblaciones de *P. aeruginosa*. Estos estudios también complementan los de susceptibilidad analizando el papel de la membrana externa en la resistencia a los antibióticos.

Respecto los perfiles de proteínas totales (figura 4.1) no hay ningún dato a destacar, dado que no existen diferencias significativas cuando se comparan entre ellos y con la cepa de colección.

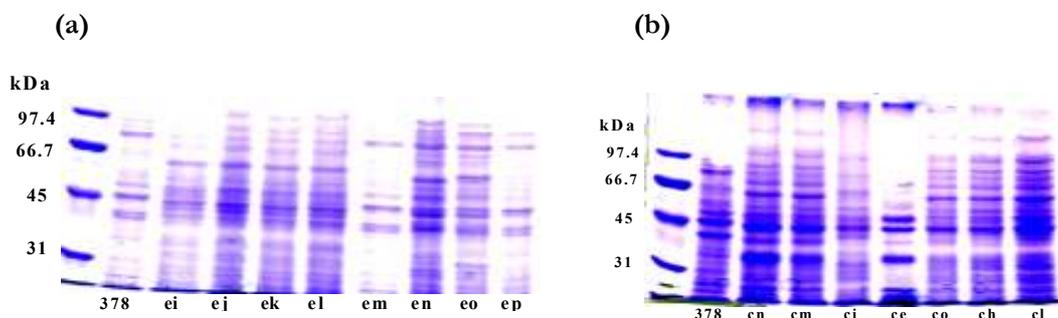


Figura 4.1 Perfiles electroforéticos de proteínas totales en SDS-PAGE de algunas de las cepas de *P. aeruginosa*, tanto ambientales (a), como clínicas (b). La cepa 378 es una cepa control, procedente de la colección española de cultivos tipo.

El papel de la membrana externa en la resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa*, es bien conocido en el caso de los carbapenems, y sobretodo en el caso del imipenem, ya que como se ha comentado en apartados anteriores es resistente a las β -lactamasas y atraviesa la membrana externa a través de la porina específica OprD. La emergencia de mutantes resistentes a imipenem después de tratamientos prolongados con este antibiótico es debida principalmente a la pérdida mutacional de la proteína [134,135], o bien al echo de que estos aislados presentan unos niveles de proteína disminuidos debido a una mutación llamada *nfxC* que reprime el gen *OprD* y activa el operón de reflujo *mexEF-oprN*, provocando además resistencia a las quinolonas [136,137].

La figura 4.2 muestra los perfiles de membrana externa (OMP) de algunas de las cepas de *P. aeruginosa*, realizados mediante electroforesis SDS-PAGE, tal y como se explica en el apartado correspondiente de materiales y métodos.

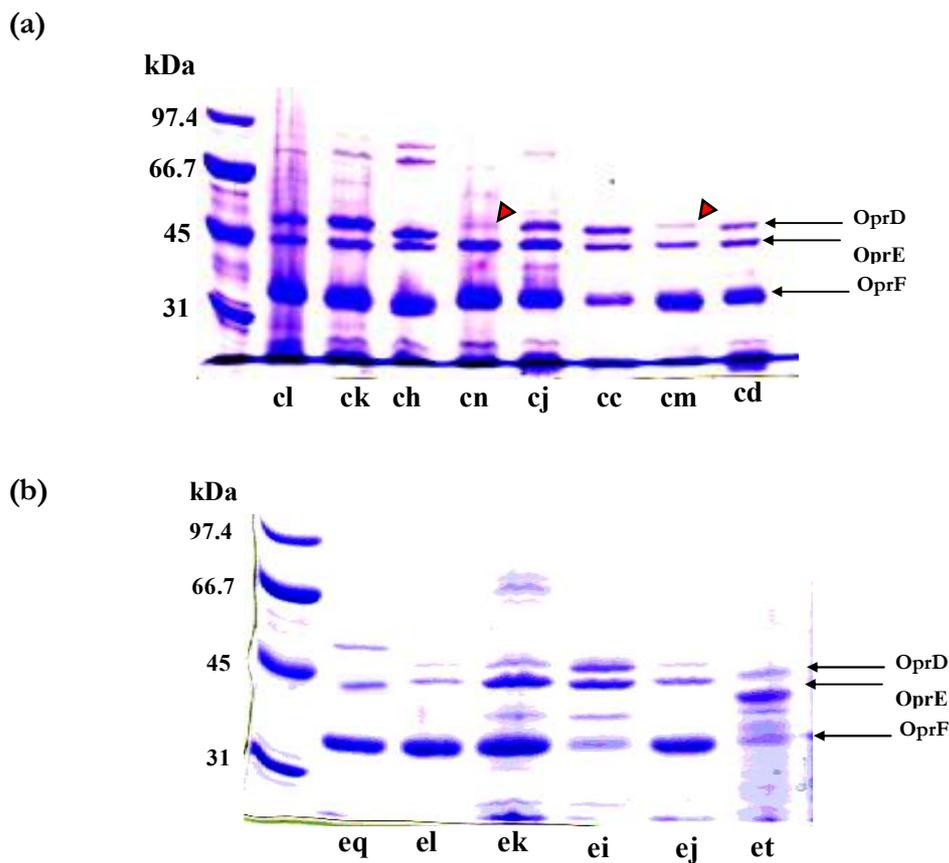


Figura 4.2 Perfiles electroforéticos de proteínas de la membrana externa (OMP) en SDS-PAGE de algunas de las cepas de *P. aeruginosa*, tanto ambientales (a), como clínicas (b). La cabeza de flecha roja en las cepas cn y cm indica una posible expresión disminuida de OprD.

Las cepas ca, cn y co son resistentes al imipenem. Observando sus perfiles de membrana externa podemos ver que en el caso de ca y cn la resistencia podría ser debida a la disminución en la expresión de la porina OprD (fig. 4.2) y, por tanto, podríamos estar delante de mutantes del tipo *nfxC*, pues también son resistentes a las quinolonas. Co no presenta una pérdida de esta proteína, lo que parece indicar que existe otro mecanismo que provoca la resistencia. Algunos autores han descrito la existencia de cepas resistentes al imipenem que no presentaban una pérdida de la porina sino una mutación en alguno de los *loops* que participan en la unión del imipenem [⁸²], de manera que la cepa expresa una proteína que podemos observar en los geles de membrana externa, pero debido a que esta es deficiente no permite la entrada del antibiótico, de manera que el microorganismo se vuelve resistente a él. Este podría ser el caso de la cepa co. La cepa cm también presenta una disminución de la expresión de OprD, pero no es resistente al imipenem, aunque sí lo es a las quinolonas; quizá esto es debido a que aún se encuentra en una etapa precoz de cambios en *nfxC* en que el grado de disminución en la expresión no es suficiente para provocar la resistencia al imipenem.

En el resto de perfiles de membrana no se observan diferencias significativas dado que en la mayoría de los perfiles observamos tres bandas mayoritarias de unos 39, 44 y 45 kDa aproximadamente, que se corresponden con OprF OprE y OprD respectivamente. Algunas cepas presentan expresión disminuida de OprF, pero no se ha demostrado que esta proteína esté implicada en la resistencia a los antibióticos. Las comparaciones electroforéticas entre perfiles de proteínas de membrana externa y proteínas totales sugieren que las cepas están relacionadas ya que los perfiles son homogéneos y no presentan variabilidad significativa entre ellos, observándose un patrón común entre las cepas de ambos orígenes.

Además de la relación existente entre la membrana y la resistencia a los antimicrobianos, decidimos incluir estos datos en el estudio de poblaciones ya que, esta resistencia, generalmente, se da por sucesos no independientes de recombinación como las mutaciones simples, lo que permite analizar detalladamente procesos muy localizados de recombinación en *P. aeruginosa*.

Con los patrones obtenidos de los perfiles de OMPs se construyó una matriz con la que se ha realizado un dendrograma que se muestra en la figura 4.3.

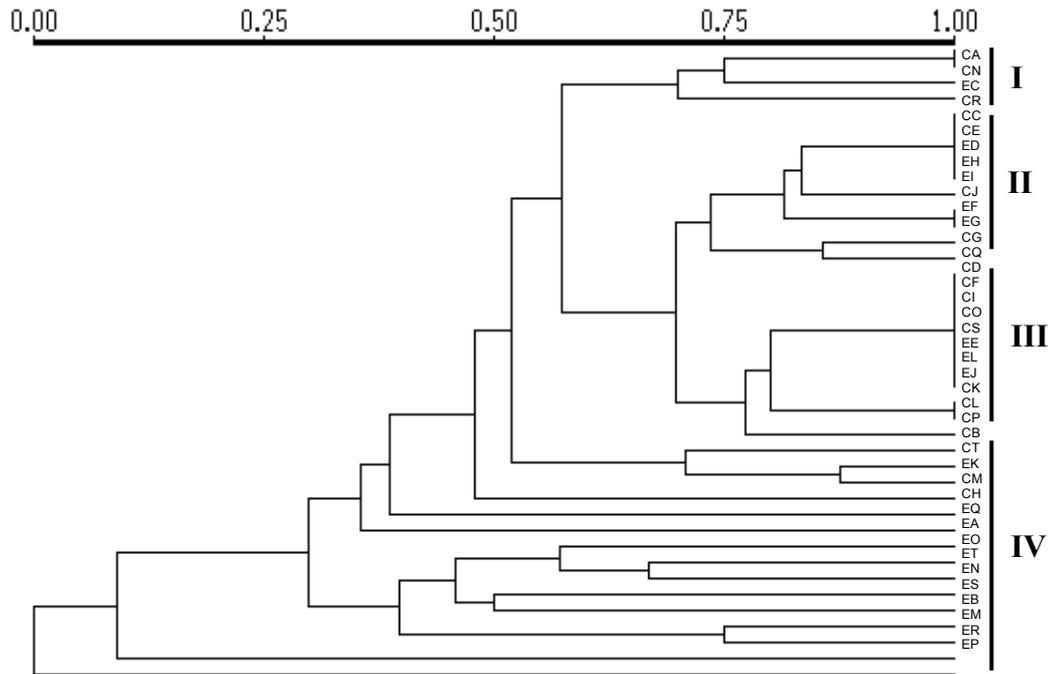


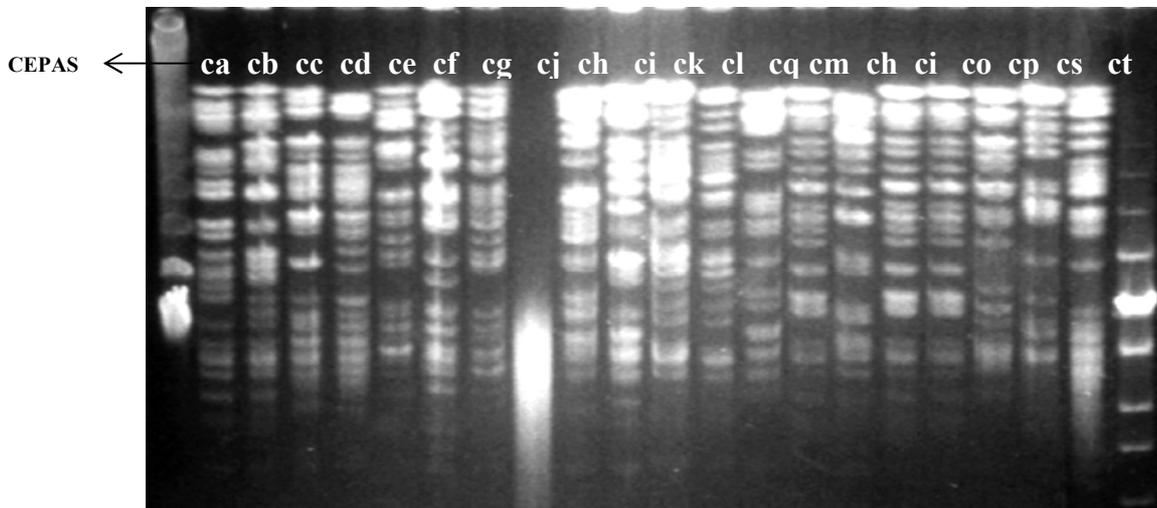
Figura 4.3 Dendrograma originado con los perfiles de proteínas de membrana externa, utilizando el índice de Jackard y UPGMA. (La barra horizontal superior indica el % de similitud entre las cepas comparadas, el cual puede ir desde el 0 % (ninguna similitud), hasta al 100% (totalmente coincidentes)).

El dendrograma de la figura anterior, nos muestra que la separación entre las dos poblaciones, clínica y ambiental, no es muy clara, confirmando la observación hecha a partir de los geles de membrana. Se puede identificar un primer cluster en el que se incluyen cuatro cepas (cluster I), tres de origen clínico y una de origen ambiental. El segundo cluster (cluster II) que observamos, también contiene aislados tanto clínicos como ambientales, igual que el cluster III. En cambio, el cluster IV está formado únicamente por cepas de origen ambiental (eq, ea, eo, et, en, es, eb, em, er y ep), aunque la distancia genética entre ellas sugiere una relación pobre. De hecho las cepas de este grupo están tan poco relacionadas con las demás, como con las que forman los otros clusters. Sin embargo, parece razonable concluir de este dendrograma que las membranas externas de los aislados ambientales son más diversas que las de los aislados clínicos. Si calculamos la diversidad media de las cepas ambientales obtenemos un valor aproximado de 0.62, frente a un valor de 0.28 en las clínicas. Si se consideran las máximas diferencias entre dos cepas, también se puede observar que entre aislados ambientales pueden ser diferencias de 0.70 (por ejemplo cepas el-er) mientras que la máxima disimilitud entre cepas clínicas nunca supera 0.47.

4.3 ANÁLISIS DEL DNA MEDIANTE PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

Se ha demostrado que las técnicas de tipado que se basan en información obtenida de los ácidos nucleicos son mucho más discriminatorias que las fenotípicas (particularmente en el caso del análisis de OMPs) para el tipaje de *P. aeruginosa* [138]. Así pues, con el fin de establecer posibles relaciones entre los aislados estudiados, se realizó un análisis genético del genoma mediante PFGE. En la figura 4.4 podemos observar los perfiles obtenidos mediante esta técnica; y la tabla 4.4 nos muestra el resumen de los resultados.

(a)



(b)

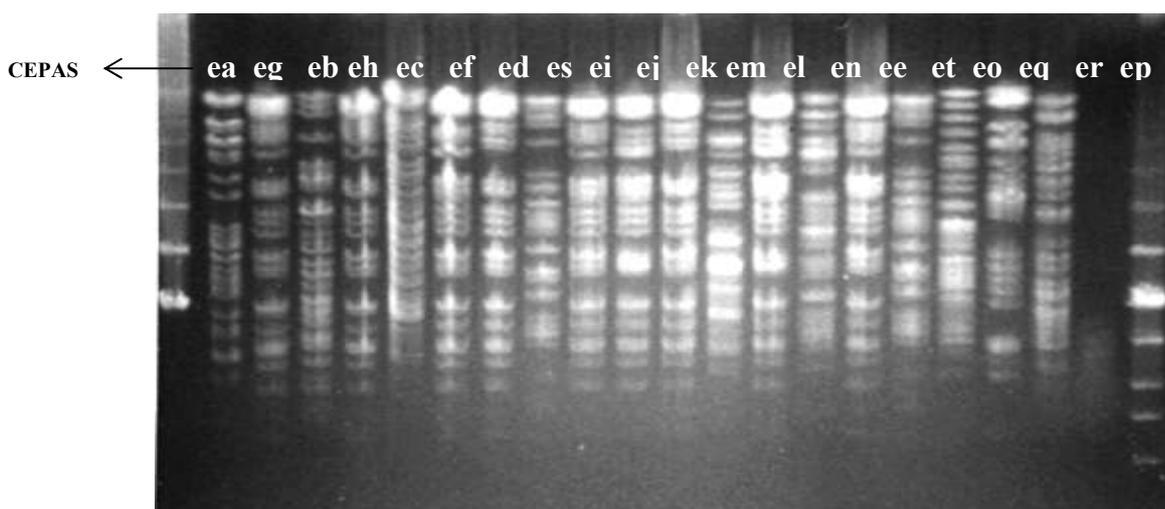


Figura 4.4 Perfiles electroforéticos de las cepas clínicas (a) y de las cepas ambientales (b). (El DNA de las cepas cj y ep está degradado en esta preparación, y los resultados finales de éstas, no se muestran en este trabajo).

Tabla 4.4 Genotipos de los aislados clínicos y ambientales de *P. aeruginosa* determinados mediante PFGE.

Cepas clínicas		Cepas ambientales	
Cepa	Genotipo	Cepa	Genotipo
Ca	1	Ea	18
Cb	2	Eb	19
Cc	3	Ec	20
Cd	4	Ed	19
Ce	5	Ee	26
Cf	6	Ef	19
Cg	7	Eg	19
Ch	8	Uh	20
Ci	9	Ei	19
Cj	10	Ej	19
Ck	11	Ek	19
Cl	11	El	21
Cm	12	Em	19
Cn	13	En	22
Co	14	Eo	19
Cp	13	Ep	20
Cq	13	Eq	23
Cr	15	Er	24
Cs	16	Es	25
Ct	17	Et	27

Como observamos en la tabla 4.4, se han determinado un total de 27 genotipos entre las 40 cepas estudiadas. Ningún genotipo detectado en las cepas clínicas se encuentra también entre las ambientales, y viceversa.

Las cepas clínicas presentan 17 genotipos; un de ellos, el genotipo 13, se detecta en tres aislados (7,5%), mientras que el genotipo 11, lo muestran dos de las cepas (5%). Entre las cepas ambientales se detectaron 10 genotipos, y del mismo modo que para el caso anterior dos genotipos que se repiten con mayor frecuencia; el genotipo 19 se presenta en nueve de los 20 aislados (22,5%), mientras que el genotipo 20 lo encontramos en tres (7,5%).

En general se observa que la diversidad genética medida mediante esta técnica, es menor entre cepas ambientales que entre cepas clínicas, dado que estas últimas presentan un número más elevado de genotipos. Esta sorprendente poca diversidad detectada entre las cepas ambientales, puede ser explicada por su origen, ya que mientras todas las cepas ambientales fueron aisladas en el entorno del Centro Médico (un único hábitat y además bastante reducido), las cepas clínicas derivan de los diversos hábitats en los que los pacientes han vivido antes de su admisión en el hospital. Si esto es así, la baja diversidad detectada en el grupo de aislados ambientales puede ser un artefacto, ya que el origen geográfico es un factor de distorsión que opera en la “colección ambiental”, pero no en la clínica. Al mismo tiempo, esto demuestra que las cepas llamadas ambientales, son bacterias que viven en los ambientes y no únicamente contaminantes de origen clínico o humano.

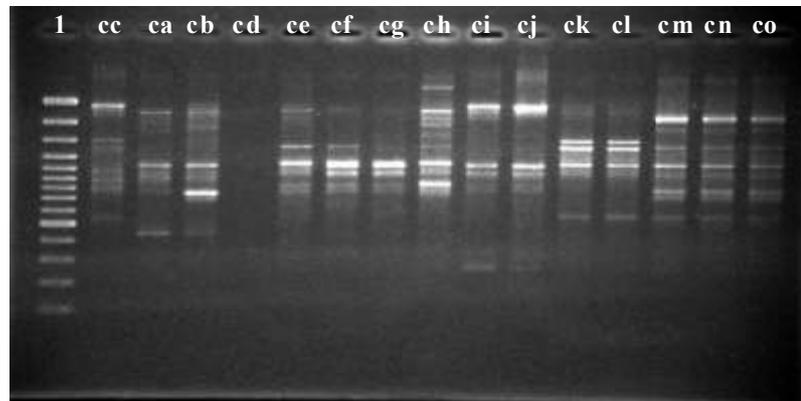
4.4 ANÁLISIS DEL DNA MEDIANTE RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Los polimorfismos existentes en las huellas genómicas nos ayudan a distinguir entre cepas débilmente divergentes de un organismo. La realización de esta técnica nos permite obtener estos polimorfismos, detectados como fragmentos de DNA amplificados mediante PCR, utilizando *primers* arbitrarios. RAPD ha sido utilizado para el tipado de muchos microorganismos, incluyendo *P. aeruginosa*, y se ha demostrado que es muy útil a la hora de discriminar aislados clínicos y ambientales de *P. aeruginosa* [38,39]. No hay que olvidar, sin embargo, que esta técnica mide la variación genética a corto plazo.

Para detectar el grado de divergencia de nuestras dos poblaciones mediante esta técnica, se extrajo el DNA de cada una de las cepas y posteriormente se realizó una PCR, con cada uno de los *primers* arbitrarios. Para visualizar los resultados se realizaron electroforesis convencionales en geles de agarosa. Los resultados obtenidos se visualizaron mediante geles de agarosa.

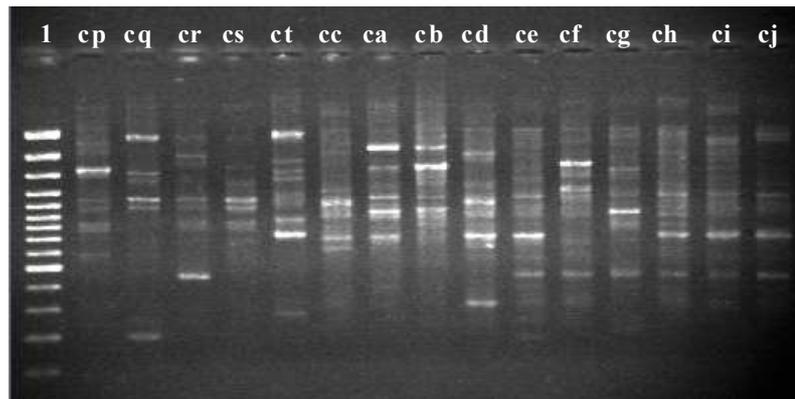
La figura 4.6 muestra los resultados de las electroforesis realizadas.

