

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Detección de la β -lactamasa de espectro extendido OXA-141 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística

Maribel González-Villa^{a,b}, Rosa María Ribas-Aparicio^a, Rafael Coria-Jiménez^b, Jenny Elizabeth Donis-Rocandio^a y Gerardo Aparicio-Ozores^{a,*}

^a Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

^b Servicio de Microbiología y Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud (SSA), México D.F., México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 29 de julio de 2011

Aceptado el 1 de enero de 2012

On-line el 25 de febrero de 2012

Palabras clave:

Pseudomonas aeruginosa

Fibrosis quística

Resistencia a antibióticos

β -lactamasa OXA

R E S U M E N

Introducción: Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), investigar la ubicación de los genes que codifican para esas enzimas y determinar la relación clonal de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a la ceftazidima aisladas de pacientes mexicanos con fibrosis quística.

Metodología: Se determinó el perfil de resistencia a 11 antibióticos (CLSI) y la detección fenotípica de las BLEE siguiendo un método de difusión en discos de papel filtro adaptado para *P. aeruginosa*. La caracterización de los genes de las BLEE y de integrones se realizó por PCR y secuenciación del ADN, mientras que el análisis de la relación clonal se realizó por PFGE.

Resultados: De las 148 cepas en estudio, 22 resultaron resistentes a la ceftazidima y el análisis por PCR y secuenciación reveló la presencia del gen *bla*_{OXA-141} en 7 cepas, 6 resistentes y una sensible a la ceftazidima. Asimismo, *bla*_{GES} se detectó en 11 cepas. Los genes *int12* e *int13* no se detectaron por PCR, pero en las 6 cepas resistentes a la ceftazidima se descubrió el gen *bla*_{OXA-141} en un integrón de la clase 1. El análisis de la relación clonal de los aislamientos mostró que la mayoría de los pacientes se infectaron a lo largo del periodo de estudio con cepas de *P. aeruginosa* que presentaron patrones diferentes, principalmente en los individuos que no tenían relación familiar.

Conclusiones: Este trabajo demuestra la existencia del gen *bla*_{OXA-141} asociado a un integrón de clase 1 en varias cepas de *P. aeruginosa*, así como de genes *bla*_{GES} cuya localización y variante están en estudio en el grupo de investigación. Lo anterior, aunado a la diversidad de cepas capaces de infectar a individuos sensibles, sugiere un riesgo de dispersión de las cepas de *P. aeruginosa* productoras de BLEE entre la población mexicana que padece fibrosis quística

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Detection of extended spectrum β -lactamase OXA-141 in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis

A B S T R A C T

Introduction: The aims of this research were to study the presence of extended spectrum β -lactamases (ESBL) to investigate the location of the genes encoding these enzymes, and determine the clonal relationship of strains of ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Mexican patients with cystic fibrosis.

Methods: We determined the resistance profile to 11 antibiotics (CLSI) and phenotypic ESBL detection following a disk diffusion method adapted for *P. aeruginosa*. Characterization of ESBL genes and integrons was performed by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing, while analysis of the clonal relationship was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa

Cystic fibrosis

Antibiotic resistance

β -lactamase OXA

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gaparico@ipn.mx (G. Aparicio-Ozores).

Results: Of the 148 strains studied, 22 were resistant to ceftazidime, and analysis by PCR and sequencing revealed the presence of the gene *bla*_{OXA-141} in 7 strains, 6 of which were resistant and one, susceptible to ceftazidime. In addition, *bla*_{GES} was detected in 11 strains. *int12* and *int13* genes were not detected by PCR, but in the 6 ceftazidime-resistant strains, the *bla*_{OXA-141} gene was determined in a class 1 integron. Analysis of the clonal relationship of isolates showed that the majority of patients were infected during the study period with *P. aeruginosa* strains that exhibit different patterns, especially in individuals without a familial relationship.

Conclusions: This report demonstrates the existence of the *bla*_{OXA-141} gene associated with a class 1 integron in several strains of *P. aeruginosa*, as well as *bla*_{GES} genes, and their location and variants are being studied by our research group. This, combined with the diversity of strains able to infect several susceptible individuals, suggests the risk of spread of *P. aeruginosa*-strain ESBL producers among Mexican populations with cystic fibrosis.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista causante de infecciones con altos índices de morbilidad y mortalidad en huéspedes inmunocomprometidos y pacientes con fibrosis quística. La prevalencia de la bacteria en el tracto respiratorio de los pacientes con fibrosis quística es elevada, debido a la rápida adaptación fisiológica y genética del microorganismo al medio ambiente del huésped, por lo que requieren una mayor atención médica, así como el uso obligado de antibióticos¹. El tratamiento continuo con antibióticos β-lactámicos y aminoglucósidos es importante para evitar el deterioro pulmonar en estos pacientes, pero actúa como un mecanismo de selección de cepas capaces de resistir a la acción de los antimicrobianos².