Primer 270



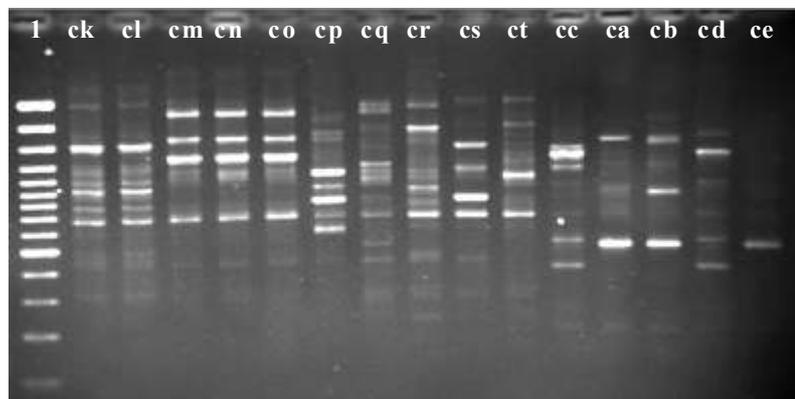
Primer 270

Primer 208

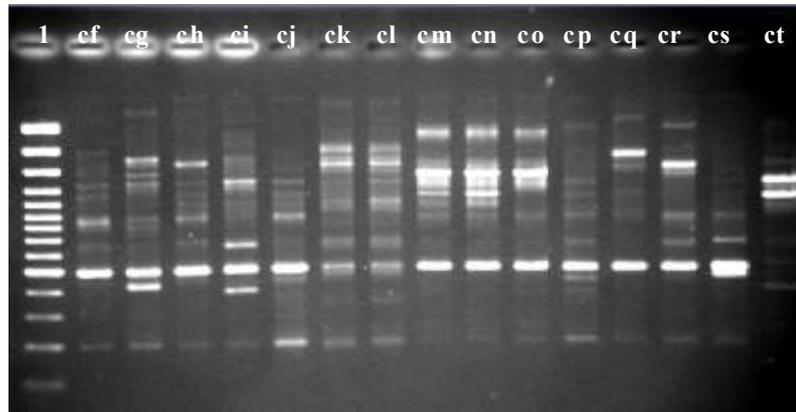


Primer 208

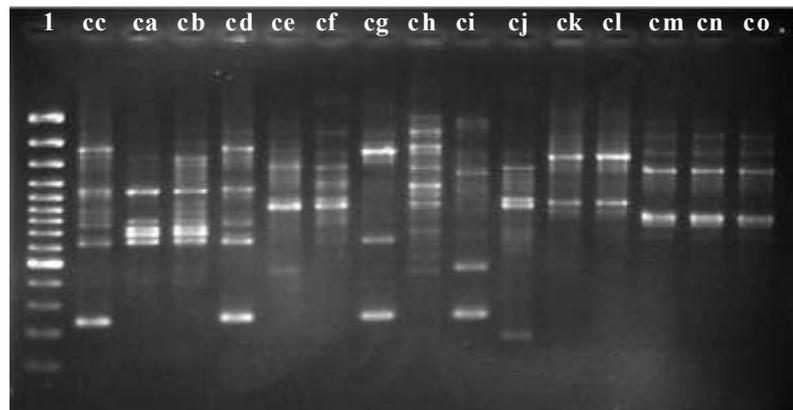
Primer 241



Primer 241

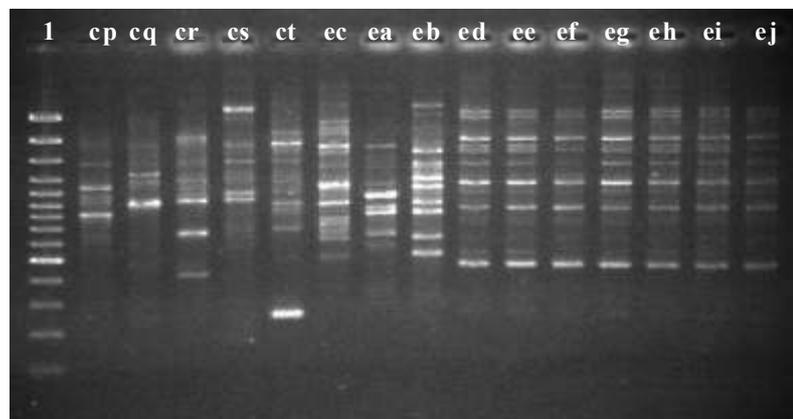


Primer 228



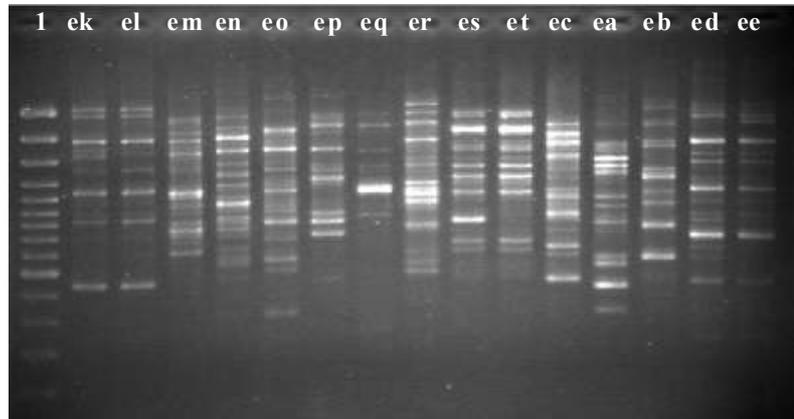
Primer 228

Primer 270

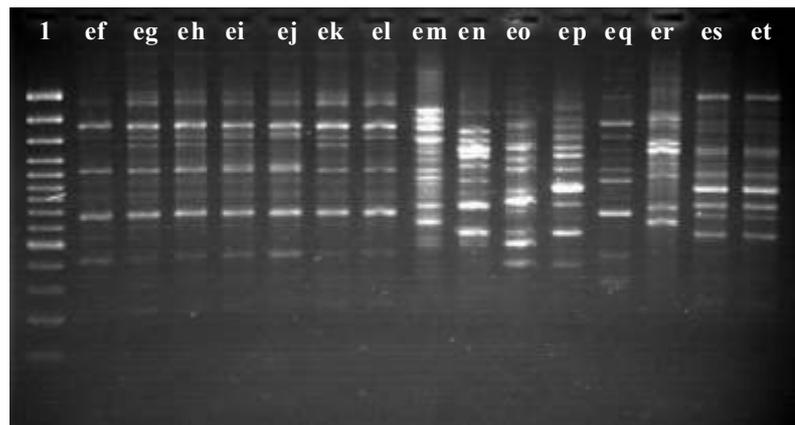


Primer 270

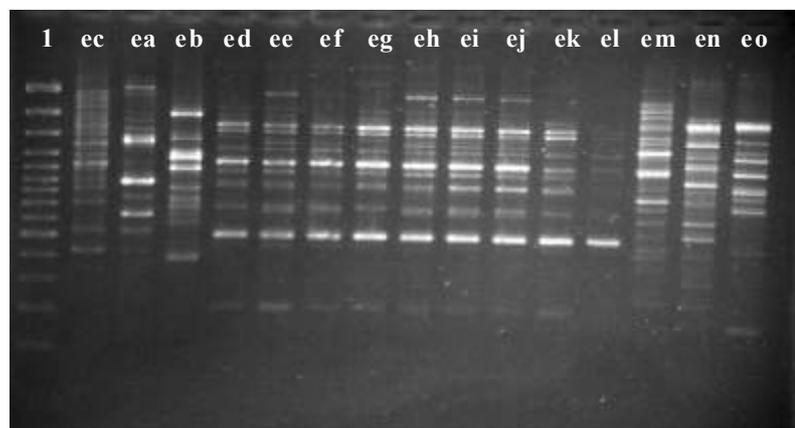
Primer 208



Primer 270



Primer 241



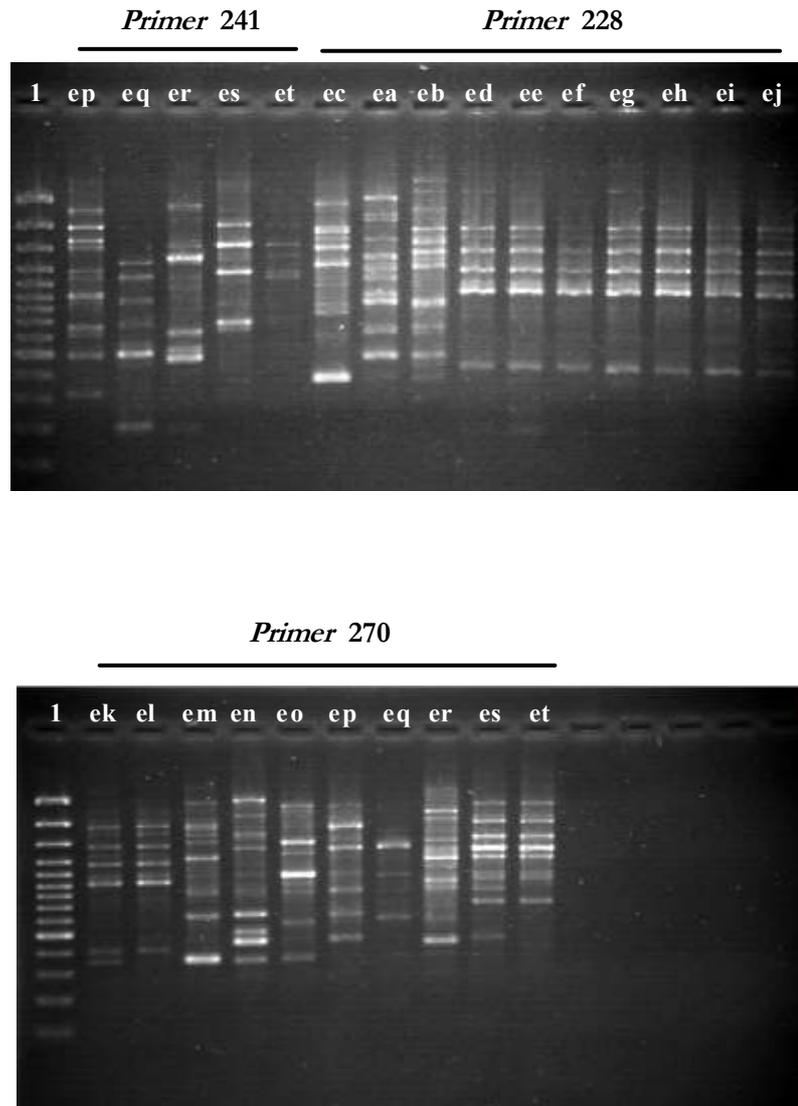


Figura 4.6 Imágenes de los geles de agarosa que muestran los polimorfismos obtenidos mediante RAPD con los *primers* 270, 241, 208 y 228, tanto de las cepas clínicas como de las ambientales. En todos los casos el carril 1 muestra el marcador *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* y el resto de carriles están indicados con el nombre de la cepa correspondiente. También se ha indicado, mediante una barra horizontal, a qué *primer* corresponden los diversos carriles.

A partir de los resultados obtenidos con los diversos *primers* utilizados y, mediante la metodología explicada en el apartado correspondiente de material y métodos, se realizó una matriz numérica, a partir de la cual se construyeron dendrogramas, utilizando el programa NTSYS-pc, los cuales se muestran en las figuras 4.7, 4.8, 4.9 y 4.10.

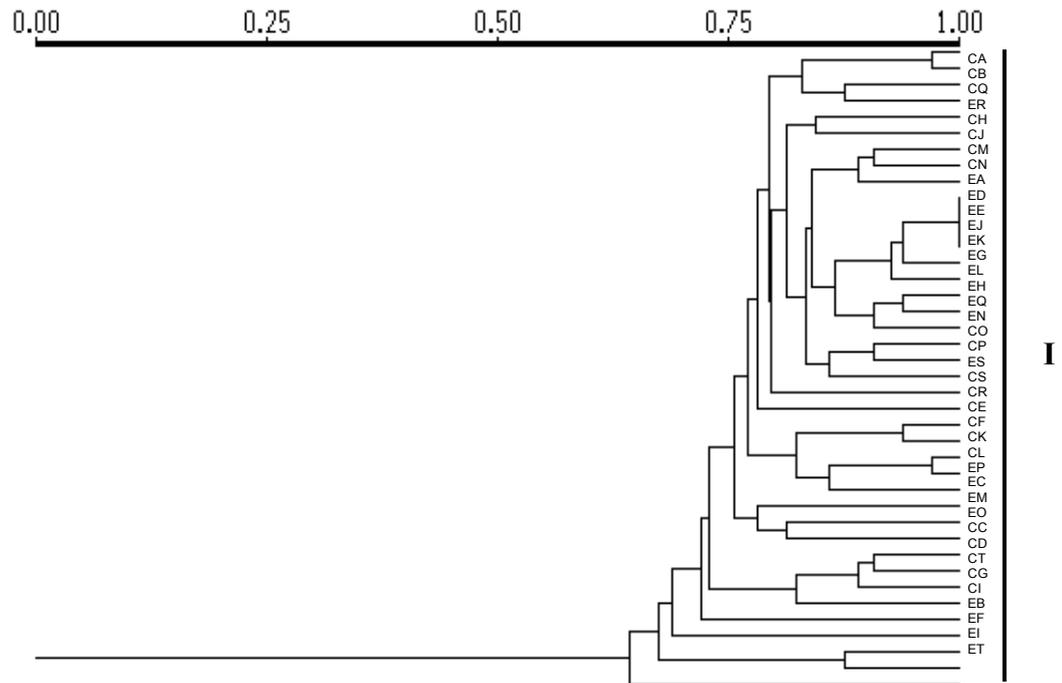


Figura 4.7 Dendrograma obtenido a partir del RAPD con el *primer 228*. Los clusters generados se indican mediante números romanos.

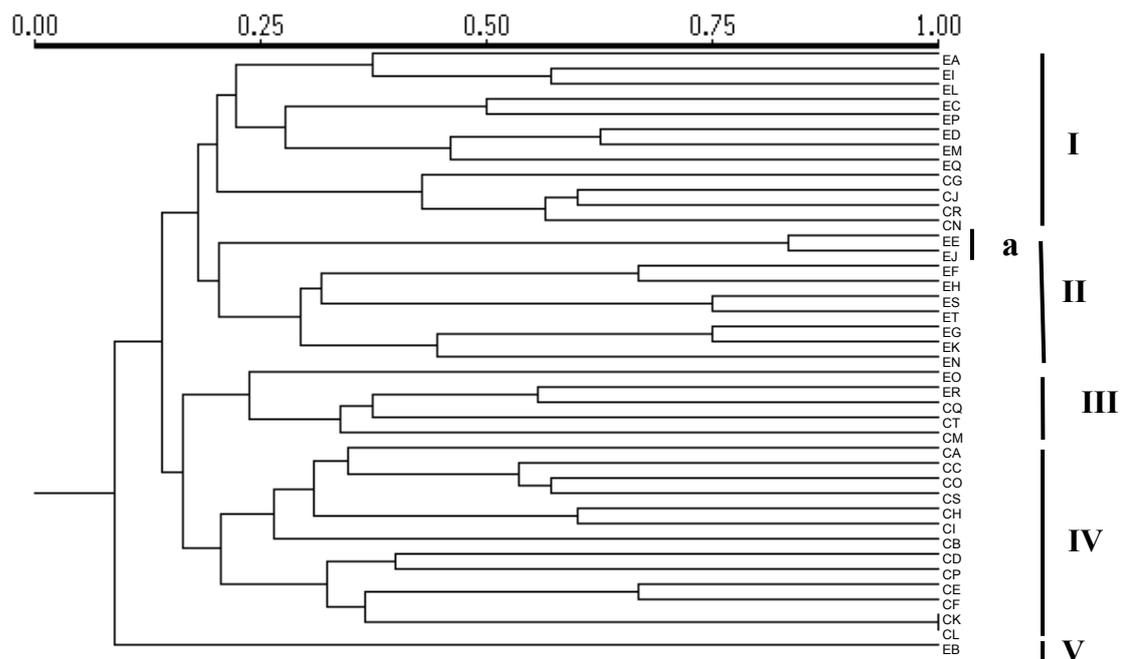


Figura 4.8 Dendrograma obtenido a partir del RAPD con el *primer 270*. Los clusters generados se indican mediante números romanos, y los subclusters mediante letras.

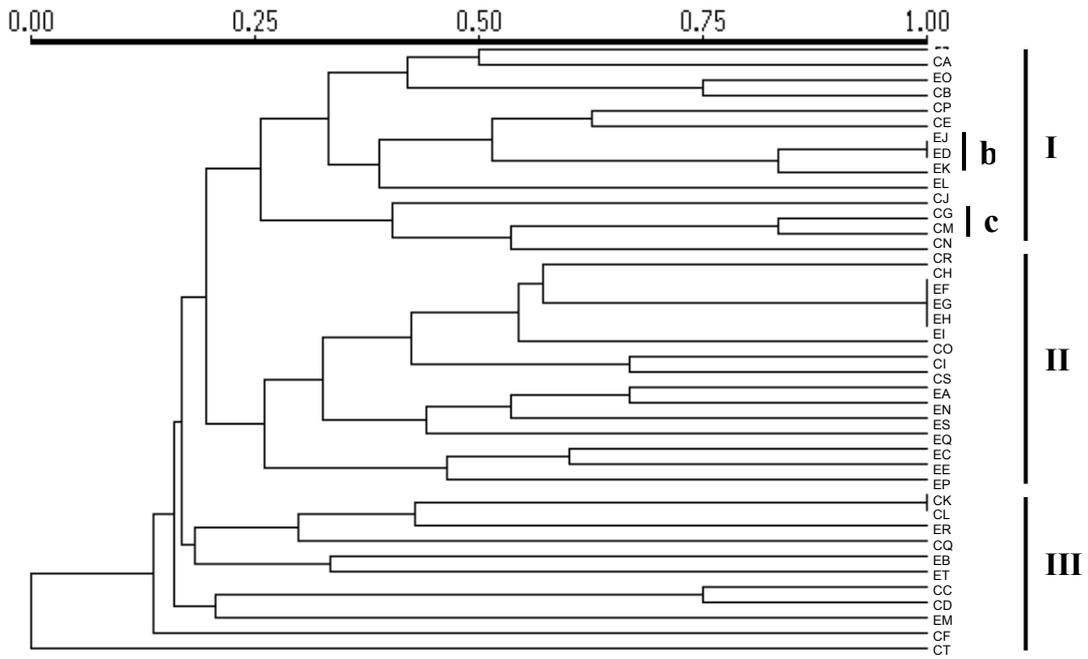


Figura 4.9 Dendrograma obtenido a partir del RAPD con el *primer* 241. Los clusters generados se indican mediante números romanos, y los subclusters mediante letras.

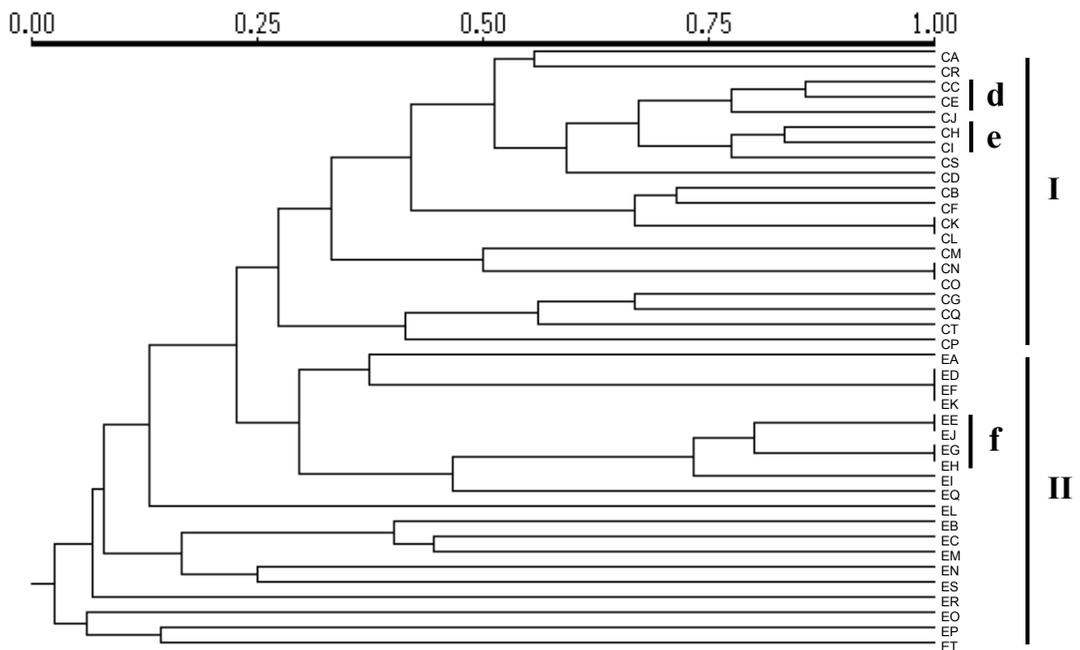


Figura 4.10 Dendrograma obtenido a partir del RAPD con el *primer* 208. Los clusters generados se indican mediante números romanos, y los subclusters mediante letras.

Los *primers* utilizados han sido identificados por Mahenthiralingam *et al.* [¹¹²], como *primers* que amplifican, de una manera reproducible, polimorfismos apropiados para la diferenciación de cepas de *P. aeruginosa*. Los resultados obtenidos con los diversos *primers* son claramente diferentes.

De las reacciones desarrolladas con el *primer* 228 (figura 4.7) se sugiere una estructura poblacional con un elevado grado de homogeneidad, ya que todas las cepas se encuentran en un único grupo (cluster I) con un 75% de identidad; así pues, se podría asumir que las agrupaciones obtenidas con este *primer* son poco significativas. Por otro lado, podemos decir que la elevada homogeneidad de la población podría ser debida a que este *primer* amplifica una región muy conservada del genoma de *P. aeruginosa*, de manera que no detectamos variabilidad entre las poblaciones.

La utilización del *primer* 270 (Figura 4.8) genera cinco clusters; el cluster I está formado básicamente por cepas ambientales, aunque también podemos encontrar cuatro aislados clínicos. El segundo cluster (cluster II) lo componen exclusivamente cepas ambientales; mientras que el cluster III incluye casi el 50% cepas clínicas y ambientales. El número IV está compuesto únicamente por cepas clínicas. Finalmente, la cepa eb (una cepa ambiental) se encuentra claramente separada del resto de bacterias estudiadas (cluster V).

Si observamos los resultados obtenidos con el *primer* 241 (figura 4.9), identificamos principalmente tres clusters que incluyen cepas tanto ambientales como clínicas; a pesar de esto, podemos observar que dentro estos clusters principales, las cepas clínicas y ambientales forman subclusters. Dado que en este caso los tres clusters también incluyen cepas de ambos orígenes, podría ser que este *primer* también amplificase una región bastante variable en la evolución de las poblaciones de *P. aeruginosa*.

Finalmente, el *primer* 208 (Figura 4.10) discrimina claramente entre cada una de las poblaciones, de manera que encontramos únicamente dos grandes clusters, uno de los cuales está formado únicamente por las cepas de origen clínico (cluster I), y el otro (cluster II) únicamente por las cepas ambientales, de manera que estaríamos delante un *primer* que nos amplifica una región importante para la diferenciación de las dos poblaciones, la clínica y la ambiental. Esto hace pensar que el *primer* que mejor discrimina entre las dos poblaciones, en nuestro estudio, es éste.

4.5 DISCUSIÓN FINAL SOBRE LAS POBLACIONES DE *Pseudomonas aeruginosa* ESTUDIADAS

En el dendrograma generado a partir del análisis de OMPs no se observa una separación tan clara entre cepas clínicas y ambientales, como cuando se toman los datos obtenidos por PFGE; se podría pensar incluso, que la medida de la diversidad por SDS-PAGE de las proteínas de membrana externa, difiere de los resultados por PFGE, donde se observa una elevada diversidad entre las cepas clínicas.

Si asumimos que la membrana externa constituye una barrera de permeabilidad que juega un gran papel en la resistencia a los antibióticos, se esperaría que únicamente determinadas combinaciones de proteínas de membrana sobreviviesen en los pacientes hospitalizados, de manera que la presión selectiva actuaría, en este caso, de una manera inversa a la esperada, es decir, disminuyendo la diversidad fenotípica entre las cepas clínicas, aunque la diversidad genética medida por PFGE es bastante elevada en este grupo. En este sentido, Pirnay *et al.* señalaron que por lo menos una proteína de *P. aeruginosa* (OprD) importante para la adaptabilidad de la bacteria, era altamente mutable, y sometida a elevada presión selectiva en los ambientes hospitalarios. Además ya hemos comentado que los métodos que miden variación fenotípica, como es el caso de los patrones de OMPs, únicamente detectan este tipo de variación, la fenotípica y ésta es muy difícil de relacionar con las variaciones alélicas y por tanto, con la diversidad genética.

Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos por RAPD con el *primer* 208, podemos observar que la diversidad es más elevada entre las cepas ambientales, que entre las cepas clínicas; estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la electroforesis de proteínas de membrana, pero no con los perfiles dados por el PFGE, lo que, como ya se ha explicado anteriormente podía ser debida al diferente origen geográfico que presentan ambas poblaciones.

Esto concuerda con el análisis realizado mediante los *primers* 270 y 241. En estos dos casos podemos observar que los clusters están compuestos, en su mayoría, tanto de cepas ambientales como de clínicas, y en los casos en que esto no es así (clusters II y IV, generados mediante el *primer* 270) el grado de similitud entre las cepas presenta un porcentaje bastante bajo (<50%); todo esto parece indicar que la región ahora amplificadas

podría ser una región altamente variable. Además el hecho de que algunos de estos clusters contengan cepas de lugares geográfica y ecológicamente distintos, sugiere tasas elevadas de migración y una versatilidad nutricional remarcable, adquirida, ya sea mediante recombinación, como mediante otro mecanismo de evolución. Esto, ya fue sugerido por Pirnay *et al.* en un estudio realizado con 73 cepas de *P. aeruginosa*, tanto de origen clínico como ambiental, recogidas en varios lugares del mundo [41].

La existencia de subclusters (a-f) generados por los *primers* 270, 241 y 208, cuyos miembros presentan una elevada homología ($\geq 80\%$), es una evidencia de un reciente y explosivo incremento de estos clones en la población, ya sea de origen clínico como ambiental. En el caso de las cepas de origen clínico, el estudio de la características de estos clones epidémicos, también demuestra que estos clones son recientes y se encuentran en las primeras etapas de adaptación al ambiente hospitalario, ya que ninguno de ellos presenta elevada resistencia a los antibióticos ensayados, de manera que es posible, que la ventaja adquirida por ellos, sea de tipo ecológico; es decir probablemente, en primer lugar adquirirían una característica que les permitiría ocupar un nuevo nicho ecológico, y posteriormente, según la presión del ambiente desarrollarían o no características más adaptativas, con el fin de sobrevivir en el ambiente, que en este caso llevaría, probablemente, a la adquisición de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. En el caso de las cepas ambientales, la ventaja selectiva probablemente también será de ocupación de nicho ecológico y su evolución, probablemente, no dará lugar a cepas resistentes a los antimicrobianos, ya que *a priori* estas cepas no tienen porque estar sometidas a una presión selectiva de éstos.

En resumen, se detecta una clara separación entre cepas clínicas y ambientales, por lo menos mediante tres tipos de experimentos (susceptibilidad antibiótica, PFGE, y RAPD utilizando el *primer* 208). Estos resultados son consistentes con las diferencias observadas en los perfiles de OMPs, ya que la presión selectiva favorece la presencia de ciertos modelos de membrana externa en aquellos ambientes en los que existe fuerte presión.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las diferentes técnicas se podría pensar que la población de *P. aeruginosa* en nuestro entorno (Hospital de Bellvitge y alrededores), es una población clonal epidémica. Si esto es así, las poblaciones de este microorganismo tendrían un origen panmítico, pero únicamente un número determinado

de clones se habrían diseminado de una forma epidémica. Estos clones se habrían originado a partir de una amplia variedad de genotipos no relacionados, y entre ellos habría existido una elevada frecuencia de recombinación, para dar lugar a una “nueva” población. Si observamos el dendrograma originado con el primer 208 podremos detectar que todas las cepas provienen de una población ambiental muy diversa, en la que un clon ha emergido para dar lugar a la población clínica que, una vez establecida, vuelve a diversificarse. Esta diversificación se debe a que los clones son transitorios ya que, con el tiempo, la recombinación borra las evidencias de asociación.

4.6 ANÁLISIS DE LA PRESENCIA/AUSENCIA DE INTEGRONES

La resistencia adquirida de los microorganismos, es realmente un problema muy relevante desde el punto de vista clínico, ya que en los últimos años, particularmente a nivel hospitalario, están apareciendo un gran número de cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos no relacionados entre ellos, dando lugar a lo que se conoce como cepas multiresistentes (MDR). Este tipo de resistencia suele producirse por modificaciones genéticas [139]; a partir de poblaciones inicialmente susceptibles emergen cepas resistentes, debido a algún cambio genético, como consecuencia, por ejemplo de una mutación. Esto combinado con la presión selectiva del medio (que suele presentar grandes concentraciones de antibióticos) hace que las cepas sensibles sean progresivamente eliminadas, mientras que las resistentes persistirán, se extenderán y podrán llegar a ser dominantes.

La adquisición de resistencia a múltiples antimicrobianos puede ser debida, además, al intercambio de material genético a través de mecanismos de transformación, transducción o conjugación o, a una combinación de éstos [140]. Frecuentemente se produce una transmisión de genes mediante plásmidos o transposones conjugativos. En los últimos años se han descrito unas estructuras genéticas implicadas en la transferencia de genes procedentes de otras bacterias, sean o no de la misma especie, y por tanto implicadas también en la propagación de genes de resistencia. Se trata de los integrones, que son sistemas de recombinación natural que facilitan la adquisición y expresión de genes de resistencia a múltiples antibióticos y a desinfectantes entre otros.

Las susceptibilidades a los antimicrobianos ensayados se resumen en las tablas 4.1 y 4.5.

Tabla 4.5 Resumen de las susceptibilidades a los antimicrobianos ensayados.

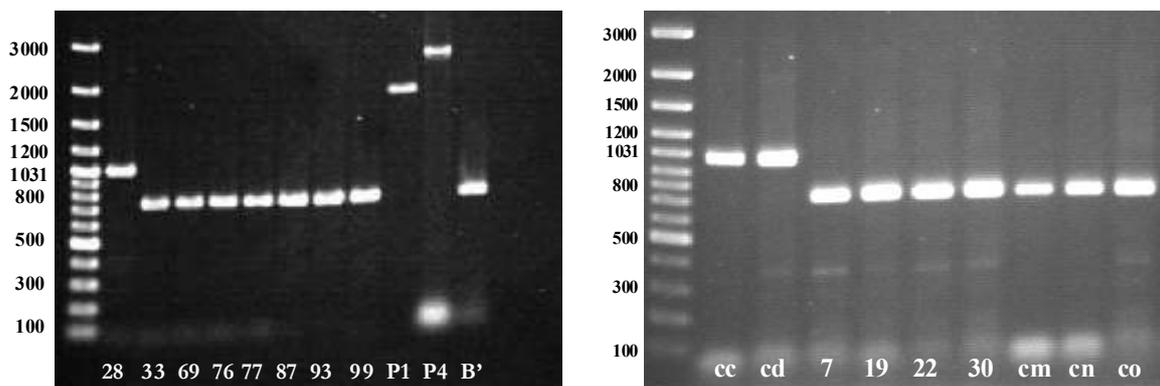
Cepa	β -lactámicos				Carbapenems		Aminoglucósidos			Quino
	P/T	CAZ	FEP	ATM	IMI	MER	G	T	A	CIP
P1	I	R	R	S	R	R	R	R	S	R
P2	I	R	I	R	S	S	S	S	S	R
P3	I	R	I	R	I	I	S	S	S	S
P4	I	R	R	I	S	S	R	R	R	R
P14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P16	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S
P17	R	R	S	I	R	S	R	R	I	S
P18	S	R	S	I	I	S	I	I	I	S
7	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
17	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R
19	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R
22	S	I	I	R	R	R	R	R	S	R
26	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
28	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
33	S	I	I	R	R	R	R	R	S	R
69	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
76	S	I	I	R	R	R	R	R	S	R
77	S	I	I	R	R	R	R	R	S	R
87	S	I	I	R	R	R	R	R	S	R
93	S	I	I	R	R	R	R	R	S	R
99	S	I	I	R	R	R	R	R	S	R
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A'	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B'	S	I	I	S	R	I	R	R	S	R
C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C'	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D'	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
E	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E'	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
F	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F'	S	S	S	S	R	S	I	S	R	S
G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
G'	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

P/T: Piperacilina-Tazobactam; CAZ: Ceftacídima; FEP: Cefepima; ATM: Aztreonam; IMI: Imipenem; MER: Meropenem; G: Gentamicina, T: Tobramicina, A: Amikacina; y CIP: Ciprofloxacina. R: Resistente; I: Sensibilidad disminuida; S: Sensible.

Con el fin de investigar si algunas de las resistencias a diversos antimicrobianos presentadas por nuestras cepas se debía a la presencia de integrones, cromosómicos o plasmídicos, se realizó un *screening* de la presencia de estas estructuras en el genoma de las cepas.

En primer lugar, para detectar la presencia de posibles plásmidos que pudieran contener integrones, se realizó una extracción de plásmidos mediante una técnica convencional, tanto en las cepas utilizadas en el estudio de poblaciones (tabla 3.1), como en otro grupo de 36 cepas (tabla 3.2) de origen clínico. Todas las cepas ensayadas fueron negativas, es decir, ninguna de ellas presentaba plásmidos detectables por el método empleado. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, las técnicas comúnmente utilizadas para la purificación de plásmidos pequeños, no son eficientes para la separación de moléculas de DNA extracromosómicas muy grandes o megaplásmidos (de más de 100 kb), ya que no las separan del DNA cromosómico y, además, este tipo de plásmidos son demasiado grandes para ser bien resueltos en una electroforesis convencional. Por ello, para descartar la presencia de estos plásmidos grandes, también se realizó una detección de posibles megaplásmidos mediante electroforesis de campo pulsante (o S1-PFGE). También en este caso todas las cepas fueron negativas. El hecho de que ninguna de las cepas presente DNA plasmídico, nos dice que todos los integrones detectados están situados en el cromosoma bacteriano, sugiriendo que han debido moverse de sus localizaciones originales al cromosoma de las cepas.

Posteriormente, para detectar la presencia de integrones de clase I, se realizó una PCR mediante dos *primers* situados en las regiones conservadas 5'CS y 3'CS éstos. Estos primers amplifican únicamente la región variable, de manera que sólo se están amplificando los *cassettes* génicos insertados en cada uno de los integrones presentes en el genoma de las bacterias analizadas. Veintiséis de las 76 cepas clínicas ensayadas mostraron la presencia de al menos, un amplificado (figura 4.11). Las cepas ambientales fueron todas negativas.



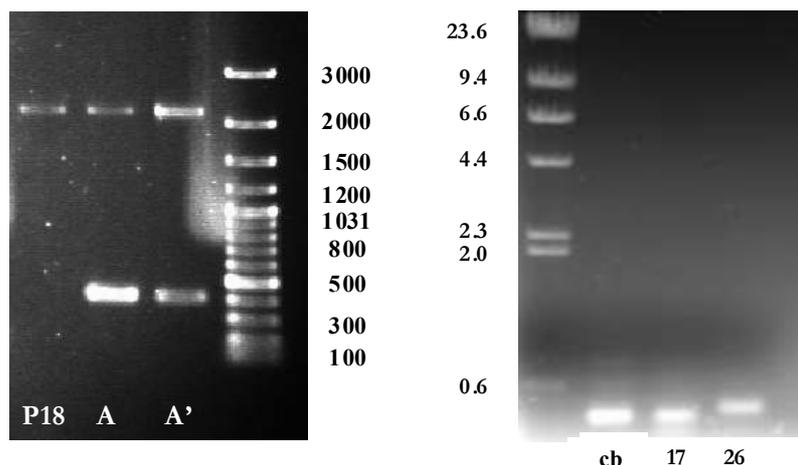


Figura 4.11 Geles de agarosa que muestran los amplicados obtenidos tras la PCR realizada con los *primers* de las secuencias conservadas de los integrones. En la parte inferior se han indicado las cepas a las que pertenecen los diversos amplicados.

El amplicado de mayor tamaño lo presenta la cepa P4 y es de unos 3000pb (la secuencia de éste se está determinando actualmente); mientras que con 2000pb aproximadamente, tendríamos los amplicados de las cepas P1 y P18. Las cepas cc, cd y 28 presentan un amplicado de unos 1000pb, mientras que en las cepas 7, 19, 22, 30, 33, 69, 76, 77, 87, 93, 99, cm, cn, co, y B' su tamaño es de aproximadamente 750pb, siendo este el grupo más numeroso. Por otro lado, las cepas 2, 17 y 26, presentan el amplicado de menor tamaño, unas 200 pb y, por último, tendríamos a las cepas A y A' ambas con dos amplicados, uno de unas 2000pb y otro de unas 400 pb. Esta heterogeneidad en los tamaños de los amplicados indica una heterogeneidad entre los diversos grupos.

Una vez obtenidos los amplicados, se procedió a la preparación de las muestras para la determinación de las secuencias de todos ellos. En los casos en los que la cepa presentaba un único amplicado, se procedió a purificar directamente el producto obtenido tras la PCR, mientras que en el caso de las cepas con dos amplicados, se tuvieron que extraer ambos de la agarosa para poderlos aislar, tal y como se indica en el apartado 3.11.7 de material y métodos.

Después de obtener las secuencias nucleotídicas y, después de corregirlas y supervisarlas mediante el programa informático ChromasPro, se procedió a la comparación de éstas con la base de datos de bacterias mediante el BLAST.

Como resultado se obtuvieron los genes que portan los integrones correspondientes. Todos estos datos se resumen en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Resumen de las cepas que contienen integrones, la medida y los *cassettes* génicos que éstos contienen, y los productos a los que dan lugar.

CEPA	FECHA Y LUGAR AISLAMIENTO	MEDIDA (bp)	NOMBRE	CASSETTES	PROTEINAS CODIFICADAS
Cc	5/5/03- Bronco aspirado	1000	Inl8	<i>aadA7</i>	Aminoglucósido adeniltransferasa
Cd	7/5/03- Orina	1000	Inl9	<i>aadA7</i>	Aminoglucósido adeniltransferasa
28	15/10/05- Exudado herida	1000	Inl28	<i>aadA7</i>	Aminoglucósido adeniltransferasa
7	8/5/03- Esputo	740	Inl7	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
Cm	15/5/03- Esputo	740	Inl13	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
Cn	16/5/03- Orina	740	Inl34	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
Co	16/5/03- Orina	740	Inl35	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
19	13/5/03- Orina	740	Inl19	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
22	13/5/03- Orina	740	Inl22	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
30	14/5/03- Orina	740	Inl30	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
B'	4/6/04- Frotis faríngeo	740	InB'	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
33	26/12/05- Líquido pleural	750	Inl33	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
69	15/1/05- Orina	750	Inl69	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
76	15/9/05- Orina	750	Inl76	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
77	15/10/05- Sangre	750	Inl77	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
87	15/10/05- Sangre	750	Inl87	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
93	15/10/05- Orina	750	Inl93	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
99	15/10/05- Orina	750	Inl99	<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
cb	5/5/03- Bronco aspirado	200	Inl2	Ninguno	-----
17	10/5/03- Frotis herida	200	Inl17	Ninguno	-----
26	13/5/03-Lavado broncoalveolar	200	Inl26	Ninguno	-----
A	5/5/04- Frotis rectal	2500	InA1	<i>orfL</i>	Hipotética integrasa fágica
				<i>tetR</i>	TetR
				<i>orfJ</i>	Proteína hipotética, función desconocida
A'	11/5/04- Frotis rectal	2500	InA'1	<i>orfL</i>	Hipotética integrasa fágica
				<i>tetR</i>	TetR
				<i>orfJ</i>	Proteína hipotética, función desconocida
P1	2002- Portugal	2000	InP1	Ninguno	-----
				<i>aadB</i>	Aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa
				<i>orfE</i>	Proteína hipotética, función desconocida
P18	2002-Ramón y Cajal	2500	InP18	<i>aadA11</i>	Aminoglucósido-3'-adeniltransferasa
				<i>orfL</i>	Hipotética integrasa fágica
				<i>tetR</i>	TetR
				<i>orfJ</i>	Proteína hipotética, función desconocida

La mayoría de estos *cassettes* (*aadB*, *aadA7* y *aadA11*) codifican enzimas modificadores de aminoglucósidos. Roy *et al.* ya apuntaron que aproximadamente el 75% de los aislados clínicos resistentes a aminoglucósidos presentaban un integrón [141].

La principal diana de los aminoglucósidos es el ribosoma bacteriano, concretamente proteínas ribosomales, así como el sitio A del tRNA del rRNA 16S. Esta unión hace que se inhiba o se desplace la pauta de lectura, de manera que se ve afectada la síntesis de proteínas, comprometiendo así la integridad celular [142]. El principal mecanismo de resistencia a estos compuestos bactericidas es la actuación de enzimas que inactivan los aminoglucósidos modificándolos por fosforilación, adenilación o acetilación. Pueden darse diversos tipos de enzimas que modifican este tipo de antibióticos, en nuestro caso, todos los codificados por genes presentes en los integrones pertenecen al grupo de las aminoglucósido nucleotidiltransferasas u *O*-adeniltransferasas (ANTs). Estas enzimas modifican estructuralmente los aminoglucósidos, ya que transfieren la porción monofosfato de adenosina (AMP) del ATP a un grupo hidroxilo de estos compuestos, de manera que el fármaco es adenilado. La molécula de antibiótico modificada es incapaz de unirse a la proteína blanco en el ribosoma. Este mecanismo se presenta tanto en cocos Gram positivos, como en bacilos Gram negativos [143], siendo el más común en *Pseudomonas aeruginosa*. La nomenclatura utilizada para las *O*-adeniltransferasas es la siguiente: AAC (acetiltransferasas), ANT (nucleotidiltransferasas o adeniltransferasas), y APH (fosfotransferasasa) según el tipo de modificación enzimática; (1), (3), (6), (9), (2'), (3'), (4'), (6'), (2''), y (3'') para el lugar de modificación; I, II, II, IV, V, etc. para los patrones de resistencia; y a, b, c, etc., para designaciones proteicas únicas.

Los integrones Inl8, Inl9 e Inl28 presentan un único *cassette*, el *aadA7* o *ant(3'')-Ia* (en la figura 4.12 se muestra, a modo de ejemplo, la secuencia de uno de estos *cassettes* y la del enzima que codifica). Este *cassette*, fue descrito por primera vez por Davies *et al.* en el año 2000 en una cepa de *E. coli* perteneciente a una colección de cepas de referencia, aisladas entre 1973 y 1983 de múltiples huéspedes animales sanos y localizaciones geográficas diversas (colección ECOR) [144].

Este enzima pertenece a las enzimas del tipo AAD(3'') (o ANT(3'')) encontradas en Gram negativos. Con una sola excepción hasta el momento (el gen *aadA*(Sch) de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis) las enzimas de tipo AAD(3'') de Gram negativos, se

encuentran siempre presentes en integrones. Este *cassette* (*aadA7*) codifica la aminoglucósido adeniltransferasa, enzima que confiere resistencia a la estreptomycinina y la espectinomycinina [¹⁴⁵], antibióticos que por no ser de uso común en clínica no se han ensayado. Por el mismo motivo sorprende la presencia de este *cassette* en tres de los aislados; esto nos da una muestra de la diseminación de las resistencias entre las poblaciones bacterianas.

```

1      atgagtgaaaaagtgcccgccgagatcttcggtgcaactatcacaagcactcaacgtcatc
      M S E K V P A E I S V Q L S Q A L N V I
61     gggcgccacttggagtcgacggttgctggccggtgcatttgtagcgtccgcactggatggc
      G R H L E S T L L A V H L Y G S A L D G
121    ggattgaaaccgtacagtgatattgatttgctggtggctgtagctgcaccgctcaatgat
      G L K P Y S D I D L L V A V A A P L N D
181    gccgtgcccgaagccctgctcgtcgatctcttggaggtttcagctcccctggccaaaac
      A V R Q A L L V D L L E V S A S P G Q N
241    aaggcactccgcgccttgggaagtgaccatcgtcgtgcacagtgacatcgtaccttggcgt
      K A L R A L E V T I V V H S D I V P W R
301    tatccggccagcggggaactgcagttcggagagtgggcagcgcaaagacatccttgcgggc
      Y P A R R E L Q F G E W Q R K D I L A G
361    atcttcgagcccgccacaaccgattctgacttggcgattctgctaacaaggcaagcaa
      I F E P A T T D S D L A I L L T K A K Q
421    catagcatcgtcttggcaggttcagcagcgaaggatctcttcagctcagtcgccagaaagc
      H S I V L A G S A A K D L F S S V P E S
481    gatctattcaaggcactggccgatactctgaagctatggaactcggccagattggggcg
      D L F K A L A D T L K L W N S P P D W A
541    ggcgatgagcggaatgtagtgtactttgtctcgtatctggtacaccgcccgaaccggc
      G D E R N V V L T L S R I W Y T A A T G
601    aagatcgcgccaaggatggtgctgccacttggcgaatggcagcgttggcagctcaacat
      K I A P K D V A A T W A M A R L P A Q H
661    cagcccattcctgtgaatgccaagcgggcttatcttgggcaagaagaagattatttggcc
      Q P I L L N A K R A Y L G Q E E D Y L P
721    gctcgtgcgatcaggtggcggcgtcattaaattcgtgaagtatgaagcagttaaactg
      A R A D Q V A A L I K F V K Y E A V K L
781    ctgggtgccagcaatgatgtctaacaattcattcaagccgacgcccgttcgcgggcgg
      L G A S Q -
      ctttaattcaagcgttagatgcactaagcacataattgctcacagccaaactatcaggtca
      agtcttgc

```

Figura 4.12 Secuencia del gen y la proteína de la aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA7*) del integrón perteneciente a la cepa 28.

Los integrones Inl7, Inl13, Inl19, Inl22, Inl30, Inl33, Inl34, Inl35, Inl69, Inl76, Inl77, Inl87, Inl93, Inl99, y InB', presentan un único *cassette*, el *aadB* o *ant(2'')-Ia*, que codifica la aminoglucósido 2'-O-adeniltransferasa (AAD(2'')), también denominada ANT(2'')-I. Este enzima confiere resistencia a la kanamicina, la gentamicina y la tobramicina [¹⁴⁷] en los numerosos casos en los que ha sido descrito formando parte de integrones en cepas de *Enterobacterias* de orígenes diversos, así como en *Pseudomonas spp.* En este caso todos los aislados que presentan el integrón conteniendo este *cassette* son resistentes a los aminoglucósidos citados (la kanamicina, no ha sido ensayada).

La figura 4.13 muestra uno de los genes de la aminoglucósido 2'-O-adeniltransferasa obtenidos.

```

1      atggacacaacgcaggtcacattgatacacaataattctagctgcgccagatgagcgaat
      M D T T Q V T L I H K I L A A A D E R N
61     ctgccgctctggatcgggtgggggctggggcgatcgatgcacggctagggcgtgtaacacgc
      L P L W I G G G W A I D A R L G R V T R
121    aagcacgatgatattgatctgacgtttcccggcgagaggcgcgccgagctcgaggcaatg
      K H D D I D L T F P G E R R G E L E A M
181    gttgaaatgctcggcggggcgctcacggaggagttggactatggattcttagcggagatc
      V E M L G G R V T E E L D Y G F L A E I
241    ggggatgagttacttgactgccaacctgcttggtgggcagacgaagcgtatgaaatcgcg
      G D E L L D C E P A W W A D E A Y E I A
481    gaggtccgcagggctcgtgccagaggcggttgatggcgctcatcgccggggcgccagtc
      E A P Q G S C P E A V D G V I A G R P V
541    cgttgtaacagctgggaggcgatcatctgggattacttttactatgccgatgaagtacca
      R C N S W E A I I W D Y F Y Y A D E V P
601    ccaatggactggcctacaaagcacatagagtcctacaggctcgcacactcactcggg
      P M D W P T K H I E S Y R L A C T S L G
661    gcgaaaagggtgaggtcttgctgctccgctttcaggtcgcgatagcggcctaacaattc
      A E K V E V L R A A F R S R Y A A -
      gtccaagccgacccgcttcgcgccgggcttaactcaggtgtagatgcactaagcaca
      taattgctcacagcctaactatcagg

```

Figura 4.13 Secuencia del gen y la proteína de la aminoglucósido-2'-O-adeniltransferasa (*aadB*) del integrón situado en la cepa B'.

La cepa P1 presenta un integrón con lo que se denomina *cassette array*, es decir, una asociación de genes que en este caso son (orden 5'-3'): *aadB*, un gen hipotético (“*orfE-like*”) y *aadA11* (figura 4.14).

```

1      atggacacaacgcaggtcacattgatacacaataattctagctgcgccagatgagcgaat
      M D T T Q V T L I H K I L A A A D E R N
61     ctgccgctctggatcgggtgggggctggggcgatcgatgcacggctagggcgtgtaacacgc
      L P L W I G G G W A I D A R L G R V T R
121    aagcacgatgatattgatctgacgtttcccggcgagaggcgcgccgagctcgaggcaata
      K H D D I D L T F P G E R R G E L E A I
181    gttgaaatgctcggcggggcgctcacggaggagttggactatggattcttagcggagatc
      V E M L G G R V M E E L D Y G F L A E I
241    ggggatgagttacttgactgccaacctgcttggtgggcagacgaagcgtatgaaatcgcg
      G D E L L D C E P A W W A D E A Y E I A
301    gaggtccgcagggctcgtgccagaggcggtgagggcgctcatcgccggggcgccagtc
      E A P Q G S C P E A A E G V I A G R P V
361    cgttgtaacagctgggaggcgatcatctgggattacttttactatgccgatgaagtacca
      R C N S W E A I I W D Y F Y Y A D E V P
421    ccagtgactggcctacaaagcacatagagtcctacaggctcgcacactcactcggg
      P V D W P T K H I E S Y R L A C T S L G
481    gcgaaaagggtgaggtcttgctgctccgctttcaggtcgcgatagcggcctaacaattc
      A E K V E V L R A A F R S R Y A A -
541    gtccaagccgacccgcttcgcgccgggcttaactcaggtgtagtcccacaccggtt
601    tccaattcgtccaagccgacccgcttcgcgccgggcttaactcaggtgtagtcccac
662    caccggtttcatgcgccacccaaccgattcatgcgcgagccacttattccagcgctatg
      M R A A T Y S S A M
722    ccctgttcaaaaggttttcaagcctttttgggctccagcgcttggtgcggaagcgctacc
      P C S K G F Q A F L G S S A C A A S A T
782    agctatcatttttgcagcgctgcgccgcttttctggtggccagcgctttttctggtggctg
      S Y H F C S A A P L S W P S A F S W A A

```

```

842 cccttgtccaagtccgggcgctcccttttggccttcgggtctaaccggcggttcaagccg
P L S K S G R S L L A F G S N P A F K P
902 acccgctacggcgggcggttaccttggcggtagacatcatgagtaacgcagtacc
T R L R R A A Y L G R - M S N A V P
962 gccgagatttcggtacatctatcactggctctcaacgccatcgagcgtcatctggaatca
A E I S V H L S L A L N A I E R H L E S
1022 acgttgctggacgagcatttgtacggttctgcaactggcgggtggcctgaagccatacagt
T L L D E H L Y G S A L D G G L K P Y S
1082 gatattgatttgcgtggttactgtggctgcacagctcgatgagactgtccgacaagccctg
D I D L L V T V A A Q L D E T V R Q A L
1142 gtcgtagatctcttggaaatttctgctcccctggccaaagagaggctctccgctccttg
V V D L L E I S A S P G Q R E A L R S L
1202 gaagttaccatcgtcgtgcatgggatggttgccttggcggttatccggccagacgggaa
E V T I V V H G D V V P W R Y P A R R E
1262 ctgcaattcggggagtgccagcgttaaggacattcttgcgggcattcttcgagcccgcaca
L Q F G E W Q R K D I L A G I F E P A T
1322 accgatggtgatctggctattctgctaactaaagtaaggcagcatagccttgattgaca
T D V D L A I L L T K V R Q H S L A L T
1382 ggttcggccgcagaggatttctttaaccagttccggaaggcgatctattcaaggcattg
G S A A E D F F N P V P E G D L F K A L
1442 agcgacactctgaaactatggaattcgcagccggattgggaaggcagatgaccgtaatgta
S D T L K L W N S Q P D W E G D D R N V
1502 gtcttaccttgcctcgcatttggaaaagcgcagcaaccggtaagaccgcaccgaaggat
V L T L S R I W K S A A T G K T A P K D
1562 atcgttgccaaccgggcaattgagtggttgcctcaacataagcccgtactgcttgaa
I V A N R A I E C L P N Q H K P V L L E
1622 gcccgccaggcttactcttggacaaggagaagattgcttggcctcacgcgggatccgttg
A R Q A Y L G Q G E D C L A S R A D P L
1682 gcggcgcttcgctcacttcgtgaaacatgaagccactaaattgcttggtgccatgccagt
A A F V H F V K H E A T K L L G A M P V
1742 atgtctaacaattcattcaagccgaaccggcttcgcggtcggtcgttaa
M S N N S F K P N P L R G S A -

```

Figura 4.14 Secuencia de los genes y las proteínas situados en el integrón de la cepa P1. El primer gen es *aadB* (color azul); el segundo *orfE* (color naranja) y el tercero *aadA11* (color lila). En negrita se han marcado los codones de inicio y de terminación de la traducción.

Como ya hemos comentado, el primer *cassette* del integrón, *aadB*, codifica la aminoglucósido 2'-O-adeniltransferasa, enzima que confiere resistencia a la kanamicina, la gentamicina y la tobramicina. Este gen presenta una secuencia 100% igual a la del gen prototipo [146] (número de acceso al GenBank: L06418). *Downstream* de *aadB* se ha identificado un gen "*orfE-like*", con una homología del 90% con varios genes *orfE* descritos anteriormente [96,147,148] (número de acceso al GenBank: AAB60001) el cual codifica una proteína hipotética de la que se desconoce la función. Este gen "*orfE-like*" flanquea una ORF de 846 bp que codifica un gen de resistencia a los aminoglucósidos descrito relativamente hace poco, llamado *aadA11*, y que se traduce en el enzima aminoglucósido-3'-adeniltransferasa (ANT(3')) que confiere resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina.

El mapa del integrón de la cepa P1 se representa en la figura 4.15.

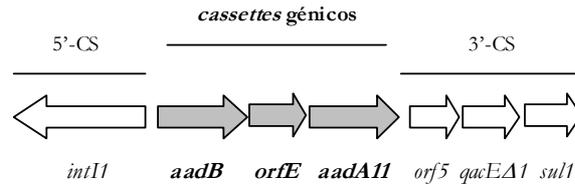


Figura 4.15 Mapa del InP1 de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* P1. Las flechas marcan la dirección de la pauta de lectura.

Este *cassette array* ya ha sido descrito en el integrón In2345 de una cepa de *P. aeruginosa* (PA2345) aislada en el Hospital Universitario de Besançon en Francia [149], y comparte con él una elevada homología: si alineamos las secuencias (figura 4.16) observamos que *aadB* y *orfE* comparten el 100% de los nucleótidos con los genes de In2345, mientras que *aadA11* únicamente presenta diferencias en 19 de los nucleótidos lo que representa que comparte el 98% de los nucleótidos, cosa que resulta en un cambio en 13 aminoácidos (figura 4.17).

Por lo tanto, este integrón, únicamente se ha descrito en dos cepas distintas y en dos lugares distintos (Francia y Portugal), cosa que sugiere que la cepa que lo presentaba viajó de un lugar a otro “utilizando” como vehículo al hombre, que una vez más actúa facilitando la transmisión de las resistencias.

PA2345	TTAGGCCGC ATG GACACAACGCAGGTCACATTGATACACAAAATTCTAGCTGCGGCAGAT	60
P1	----- ATG GACACAACGCAGGTCACATTGATACACAAAATTCTAGCTGCGGCAGAT	
PA2345	GAGCGAAATCTGCCGCTCTGGATCGGTGGGGCTGGGCGATCGATGCACGGCTAGGGCGT	120
P1	GAGCGAAATCTGCCGCTCTGGATCGGTGGGGCTGGGCGATCGATGCACGGCTAGGGCGT	
PA2345	GTAACACGCAAGCACGATGATATTGATCTGACGTTTCCCGGCGAGAGGCGCGGCGAGCTC	180
P1	GTAACACGCAAGCACGATGATATTGATCTGACGTTTCCCGGCGAGAGGCGCGGCGAGCTC	
PA2345	GAGGCAATAGTTGAAATGCTCGGCGGGCGCGTTCATGGAGGAGTTGGACTATGGATTCTTA	240
P1	GAGGCAATAGTTGAAATGCTCGGCGGGCGCGTTCATGGAGGAGTTGGACTATGGATTCTTA	
PA2345	GCGGAGATCGGGGATGAGTTACTTGACTGCGAACCTGCTTGGTGGGCGAGACGAAGCGTAT	300
P1	GCGGAGATCGGGGATGAGTTACTTGACTGCGAACCTGCTTGGTGGGCGAGACGAAGCGTAT	
PA2345	GAAATCGCGGAGGCTCCGCAGGGCTCGTGCCAGAGGCGGCTGAGGGCGTCATCGCCGGG	360
P1	GAAATCGCGGAGGCTCCGCAGGGCTCGTGCCAGAGGCGGCTGAGGGCGTCATCGCCGGG	
PA2345	CGGCCAGTCCGTTGTAACAGCTGGGAGGCGATCATCTGGGATTACTTTTACTATGCCGAT	420
P1	CGGCCAGTCCGTTGTAACAGCTGGGAGGCGATCATCTGGGATTACTTTTACTATGCCGAT	
PA2345	GAAGTACCACCAGTGGACTGGCCTACAAAGCACATAGAGTCTACAGGCTCGCATGCACC	480
P1	GAAGTACCACCAGTGGACTGGCCTACAAAGCACATAGAGTCTACAGGCTCGCATGCACC	
PA2345	TCACTCGGGGCGGAAAAGGTTGAGGCTTTGCGTGCCGCTTTCAGGTCGCGATATGCGGCC	540
P1	TCACTCGGGGCGGAAAAGGTTGAGGCTTTGCGTGCCGCTTTCAGGTCGCGATATGCGGCC	
PA2345	TAA CAATTCTGTCCTCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAACTCAGGTGTTAGTCCCA	600
P1	TAA CAATTCTGTCCTCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAACTCAGGTGTTAGTCCCA	
PA2345	TCACCCGTTTC-----	660
P1	TCACCCGTTTCCAATTCTGTCCTCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAACTCAGGTGT	

PA2345 P1	-----ATGCGCGCACCCAACCGATT CATGCGCGCAGCCACTTATTC TAGTCCCATCACCCGTTTCATGCGCGCACCCAACCGATT CATGCGCGCAGCCACTTATTC	720
PA2345 P1	CAGCGCTATGCCCTGTTCAAAGGTTTTCAAGCCTTTTTGGGCTCCAGCGCTTGTGCGGC CAGCGCTATGCCCTGTTCAAAGGTTTTCAAGCCTTTTTGGGCTCCAGCGCTTGTGCGGC	780
PA2345 P1	AAGCGCTACCAGCTATCATTTTTGCAGCGCTGCGCCGCTTTCGTGGCCAGCGCTTTTTC AAGCGCTACCAGCTATCATTTTTGCAGCGCTGCGCCGCTTTCGTGGCCAGCGCTTTTTC	840
PA2345 P1	GTGGGCTGCGCCCTTGTCCAAGTCCGGGCGCTCCCTTTTTGGCCTTCGGGTCTAACCCGGC GTGGGCTGCGCCCTTGTCCAAGTCCGGGCGCTCCCTTTTTGGCCTTCGGGTCTAACCCGGC	900
PA2345 P1	GTTCAAGCCGACCCGCTACGCGGGCGGCTTACCTTGGCCGTTAGACATCCATAGTAAC GTTCAAGCCGACCCGCTACGCGGGCGGCTTACCTTGGCCGTTAGACATCCATAGTAAC	960
PA2345 P1	GCAGTACCCGCGAGATTTGGTACAGCTATCACTGGCTCTCAACGCCATCGAGCGTCAT GCAGTACCCGCGAGATTTGGTACAGCTATCACTGGCTCTCAACGCCATCGAGCGTCAT	1020
PA2345 P1	CTGGAATCAACGTTGCTGGCCGTGCATTTGTACGGCTCTGCACTGGACGGTGGCCTGAAG CTGGAATCAACGTTGCTGGCCGTGCATTTGTACGGCTCTGCACTGGACGGTGGCCTGAAG	1080
PA2345 P1	CCATACAGTGATATTGATTGCTGGTTACTGTGGCTGCACAGCTCGATGAGACTGTCCGA CCATACAGTGATATTGATTGCTGGTTACTGTGGCTGCACAGCTCGATGAGACTGTCCGA	1140
PA2345 P1	CAAGCCCTGGTCGTAGATCTCTTGAAATTTCTGCCTCCCCTGGCCAAAGTGAGGCTCTC CAAGCCCTGGTCGTAGATCTCTTGAAATTTCTGCCTCCCCTGGCCAAAGTGAGGCTCTC	1200
PA2345 P1	CGCGCCTTGGAAAGTTACCATCGTCGTGCATGGTGATGTTGTCCCTTGGCGTTATCCGGCC CGCCTTGGAAAGTTACCATCGTCGTGCATGGTGATGTTGTCCCTTGGCGTTATCCGGCC	1260
PA2345 P1	AGACGGAACTGCAATTCGGGGAGTGGCAGCGTAAGGACATTCTTGCGGGCATCTTCGAG AGACGGAACTGCAATTCGGGGAGTGGCAGCGTAAGGACATTCTTGCGGGCATCTTCGAG	1320
PA2345 P1	CCCGCCACAACCGATGTTGATCTGGCTATTCTGCTAACTAAAGTAAGGCAGCATAGCCTT CCCGCCACAACCGATGTTGATCTGGCTATTCTGCTAACTAAAGTAAGGCAGCATAGCCTT	1380
PA2345 P1	GCATTGGCAGGTTTCGGCCGAGAGGATTTCTTTAACCCAGTTCCGGAAGGCGATCTATTC GCATTGGCAGGTTTCGGCCGAGAGGATTTCTTTAACCCAGTTCCGGAAGGCGATCTATTC	1440
PA2345 P1	AAGGCATTGAGCGACACTCTGAAACTATGGAATTCGCAGCCGATTGGGAAGGCGATGAG AAGGCATTGAGCGACACTCTGAAACTATGGAATTCGCAGCCGATTGGGAAGGCGATGAG	1500
PA2345 P1	CGGAATGTAGTGCTTACCTTGTCTCGCATTGGTACAGCGCAGCAACCCGGCAAGATCGCA CGAATGTAGTGCTTACCTTGTCTCGCATTGGTACAGCGCAGCAACCCGGCAAGATCGCA	1560
PA2345 P1	CCGAAGGATATCGTTGCCAACTGGGCAATTGAGCGTCTGCCAGATCAACATAAGCCCGTA CCGAAGGATATCGTTGCCAACTGGGCAATTGAGCGTCTGCCAGATCAACATAAGCCCGTA	1620
PA2345 P1	CTGCTTGAAGCCCGCAGGCTTATCTTGGACAAGGAGAAGATTGCTTGGCCTCACGCGCG CTGCTTGAAGCCCGCAGGCTTATCTTGGACAAGGAGAAGATTGCTTGGCCTCACGCGCG	1680
PA2345 P1	GATCAGTTGGCGCGTTCGTTCACTTCGTGAAACATGAAGCCACTAAATTGCTTGGTGCC GATCAGTTGGCGCGTTCGTTCACTTCGTGAAACATGAAGCCACTAAATTGCTTGGTGCC	1740
PA2345 P1	ATGCCAGTGATGTCTAACAATTCATTCAAGCCGAACCCGCTTCGCGGGTCGGCTTAATTC ATGCCAGTGATGTCTAACAATTCATTCAAGCCGAACCCGCTTCGCGGGTCGGCTTAA---	1800

Figura 4.16 Alineamiento de la secuencia del integrón In2345 de la cepa de *P. aeruginosa* PA2345 y la secuencia del integrón InP1 de la cepa P1. Las diferencias entre nucleótidos se han marcado en verde. En color azul, se ha marcado la secuencia de nucleótidos de *aadB*; en color naranja la del gen “*orfE-like*” y en lila la de *aadA11*. En negrita se han marcado los codones de inicio y de terminación de la traducción.

PA2345	MSNAVPAEISVQLSLALNAIERHLESTLLAVHLYGSALDGGGLKPYSDIDLVTVAQQLDE	60
P1	MSNAVPAEISVQLSLALNAIERHLESTLLAVHLYGSALDGGGLKPYSDIDLVTVAQQLDE	
PA2345	TVRQALVVDLLEISASPGQSEALRALEVTIVVHGDVVPWRYPARRELQFGEWQRKDILAG	120
P1	TVRQALVVDLLEISASPGQSEALRALEVTIVVHGDVVPWRYPARRELQFGEWQRKDILAG	
PA2345	IFEPATTDVDLAILLTKVRQHSALAGSAAEDFFNPNVPEGDLFKALSDTLKLWNSQPDWE	180
P1	IFEPATTDVDLAILLTKVRQHSALAGSAAEDFFNPNVPEGDLFKALSDTLKLWNSQPDWE	
PA2345	GDERNVVLTLSRIWYSAATGKIAPKDIVANWAIERLPDQHKPVLLEARQAYLGQGEDCLA	240
P1	GDERNVVLTLSRIWYSAATGKIAPKDIVANWAIERLPDQHKPVLLEARQAYLGQGEDCLA	
PA2345	SRADQLAAFVHFVKHEATKLLGAMPVMSNNSFKPNPLRGSA	281
P1	SRADQLAAFVHFVKHEATKLLGAMPVMSNNSFKPNPLRGSA	

Figura 4.17 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos expresada por el *cassette aadA11* situado en el integrón In2345 de la cepa de *P. aeruginosa* PA2345, y la secuencia de aminoácidos del mismo *cassette* situado en la cepa P1. Las coincidencias entre aminoácidos se han marcado en verde.

Las cepas cb, 17 y 26, presentan integrones vacíos, que ya han sido descritos en numerosas ocasiones [150,151], es decir, presentan únicamente los segmentos conservados 5'CS y 3'CS, y en la zona variable no hay incorporados *cassettes* génicos.

La presencia de estructuras vacías sugiere que en ausencia de presión selectiva continuada, por parte de los antibióticos, los integrones que persisten “prefieren” hacerlo sin *cassettes* génicos integrados; es posible que cuando la presión antibiótica del ambiente se diluye, los *cassettes* génicos se escindan de los integrones. También se ha comentado que podrían representar un integrón ancestral que todavía no ha incorporado *cassettes* génicos, y que funciona como reservorio, “a la espera” de la captación de *cassettes*; quizá la cepa se está “preparando” para incorporar más genes. La presión selectiva ejercida por los antibióticos juega un papel muy importante en la promoción de la incorporación de *cassettes* génicos en la región variable de los integrones, y al contrario que en los casos en que la presión disminuye, cuando ésta aumenta, la presencia de estas estructuras podría facilitar la rápida incorporación de genes que proporcionen una ventaja selectiva a las cepas que los poseen.

Las cepas A, A' presentan dos integrones, definidos por productos de PCR de 2500pb y 400pb. Los integrones de ambas cepas presentan los mismos genes y, el integrón de 2500pb es además, compartido por la cepa P18. Únicamente y, como era de esperar, observamos algunas diferencias en las secuencias tanto nucleotídicas, como de aminoácidos, pero como los genes para los que codifican son los mismos en este trabajo únicamente se comparan A' y P18.

El integrón de menor tamaño, es un integrón vacío, como en el caso de las cepas cb, 17 y 26. Su presencia podría hacernos pensar que esta cepa ha estado sometida a una presión antibiótica tan fuerte en el medio en el que se encuentra, que quizá esté adquiriendo rápidamente todos los mecanismos posibles para hacer frente a los numerosos antibióticos a los que está sometida, y además de presentar un integrón de gran tamaño, ha adquirido otro que le permita la incorporación de más genes. Posiblemente se encuentre, como ya hemos comentado anteriormente, en una fase previa de adquisición de genes en el integrón, es decir, quizá primero adquiere la estructura vacía y, posteriormente incorpora *cassettes* génicos.

El integrón de mayor medida es un *cassette array* con tres genes (orden 5'-3'): una pauta de lectura a la que hemos denominado *orfL*, que codifica una proteína similar a una integrasa fágica, *tetR* y otra pauta de lectura, *orfJ*, que codifica una proteína hipotética de función desconocida (como ejemplo, en la figura 4.19, se expone la secuencia de los genes presentes en el integrón de P18). El mapa de los integrones de A, A' y P18 se muestra en la figura 4.18.

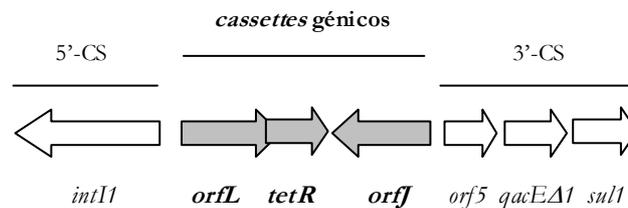


Figura 4.18 Mapa de los integrones de la cepas A, A' y P18. Las flechas marcan la dirección de la pauta de lectura de los genes que componen el *cassette array*.

```

1      atgCGCCAGGAactggaagCGGAAGTGTATgAACTGGAACAGATGGCGCCGAGCAGCCGC
      M R Q E L E A E V Y E L E Q M A P S S R
61     agCGCGGAACATctgctgCGCCTGGAAAAAGCGCGCAAAGATAGCAAACGCCTGTTCTG
      S A E H L L R L E K A R K D S K R L F L
121    tgCCTGAACGGCAGCGGCAACAAAAGCGAACGCCTGGCGCATATTGAAGTGTGGCCAG
      C L N G S G N K S E R L A H I E V L G Q
181    gCGGGCAGCAACGAAAGCTTTAAACGCATTGCGAAAGCGGCGGGCAGCGATTGGCCGCTG
      A G S N E S F K R I A K A A G S D W P L
241    CGCACCCATCAGTGC CGCGCACCTATGCGCGCTGCTTTGTGGAAGCGCGCATGGGCGCG
      R T H Q C R R T Y A R C F V E S R M G R
301    accAGCCTGGTGTCTGAAATGGCAGCTGAAACATAGCAGCATGAGCATGACCCAGCTG
      T S L V F L K W Q L K H S S M S M T Q L
361    tATGCGAGCAACCCGCTGCAGGATCTGACCCTGTTGATGAAATTCTACAGCAGAGAACG
      Y A S N P L Q D L T L F D E I L Q Q R T
421    gAGTTCAGATCGACCTCATTGAGTCCTGGCTTGATGACCAGCCTTTGGCAGGTGGTGCC
      E F K I D L I E S W L D D Q P L A G G A
481    gGGAGCAAAATCGTTGAGTTGCGTGGGATTCCGGTCAAGGATAGAGCTGCTTTGCTTGCC
      G S K I V E L R G I P V K D R A A L L A
541    cAGACCGCCCCACATGCCAACATAGCTGCGACTGGACCGGCTGGTGCATCGCCACAGAG
      Q T A P H A N I R A T G H G W C I A T E

```

601 cggggctgCGGaggtgctgggctatacgaagccacacgggtgtccagggtgcaaaaattcg
 R G C G G A G L Y E A T R C P G C K N S
 661 gtgatcgatgagacgttcgccagcactgggcaggacatcgacattcaacagcgagagctg
 V I D E T F A S T G Q D I D I Q R E L
 721 ataaaaattgaggatgcaggcccggctgtaggcagcggaagaacgcgacttgcaaggta
 I K I E D A G P A V R Q R E E R D L Q V
 781 gcactagatgtaattaccagccttggcctttctccagttgaggaaatggaggaggcgga
 A L D V I T S L G L S P V E E M E E A A
 841 **aatgactag**acaggcggaggccctgactctcctattcgctccagggtcgaagacactc
 N D -
 M T R Q A E G P D S P I R S R S K T L
 900 gccatgactagacaggcggaggccctgactctcctattcgctccagggtcgaagacactc
 A M T R Q A E G P D S P I R S R S K T L
 961 gccgcgctcaacaaggctcgtcgacgatctcattgctgggtgacggaagctttccatcaca
 A A L N K V V D D L I A G D G K L S I T
 1021 tccgttgcccagcggcagggtgtgactccgggactcatccataacacttaccgaagcata
 S V A R A A G V T P G L I H N T Y P S I
 1081 gcggaaggattcgcaacatcgttggcaagtcggtgagcagccagcagactcgaagcat
 A E R I R N I V G K S V R A Q R D S K H
 1141 caagcggatgagcagagaagaagaacaggngctccgtgagagaatgatcagctt
 Q A V M S E K E K N R X L R A E N D Q L
 1201 ttagcggaggtagctcggctggttcggataaccagcagactaatattcgagatgattcag
 L A E V A R L A S D N Q R L I F E M I Q
 1261 ctgaaggcggngccaacgnaacacccgactccctctgaaaccaggggc**actag**
 L K A X A N X K D T A L P L K P G A N -
 1321 gcccgatggggaaccgcgagaattcgtaaaaatcgcaagcgaacagttcaagcgtccc
 1381 gccacgctgactgtagcttgttactggt**tcag**tctgtctcgcgggtaaaagcgaatagaacaa
 - D T E R T F R Y F L
 1444 gttcggctcgtgaccacgtacaaatacccttcacgtcgatggttacgccttcggcttgggg
 N P E S V V Y L Y G E D D I T V G E A Q P
 1504 tatgcctttcagcaaacagcaaacccctcgccaaggagcggaaactcaccaccttgcctc
 I G K L L G A F G R A L S R F S V V K G E
 1564 atcggtgatttcaatcagcagtttcgactcgtcgtgagcaatatcaggtggccactctgttg
 D T I E I L L K S E D S L L I L H G S Q Q
 1625 atcgaagacgaccgaagacaagtcagtggaataccttgcctttaccaagttggacaggtc
 D F V V S S L D T A F V K D K V L N S L D
 1685 gcgcagtgagggaaaaacctcctgacaggtggcaggaaggccgcccacttccgaatg
 R V H L S F G G A L S A R L G G V E L L Q
 1745 gcgagggtcacgctccttggtcacaaacagcagatcacctttcaggtcgtaggcagcccttc
 R P D R E K T V F L R D G K L D Y A L G E
 1806 aaggcctttgttgcgccttgcgaagtgcaaggtcagagctggatcactgggtctcggctcaa
 L G K N D A K G L A L T L A P Y Q D R S L
 1067 tgagcagccgggagaagcttactgccttcggcgaggggacatccacgataacaaggctctg
 S R G P S L K S G E A L P V D V I V L S Q
 1928 ccggcgtcctcggcgattaccagttggcgttgcggcataggacaccgcctccacatcgtg
 R R E E A I V L Q G N G A Y S V A E V D H
 1989 gaaaccgtccaggctatagcgccttccacgacacgactgagggccaaatagtttcg
 F G D L S Y R R E V D G D R S L A L Y N R
 2050 ttttggcgggttgtaaccgcccacagtaggtacaggtcagggtcgaaggtcaggccccgaaag
 K P G N T V A W L L Y L D P D F T L G S L
 2111 gttgttgcacaccgggaaccggttagcatcgagctcaaccggatagtcaggcagccacac
 N N D V G P V P K A D L E V R Y D P L W V
 2172 agagcgtcctgccaatcgtcgggtgtgccagtggtccttgatccagaagtacaaccgatcatc
 S R E Q W D D T H W H T K I W F Y L R D D
 2233 aaggtgatgggtgCGGacttggaaatcggtaagcaatacaaaagcacagcagtgcccacatcca
 L H H T R V Q F V T L L V F C L L A W M W
 2294 ggcaactgtttctgtgttcggccaaccagtttttagccatcaaat**cat**tagaagcctcgt
 A S T K Q T R G L W N K A M L Y M
 2355 taattgggactgacgtcagagctgtcatggtttcaatccgactcggcgggctcgcacaggt
 2416 gatgcacaacggcgtggccggatcgaattccaggcggcccaggcgatcaactcggcagctg
 2477 gttacaccagccat

Figura 4.19 Secuencia del *cassette array* del integrón de la cepa P18. En color lila se representa *orfL*; en verde *tetR* y en naranja *orfJ*. En negrita se han marcado los codones de inicio y de terminación de la traducción.

La hipotética integrasa, codificada por *orfL*, presenta una gran homología (79%) con otra hipotética integrasa (CP62a) encontrada en un elemento móvil denominado pKLC102 de una cepa de *P. aeruginosa* aislada de las vías aéreas de un paciente con fibrosis quística (figura 4.20). pKLC102 coexiste como plásmido e isla genómica en las cepas pertenecientes a un clon denominado C, y presenta un origen fágico [152]. La presencia de una integrasa fágica en este integrón podría sugerir que el DNA integrado no ha sido recombinado por la integrasa presente en el integrón, que es el mecanismo más común, sino por esta recombinasa de origen fágico, presente en el integrón.

CP62a	MRQELEAEVYELEQMAPSSRSAEHLRLLEKARKDSKRLFLCLNGSGNKSERLAHIEVLGQ	60
A1	MRQELEAEVYELEQMGPSRSAEHLRLLEKARKDSKRLFLCLNGTGNKSERLAHIEVLGQ	
P18	MRQELEAEVYELEQMGPSRSAEHLRLLEKARKDSKRLFLCLNGTGNKSERLAHIEVLGQ	
CP62a	AGSNESFKRIAKAAGSDWPLRTHQCRRTYARCFVESRMGR TSLVFLKWQLKHSMSMTQL	120
A1	AGSNESFKRIAKAAGSDWPLRTHQCRRTYARCFVESRMGR TSLVFLKWQLKHSMSMTQL	
P18	AGSNESFKRIAKAAGSDWPLRTHQCRRTYARCFVESRMGR TSLVFLKWQLKHSMSMTQL	
CP62a	YASNPLQDLTLFDEILQQMTEFKIDLIESWLDDQPLAGGAGSKIVELRAIPVKDRAALLA	180
A1	YASNPLQDLTLFDEILQQMTEFKIDLIESWLDDQPLAGGAGSKIVELRCIPVKDRAALLA	
P18	YASNPLQDLTLFDEILQQMTEFKIDLIESWLDDQPLAGGAGSKIVELRCIPVKDRAALLA	
CP62a	QTAPHANIRATGHGWCIAATERGCGGAGLYEATRCPGCKH SVIDETFAGTWQGIYSQQREL	240
A1	QTAPHANIRATGHGWCIAATERGCGGAGLYEATRCPGCKH SVIDEFVFASTWQGIYSQQREL	
P18	QTAPHANIRATGHGWCIAATERGCGGAGLYEATRCPGCKH SVIDETFASTWQGIYSQQREL	
CP62a	MKIEDAGPAVKQRAERDLQVALDVINSLGLSPDDQEEEA VNG	283
A1	TKIEDAGPAVFRQRAERDLQVALDVITSLGLSPVEEMEEA AND-	
P18	TKIEDAGPAVFRQRAERDLQVALDVITSLGLSPVEEMEEA AND-	

Figura 4.20 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del *cassette orfL* de los Integrones InA1, InP18 y CP62a, situado en pKLC102. En verde se han marcado las diferencias en la secuencia de aminoácidos.

La pauta de lectura de *orfL* está solapada con la del siguiente gen, cosa que no suele ocurrir en los integrones. Esto podría sugerir que *orfL* y el siguiente gen se han podido incorporar al integrón como si de un único *cassette* génico se tratara. Una posible explicación a esto sería quizá una delección de un fragmento de DNA situado entre los dos genes, que ha provocado la fusión de ambos genes. En estos casos no se suelen mantener las pautas de lectura sino que se produce una proteína de fusión que, en ocasiones, es funcional. En nuestro caso se han solapado, curiosamente, las pautas de lectura, de manera que se podrían sintetizar por separado, ambas proteínas.

La delección podría haber sucedido antes de la incorporación de los *cassettes* al integrón, de manera que ambos se hubiesen insertado conjuntamente, o bien, una vez ya estaban incorporados al integrón. También habría podido ocurrir una recombinación de uno de los *cassettes* en un lugar secundario de inserción, cosa que podría haber provocado la pérdida de parte del *attC*, y como consecuencia la fusión de los dos *cassettes* adyacentes.

Esta segunda pauta de lectura codifica una proteína con elevado porcentaje de similitud con proteínas de la familia TetR y concretamente con otra presunta proteína perteneciente a esta familia, también descrita en pKLC102 de *P. aeruginosa* del clon C (figura 4.21).

TetR	-MASKSTEPSKGRSRPKTADALNKVIDRMLAGNEKLSISSVARAAGVTPGLIHNTYPAVA	60
A1	MTRQAE ^G PD ^S PI ^R RSR ^S KT ^L AALNKV ^V DD ^L IAG ^D GKLSI ^T TSVARAAGVTPGLIHNTYP ^S IA	
P18	MTRQAE ^G PD ^S PI ^R RSR ^S KT ^L AALNKV ^V DD ^L IAG ^D GKLSI ^T TSVARAAGVTPGLIHNTYP ^S IA	
TetR	ERIRSLIGKSTRAQRDSKHQALMKEKDLNKALRAENSLLEETIARLASV ^N QR ^L MLE ^L AQ ^L	120
A1	ERIRN ^I V ^G K ^S V ^R AQRDSKHQALM ^S E ^K E ^K N ^R V ^L RAEND ^O LL ^E V ^A RLASV ^N QR ^L I ^F F ^E M ^I Q ^L	
P18	ERIRN ^I V ^G K ^S V ^R AQRDSKHQAL ^M S ^E E ^K E ^K N ^R V ^L RAEND ^O LL ^E V ^A RLAS ^D N ^Q R ^L I ^F F ^E M ^I Q ^L	
TetR	KGVAQ ^G KVIELAPKPGAK	140
A1	KAVANGKV ^T AL ^E PLKPG ^E TR ^E -----	
P18	KAXAN ^X KD ^T AL ^E PLKPGAN	

Figura 4.21 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del *cassette tetR* de los Integrones InA1, InP18 y el integrón situado en pKLC102. En verde se han marcado las diferencias en la secuencia de aminoácidos.

La familia de proteínas de TetR está relacionada con la resistencia a la tetraciclina. La tetraciclina presenta un amplio espectro de actividad, y actúa inhibiendo la síntesis de proteínas como consecuencia de su unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Los genes de resistencia a la tetraciclina se encuentran frecuentemente localizados en elementos móviles, tales como plásmidos, transposones y/o integrones, que pueden ser transferidos entre especies bacterianas. Existen tres tipos de resistencia a la tetraciclina: reflujo, protección ribosomal, y modificación del antibiótico. La expresión de muchos de estos genes *tet* está controlada por una familia de reguladores transcripcionales conocidos como TetR. Esta familia está involucrada en el control transcripcional de proteínas que están implicadas en bombas de reflujo, rutas para la biosíntesis de antibióticos, en el control de vías catabólicas, procesos de diferenciación y patogenicidad, y proteínas sintetizadas en respuesta a estrés osmótico y compuestos tóxicos [153].

Las proteínas TetR pueden actuar mediante diversas vías: participando en complejas cascadas de regulación o, pueden unirse a una diana directamente para ejercer su acción; este es el caso de TetR que se une a *tetA* para reprimir su expresión en ausencia de tetraciclina [154]. La proteína Tet(A) es una porina de reflujo que forma parte de una bomba que exporta tetraciclina al exterior celular para prevenir su unión a los ribosomas.

Finalmente, el último fragmento del integrón comprende una pauta de lectura, *orfJ*, que se traduce en una hipotética proteína con un 91% de identidad con una proteína de función desconocida (figura 4.22), descrita anteriormente en un transposón situado en un plásmido relacionado con resistencia a los antibióticos, pBS228 [155]. En nuestro caso la inserción de este *cassette* se ha realizado en posición invertida, es decir, en sentido 3'→5' (figura 4.18). Esto no es muy frecuente y, probablemente este cassette no se transcriba, no sólo por no estar insertada la hebra codificante del DNA, sino porque no está insertado en la orientación correcta respecto a los promotores, y además no presenta promotor propio.

Hp	MYLMAKNWLSRTRKASAWMWALLCLVLLTVFQVRTHHLDDRLYFWIKTSWHTDDWQERSV	60
A1	MYLMAKNWLCRTCKTSAWMWALLCFVLLTVFQVRTHHLDDRLYFWIKTSHWHTDDWQERSV	
P18	MYLMAKNWLCRTCKTSAWMWALLCFVLLTVFQVRTHHLDDRLYFWIKTSHWHTDDWQERSV	
Hp	WLPGYRVELDAKAVPGVDNNLSGLTFDPLNLLWAVTNGPNEL-LALSRDGDVERRYNLDG	120
A1	WLPDYRVELDAKVPVPGVDNNLSGLTFDPLNLLWAVTNGPKRNYLALSRDGDWAWRYSLDG	
P18	WLPDYRVELDAKVPVPGVDNNLSGLTFDPLNLLWAVTNGPNEL-LALSRDGDVERRYSLDG	
Hp	FHDVEAVSYAGNGQLVIAEERRQSLVIVDVPFAEDGKLSPDRSLSRDQYPALTLALGKED	180
A1	FHDVEAVSYAGNGQLVIAEERRQSLVIVDVPFAEGSKLSPGRSLSRDQYPALTLALGKAD	
P18	FHDVEAVSYAGNGQLVIAEERRQSLVIVDVPFAEGSKLSPGRSLSRDQYPALTLALGKAD	
Hp	NKGLEGLAYDLKGDRLFVTKERDPRQLLEVGGLRASLAGGFSLHVRDLSNLVKDKVFATD	240
A1	NKGLEGLAYDLKGDRLFVTKERDPRQLLEVGGLRASLAGGFSLHVRDLSNLVKDKVFATD	
P18	NKGLEGLAYDLKGDRLFVTKERDPRQLLEVGGLRASLAGGFSLHVRDLSNLVKDKVFATD	
Hp	LSSVVFDDQSGHLILLSDESKLLIEMTDEGKVVSRSLARGFAGLLKGIPOAEGVTIDDE	300
A1	LSSVVFDDQSGHLILLSDESKLLIETDEGKVVSRSLARGFAGLLKGIPOAEGVTIDDE	
P18	LSSVVFDDQSGHLILLSDESKLLIETDEGKVVSRSLARGFAGLLKGIPOAEGVTIDDE	
Hp	GYLYVVSEPNLFYRFTREPD	320
A1	GYLYVVSEPNLFYRFTRETD	
P18	GYLYVVSEPNLFYRFTRETD	

Figura 4.22 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del *cassette orfJ* de los Integrones InA1, InP18 y el de la hipotética proteína con la que presentan homología, situada en pKLC102. En verde se han marcado las diferencias en la secuencia de aminoácidos.

En los resultados se observa que más de la mitad de los aislados presentan un integrón; pero a esta alta prevalencia hay que añadir el hecho que dos de los aislados presentan más de un integrón

La determinación de las secuencias revela una alta prevalencia de genes que confieren resistencia a estreptomycin y espectinomycin, entre los integrones presentes, incluso cuando estos antibióticos, ya no son usados con elevada frecuencia en la clínica. Este hecho hace que algunos autores hayan sugerido la utilización de los integrones para la caracterización de cepas clínicamente importantes, aunque no es algo que actualmente se utiliza con frecuencia. Por otro lado, esto podría indicar que algunos *cassettes* se incorporan, en los integrones, de una forma más estable que otros.

El hecho de que las cepas ambientales fueran todas negativas, es una indicación de que no están sometidas a ninguna presión ambiental en el entorno en el que viven. Sin embargo, existen numerosos ejemplos en la bibliografía de cepas ambientales que presentan integrones en su genoma. Aunque en muchas ocasiones estos no contienen *cassettes* génicos integrados [156], en otras los *cassettes* presentan genes relacionados con la resistencia a diversos antimicrobianos como el trimetoprim, el cloranfenicol, los aminoglicósidos, la eritromicina y los β -lactámicos. Por lo tanto, la transferencia génica horizontal, es mucho mayor de lo esperado, y los integrones, como ya se ha comentado, contribuyen en gran medida a ella, pero también a la diversidad génica de los microorganismos.

La presencia de integrones iguales en cepas procedentes de distintos pacientes y aisladas en fechas diversas, sugiere elevadas tasas de transferencia horizontal de estos elementos, en el entorno del que se han aislado las cepas, cosa totalmente en concordancia con el hecho de que el ambiente hospitalario es un entorno que ejerce elevada presión antibiótica a los microorganismos que habitan en él, forzándolos a adquirir resistencias a elevadas tasas.

4.7 ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DE LA PORINA OprD.

Los carbapenems, entre ellos el imipenem y el meropenem, son potentes inhibidores de *P. aeruginosa*, porque a pesar de pertenecer al grupo de los β -lactámicos, presentan una elevada estabilidad a la β -lactamasa cromosómica AmpC de este microorganismo. Sin embargo, la resistencia de aislados clínicos al imipenem y al meropenem aumenta progresivamente. La resistencia al imipenem, hasta el momento, se cree debida a la pérdida de la porina OprD, sola o en asociación a una súper expresión de la bomba de reflujo MexEF-OprN en los mutantes denominados *nfxC*. Respecto al meropenem la superproducción del sistema de reflujo MexAB-OprM en mutantes *nalB*, puede aumentar la resistencia éste carbapenem, pero no tiene efecto sobre la susceptibilidad al imipenem, ya que éste no es un sustrato de la bomba.

Para determinar si en el caso de nuestras cepas, la resistencia al imipenem era como consecuencia de la ausencia de la porina OprD en la membrana, en primer lugar, se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, con el fin de observar si esta proteína se encontraba o no en la membrana externa de nuestros aislados. Esto se realizó en un gran número de cepas multiresistentes, descritas en las tablas 3.1 y 3.2.

En la mayoría de las cepas resistentes, la membrana externa muestra una ausencia de la proteína OprD, mientras que en las sensibles, se observa esta proteína en la membrana. Esto es lo que ocurre por ejemplo en las cepas D-D', E-E', F-F' y G-G', donde D, E, F y G, son sensibles y presentan OprD; mientras que D', E', F' y G', son resistentes y no presentan esta porina (figura 4.23).

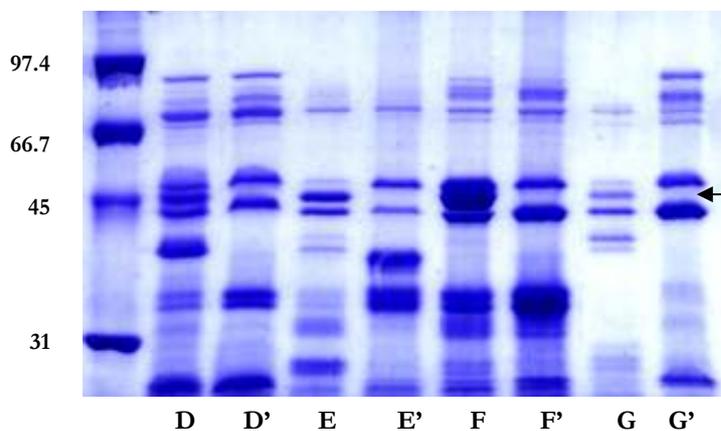


Figura 4.23 Perfiles electroforéticos de las OMPs de algunas de las cepas de *P. aeruginosa*. La flecha indica la posición en la que se encuentra la OprD, en las cepas que la presentan.

Con el objetivo de estudiar las mutaciones que dan lugar a una ausencia de la porina en la membrana externa, se procedió a amplificar por PCR el gen *oprD* y se determinó la secuencia del producto obtenido. Una vez obtenidas las secuencias, éstas se compararon con la secuencia de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1, para determinar los cambios existentes.

El estudio de las mutaciones de las cepas P16, P17, 22, 26, 28, 33, 69, 76, 77, 87, 93, 99, B', G' (cepas resistentes al imipenem y que no presentan OprD en sus membranas externas) reveló la presencia de un codón de finalización de la traducción prematuro, que da lugar a una proteína truncada y, por lo tanto, afuncional. Este stop prematuro se genera en todos los casos por una sustitución de una C por una T en el nucleótido 424 (Gln₁₄₂ → stop). Hasta el momento se han descrito numerosas cepas que presentan como mutación un stop prematuro, pero hasta el momento no se había detectado en este codón.

La cepa D', también presenta un codón de terminación prematura, producido por la inserción de dos nucleótidos en las posiciones 640 y 641, que hacen que varíe la pauta de lectura; en cambio, en el caso de la cepa F', este codón stop está provocado por la inserción de 14 nucleótidos en las posiciones 574 a 588. Estas mutaciones tampoco habían sido descritas hasta el momento (figura 4.25).

Por el contrario la cepa E', presenta una delección de 7 nucleótidos en la posición 1337, que provoca una ausencia de codón de terminación en el lugar adecuado, con lo que la traducción produce una proteína de gran tamaño, que no corresponde con la OprD y, que como sería de esperar, o bien no es exportada, o bien no se inserta en la membrana externa (figura 4.25).

Esto también ocurre en la cepa C', aunque en este caso la falta de un codón stop es debida a una inserción en la posición 1200 que provoca una variación de la pauta de lectura, a partir de este punto, con lo que la generación de nuevos tripletes, hace que se pierda el codón stop y no haya una terminación de la traducción en el lugar que correspondería (figura 4.24).

```

1      atgaaagtgatgaagtggagcgccattgcactggcgggtttccgcaggtagcactcagttc
      M K V M K W S A I A L A V S A G S T Q F
61     gccgtggccgacgcattcgtcagcgatcaggccgaagcgaaggggttcacgaagacagc
      A V A D A F V S D Q A E A K G F I E D S
121    agcctgaaacctgctgctccgcaactactatttcaaccgtgacggcaaggaaggtcgggggt
      S L N L L L R N Y Y F N R D G K E G R G
181    gatcgcgtcgattggaccagggcttcctcaccacctacgaatccggcttcactcaaggc
      D R V D W T Q G F L T T Y E S G F T Q G
241    accgtgggcttcggggtcgatgccttcggctacctgggctgaagctcgacggcacctcc
      T V G F G V D A F G Y L G L K L D G T S
301    gacaagaccggcaccggcaacctgcccggatgaacgacggcaagccgcgcatgactac
      D K T G T G N L P V M N D G K P R D D Y
361    agccgcgccggggcgccgtgaaggtgcgcatctccaagaccatgctgaagtggggag
      S R A G G A V K V R I S K T M L K W G E
421    atgcaaccgaccgcccggctcttcgcccgtggcggcagccgctgttcccgcagaccggc
      M Q P T A P V F A A G G S R L F P Q T A
481    accggcttccagctgcagagcagcgaattcgaagggctcgacctcgaggcaggccacttc
      T G F Q L Q S S E F E G L D L E A G H F
541    accgagggcaaggagccgaccaccgtcaaactcgcgcggtgaactctacgccacctacgcc
      T E G K E P T T V K S R G E L Y A T Y A
601    ggcagacagccaagagcgcgcgacttcgctggcggccgctacgcgatcaccgacaacctc
      G Q T A K S A D F A G G R Y A I T D N L
661    agcgcctccctctatggcgcagagctgaaagacatctatcgccagtactacctgaacaac
      S A S L Y G A E L K D I Y R Q Y Y L N T
721    aactacaccatcccgctggcctccgatcaatcgctgggcttcgacttcaacatctaccgc
      N Y T I P L A S D Q S L G F D F N I Y R
781    accaccgacgaaggcaagtccaaggctggcgacatcagcaacaccacctggctccctggcg
      T T D E G K S K A G D I S N T T W S L A
841    ggcgcgatatactctggacgccacaccttactctggcctaccagcagggtgatggcgat
      G A Y T L D A H T F T L A Y Q Q V H G D
901    cagccgtttgattacatcggttcggcggcaacggttccggcgccggggcgactcgatc
      Q P F D Y I G F G G N G S G A G G D S I
961    ttctcgccaactccgtccagtactccgacttcaacggctcctggcgagaaatcctggcag
      F L A N S V Q Y S D F N G P G E K S W Q
1021   gcccggtacgacctgaacctggcctcctacggcgttccctggcctgacctatgctgctg
      A R Y D L N L A S Y G V P G L T F M L R
1081   tacatcaatggtaaggacatcgacgggaccaaggtcgatttcagctcctcctatggcaggc
      Y I N G K D I D G T K V D S S S S Y A G
1141   ctgtacggcgaggatggcaagcaccacgaaaccaacctcgaagccaagtacgtgggtccac
      L Y G E D G K H H E T N L E A K Y V V H
1201   gtcgggtccggccaaggacctgtcgttccgcacccgccaggcctggcaccgtgccaacgc
      V R S G Q G P V V P H P P G L A P C Q R
1261   cgaccagggcgaaggcgaccagaacgagttccgcctgatcgtcgactatccgctgtcgat
      R P G R R R P E R V P P D R R L S A V D
1321   cctgtaatcgaccgacaggcaacgaaaaancccgntcgccg
      P V I D R Q A T K K X R X A

```

Figura 4.24 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína OprD de la cepa C'. En rojo se han marcado los cambios de aminoácidos, mientras que en sombreado gris se han marcado los cambios de nucleótidos (únicamente aquellos que resultan en un cambio de aminoácido), respecto a la cepa de referencia PA01. En amarillo se ha marcado la inserción responsable del cambio de pauta de lectura.

El estudio de estas cepas resistentes nos indica que la causa que, con más frecuencia está implicada en la pérdida de la porina, es una mutación de diversos tipos en el gen, que genera una terminación prematura de la traducción.

A modo de ejemplo, la figura 4.25, muestra la alineación de la secuencia proteica de algunas de estas cepas con la de la cepa de referencia PA01.

		L1		
PA01	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	<u>LLLLRNYYFNRDGKSGSGD</u>	61	
PC'	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLN	LLLLRNYYFNRDGKEGRGD		
E'	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLN	LLLLRNYYFNRDGKEGRGD		
D'	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLN	LLLLRNYYFNRDGKEGRGD		
F'	MKVMKWSAIALAVSAGSTHSTGPTHSCSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLLRNYYFNRDGKEGRGD		
B'	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLLRNYYFNRDGKEGRGD		
69	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAK-VLEERRM	LLLLRNYYFNRDGKEGRGE		
76	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFVEERR	LNLLLLRNYYFNRDGKEGRGD		
77	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLN	LLLLRNYYFNRDGKEGRGD		
33	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLN	LLLLRNYYFNRDGKEGRGD		
		L2		
PA01	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTS	<u>DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS</u>	121	
PC'	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
E'	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
F'	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
D'	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
B'	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
69	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGGDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
76	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGGDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
77	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
33	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTS	DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS		
		L2	L3	
PA01	<u>RAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGSRLFPQTATGFQ</u>	<u>LOSSEFEGLDLEAGHFT</u>	181	
PC'	RAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGSRLFPQTATGFQ	LOSSEFEGLDLEAGHFT		
E'	RAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGSRLFPQTATGFQ	LOSSEFEGLDLEAGHFT		
F'	RAGGALKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGSRLFPQTATGFQ	LOSSEFEGLDLEAGHFT		
D'	RAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGSRLFPQTATGFQ	LOSSEFEGLDLEAGHFT		
B'	RAGGAVKVRISKTMLKWGEM-----	-----		
69	RAGGAVKVRISKTMLKWGEM-----	-----		
76	RAGGAVKVRISKTMLKWGEM-----	-----		
77	RAGGAVKVRISKTMLKWGEM-----	-----		
33	RAGGAVKVRISKTMLKWGEM-----	-----		
		L3	L4	
PA01	<u>EGKEPTTVKSRGELYATYAGETA</u>	<u>KSADFI</u>	<u>GGRYAITDNLSASLYGAELEDIYRQYYLNSN</u>	241
PC'	EGKEPTTVKSRGELYATYAGQTA	KSADFI	GGRYAITDNLSASLYGAELEKDIYRQYYLNTN	
E'	EGKEPTTVKSRGELYATYAGQTA	KSADFI	GGRYAITDNLSASLYGAELEKDIYRQYYLNTN	
F'	EGKQGT	TKSRNL	CRPDRQERGLRRRPLRDHRQSQR	LPVWRRIERHLSPVLP
D'	EGKEPTTVKSRGELYATYAGQTA	KSADFI	GGRYTRSP	TTSAPPSMAQS
B'	-----	-----	-----	-----
69	-----	-----	-----	-----
76	-----	-----	-----	-----
77	-----	-----	-----	-----
33	-----	-----	-----	-----
		L5		
PA01	YTIPLASDQSLGDFDFNIY	<u>RTNDEGKAKAGDISN</u>	TTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGDQ	301
PC'	YTIPLASDQSLGDFDFNIYRTT	DEGKSKAGDISN	TTWSLAGAYTLDAHTFTLAYQQVHGDE	
E'	YTIPLASDQSWGDFDFNIYRTT	DEGKSKAGDISN	TTWSLAGAYTLDAHTFTLAYQQVHGDE	
F'	GIRPVAGLRLQHLPHHR	-----	-----	
D'	-----	-----	-----	
B'	-----	-----	-----	
69	-----	-----	-----	
76	-----	-----	-----	
77	-----	-----	-----	
33	-----	-----	-----	

	<u>L6</u>	<u>L7</u>	
PAO1	PFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVRY		361
PC'	PFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMLRY		
E'	PFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMLRY		
F'	-----		
D'	-----		
B'	-----		
69	-----		
76	-----		
77	-----		
33	-----		
	<u>L7</u>	<u>L8</u>	
PAO1	INGKDIDGTFKMSDNNVGYKNGYGEDGKHHE	TNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRAN	421
PC'	INGKDIDGTKV-DSSSSYAGL-YGEDGKHHE	TNLEAKYVVHVRSGQGPVVPHPGLAPCQ	
E'	INGKDIDGTKV-DSSSSYAGL-YGEDGKHHE	TNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRAN	
F'	-----		
D'	-----		
B'	-----		
69	-----		
76	-----		
77	-----		
33	-----		
	<u>L8</u>		
PAO1	ADQEGDQNE	FRLIVDYPLSIL-----	456
PC'	RRPGRRRPERVPPDRRLSAVDF	VIDRQATKKPGIA-----	
E'	ADQEGDQNEFRLIVD	YRSCNRPTGNEKTR-----	
F'	-----		
D'	-----		
B'	-----		
69	-----		
76	-----		
77	-----		
33	-----		

Figura 4.25 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína OprD de algunas de las cepas, con la cepa de referencia PAO1. En amarillo se indican los lugares de terminación prematura de la traducción proteica; mientras que en azul, se indica la falta de esta terminación.

Sorprendentemente, en algunos casos el patrón de sensibilidad/resistencia al imipenem, no corresponde con la presencia/ausencia de la OprD en la membrana externa. Este es el caso de las cepas P1, P3, P4, P18, A' y C.

La cepa P1, es una cepa resistente al imipenem que, sin embargo, presenta la proteína cuando se realizan electroforesis de las proteínas de membrana externa en geles de poliacrilamida sin desnaturalizar.

Puesto que OprD es una proteína trimérica, también se realizaron geles tratando la muestra a 100°C durante 10 min. de manera que el trímero se descompone originando monómeros que pueden observarse y que presentan un peso aproximado de unos 45KDa. En la muestra sin tratamiento térmico, el heterómero de proteína no se separa y no puede observarse en esta zona del gel, ya que su peso es superior y no se resuelve correctamente en este tipo de electroforesis. En las figuras 4.26, y 4.27 observamos la presencia de OprD tanto en la cepa resistente P1, como en una cepa clínica sensible (P2) y en la cepa de referencia P14 (ATCC27853), también sensible, tanto hervida, como sin hervir.

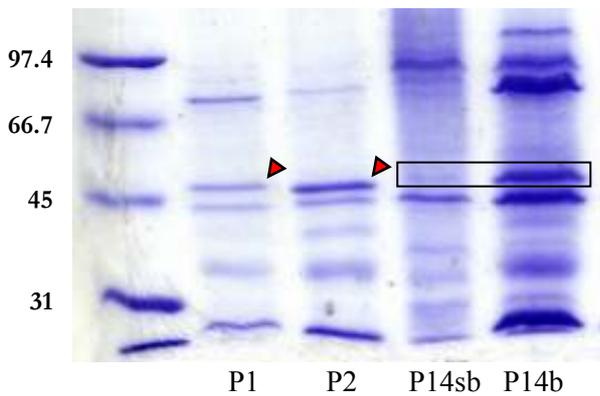
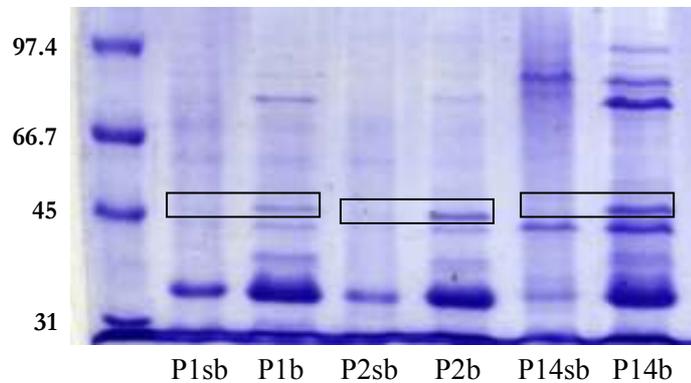


Figura 4.26 Perfil electroforético de las cepas P1, P2 y P14 (ATCC27853). P14sb presenta la muestra en condiciones no desnaturizantes (sin hervir), mientras que P14b la presenta desnaturizada (hervida). La flecha roja marca la posición de OprD.

Figura 4.27 Perfil electroforético de las cepas P1, P2 y P14 (ATCC27853). Observamos OprD, únicamente en los casos en que la muestra presenta tratamiento térmico. Sb, sin hervir; b hervida.



Una vez comprobado que realmente OprD aparecía en la membrana de P1, se realizó un estudio de las mutaciones del gen que codifica esta proteína. (figura 4.28)

```

1      atgaaagtgatgaagtggagcgcattgcaactggcggtttccgcaggtagcactcagttc
      M K V M K W S A I A L A V S A G S T Q F
61     gccgtggccgacgcattcgtcagcgatcaggccgaagcgaaggggtcatcgaagacagc
      A V A D A F V S D Q A E A K G F I E D S
121    agcctcgacctgctgctccgcaactactatttcaaccgtgacggcaagagcggcagcggg
      S L D L L L R N Y Y F N R D G K S G S G
181    gaccgcgtcgactggacccaaggttctcaccacctatgaatccggcttcacccaaggc
      D R V D W T Q G F L T T Y E S G F T Q G
241    accgtgggcttcggcgtcgatgccttcggctacctcggctctgaagctcgacggcacctcg
      T V G F G V D A F G Y L G L K L D G T S
    
```

```

301  gacaagagcggtaccggcaacctgcccgtgatgaacgacggcaggccccgtgacgactac
    D K S G T G N L P V M N D G T P R D D Y
161  agccgcgcccgtggcgccgtgaaggtacgcacatctccaagaccatgttgaagtggggcgag
    S R A G G A V K V R I S K T M L K W G E
421  gtgcagccgaccgctccgggtcttcgcccggcgccgagccgcctgttcccgcagaccgcg
    V Q P T A P V F A A G G S R L F P Q T A
481  accggcttccaactgcagagcagcgaacctgaagggtcgcacatctcgaagcagggcacttc
    T G F Q L Q S S E L E G L D L E A G H F
541  accgaaggcaagcagggcaccaccctttgtcgcggggcgaactctacgcaacctatgca
    T E G K Q G T T P L S R G E L Y A T Y A
601  ggcgagaccgccaagagcgcgatttcatgggggcccgtacgcaatcaccgataacctc
    G E T A K S A D F I G G R Y A I T D N L
661  agcgcctccctgtacggcgccgaactcgaagacatctatcgtcagtattacctgaacagc
    S A S L Y G A E L E D I Y R Q Y Y L N S
721  aactacaccatcccactggcatccgaccaatcgctgggcttcgatttcaacatctaccgc
    N Y T I P L A S D Q S L G F D F N I Y R
781  acaaacgatgaaggcaaggccaaggccggcgacatcagcaacaccacttgggtccctggcg
    T N D E G K A K A G D I S N T T W S L A
841  gcagcctacactctggatgcgcacactttcacctggcctaccagaaggtccatggcgat
    A A Y T L D A H T F T L A Y Q K V H G D
901  cagccgtttgattatcgggttcggcgaggaacggttccggcggcgcggtgactcgatt
    Q P F D Y I G F G E N G S G G G G D S I
961  ttctcgccaactccgtgcagtactccgacttcaacggccccggcgagaaatcctggcag
    F L A N S V Q Y S D F N G P G E K S W Q
1021 gcccgtacgacctgaacctcgccctcctatggcgttcccggcctgactttcatggctccgc
    A R Y D L N L A S Y G V P G L T F M V R
1081 tatatcaatggcaaggacatcgatggcaccgaagatgtctgacaacaacgtcggctataag
    Y I N G K D I D G T K M S D N N V G Y K
1141 aactacggctacggcgaggacggcaagcaccacgagaccaacctggaagccaagtacgtg
    N Y G Y G E D G K H H E T N L E A K Y V
1201 gtccagtcgggtccggccaaggacctgtcgttccgcacccgccaggcctggcaccgcgc
    V Q S G P A K D L S F R I R Q A W H R A
1261 aacgcccaccaggcgaaggcgaccagaacgagttccgcctgatcgtcgactatccgctg
    N A D Q A E G D Q N E F R L I V D Y P L
1321 tcgatcctgtaa
    S I L -

```

Figura 4.28 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína OprD de la cepa P1. En rojo se han marcado los cambios de aminoácidos, mientras que en sombreado gris se han marcado los cambios de nucleótidos (únicamente aquellos que resultan en un cambio de aminoácido), respecto a la cepa de referencia PA01.

El *loop* 2 presenta dos mutaciones: C₃₀₈ → G, que hace que T103S; y A₃₄₄ → C, con lo que K115T, ambos cambios representan un cambio de carga (estos cambios ya han sido descritos con anterioridad [82]). El *loop* 3 presenta cinco cambios de aminoácido: F170L, E185Q, P186G, V189P y K190L. De estos cinco cambios únicamente los de las posiciones 185 y 190 están implicados en cambio de carga de las moléculas, y además algunos de ellos también han sido descritos en ocasiones anteriores [80]. El *loop* 6, presenta dos cambios de aminoácidos, de los cuales únicamente uno representa cambio de carga (R310E). Finalmente el *loop* 8 presenta un único cambio con implicación en la variación de carga: G425A.

Se sabe que únicamente mutaciones, concretamente deleciones, son no disruptivas siempre que afecten a los *loops* de OprD, más sujetos a cambios debido a que se encuentran en zonas donde el ambiente puede ejercer cierta presión selectiva que los “fuerce” a evolucionar a una tasa más elevada. En cambio, si estas mutaciones afectan a los segmentos transmembrana de la proteína, pueden afectar a la biogénesis de ésta; con lo cual, en principio, no habría motivo por el que esta cepa resistente no deba presentar la proteína en su membrana, ya que no se observan deleciones, no solo en los segmentos transmembrana, sino en ninguno de los *loops* externos.

Hasta el momento es comúnmente aceptado que la presencia de la proteína, al permitir el paso del imipenem al interior celular, haga obligatoriamente a la cepa sensible a este compuesto, cosa que no ocurre en P1. Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que los *loops* 2 y 3 están implicados en la unión al imipenem [79]; P1 presenta numerosos cambios en estos dos *loops*, que además, implican un cambio de aminoácido y carga de las moléculas, por lo que podría ser que a pesar de que la proteína este insertada en la membrana, estos cambios hayan producido que ésta no sea capaz de unir el antibiótico, ya sea por una variación en los residuos implicados en esta unión, o bien, debido a que estas sustituciones de unos aminoácidos por otros, han producido que estos *loops* se plieguen de distinto modo y que, por tanto, no estén orientados espacialmente de la manera correcta para permitir la unión y/o el paso del imipenem; muchas de estas mutaciones las presentan también, cepas susceptibles, pero en este caso podrían contribuir a un pliegamiento incorrecto o una falta de unión del imipenem, la presencia de algunos cambios de aminoácidos en otros *loops* o bien, en las zonas situadas entre éstos (figura 4.35). Todo esto conferiría a la cepa P1 una resistencia a este carbapenem aún cuando la proteína esté presente en su membrana.

El caso contrario, nos lo proporcionan las cepas P4 y P18. Estas cepas son sensibles al imipenem, pero no presentan OprD en sus membranas (figura 4.29).

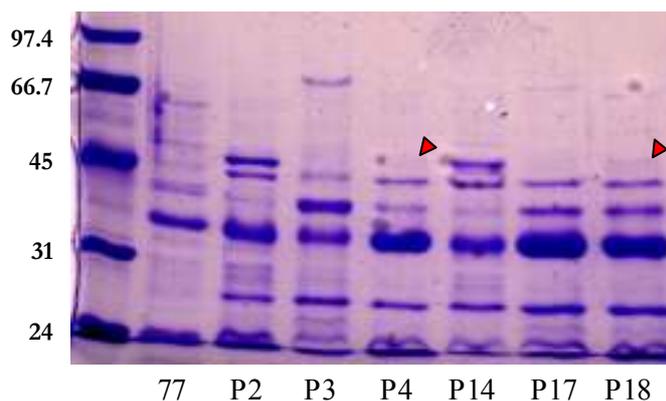


Figura 4.29 Perfil electroforético de las cepas 77 (Imi^R), P2 (Imi^S), P3 (Imi^I), P4 (Imi^S), P14 (ATCC27853), P16 (Imi^R) y P17 (Imi^R). La flecha roja marca la posición donde debería estar OprD en el caso de las cepas sensibles. Imi^R: cepa resistente al imipenem; Imi^S: cepa sensible al imipenem y Imi^I: cepa que presenta una susceptibilidad reducida.

La cepa P18 presenta, entre otras, una mutación descrita recientemente por Wretlind *et al.* [⁸⁷]: un cambio de guanina a adenina en el nucleótido 831, que genera un codón stop, y por lo tanto una terminación prematura de la transcripción (figura 4.30).

```

1      atgaaagtgatgaagtggagcgccattgcactggcggtttccgcaggtagcactcagttc
      M K V M K W S A I A L A V S A G S T Q F
61     gccgtggccgacgcattcgtcagcgatcaggccgaagcgaaggggttcacgaagacagc
      A V A D A F V S D Q A E A K G F I E D S
121    agcctcgacctgctgctccgcaactactatattcaaccgtgacggcaagagcggcagcggg
      S L D L L L R N Y Y F N R D G K S G S G
181    gaccgctcgactggacccaaggcttcctcaccacctatgaatccggcttcacccaaggc
      D R V D W T Q G F L T T Y E S G F T Q G
241    accgtgggcttcggcgtcgatgccttcgggtacctcggcctgaagctcgacggcacctcg
      T V G F G V D A F G Y L G L K L D G T S
301    gacaagaccggcaccggcaacctgcccggatgaacgacggcaagccgcgacgactac
      D K T G T G N L P V M N D G K P R D D Y
361    agccgcgtggcggcgccgtgaaggtgctcattccaagaccatgctgaagtggggcgaa
      S R A G G A L K V R I S K T M L K W G E
421    atgcaacctaccgcgcgggtcttcgcccggcggcggcagccgcctgttcccgcagaccgcg
      M Q P T A P V F A A G G S R L F P Q T A
481    accggcttccaactgcagagcagtgaaattcgaagggtcgcgatcctgaagcggccacttc
      T G F Q L Q S S E F E G L D L E A G H F
541    accgaaggcaagcagggcaccaccacccaagtcgctggcggcgaactctacgcaacctatgca
      T E G K Q G T T T K S R G E L Y A T Y A
601    ggtcagaccgccaagagcgcggacttcgcccggcggcggcctacgcgatcaccgacaatctc
      G Q T A K S A D F A G G R Y A I T D N L
661    agcgcctccctgtatggcgcgaattgaaagacatctatcgcagctattacctgaacacc
      S A S L Y G A E L K D I Y R Q Y Y L N T
721    aactacaccatcccgtggcatccgaccagtcgctgggcttcgacttaacatctaccgc
      N Y T I P L A S D Q S L G F D F N I Y R
781    accaccgatgaaggcaaagccaagccggcgacatcagcaacaccgctgatccctggncc
      T T D E G K A K A G D I S N T A -

```

Figura 4.30 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína OprD de la cepa P18. En rojo se han marcado los cambios de aminoácidos, mientras que en sombreado gris se han marcado los cambios de nucleótidos (únicamente aquellos que resultan en un cambio de aminoácido), respecto a la cepa de referencia PA01.

P4 presenta mutaciones en todos los *loops* excepto en L1. En el L2 V127L; en L3 E185Q, P186G y V189T; en el L4 E229K; en el L5 N262T; en el L6 R310E, G312R y A315G; en el L7 un fragmento de 12 aminoácidos (372-MSDNNVGYKKNYG-383) es substituido por un fragmento completamente distinto de 10 aminoácidos (372-VDSSSSFAGL-381) y, finalmente en el L8 Q424E (figura 4.31).

```

1      atgaaagtgatgaagtggagcgccattgcactggcggtttccgcaggtagcactcagttc
      M K V M K W S A I A L A V S A G S T Q F
61     gccgtggccgacgcattcgtcagcgatcaggccgaagcgaaggggttcacgaagacagc
      A V A D A F V S D Q A E A K G F I E D S
121    agcctcgacctgctgctccgcaactactatattcaaccgtgacggcaagagcggcagcggg
      S L D L L L R N Y Y F N R D G K S G S G
181    gaccgctcgactggacccaaggcttcctcaccacctatgaatccggcttcacccaaggc
      D R V D W T Q G F L T T Y E S G F T Q G

```

```

241 accgtgggcttcggcgctcgatgccttcgggctacctcggcctgaagctcgacggcacctcg
   T V G F G V D A F G Y L G L K L D G T S
301 gacaagaccggcaccggcaacctgccggtgatgaacgacggcaagccggcagcactac
   D K T G T G N L P V M N D G K P R D D Y
361 agccgcgctggcggcgccctgaaggtgcgcatctccaagaccatgctgaagtggggcgaa
   S R A G G A L K V R I S K T M L K W G E
421 atgcaacctaccgcgcccgtcttcgcgcggcggcagccgcctgtcccgcagaccgcg
   M Q P T A P V F A A G G S R L F P Q T A
481 accggcttccaactgcagagcagtgattcgaaggctcgatctcgaagcggggcacttc
   T G F Q L Q S S E F E G L D L E A G H F
541 accgaaggcaagcagggcaccaccaccaagtgcgcggcgaactctacgcaacctatgca
   T E G K Q G T T T K S R G E L Y A T Y A
601 ggtcagaccgccaagagcgcggacttcggcggcggcgcgtacgcgatcaccgacaatctc
   G Q T A K S A D F A G G R Y A I T D N L
661 agcgcctccctgtatggcgcgaattgaaagacatctatcgccagtattacctgaacacc
   S A S L Y G A E L K D I Y R Q Y Y L N T
721 aactacaccatcccgcgtggcatccgaccagtcgctgggcttcgacttcaacatctaccg
   N Y T I P L A S D Q S L G F D F N I Y R
781 accaccgatgaaggcaagccaaggccggcgacatcagcaacaccgctgggtccctggcc
   T T D E G K A K A G D I S N T A W S L A
841 ggcgcgtagactctggacgcgcacaccttcaccctggcctaccagcaggtgcatggcgac
   G A Y T L D A H T F T L A Y Q Q V H G D
901 gagccggttcgactacatcggcttcggcggagaaccggtccggcggcggcggtgactcgatt
   E P F D Y I G F G E N R S G G G D S I
961 ttcctcgccaactccgtgcagtactccgacttcaacggccccggcgagaaatcctggcag
   F L A N S V Q Y S D F N G P G E K S W Q
1021 gcccgctacgacctgaacatggcctcctacggcgttcccggcctgaccttcatggttcgt
   A R Y D L N M A S Y G V P G L T F M V R
1081 tacatcaacggtaaggacatcgacggcaccgaaggtcgactccagttcctccttcggcggc
   Y I N G K D I D G T K V D S S S S F A G
1141 ctgtacggcggagacggcaagcaccacgagaccaacctggaagccaagtacgtcgtccag
   L Y G E D G K H H E T N L E A K Y V V Q
1201 gccggcccggccaaggacctgtcgttccgtatccgccaggcctggcaccgcgccaatgcc
   A G P A K D L S F R I R Q A W H R A N A
1261 gacgaaaggtgaaggcgaccagaacgagttccgcctgatcgtcgactatccgcgtgtcgatc
   D E G E G D Q N E F R L I V D Y P L S I
1321 ctgtaa
   L -

```

Figura 4.31 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína OprD de la cepa P4. En rojo se han marcado los cambios de aminoácidos, mientras que en sombreado gris se han marcado los cambios de nucleótidos (únicamente aquellos que resultan en un cambio de aminoácido), respecto a la cepa de referencia PA01.

Las mutaciones presentes en *oprD* de P4, parecen no estar implicadas en el hecho de que no encontremos OprD en su membrana externa, es decir, no existen deleciones en zonas de la proteína que pudiesen afectar la biogénesis de ésta; tan solo existe una sustitución de 12 aminoácidos por otros 10 distintos en el L7; esta mutación está ya descrita en la bibliografía [80] y se ha propuesto que afecta a un acortamiento en este *loop*, que tiene como consecuencia una mayor apertura del canal de la OprD, que conferiría mayor susceptibilidad al meropenem. Éste no es el caso de nuestra cepa, puesto que, como ya hemos comentado, P4 no presenta OprD en la membrana externa.

Por otro lado se ha demostrado la existencia de cepas que presentan una pérdida de OprD causada por algún mecanismo de represión de la transcripción de *oprD* y que provoca una reducción importante del mRNA de *oprD* o bien, algún mecanismo que actúa a nivel post-transcripcional causando una fuerte reducción de la producción de proteína; éste es también el caso de los mutantes de tipo *nfxC* [73,82]. En ausencia de mutaciones en el gen *oprD* de P4, suponemos que la ausencia de proteína en la membrana externa de la cepa, es debida a alguno de estos mecanismos, y siendo P4 resistente a la ciprofloxacina podría, incluso, tratarse de un mutante *nfxC*.

De todos modos, la ausencia de OprD tanto en P4, como en P18, implicaría, como ya hemos comentado, una resistencia al imipenem; sin embargo ambas cepas son totalmente sensibles, presentando unas MICs para este antibiótico de 4 y 2 µg/ml, respectivamente. Esto nos hace pensar que en estas cepas podría existir un mecanismo secundario, hasta ahora no descrito, de entrada del imipenem a las células y que por lo tanto también estaría implicado en la susceptibilidad/resistencia al carbapenem. En este caso, esta puerta de entrada secundaria a la célula permitiría que las cepas P4 y P18 presentasen una gran susceptibilidad al imipenem, pese a no tener OprD en sus membranas. Este mecanismo sería minoritario, ya que hasta el momento, lo presentan un pequeño número de cepas.

De hecho, la proteína OprD, pertenece a una gran familia de 19 miembros, de la que hasta el momento, solo se ha relacionado a OprD con el transporte de antibióticos; además el conocimiento del genoma completo de *P. aeruginosa* ha permitido el descubrimiento de 163 proteínas de membrana conocidas o, precedidas por homología con OMPs de la misma especie o de otras, de las cuales 64 se agrupan en tres grandes familias de porinas (una de las cuales es la familia de la OprD), de manera que quizá alguna de estas proteínas podría haber “cedido” a la gran presión antibiótica que se está ejerciendo en la sociedad actual, y habría evolucionado para “involucrarse en la gran cruzada” que actualmente mantienen los microorganismos contra los antibióticos.

La existencia de este mecanismo secundario nos vuelve a sugerir el perfil de la cepa P3, que a pesar de no tener OprD en su membrana (figura 4.29), debido a un stop prematuro (cambio de G₈₃₁ → A), presenta una sensibilidad disminuida a este carbapenem (figura 4.32).

Esto nos hace pensar, de nuevo, en la entrada de imipenem a la célula por otro mecanismo distinto de la OprD, lo cual no permitiría que esta ausencia de porina provocase una resistencia total al antibiótico.

```

1      atgaaagtgatgaagtggagcgcattgcaactggcgggtttccgcaggtagcactcagttc
      M K V M K W S A I A L A V S A G S T Q F
61     gccgtggccgacgcattcgtcagcgatcaggccgaagcgaaggggttcacgaagacagc
      A V A D A F V S D Q A E A K G F I E D S
121    agcctcgacctgctgctccgcaactactatattcaaccgcgacggcaagagcggcagcggg
      S L D L L L R N Y Y F N R D G K S G S R
181    gaccgtgtcgaactggaccagggttctcaccacttacgaatccggcttcaccaagggc
      D R V D W T Q G F L T T Y E S G F T Q G
241    accgtcggcttcggcgtggatgccttcggctacctcggcctgaagctcgacggtacctcc
      T V G F G V D A F G Y L G L K L D G T S
301    gacaagaccggcggccggcaacctgcccgggtgatgaacgacggcaagccgcgcatgactac
      D K T G A G N L P V M N D G K P R D D Y
361    agccgcgcagggcggcgcctgaaggtgcgcatctccaagaccatgctgaaatggggcgag
      S R A G G A L K V R I S K T M L K W G E
421    atgcagccgaccgcaccgggtcttcgcccggcggcagccgcctgttcccgcagaccgg
      M Q P T A P V F A A G G S R L F P Q T A
481    accggcttccagttgcagagcagcgaattcgaaggcctcgacctcgaagcggggccatttc
      T G F Q L Q S S E F E G L D L E A G H F
541    accgaaggcaagcagggcaccaccaccaagtcgcgcggcgaactctacgcgacctatgca
      T E G K Q G T T T K S R G E L Y A T Y A
601    ggccagaccgccaagagcgcggacttcggccggcggcggcctacgcgatcaccgacaacctc
      G Q T A K S A D F A G G R Y A I T D N L
661    agcgcctccctgtatggcgcgaactgaaagacatctatcgccagtactacctgaacacc
      S A S L Y G A E L K D I Y R Q Y Y L N T
721    aactacaccattccgctggcggaaagatcagtcgctgggcttcgacttcaacatctaccgc
      N Y T I P L A E D Q S L G F D F N I Y R
781    accaccgacgaaggcaagtcgaagcggcgacatcagcaacaccacctgatccctggnc
      T T D E G K S K A G D I S N T T -

```

Figura 4.32 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína OprD de la cepa P3. En rojo se han marcado los cambios de aminoácidos, mientras que en sombreado gris se han marcado los cambios de nucleótidos (únicamente aquellos que resultan en un cambio de aminoácido), respecto a la cepa de referencia PA01.

La cepa C, es una cepa sensible, que no presenta OprD, cuando se realizan electroforesis en geles de poliácridamida, de las proteínas de la membrana externa (figura 4.33).

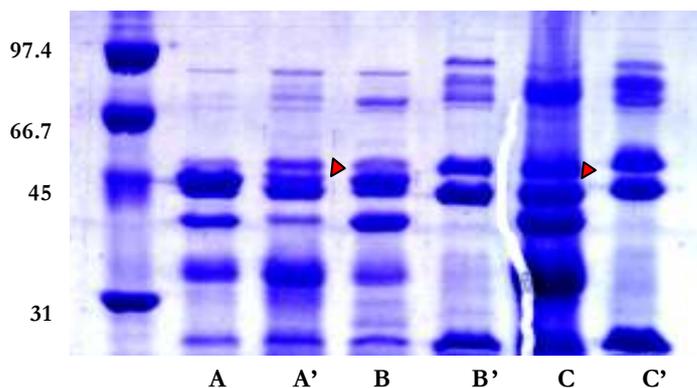


Figura 4.33 Perfiles electroforéticos de proteínas de la membrana externa (OMP) en SDS-PAGE de algunas de las cepas de *P. aeruginosa*. La flecha roja marca la posición de OprD en la cepa A' y su ausencia en C.

El estudio de la secuencia del gen *oprD* de C, nos muestra que éste presenta numerosas mutaciones. En el L2 V127L; en L3 E185Q y V189T; en el L4 E229K; en el L5 N262T; en el L6 R310E y A315G; en el L7 un fragmento de 12 aminoácidos (372-MSDNNVGYKKNYG-383) es substituido por un fragmento completamente distinto de 10 aminoácidos (372-VDSSSFAGL-381) y, finalmente en el L8 Q424E (figura 4.34). Todas estas mutaciones las comparte con P4, con la excepción del L1 que presenta dos cambios: S57E y S59R. Además en la posición 1200 hay una inserción que provoca una variación de la pauta de lectura, con lo que además de que, a partir de este punto, los tripletes no se leen correctamente y se traducen por otros aminoácidos diferentes a los de la proteína nativa, se genera un nuevo codón stop en la posición 424 (debido a C₁₂₇₀→T), de manera que la proteína queda truncada en su extremo C-terminal, con lo que es posible que debido a esto la proteína no llegue a la membrana. Esta inserción también la presenta la cepa C', con las mismas consecuencias fenotípicas que en el caso de C, aunque C', como ya se ha comentado, es una cepa resistente al imipenem.

Igual que en el caso de P3, P4, y P18, esta cepa, también nos sugiere la existencia de otro mecanismo implicado en el paso al interior celular del imipenem, y que confiera sensibilidad a la cepa.

```

1      atgaaagtgatgaagtggagcgccattgcactggcggnttccgcaggtagcactcagttc
      M K V M K W S A I A L A X S A G S T Q F
61     gccgtggccgacgcattcgtcagcgatcaggccgaagcgaaggggttcacgaagacagc
      A V A D A F V S D Q A E A K G F I E D S
121    agcctcgacctgctgctccgcaactactatttcaaccgtgacggcaaggaaggtcggggc
      S L D L L L R N Y Y F N R D G K E G R G
181    gatcgcgctcgattggaccagggttctcaccacctacgaatccggcttcactcaaggc
      D R V D W T Q G F L T T Y E S G F T Q G
241    accgtgggcttcggcgatgccttcgggtacctgggctgaagctcgacgggtacctcg
      T V G F G V D A F G Y L G L K L D G T S
301    gacaagaccggcaccggcaacctgcccggatgaacgacggcaagccgacgactac
      D K T G T G N L P V M N D G K P R D D Y
361    agccgcgctggcggcgccctgaaggtgcgcatctccaagaccatgctgaagtgggcgaa
      S R A G G A L K V R I S K T M L K W G E
421    atgcaacctaccgcccgggtcttcgcccggcggcagccgcctgttcccgcagaccgcg
      M Q P T A P V F A A G G S R L F P Q T A
481    accggcttccaactgcagagcagtgattcgaaggctcgatctcgaagcgggcccacttc
      T G F Q L Q S S E F E G L D L E A G H F
541    accgaaggcaagcagggcaccaccaccaagtgcgcccggcgaactctacgcaacctatgca
      T E G K Q G T T T K S R G E L Y A T Y A
601    gccagaccgccaagagcgcggacttcggcggcggccgctacgcgatcaccgacaatctc
      G Q T A K S A D F A G G R Y A I T D N L
661    agcgcctccctgtatggcggcaattgaagacatctatcgccagttattcctgaacacc
      S A S L Y G A E L K D I Y R Q Y Y L N T
721    aactacacaatcccgtggcatccgaccagtcgctgggcttcgacttaacatctaccgc
      N Y T I P L A S D Q S L G F D F N I Y R
781    accaccgatgaaggcaagccaagccggcgacatcagcaacaccgctgggtccctggcc
      T T D E G K A K A G D I S N T A W S L A

```

```

841  ggcgcgtacaccctggacgcgcacaccttcaccctggcctaccagcagggtgcatggcgac
      G A Y T L D A H T F T L A Y Q Q V H G D
901  gagccgttcgactacatcggttcggcgagaaacggttcggcgggcggtgactcgatt
      E P F D Y I G F G E N G S G G G G D S I
961  ttctcgccaactctgtgcagtactccgacttcaacggcctggcgagaaatcctggcag
      F L A N S V Q Y S D F N G P G E K S W Q
1021 gctcgtacgacctgaacatggcctcctacggcgttccggcctgactttcatggttcgt
      A R Y D L N M A S Y G V P G L T F M V R
1081 tacatcaatggttaaggacatcgacggcaccaaggctcgactccagttcctcctcctcgc
      Y I N G K D I D G T K V D S S S S F S A
1141 ctgtacggcgaggacggcaagcaccgaaaccaacctggaagcacaatacgtcgtcca
      L Y G E D G K H P E P N L E A K Y V V H
1201 gtccggtccggccaaggacctgctgctccgcacccggcctggcaccgtgccaacgc
      V R S G Q G P V V P H P P G L A P C Q R
1261 cgaccaggtgaagtcgtccagaacgagttccgcctgatcgtcgactatccgctgctcgat
      R P G -
1321 cctataatcgaccga
  
```

Figura 4.34 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína OprD de la cepa C. En rojo se han marcado los cambios de aminoácidos, mientras que en sombreado gris se han marcado los cambios de nucleótidos (únicamente aquellos que resultan en un cambio de aminoácido), respecto a la cepa de referencia PAO1. En amarillo se ha marcado la inserción responsable de cambio de pauta de lectura.

Todos los cambios de aminoácidos de las cepas P1, P3, P4, P18, y C respecto a la cepa de referencia PAO1, se resumen en la figura siguiente (figura 4.35).

		L1	
PAO1	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLRNYFNRDGKSGSGD	61
P1	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLRNYFNRDGKSGSGD	
P4	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLRNYFNRDGKSGSGD	
PC	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLRNYFNRDGKSGSGD	
P3	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLRNYFNRDGKSGSRD	
P18	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLRNYFNRDGKSGSGD	
		L2	
PAO1	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLG	LKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS	121
P1	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLG	LKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS	
P4	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLG	LKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS	
PC	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLG	LKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS	
P3	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLG	LKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS	
P18	RVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLG	LKLDGTSDKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS	
		L2	
		L3	
PAO1	RAGGAV KVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQ	LSSEFEGLDLEAGHFT	181
P1	RAGGAVKVRISKTMLKWGEVQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQ	LSSEFEGLDLEAGHFT	
P4	RAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQ	LSSEFEGLDLEAGHFT	
PC	RAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQ	LSSEFEGLDLEAGHFT	
P3	RAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQ	LSSEFEGLDLEAGHFT	
P18	RAGGAVKVRISKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQ	LSSEFEGLDLEAGHFT	

	L3	L4	
PAO1	EGKEPTTVKSR GEELYATYAGETAKSADFIGGRYAITDNLS SASLYGAELEDIYRQYYLNSN		241
P1	EGK OGTTPT SRGELYATYAGETAKSADFIGGRYAITDNLSASLYGAELEDIYRQYYLNSN		
P4	EGK OGTT KSRGELYATYAGETAKSADFA GGRYAITDNLSASLYGAE LKDIYRQYYLNTN		
PC	EGK OGTT KSRGELYATYAGETAKSADFA GGRYAITDNLSASLYGAE LKDIYRQYYLNTN		
P3	EGK OGTT KSRGELYATYAGETAKSADFA GGRYAITDNLSASLYGAE LKDIYRQYYLNTN		
P18	EGK OGTT KSRGELYATYAGETAKSADFA GGRYAITDNLSASLYGAE LKDIYRQYYLNTN		
	L5		
PAO1	YTIPLASDQSLGDFDFNIY RTNDEGKAKAGDISN TTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGDQ		301
P1	YTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGDQ		
P4	YTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNT AWSLAGAYTLDAHTFTLAYQ KVHGDE		
PC	YTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNT AWSLAGAYTLDAHTFTLAYQ KVHGDE		
P3	YTIPLA ED QSLGDFDFNIYRTNDEG SK AGDISNTT-----		
P18	YTIPLASDQSLGDFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNT A -----		
	L6	L7	
PAO1	PFDYIGFGRNGSGAGG DSIFLANSVQYSDFN GPGEKSWQARYDLN LASYGV PGLTFMVRY		361
P1	PFDYIGF GN SGGGGDSIFLANSVQYSDFN GPGEKSWQARYDLN LASYGV PGLTFMVRY		
P4	PFDYIGF GN SGGGGDSIFLANSVQYSDFN GPGEKSWQARYDLN MASYGV PGLTFMVRY		
PC	PFDYIGF GN SGGGGDSIFLANSVQYSDFN GPGEKSWQARYDLN MASYGV PGLTFMVRY		
P3	-----		
P18	-----		
	L7	L8	
PAO1	INGKDIDGTKMSDNNVGYK NYGY GEDGKH HE TNLEAKYVVQSGPAKDL SFRIRQAW HRAN		421
P1	INGKDIDGTKMSDNNVGYK NYGYGEDGKH HETNLEAKYVVQSGPAKDL SFRIRQAW HRAN		
P4	INGKDIDG TK-V DSSSS FAGL -YGEDGKH HETNLEAKYVVQ SGPAKDL SFRIRQAW HRAN		
PC	INGKDIDG TK-V DSSSS FSAL -YGEDGKH HE TNLEAKYVV HVRSGQGPVVPHP PGL APCO		
P3	-----		
P18	-----		
	L8		
PAO1	ADQEGEQNE FRLIVDYPLSIL	443	
P1	ADQ A EGEQNEFRLIVDYPLSIL		
P4	AD E EGEQNEFRLIVDYPLSIL		
PC	RRPG -----		
P3	-----		
P18	-----		

Figura 4.35 Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína OprD de las cepas P1, P3, P4, P18 y C con la cepa de referencia PAO1. En amarillo se indica el reemplazo de un fragmento de aminoácidos, mientras que en verde se han indicado otros cambios de aminoácido y, en azul, se indica la terminación prematura de la traducción. Las localizaciones de los *loops* L1 a L8 se han marcado con líneas negras.

Al amplificar el gen *oprD* mediante la técnica de la PCR, se observó que todas las cepas presentaban un amplificado que se corresponde con el tamaño esperado del gen de la OprD (1586 pb), excepto A y A', que presentaban tamaños muy superiores (aproximadamente 3000pb en el caso de A y 2000pb para A'), sugiriendo la presencia de largos insertos en el interior de *oprD* (figura 4.36).

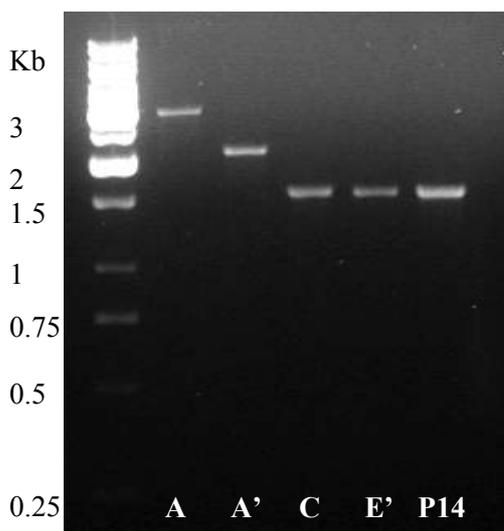


Figura 4.36 Gel de agarosa que muestra los amplificadores obtenidos tras la PCR realizada con los *primers* OprDSEQF1 y OprDSEQR1. En la parte inferior se han indicado las cepas a las que pertenecen los diversos amplificadores.

El análisis de las secuencias de A y A' demostró que, efectivamente, estas dos cepas presentaban largos insertos dentro del gen, concretamente ambas cepas presentan el mismo inserto de 1300pb aproximadamente, al que hemos denominado ISPa13. Éste es un nuevo elemento genético móvil, clasificado como secuencia de inserción o IS, ya que presenta las características propias de un elemento IS. Estos elementos se caracterizan por estar flanqueados por repeticiones invertidas imperfectas, y suelen presentar pautas de lectura abiertas que generalmente codifican para funciones involucradas con la movilidad del propio elemento insercional, como un enzima, por ejemplo una transposasa, que reconoce las repeticiones imperfectas y procesa los extremos; este enzima suele estar codificado por una o dos ORFs, y su secuencia ocupa, normalmente, la totalidad del inserto.

El elemento ISPa13 presenta dos pautas de lectura abierta. La primera pauta de lectura, cuando se traduce, tiene gran homología con una transposasa de un elementote inserción, IS3/IS911, de *Shewanella baltica*; aunque en nuestro caso la proteína, presenta un aminoácido menos en la zona N-terminal, así como la inserción de un par de aminoácidos en las posiciones D65 y A66, tanto en la cepa A como en la cepa A' (figura 4.37).

Los miembros de la familia de IS3 se caracterizan por longitudesdeentre 1200 y 1550 bp, y por repeticiones invertidas de 20-40pb en sus extremos que, aunque son variables, presentan la estructura 5'-TG-----CA-3'; generalmente, estos elementos presentan dos pautas de lectura consecutivas y parcialmente solapadas. Sin embargo, muchos miembros presentan una organización que no se corresponde con la organización general de la familia IS3 [157]. Debido a que ISPa13, cumple casi todos los requisitos requeridos para pertenecer a la familia IS3, pensamos que efectivamente podría pertenecer a ella, aunque las dos pautas de lectura que presenta no están solapadas.

```

Sb      MSLKKS HKSY PQA FKA EAV L MVLE QGYS VADA AKSLGV STSL LYNWKEK      49
A       -MTKK T RRRYSDFKAEAVNMV RGE GY AISEAAR L DIDRSL L DRWCRO
A'      -MTKK T RRRYSDFKAEAVNMV RGE GY AISEAAR L DIDRSL L DRWCRO

Sb      HQALQQGITLESERD--ELKRLRKENKELRMEKEILKKASAFFAREMK      98
A       QRDREDGVTDDQADERDAEIKKLRREVRKLRTEKEVLKKATAFFARESS
A'      QRDREDGVTDDQADERDAEIKKLRREVRKLRTEKEVLKKATAFFARESS

```

Figura 4.37 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la transposasa de *S. baltica* (Sb) y las del elemento ISPa13 localizado en el gen *oprD* de las cepas A y A'. En verde se han marcado las diferencias en la secuencia de aminoácidos. Los guiones indican la ausencia de aminoácidos.

La otra pauta de lectura presenta elevada homología con una parte de una integrasa de *Nitrosomonas europaea*, en concreto, únicamente se alinea con los primeros 187 aminoácidos de ésta (la proteína homóloga consta de trescientos aminoácidos), aunque su similitud no es muy elevada, como puede observarse en la figura 4.38. La presencia de múltiples mutaciones y un codón stop prematuro, podrían ser los responsables de que el resto de secuencia no se alinee con la proteína de *N. europaea*.

```

Ne      MCGVFREGVAVRYARIEQLRQHHA VAA MCRILDVSESGYHAWRQRPPSAR      50
A       -----M DVS S G F Y A W R Q R E P D E Q
A'      -----M DVS S G F Y A W R Q R E P D E Q

Ne      QQENLRLETEVKA AHQRTRETYGPRRLRSD LADHGIQTS LYRIKRIRRKL      100
A       RQ---CLHREVKDIHDQKRGSYGSRRMAKELRRRGHAVGRYQARSLMQEA
A'      RQ---CLHREVKDIHDQKRGSYGSRRMAKELRRRGHAVGRYQARSLMQEA

Ne      GLRCKQKRKFKATDTSRHALPLAPNLLDRQFTVAAPDRAWVSDITYVATD      150
A       GVA CRQRRRYRHTTDS DHGLP VAPNLLKRQFTVPEPNQAWRRHHCHLDLG
A'      GVA CRQRRRYRHTTDS DHGLP VAPNLLKRQFTVPEPNQAWRRHHCHLDLG

Ne      EGWLYLAGIKDLFNGELVGYAMSERMTTSLV SQALFRAVA AKRPARGLIH      200
A       R-LVVPGGRAGPLRPTGHRLAMADHMKTSLTLTP-----
A'      R-LVVPGGRAGPLRPTGHRLAMADHMKTSLTLTP-----

Ne      HSDRGSQYCAHAYRKQLQQFGMQASMSRKGNCWDNAPMESFWGSLKNELV      250
A       -----
A'      -----

Ne      HHRRTTRTQARQEITEYIEIFYNRIRKQARLG YLSPAQFTQKYHAKQIAA      300
A       -----
A'      -----

```

Figura 4.38 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la integrasa de *N. europaea* (Ne) y las del elemento ISPa13 localizado en el gen *oprD* de las cepas A y A'. En verde se han marcado las diferencias en la secuencia de aminoácidos. Los guiones indican la ausencia de aminoácidos.

En el resto del inserto no se puede leer ninguna otra pauta de lectura que sea consistente con una posible proteína.

A modo de ejemplo, la figura 4.39 muestra la secuencia del elemento ISPa13 localizado en el gen *oprD* de la cepa A (como ya se ha comentado, el de la cepa A', es el mismo, con algunas diferencia en la secuencia de aminoácidos).

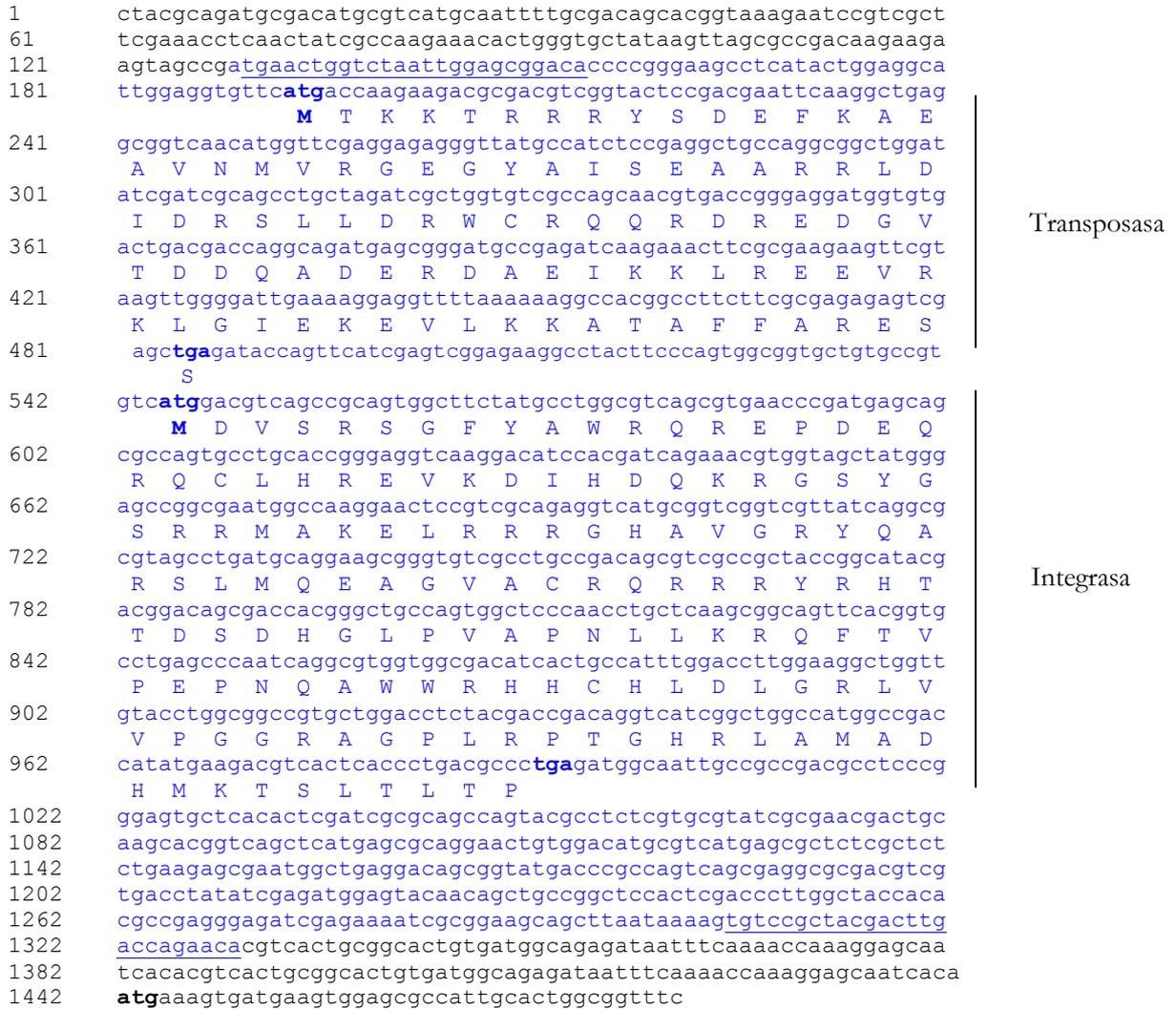


Figura 4.39 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del elemento ISPa13 localizado en el gen *oprD* de la cepa A (en azul). En color negro se ha indicado la secuencia correspondiente a *OprD*. Las 25pb subrayadas en los extremos 5' y 3' de ISPa13 representan las posibles repeticiones invertidas imperfectas, que caracterizan a estos elementos.

La diferencia más importante entre las dos ISs es la zona en la que se han insertado. En A el inserto se ha situado en la zona del promotor del gen de la *OprD*, delante del ATG inicial, cosa que hace que, a pesar de su inserción, *oprD* esté íntegro, y por tanto, también lo debería estar la proteína; es por ello que no es de extrañar que en la electroforesis de proteínas de membrana externa de la cepa A, la *OprD* esté presente (figura 4.33).

Debido a esto, la cepa A es una cepa sensible al imipenem, ya que la presencia de OprD permite el paso del antibiótico al interior celular. Esto se confirma al observar la secuencia de *oprD*, ya que las mutaciones presentes él, no són mutaciones que esten implicadas en la biogénesis de la proteína (figura 4.40). Hasta ahora, la presencia de estos elementos únicamente se había descrito en cepas resistentes, donde producían una inactivación de la transcripción del gen *oprD*. En nuestro caso la presencia del inserto parece no afectar la transcripción génica.

```

1      ctacgcagatgcgacatgctgcaatggtgacagcagcggtaagaatccgctcgct
61     tcgaaacctcaactatcgccaagaacactgggtgctataagttagcgcgacaagaaga
121    agtagccgatgaactggtctaatggagcgggacaccccggaagcctcatactggaggca
181    ttggaggtgttcatgaccaagaagcgcgacgtcggtaactccgacgaattcaaggctgag
241    gcggtcaacatggttcgaggagaggggttatgccatctccgaggctgccaggcggctggat
301    atcgatcgcagcctgctagatcgtggtgctgccagcaacgtgaccgggaggatggtgtg
361    actgacgaccaggcagatgagcgggatgcccagatcaagaacttcgcgaagaagtctgt
441    aagttggggattgaaaaggaggttttaaaaaaggccacggccttctcgcgagagagtcg
481    agctgagataaccagttcatcgagtcggagaaggcctacttcccagtgggggtgctgtgcc
542    gtgtcatggacgtcagccgagtggttctatgcctggcgtcagcgtgaacccgatgagca
602    gcgccagtgctgcaccgggaggtcaaggacatccacgatcagaacgtggtagctatgg
662    gagccggcgaatggccaaggaactccgtcgcagaggtcatgcccgtcggtcgttatcaggc
722    gcgtagcctgatgcaggaagcgggtgctgcctgccagcagcgtgccgctaccggcatac
782    gacgacagcagaccacgggctgcccagtggtgctcccaacctgctcaagcggcagttcacgt
842    gctgagcccaatcaggcgtggtggcgacatcactgccatttggacctggaaggctggt
902    tgtacctggcggccgtgctggacctctacgaccgacaggtcatcggtggccatggccga
962    ccatatgaagacgtcactcaccctgacgcccctgagatggcaattgccgcccagcctccc
1022   gggagtgctcactcgcagcagcagcagcagcctctcgtgctatcgcgaacgactg
1082   caagcagcgtcagctcatgagcgcaggaactgtggacatgctgctatgagcgtctcgcctc
1142   tctgaagagcgaatggctgaggacagcgggtatgaccgcccagtcagcagggcgcgacgtc
1202   gtgacctatcgcagatggagtcaacagctgcccgtccactcgcacctggttaccac
1262   acgcccagggagatcgagaaaatcgcggaagcagcttaataaaagtgtccgctacgactt
1322   gaccagaaca cgtcactgcccactgtgatggcagagataatttcaaaaccaaaggagca
1382   atcacaatgaaagtgatgaagtggagcgcattgactggcgggttcccgaggtagcact
      M K V M K W S A I A L A V S A G S T

1442   cagttcgccgtggccgacgcattcgtcagcagatcaggccgaagcgaaggggttcacgaa
      Q F A V A D A F V S D Q A E A K G F I E
1502   gacagcagcctcgacctgctgctccgcaactactatgttcaaccgtgacggcaagagcggc
      D S S L D L L L R N Y Y F N R D G K S G
1622   agcggggaccgctcgcactggacccaaggcttccctcaccacatgaatccggctcacc
      S G D R V D W T Q G F L T T Y E S G F T
1682   caaggcaccgtgggttcggcgtcagatgccttcggctacctcggcctgaagctcgcagcgc
      Q G T V G F G V D A F G Y L G L K L D G
1742   acctcggacaagaagggtaccggcaacctgcccgtgatgaacgacggcaagcccgctgac
      T S D K S G T G N L P V M N D G T P R D
1802   gactacagccgcgcccgtggcgcgctgaaggtacgcacatctccaagaccatggtgaagtgg
      D Y S R A G G A V K V R I S K T M L K W
1862   ggcgagatgcagccgaccgctccggtcttcgcccgtggcggcagccgctggtcccgcag
      G E M Q P T A P V F A A G G S R L F P Q
1922   accgcgaccggcttccaactgcagagcagcgaactcgaagggctcagatctcgaagcaggc
      T A T G F Q L Q S S E L E G L D L E A G
1982   cacttcaccgaaggcaagcagggcaccaccaccaagtcgcccggcgaactctacgcaacc
      H F T E G K Q G T T T K S R G E L Y A T
2042   tatgcaggcagaccgccaagagcgcgatttccattgggggcccgtacgcaatcaccgat
      Y A G E T A K S A D F I G G R Y A I T D
2102   aaactcagcgcctccctgtacggtgctgaactcgaagacatctatcagtcagttaccctg
      N L S A S L Y G A E L E D I Y R Q Y Y L
2162   aacagcaactacaccatcccactggcatccgaccaatcgctgggcttcgatttcaacatc
      N S N Y T I P L A S D Q S L G F D F N I

```

```

2222   tacgcacaaaacgatgaaggcaaggccaaggccggcgacatcagcaacaccacttgggcc
      Y R T N D E G K A K A G D I S N T T W S
2282   ctggcgccagcctacactctggatgcgcacactttcaccttggcctaccagaaggtccat
      L A A A Y T L D A H T F T L A Y Q K V H
2342   ggcgatcagccgtttgattatatcggttcggcgagaaacgggttccggcgccggcggtgac
      G D Q P F D Y I G F G E N G S G G G G D
2402   tcgattttcctcgccaactccgtccagtactccgacttcaacggccctggcgagaaatcc
      S I F L A N S V Q Y S D F N G P G E K S
2462   tggcaggcccgctacgacctgaacctgcctcctatggcggttcccgccctgactttcatg
      W Q A R Y D L N L A S Y G V P G L T F M
2522   gtccgctatatcaatggcaaggacatcgatggcaccagaatgtctgacaacaacgtcggc
      V R Y I N G K D I D G T K M S D N N V G
2582   tataagaactacggctacggcgaggacggcaagcaccacgagaccaacctggaagccaag
      Y K N Y G Y G E D G K H H E T N L E A K
2642   tacgtggtccagtcgggtccggccaaggacctgtcgttccgcatccgaggcctggcac
      Y V V Q S G P A K D L S F R I R Q A W H
2702   cgcgccaacgcccagaccaggccgaaggccaccagaacgagttccctcctgtacgtcgtctat
      R A N A D Q A E G H Q N E F L L Y V V Y
2762   ccgctgtcgatcctgtaacgcaccgacaggcaacgaaaaaacccggcatcgccgggtttt
      P L S I L -
2822   ttcttcttggcggaacgcgcctataaagg

```

Figura 4.40 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína OprD de la cepa A (en negro). El color azul muestra el elemento ISPa13. En rojo se han marcado los cambios de aminoácidos, y en sombreado gris se han marcado los cambios de nucleótidos, respecto a la cepa de referencia PA01, que resultan en un cambio de aminoácido. Las 25pb subrayadas representan las posibles repeticiones invertidas imperfectas de ISPa13.

La cepa A', sin embargo, presenta únicamente una parte del gen de la OprD, ya que el inserto está situado en la zona que correspondería a los cuatro primeros *loops* de la proteína (figura 4.41), concretamente la interrupción del gen se produce hasta el nucleótido 232, en el que empieza la proteína. Esto concuerda con el perfil de resistencia, pero no con el de proteínas de la membrana externa en geles de poliacrilamida (figura 4.33). El hecho de no presentar parte del gen, nos hace pensar que la biogénesis de la proteína queda afectada y, por tanto, ésta no debería estar presente en la membrana externa, por lo que la célula presentaría resistencia al imipenem. La cepa A' es una cepa resistente a este carbapenem, pero cuando analizamos las proteínas de su membrana externa, observamos OprD en ella.

Una posible explicación a esto, podría ser la existencia de una segunda copia del gen en otra parte del genoma que no presentase mutaciones que afectasen a la síntesis de OprD. Esto queda descartado ya que, en la reacción de PCR, únicamente se observa un amplificado, que corresponde al del gen que presenta el inserto. Actualmente se están analizando otras posibles explicaciones a este hecho.

```

1      ctacgcagatgcgacatgCGTcATGCAATTTTgCGACAGCAGCGTAAAGAATCCGTCGCT
61     tcgaaacctcaactatcgccaagaaacactgggtgctataagttagcgccgacaagaaga
121    actagccgttgaactgggtctaattggagcgggacaccccggttaagcctcatactggaggca
181    ttggaggtgttcATGACCAAGAAGACGCGAGCTCGGTACTCCGACGAATCAAGGCTGAG
241    gCGGTCAACATGGTTCGAGGAGGGTtatGCCATctccgaggctgCCAGGCGGCTGGAT
301    atCGATCGCAGCCTgctagatCGctGGTgTCGCCAGCAACGTgaccgggaggatggTgTg
361    actgacgaccaggcagatgagcgggatGCCGAGATcaagaaacttcCGGAAGAAGTtCGT
421    aagttgCGgattgaaaaggaggttttaaaaaaggccacggccttcttcCGGAGAGAGTcg
481    agctgagataaccagttcatCGAGTcGGAGAAGGcctacttcccagtgggcggtgctgTgCC
541    gtgTcATGGAGctcagccgagtggttctatgCctggcgtcagcgtgaaccCGatgagc
601    agcgccagtgCctgcaccgggaggtcaaggacatccacgATcagaaactggTgagctatg
661    ggagccggcgaatggccaaggaactccgTcgcagaggTcatgCGctCGgtcgTtatcagg
721    cgctgagcctgATgCAGgaagcgggtgTcgcctGCCgacagcgtcgcCGctaccggcATA
781    cgacggacagcGaccacgggctGCCagTggctcccaacctgctcaagcggcagttcaccgg
841    tgcctgagcccaatcaggcgtggTggcgacatcactGCCatttggaccttggaaGGctgg
901    ttgtacctggcggcCGTgctggacctctacgaccgacaggTcatCGgtggccatggccg
961    accatATgaagcgtcactcaccctgacgcCctgagatggcaattgCCgCCgacgcctcc
1021   cgggagTgctcactcGatcgcgCagccagTAcgCctctcGTgctATcCGaaCGact
1081   gcaagcagGgtcagctcATgagcgcaggaactgtggacatgCGtcatgagcGctctcGct
1141   ctctgaagagcgaatggctgaggacagcggTatgaccCGcagtcagcGaggcgcGcagct
1201   cgtgacctatATcGagatggagtacaacagctcCGgctccactCGacccttggctacca
1261   cagcCGgagggagatCGagaaaatCGCGgaagcagcttaataaaagtgtCCgctacgact
1321   tgaccagaacactatcgtcagTattacctgaacagcaactacccatcccactggcatcc
      Y R Q Y Y L N S N Y T I P L A S
1381   gaccaatcGctgggcttCGattcaacatctaccgcacaaacgatgaaggcaaggccaag
      D Q S L G F D F N I Y R T N D E G K A K
1441   gccggcgacatcagcaacaccacttggTccctggcggcagcctacactctggatgCGcAC
      A G D I S N T T W S L A A A Y T L D A H
1501   actttcaccttggcctaccagaaggtccatggcGatcagccgTttgattatATcggcttc
      T F T L A Y Q K V H G D Q P F D Y I G F
1561   ggCGgaaacggttccggcggcggcggtgactcGatTTTcctCGcaactccgTgCagTAc
      G E N G S G G G G D S I F L A N S V Q Y
1621   tccgacttcaacggccccggcGagaaatcctggcaggcccgctacgacctgaacctCGcc
      S D F N G P G E K S W Q A R Y D L N L A
1681   tcctatggcGttccggcctgactttcATggtccGctatataatggcaaggacatCGat
      S Y G V P G L T F M V R Y I N G K D I D
1921   ggcaccaagatgtctgacaacaacgtcggctacaagaactacggctacggcGagggacggc
      G T K M S D N N V G Y K N Y G Y G E D G
1981   aagcaccacgagaccaacctcgaagccaagTAcgtggTccagTccggTccggccaaggac
      K H H E T N L E A K Y V V Q S G P A K D
2041   ctgTcGttccGcatccGccagGcctggcaccGcGccaacGccgaccaggcCGaagGcGac
      L S F R I R Q A W H R A N A D Q A E G D
2101   cagaacgagTtccGcctgATcGtCGactatccGctgTcGatcctgtaatcGaccGacagG
      Q N E F R L I V D Y P L S I L -
2161   caacgaaaaaacccggcATcGcCGggtTTTTtcttcttggcggcaacGcGcctataaagg

```

Figura 4.41 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína OprD de la cepa A' (en negro). El color azul muestra el elemento ISPa13. En rojo se han marcado los cambios de aminoácidos, y en sombreado gris se han marcado los cambios de nucleótidos, respecto a la cepa de referencia PAO1, que resultan en un cambio de aminoácido. Las 25pb subrayadas representan las posibles repeticiones invertidas imperfectas de ISPa13.

En la siguiente figura (figura 4.42) se muestra el alineamiento de la OprD de las cepas A y A' con la cepa de referencia PAO1, en el cual se puede observar que la proteína OprD de la cepa A' empieza en el último aminoácido del *loop* 4, por lo que no sería posible que ésta proteína llegase a la membrana.

		<u>L1</u>	
PAO1	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	<u>LLLRNYFNRD</u> <u>GKSGSGD</u>	61
A	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLD	LLLRNYFNRD	
A'	-----		
		<u>L2</u>	
PAO1	RVDWTQGFLLTYESGFTQGTVGFGVDAFGYL	<u>GLKLDGTS</u> <u>DKTGTGNLPVMNDGKPRDDYS</u>	121
A	RVDWTQGFLLTYESGFTQGTVGFGVDAFGYL	GLKLDGTS	
A'	-----		
		<u>L2</u>	<u>L3</u>
PAO1	<u>RAGGAV</u> KVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGS	<u>SRLFPQTATGFQL</u> <u>QSSEFEGLDLEAGHFT</u>	181
A	RAGGAVKVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGS	SRLFPQTATGFQL	
A'	-----		
		<u>L3</u>	<u>L4</u>
PAO1	<u>EGKEPTTVKSR</u> GELYATYAGETAKSADFIGGRYAITDNL	<u>SASLYGAELEDI</u> <u>YRQYYLNSN</u>	241
A	EGK	PTTVKSRGELYATYAGETAKSADFIGGRYAITDNL	
A'	-----		
		<u>L5</u>	
PAO1	YTIPLASDQSLGDFDFNIY	<u>RTNDEGKAKAGDIS</u> <u>NTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGDQ</u>	301
A	YTIPLASDQSLGDFDFNIY	RTNDEGKAKAGDIS	
A'	-----		
		<u>L6</u>	<u>L7</u>
PAO1	<u>PFDYIGFGR</u> <u>NGSGAGGDS</u> I FLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGV	<u>PGLTFM</u> <u>VRY</u>	361
A	PFDYIGFGR	NGSGAGGDS	
A'	-----		
		<u>L7</u>	<u>L8</u>
PAO1	<u>INGKDIDG</u> <u>TKMSDNNVGYK</u> <u>NYGYGEDGKH</u> <u>HE</u> TNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRAN		421
A	INGKDIDG	TKMSDNNVGYK	
A'	-----		
		<u>L8</u>	
PAO1	<u>ADQEGDQ</u> <u>NE</u> FRLIVDYPLSIL	443	
A	ADQ	EGHQNE	
A'	-----		

Figura 4.42 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína OprD de de las cepas A y A', con la cepa de referencia PAO1. En verde indican los cambios de aminoácidos. Las barras horizontales indican la posición de los *loops*. Los guiones indican la ausencia de aminoácidos.

Como se puede observar a partir del alineamiento, las diferencias respecto la cepa de referencia PAO1 son escasas tanto en A, como en la parte presente de A'.

Las secuencias de inserción bacterianas fueron identificadas inicialmente durante estudios genéticos por su capacidad de generar mutaciones como resultado de su translocación. El interés en el estudio de la resistencia bacteriana a los antibióticos reveló un importante papel de estos elementos móviles tanto en la adquisición, como en la diseminación de genes con funciones “acesorias”, como permitir la resistencia a diversos antibióticos de los microorganismos que los presentan, aunque no debemos olvidar que las ISs están implicadas también, en otras funciones. Muchas ISs, forman parte del cromosoma de la mayoría de las especies bacterianas participando en reorganizaciones cromosómicas e integración de plásmidos. Además, en ciertos casos, la localización de diferentes elementos IS específicos en lugares definidos del cromosoma es suficientemente estable como para utilizar estas ISs como marcadores para tipar especies y para estudios epidemiológicos, en algunas especies como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spp.*, o *Vibrio cholerae*.

La presencia de largos insertos o ISs en *oprD* ya ha sido descrita por Lister *et al.* en cepas de *Pseudomonas spp.* [⁸⁶]; también se ha descrito en otros genes de esta especie [¹⁵⁸], así como en otras porinas de otras especies, por ejemplo *Klebsiella pneumoniae* [¹⁵⁹]. En todos estos casos la inserción estaba relacionada directamente con la resistencia a los antimicrobianos, poniendo de manifiesto la contribución de estos insertos en el aumento de las resistencias.

En el caso de *oprD*, Lister *et al.*, describieron una inactivación insercional de la expresión de este gen, cosa que provocaba, evidentemente una pérdida de la porina en la membrana de las cepas; en el caso de la cepa A también sería lógica esta pérdida, aunque por la inactivación insercional del gen, sino porque la inserción de ISPa13 ha provocado la pérdida de aproximadamente la mitad de la proteína. Esta es la primera vez que se describe que una IS provoca pérdida de una parte de *oprD*. En el caso de A' la inserción, o bien no provoca una disminución de la expresión, o bien esta disminución no es suficiente, ya que esta cepa sí presenta OprD en sus membranas; en todo caso estamos delante de una inserción que no afectaría a la resistencia a los carbapenems. Esto podría ser debido a que en el caso de A' el inserto se no se encuentra dentro de *oprD*, sino justo antes, mientras que en el caso de la cepas de Lister, éste siempre disrumpe el gen. La presencia de estos elementos de inserción en cepas sensibles al imipenem no se había descrito hasta el momento.

4.8 CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO ESTRUCTURAL DE LA PORINA OprD

A falta de un modelo de la proteína basado en la cristalización, que todavía hoy no se ha conseguido, nos propusimos realizar una aproximación a la estructura tridimensional de la proteína, mediante la utilización de un programa informático.

Los métodos de predicción estructural de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos son, actualmente, objeto de gran interés. Datos experimentales han demostrado que la información necesaria para plegamiento de una proteína se encuentra contenido en su propia secuencia; los científicos llaman a este hecho “la segunda parte del código genético”. Se podría pensar que la conformación espacial que adopta una proteína corresponde a un mínimo de la energía libre del espacio, de las conformaciones posibles. Esta idea permitiría que, mediante métodos teóricos de minimización de energía, se pudiese calcular la estructura que adopta cualquier secuencia de aminoácidos.

En la práctica hay numerosas configuraciones posibles para una determinada secuencia y se utilizan programas que deducen la conformación a partir de diferentes conjuntos de datos, como la modelización por homología o *threading*, que consiste en trabajar a partir de estructuras de proteínas ya conocidas y que sean homólogas a la que se estudia; algoritmos cinéticos, que realizan estudios estadísticos para predecir elementos de estructura secundaria con una optimización de tipo cinético, o modelizaciones *de novo* si se conocen algunas características de estructura y se dispone de datos adicionales de baja resolución como la membrana externa.

Dado que disponíamos de la secuencia de la proteína OprD de *P. aeruginosa*, nos planteamos realizar una aproximación a la estructura de la proteína. Se trabajó con una modelización a partir de su secuencia.

Para la construcción de un modelo tridimensional de la proteína, se utilizó el programa *Modeller* (versión 9v2). Este programa realiza una extrapolación de una estructura de la nueva proteína a partir de las estructuras ya conocidas de otros miembros que pertenezcan a la misma familia.

En nuestro caso la OprD de *P. aeruginosa* fue comparada con la proteína 2mpr de *Salmonella typhimurium* [160], que es una maltoporina de la familia de LamB, que aunque es la proteína con la que más similitud comparte, no presentan entre ellas elevada homología.

El objetivo de la modelización “teórica” realizada a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína, no es el de confirmar una estructura obtenida a través de técnicas de alta resolución sino la de sugerir, es decir, la de aportar información sobre la distribución en el espacio de diferentes aminoácidos.

Una vez establecido un modelo preliminar de la estructura de la proteína, se realizó un refinamiento del modelo, con el objetivo de corregir las transiciones entre los *loops* y las regiones adyacentes utilizando una minimización de energía. Con un proceso de minimización se construyó una nueva conformación de las regiones de solapamiento de los *loops*. El resto de la estructura fue fijada. Finalmente, se fijaron los átomos de la cadena principal de la proteína y se realizó una minimización de los residuos de las cadenas laterales. Esto cambió ligeramente las posiciones de las cadenas laterales en función de los residuos vecinos.

Las figuras 4.43 y 4.44 nos muestran el modelo tridimensional de la proteína obtenida siguiendo esta metodología.

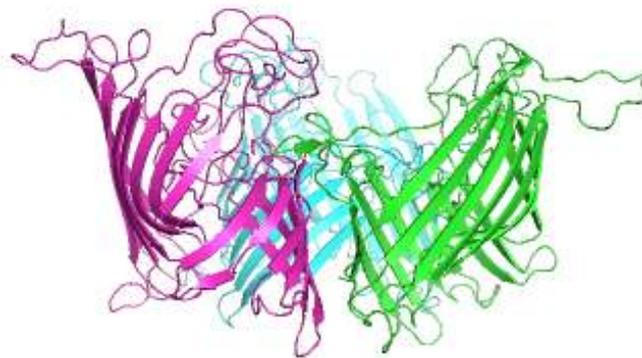
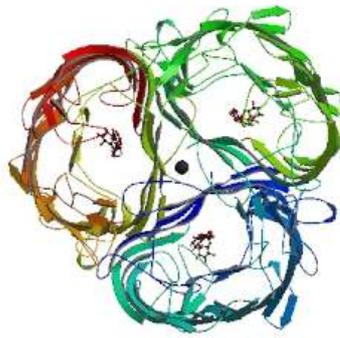
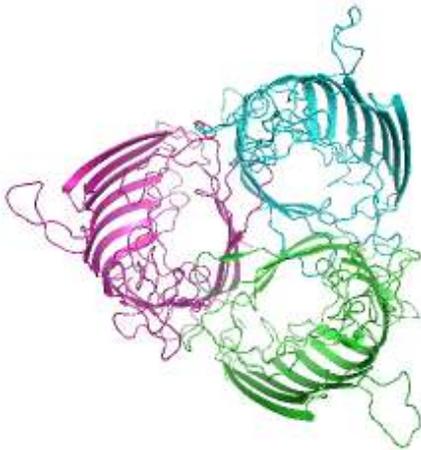


Figura 4.43 Topología de la proteína OprD visualizada mediante el interpretador de imágenes *Python* contenido en el programa *Pymol*. Vista del trímero desde la bicapa. Cada monómero que forma parte de la proteína se muestra en un color diferente.

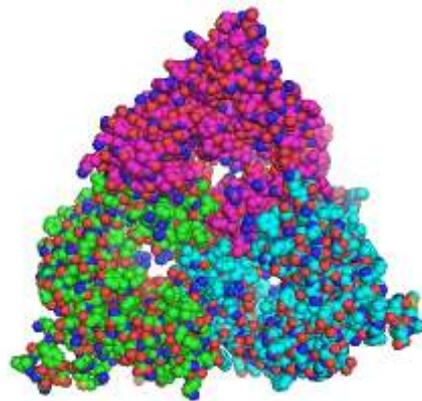


(a)

Figura 4.44 Topología de la proteína OprD y 2mpr, visualizadas mediante el interpretador de imágenes *Python* contenido en el programa *Pymol*. Cada uno de los monómeros que forman parte de las proteínas se muestra en un color diferente. Vista del trímero desde el exterior (perpendicular al plano de la membrana) de 2mpr (a) y de OprD (b). Vista, también desde el exterior del trímero, donde se observa la apertura “real” de cada uno de los poros que forman los monómeros de la proteína (c).



(b)



(c)

Como se puede observar en el modelo esta proteína pertenece al grupo de “porinas clásicas”, constituidas por tres monómeros que forman un trímero que se inserta en la membrana. Cada uno de los monómeros forma un canal lleno de agua por donde se permite el paso de ciertas sustancias. También se puede observar la estructura en forma de barril que presenta cada uno de los monómeros. Este modelo confirma las predicciones que, hasta el momento, se han realizado sobre la estructura de la porina OprD.

Actualmente se está trabajando en la optimización de este modelo estructural y en la determinación de la relación entre la situación espacial de los diversos *loops* y su función, tanto en el paso de sustancias, como en la resistencia al imipenem.

5. CONCLUSIONES

1. Las cepas clínicas son más resistentes a los antibióticos que las cepas ambientales, debido a la fuerte presión que existe en el entorno hospitalario, y que favorece a las cepas que desarrollan mecanismos para evadir la acción de diferentes antimicrobianos. Estas diferencias en la susceptibilidad sugieren, además, cierto grado de aislamiento ecológico entre las dos poblaciones, ya que las cepas clínicas se encontrarían en un hábitat, que presenta una elevada presión selectiva por parte de los antibióticos y desinfectantes, y en cambio las cepas ambientales estarían en otro hábitat separado donde esta presión no existe.
2. Técnicas que miden la variabilidad fenotípica y genotípica como las proteínas totales (PT), proteínas de membrana externa (OMPs), la electroforesis de campo pulsante (PFGE) y la amplificación de polimorfismos de DNA al azar (RAPD) utilizando el *primer* 208, confirman la distancia entre los aislados de los dos orígenes.
3. El conjunto de los resultados nos sugiere que la población de *P. aeruginosa* en nuestro entorno (Hospital de Bellvitge y alrededores), podría ser una población clonal epidémica, en la cual todas las cepas provienen de una población ambiental muy diversa, y de la que un clon ha emergido para dar lugar a la población clínica que, una vez establecida, vuelve a diversificarse.
4. La ausencia/presencia de la proteína OprD en la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*, no explica totalmente los patrones de resistencia/susceptibilidad observados en las cepas investigadas.
5. La existencia de cepas sensibles al imipenem que no presentan OprD en sus membranas externas, sugiere la presencia de otro mecanismo secundario de entrada del imipenem a las células, independiente de OprD.
6. A falta de un modelo estructural basado en la cristalización, nuestro modelo tridimensional de la proteína OprD confirma las predicciones, anteriormente realizadas, de la estructura del heterómero del que está constituido esta porina.

6. BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ **Migula W.** Ueber ein neues System der Bakterien. Arb. Bakteriol. Inst. Technisch. Hochsch. Karlsruhe 1895; 1:235–238.
- ² **Palleroni NJ.** Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads. *In:* E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (Eds.) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, DC. 1992; 105–115.
- ³ **Schroth M, Hildebrand DC, Panopoulos N.** Phytopathogenic pseudomonads and plant-associated pseudomonads. *In:* A. Balows, H G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (Ed.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York. 1992; 3:3104–3131
- ⁴ **De Vos P, Landschoot AV, Segers P, Tytgat R, Gillis M, Bauwens M, Rossau R, Goor M, Pot B, Kersters K, Lizzaraga P, De Ley J.** Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxy-ribonucleic acid: Ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1989; 9:35–49.
- ⁵ **Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M.** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1973; 23:333–339.
- ⁶ **Woese CR., Weisburg WG, Hahn CM, Paster BJ, Zablén LB, Lewis BJ, Macke TJ, Ludwig W, Stackebrandt E.** The phylogeny of purple bacteria: The gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol* 1985; 6:25– 33.
- ⁷ **Brenner DJ, Staley JT, Krieg NR.** Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. *In:* D. R. Boone, R. W. Castenholz, G. M. Garrity (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York. 2001;1:27–31.
- ⁸ **Palleroni NJ.** *Pseudomonas*. *In:* D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York 2005; 2:323–379.
- ⁹ **Meyer JM, Geoffroy VA, Baïda N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, Achouak W, Palleroni NJ.** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol* 2002; 68:2745–2753.
- ¹⁰ **Palleroni NJ.** Genus I. *Pseudomonas*. *In:* N. R. Kreig, J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MA. 1984 pp. 141–199.
- ¹¹ **Morrison AJ Jr, Wenzel RP.** Epidemiology infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1984; 6 (Suppl. 3): S627-S642.
- ¹² **Fisher MC, Goldsmith JF, Gilligan PH.** Sneakers as a source of *Pseudomonas aeruginosa* in children with osteomyelitis following puncture wounds. *J Pediatr* 1985; 106:607-609.
- ¹³ **Holland SP, Pulido JS, Shires TK, Costerton JW.** *Pseudomonas aeruginosa* ocular infections. *Pseudomonas aeruginosa: the opportunist*. *In:* R. B. Fick, Jr. (Eds.) CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1993 pp.159-176
- ¹⁴ **Pollack M.** *Pseudomonas aeruginosa*. *In:* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*; 2000 pp. 1980-2003.
- ¹⁵ **Mayhall CG.** Nosocomial pneumonia: diagnosis and prevention. *Infect Dis Clin. North Am* 1997; 11: 427-457.

- ¹⁶ **May TB, Hinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK.** Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: A key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol.* 1991; 4:191–206.
- ¹⁷ **Gessard C.** Classics in infectious diseases: On the blue and green coloration that appears on bandages. *Rev. Infect. Dis.* 1984; Suppl. 3:S775–S776.
- ¹⁸ **Torres A, Aznar R, Gatell JM, Jimenez P, Gonzalez J, Ferrer A, Celis R, Rodriguez-Roisin R.** Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 142:523–528.
- ¹⁹ **Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, and Gaynes RP.** Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med* 1999; 27: 887-892
- ²⁰ **Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP.** Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann. Int. Med.* 1990; 113:227–242
- ²¹ **Brewer CS, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV Jr.** Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 1996; 9:1019–1029.
- ²² **Hoiby N, Johansen HK, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A.** *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microb. Infect* 2001; 3:23–35.
- ²³ **Rajan S, Saiman L.** Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin. Respir. Infect.* 2002; 17:47–56.
- ²⁴ **Hamood AN, Colmer-Hamood JA, Carty NL.** Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A synthesis. In: J.-L. Ramos (Ed.) *Pseudomonas*, Volume 1: Genomics, Lifestyle and Molecular Architecture. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. 2004; pp. 389–423.
- ²⁵ **Engel JE.** Molecular pathogenesis of acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: A. R. Hauser and J. Rello (Eds.) *Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa*. Kluwer Academic Publishers. Boston, MA 2003; pp. 201–229.
- ²⁶ **Morihara K, Homma JY.** *Pseudomonas* proteases. In: A. Holder (Ed.) *Bacterial Enzymes and Virulence*. CRC Press. Boca Raton, FL 1985; pp. 41-79.
- ²⁷ **Shibuya Y, Yamamoto T, Morimoto T, Nishino N, Kambara T, Okabe H.** *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1077:316–324.
- ²⁸ **Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, Sawa T, Frank DW, Wiener-Kronish JP.** Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.* 2001; 183:1767–1774.
- ²⁹ **Pukatzki S, Kessin RH, Mekalanos JJ.** The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99:3159–3164.
- ³⁰ **Kulich SM, Yahr TL, Mende-Mueller LM, Barbieri JT, Frank DW.** Cloning the structural gene for the 49-kDa form of exoenzyme S (exoS) from *Pseudomonas aeruginosa* strain 388. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:10431–10437.

- ³¹ **Yahr TL, Goranson J, Frank DW.** Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Molec. Microbiol.* 1996; 22:991–1003.
- ³² **Finck-Barbancon V, Goranson J, Zhu L, Sawa T, Wiener-Kronish JP, Fleiszig SMJ, Wu C, Mende-Mueller L, Frank DW.** ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Molec. Microbiol.* 1997; 25:547–557.
- ³³ **Vallis AJ, Yahr TL, Barbieri JT, Frank DW.** Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect. Immun.* 1999; 67:914–920.
- ³⁴ **Maynard-Smith J, Smith NH, O' Rourke M, Spratt BG.** How clonal are bacteria?. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4384-4388.
- ³⁵ **Kiewitz C, Tümler B.** Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol* 2000; 182:3125-3135.
- ³⁶ **Denamur E, Picard B, Decoux G, Denis JB, Elion J.** The absence of correlation between allozyme and *rrn* RFLP analysis indicates a high gene flow rate within human clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *FEMS Microbiology Letters* 1993; 110:275-280.
- ³⁷ **Picard B, Denamur E, Barakat A, Elion J, Goulet P.** Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment polymorphism of the ribosomal RNA gene region. *J Med Microbiol* 1994; 40: 313-322.
- ³⁸ **Feil EJ, Holmes EC, Bessen DE, Chan MS, Enright MC.** Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:182-187.
- ³⁹ **Ripp S, Ogunseitian OA, Miller RW.** Transduction of a freshwater microbial community by a new *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage, UT1. *Mol Ecol* 1994; 3: 121-126.
- ⁴⁰ **Ruimy R, Genauzeau E, Barnabe C, Beaulieu A, Tibayrenc M, Andreumont A.** Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteraemia, and environmental water. *Infect Immun* 2001; 69:584-588
- ⁴¹ **Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Vanderkelen A, Zizi M, Ghysels B, Cornelis P.** *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol* 2002; 4: 898-911.
- ⁴² **Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P.** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 2000; 37: 239-253.
- ⁴³ **Molloy MP, Herbert BR, Slade MB, Rabilloud T, Nouwens AS, Williams KL, Gooley AA.** Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membranes. *Eur Journal Biochem* 2000; 265: 2871-2881.
- ⁴⁴ **Mulford CA, Osborn MJ.** An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1159-1163.
- ⁴⁵ **Benz R.** Permeation of hydrophobic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1197:167-196.

-
- ⁴⁶ **Osborn MJ, Wu HCP.** Proteins of the outer membranes of Gram negative bacteria. Annual Reviews Microbiol 1980; 34: 396-422.
- ⁴⁷ **Nikaido H.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol and Molec Biol Reviews 2003; 67: 593-656.
- ⁴⁸ **Nikaido H, Hancock R.** Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*. In: The bacteria: A treatise on structure and function, ed. JR Sokatch. 1986 pp. 145-193.
- ⁴⁹ **Bellido F, Martin NL, Siehnel RJ, Hancock R.** Reevaluation, using extract cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. J Bacteriol 1992; 174: 5196-5203.
- ⁵⁰ **Nikaido H, Nikaido T, Harayama S.** Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 1991; 266: 770-779.
- ⁵¹ **Achouak W, Heulin T, Pagès JM.** Multiple facets of bacterial porins. FEMS Microbiol Lett 2000; 199: 1-7.
- ⁵² **Schulz GE.** The structure of general porins. In: Bacterial and eukaryotic porins: structure, functions, mechanisms. Ed. By Roland Benz, Wiley- UCH. 2004.
- ⁵³ **Hancock REW.** Model membrane studies of porin function. A M. Inouye (ed.) Bacterial outer membranes as model systems. John Wiley and Sons, Inc. 1987 pp. 187-225.
- ⁵⁴ **Benz R.** Uptake of solutes through bacterial outer membranes. A Bacterial cell wall. J.M. Guhyusen, R. Hakenbeck, editor. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 1994. pp. 397-423.
- ⁵⁵ **Benz R.** Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. Biochim Biophys Acta. 1994; 1197: 167-196.
- ⁵⁶ **Saier MH Jr.** Families of proteins forming transmembrane channels. J Membr Biol 2000; 175 (3): 165-180.
- ⁵⁷ **Schulz GE.** The structures of general porins. In: Bacterial and eukaryotic porins, ed. Benz R. 2004 pp. 25-40.
- ⁵⁸ **Benz R, Orlik F.** Functional reconstitution of specific porins. In: Bacterial and eukaryotic porins, ed. Benz R. 2004 pp. 183-212.
- ⁵⁹ **Koronakis V.** Channel-tunnels. Curr Opin Struct Biol 2001; 11(4):403-7.
- ⁶⁰ **Koronakis V.** TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. FEBS Letters 2003; 555: 66-71.
- ⁶¹ **Nikaido H, Saier MH Jr.** Transport proteins in bacteria: common themes in their design. Science 1992; 258: 936-942.
- ⁶² **Nabedryk E, Garavito RM, Breton J.** The orientation of beta-sheets in porin. A polarized Fourier transforms infrared spectroscopic investigation. Biophys J 1988; 53:671-676.
- ⁶³ **Schulz GE.** The structure of bacterial outer membrane proteins. Biochim Biophys Acta 2002; 1565: 308-317.

- ⁶⁴ **Stover KC, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, et al.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa*: an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406:959-964.
- ⁶⁵ **Rawling EG, Brinkman FS, Hancock REW.** Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J Bacteriol* 1998; 180:3556-62.
- ⁶⁶ **Brinkman FS, Bains M, Hancock REW.** The amino terminus of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model. *J Bacteriol* 2000; 182:5251-5255.
- ⁶⁷ **Sugawara E, Steiert M, Rouhani S, Nikaido H.** Secondary structure of the outer membrane proteins OmpA of *Escherichia coli* and OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1996; 178: 6067-6069.
- ⁶⁸ **Hancock REW, Brinkman FSL.** Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56:17-38.
- ⁶⁹ **Poole K.** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4:500-508.
- ⁷⁰ **Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S.** Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 1993; 175: 7363-7372.
- ⁷¹ **Aires JR, Köhler T, Nikaido H, Plesiat P.** Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2624-2628.
- ⁷² **Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechere JC.** Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997; 23: 345-354.
- ⁷³ **Ochs MM, McCuster MP, Bains M, Hancock REW.** Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1085-1090.
- ⁷⁴ **Trias J, Nikaido H.** Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* 1990; 265: 15680-15684.
- ⁷⁵ **Quinn JP, Darzins A, Miyashiro D, Ripp S, Miller RV.** Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: mapping of the OprD2 gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 753-755.
- ⁷⁶ **Trias J, Nikaido H.** Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* 1990; 265: 15680-15684.
- ⁷⁷ **Trias J, Nikaido H.** Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenem and penem through outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 52-57.
- ⁷⁸ **Huang H, Jeanteur D, Pattus F, Hancock REW.** Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol Microbiol* 1995; 16(5): 931-941.
- ⁷⁹ **Ochs MM, Bains M, Hancock REW.** Role of putative Loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(7): 1983-1985.

- ⁸⁰ **Epp SF, Köhler T, Plésiat P, Michéa-Hamzehpour M, Frey J, Pechère JC.** C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(6): 1780-1787.
- ⁸¹ **Huang H, Hancock REW.** The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1996; 178(11): 3085-3090.
- ⁸² **Pirnay JP, De Vol D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P, Zizi M.** Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* 2002; 4:872-882.
- ⁸³ **Lynch MJ, Drusano GL, Mobley HLT.** Emergence of resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1892-1896.
- ⁸⁴ **Yoneyama H, Nakae T.** Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2385-2390.
- ⁸⁵ **Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC.** Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997; 23: 345-354.
- ⁸⁶ **Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD.** Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 137-143.
- ⁸⁷ **Amin NE, Giske CG, Jalal S, Keijsjer B, Kronvall G, Wretling B.** Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS* 2005; 113 (3): 187-196.
- ⁸⁸ **Fung-Tomc JC, Gradelski E, Kolek B, Minassian B, Pucci M, Kessler RE, Bonner DP.** Activity of carbapenem BMS-181139 against *Pseudomonas aeruginosa* is not dependent on porin D2. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 386-393.
- ⁸⁹ **Perez FJ, Gimeno C, Navarro D, Garcia-de-Lomas J.** Meropenem permeation through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* can involve pathways other than the OprD porin channel. *Chemother* 1996; 42: 210-214.
- ⁹⁰ **Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Epp SF, Pechère JC.** Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:424-427.
- ⁹¹ **Hall RM, Collis CM.** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989; 3: 1669-1683.
- ⁹² **Hansson K, Sundstrom L, Pelletier A, Roy PH.** IntI2 integron integrase in *Tn7*. *J Bacteriol* 2002; 184: 1712-1721.
- ⁹³ **Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM.** Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 1997; 26: 731-745.
- ⁹⁴ **Collins CM, Hall RM.** Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 155-162.

- ⁹⁵ **Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, Jones ME.** Many class I integrones comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 686-689.
- ⁹⁶ **Collins CM, Hall RM.** Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 1992; 174: 1574-1585.
- ⁹⁷ **Sandvang D, Diggle M, Platt DJ.** Translocation of integron-associated resistance in a natural system: acquisition of resistance determinants by Inc P and Inc W plasmids from *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Microb Drug Resist* 2002; 8: 151-160.
- ⁹⁸ **Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D.** Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1657-1669.
- ⁹⁹ **Recchia GD, Hall RM.** Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiol* 1995; 141: 3015-3027.
- ¹⁰⁰ **Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J.** A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 1998; 280: 605-608.
- ¹⁰¹ **Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VS, Verhoef J, Jones ME.** Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 1998;42(6):689-96.
- ¹⁰² **Cantón R, Coque TM, Baquero F.** Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:315-325.
- ¹⁰³ **Fluit AC, Schmitz FJ.** Resistance integrons and super-integrons *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 272-288.
- ¹⁰⁴ **King A, Phillips I.** The identification of *Pseudomonas* and related bacteria in a clinical laboratory. *J Med Microbiol* 1978; 11: 165-76.
- ¹⁰⁵ **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th ed., vol. 20. Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA 2000.
- ¹⁰⁶ **Puig M, Fusté C, Viñas M.** Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* 1993; 39:108-111.
- ¹⁰⁷ **Sanchez-Planas L, Viñas M.** Non-typable *Haemophilus influenzae* from a single hospital: epidemiological markers. *Microbios* 1998; 93:55-69
- ¹⁰⁸ **Laemmli, UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- ¹⁰⁹ **Ames GF, Spudich EN, Nikaido H.** Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J Bacteriol* 1974; 117:406-416.
- ¹¹⁰ **Sneath, Sokal.** Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco; 1973 pp 230-234.
- ¹¹¹ **Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD.** Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *In: Persing DH, editors. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*; 1993 pp. 563-571

- 112 **Schwartz DC, Cantor CR.** Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37(1):67-75.
- 113 **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-2239.
- 114 **Mahenthalingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP.** Random Amplified Polymorphic DNA Typing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1129-1135.
- 115 **Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski' JA, Tingey SV.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18 (22): 6531-35.
- 116 **Williams JGK, Reiter RS, Young RM, Scolnik PA.** Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucleic Acids Research* 1993; 21 (11): 2697-2702.
- 117 **Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala JF.** Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1335-1339.
- 118 **Sneath PH, Sokal RR.** Numerical Taxonomy, ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 1973 pp 230-234.
- 119 **Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH.** PCR mapping of Integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-191.
- 120 **Feliciello I, Chinali G.** A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal.Biochem* 1993; 212: 394-401.
- 121 **Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ.** A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal.Biochem* 1995; 226: 235-240.
- 122 **Yoneyama H, Yoshihara E, Nakae T.** Nucleotide sequence of the protein D2 gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1791-1793.
- 123 **Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1993.
- 124 **Stephen AF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-3402.
- 125 **Higgins DG, Sharp PM.** CLUSTAL: a Package for Performing Multiple Sequence Alignment in a Microcomputer. *Gene* 1988; 73: 237-244.
- 126 **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
- 127 **Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, Pieper U, Sali A.** Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* 2000; JohnWiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30.

- ¹²⁸ **DeLano WL.** The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific 2002; Palo Alto, CA, USA.
- ¹²⁹ **Schulz G.** Porins: general to specific, native to engineered passive pores. *Current Opinion in Structural Biology* 1996; 6: 485-490.
- ¹³⁰ **Nikaido H.** Transport across the outer membrane. *J Bioenergetics and Biomembranes* 1993; 25(6): 581-589.
- ¹³¹ **Livermore DM.** β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol* 1995; 8: 557-584.
- ¹³² **Poole K.** Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3: 255-264.
- ¹³³ **Livermore DM.** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Antimicrob Resist* 2002; 34:634-640.
- ¹³⁴ **Quin JP, Dudek EJ, DiVincenzo CA, Lucks Da, Lerner SA.** Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 1986; 154: 289-294.
- ¹³⁵ **Lynch MJ, Drusano GL, Mobley HLT.** Emergence of resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1892-1896.
- ¹³⁶ **Fufuda H, Hosaka M, Lyobe S, Gotoh N, Nishino T, Hirai K.** nfxC-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 790-792.
- ¹³⁷ **Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC.** Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997; 23: 345-354.
- ¹³⁸ **The International *Pseudomonas aeruginosa* Typing Study Group.** A multicenter comparison of methods for typing strains of predominantly from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1994; 169:134-142.
- ¹³⁹ **Daza RM.** Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 1998. 22.
- ¹⁴⁰ **Williamson JS, Wyandt CM.** Microbial resistance: the plague of tomorrow. Department of Medical Chemistry and the Department of Pharmaceutics. Research Institute of Pharmaceutical Sciences and The National Center for the Development of Natural Products School of Pharmacy. University of Mississippi.
- ¹⁴¹ **Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH.** PCR mapping of integrons reveals several novel operons of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:185-191.
- ¹⁴² **Boehr DD, Moore IF, Wright GD.** Aminoglycoside Resistance Mechanisms. *In*: D. G. White, M. N. Alekshun and P. F. McDermott (Eds.). *Frontiers in Antimicrobial Resistance*. ASM Press. Washington, DC. 2005; 85-99.
- ¹⁴³ **Wright GD.** Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2:499-503

- ¹⁴⁴ **Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J.** Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(6):1568-1574.
- ¹⁴⁵ **Shaw KJ, Rather PN, Hare R. S, Miller GH.** Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57 (1): 138-163.
- ¹⁴⁶ **Cameron FH, Groot Obbink DJ, Ackerman VP, Hall RM.** Nucleotide sequence of the AAD (2nd) aminoglycoside adenyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucleic Acids Research* 1986; 14: 8625–8635.
- ¹⁴⁷ **Partridge SR, Brown HJ, Hall RM.** Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1288–1294.
- ¹⁴⁸ **Wohlleben W, Arnold W, Bissonnette L, Pelletier A, Tanguay A, Roy PH, Gamboa GC, Barry GF, Aubert E, Davies J, Kagan SA.** On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (*aacC1*) for gentamicin acetyltransferase-3-I(AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol Gen Genet* 1989; 217(2-3): 202-208.
- ¹⁴⁹ **Llanes C, Neuwirth C, El Garch F, Hocquet D, Plésiat P.** Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 β -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(3): 270-278.
- ¹⁵⁰ **Bissonette L, Roy PH.** Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* Plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram negative bacteria. *J Bacteriol* 1992; 174(4): 1248-1257.
- ¹⁵¹ **Guerra B, Soto SM, Argüelles JM, Mendoza MC.** Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a Class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i-]. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1305–1308.
- ¹⁵² **Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tümmler B.** Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* 2004; 186(2):518-34.
- ¹⁵³ **Ramos JL, Martinez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Teran W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos MT, Brennan R, Tobes R.** The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 326-356.
- ¹⁵⁴ **Kisker C, Hinrichs W, Tovar K, Hillen W, Saenger W.** The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg²⁺ reveals mechanism of antibiotic resistance. *J Mol Biol* 1995; 247: 260-280.
- ¹⁵⁵ **Haines AS, Jones K, Batt SM, Kosheleva IA, Thomas CM.** Sequence of plasmid pBS228 and reconstruction of the IncP-1alpha phylogeny. *Plasmid* 2007; 58(1):76-83.
- ¹⁵⁶ **Rosser SJ, Young HK.** Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44(1):11-8.
- ¹⁵⁷ **Mahillon J, Chandler M.** Insertion Sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(3):725-74.
- ¹⁵⁸ **Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Hoiby N.** Constitutive high expresión of chromosomal β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3406-3411.

¹⁵⁹ **Hernandez-Alles S, Benedi Vj, Martinez-Martinez L, Pascual A, Aguilar A, Tomas JM, Alberti S.** development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:937-939.

¹⁶⁰ **Meyer JE, Hofnung M, Schulz GE.** Structure of maltoporin from *Salmonella typhimurium* ligated with a nitrophenyl-maltotrioxide. *J Mol Biol* 1997; 266: 761-775.