P. aeruginosa presenta diversos mecanismos de resistencia hacia los agentes terapéuticos, y los principales son la producción de β-lactamasas, la presencia de bombas de expresión activa y la pérdida o la disminución de la expresión de la porina OprD³, lo que en conjunto contribuye a la selección de cepas multirresistentes a los antibióticos⁴. Los genes que codifican para la síntesis de las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) pueden estar localizados a nivel cromosomal, o bien en algún elemento genético como plásmidos conjugativos, transposones, integrones e islas de patogenicidad, facilitando así su rápida diseminación. En este sentido, los integrones participan de manera determinante en la acumulación y la diseminación de los genes de resistencia⁵.

La adquisición de genes que codifican para la síntesis de BLEE permite a las bacterias contar con uno de los mecanismos principales de resistencia hacia las cefalosporinas de tercera y cuarta generación e incluso a monobactams. Estas enzimas son variadas y con muchos tipos, debido a mutaciones en respuesta a la alta presión del uso de antibióticos⁶. En las bacterias gramnegativas se han detectado múltiples tipos de BLEE con más de 800 variedades; en cepas clínicas de *P. aeruginosa* se han determinado los tipos TEM, SHV, CTX-M, GES, VEB, PER y OXA⁷, y actualmente suman unas 120 variedades⁸. Tanto OXA-2 (con 6 derivadas) como OXA-10 (con 10 derivadas) se consideran los prototipos con características de BLEE del tipo OXA que se han podido detectar en cepas clínicas⁹. Actualmente se continúan incorporando resultados que muestran nuevas variantes de las BLEE del tipo OXA en cepas de *P. aeruginosa*, como la OXA-161 referida por Juan et al. en 2009¹⁰, la cual confiere resistencia a la ceftazidima. Sin embargo en otras enzimas, como la OXA-141, se puede consultar la secuencia nucleotídica que está depositada en la base de datos provista por Jacoby en la web de nomenclatura de β-lactamasas [<http://www.lahey.org/studies/>], pero no contamos con publicaciones que proporcionen información adicional. De igual forma, en México no contamos con estudios que detecten la presencia de BLEE en aislados de *P. aeruginosa* de origen clínico.

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la presencia de BLEE en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a la ceftazidima,

investigar la ubicación de los genes que codifican para esas enzimas y determinar la relación clonal entre las cepas aisladas de pacientes mexicanos con fibrosis quística.

Métodos

Material biológico

Se estudiaron 148 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría del Distrito Federal, México, a partir de aspirados bronquiales de 76 pacientes que presentaban fibrosis quística, durante 2000 y 2001¹¹. La colección de cepas se ha mantenido en tubos con caldo soya tripticaséina y glicerol al 15% a -70 °C.

La cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se utilizó para establecer el control de calidad de la prueba de sensibilidad con discos de papel filtro, además de no presentar alguna BLEE. Se empleó una cepa de *Escherichia coli* de origen clínico productora de SHV-5 como control positivo de producción de BLEE (donada por la Dra. Castro-Alarcón, de la Universidad Autónoma de Guerrero, México). La cepa de *P. aeruginosa* 208 de origen clínico fue usada como control positivo de integrón de clase 1 y de BLEE de la variedad OXA-2 (colección de cepas del laboratorio).

Pruebas de sensibilidad

Se evaluó la sensibilidad a 11 antibióticos: aztreonam (ATM), cefepima (FEP), ceftazidima (CAZ), ceftioxima (ZOX), ciprofloxacino (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), netilmicina (NET), norfloxacino (NOR), ofloxacino (OFX) y piperacilina (PIP) (adquiridos de Becton, Dickinson Company, Maryland, EE.UU.) mediante el método de difusión con disco de papel de filtro, siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)¹².

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la ceftazidima (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.), se realizó por el método de diluciones seriadas en agar, siguiendo las recomendaciones y criterios de interpretación de resultados del CLSI¹².

Detección fenotípica de BLEE

Se estableció la presencia de BLEE empleando la prueba de sinergismo de doble disco, ceftazidima 30 µg y amoxicilina-ácido clavulánico 20/10 µg, dispuestos con una separación de 6 mm¹³.

Detección de genes de BLEE mediante PCR

Para realizar la caracterización genética por PCR se usó como molde el ADN genómico obtenido con el producto DNeasy Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany), así como iniciadores específicos para

Tabla 1

Iniciadores empleados para la detección de BLEE y la caracterización de integrones

Gen	Iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>bla_{OXA-10}</i>	OXA-A	GTC TTT CGA GTA CGG CAT TA	699	14
	OXA-B	ATT TTC TTA GCG GCA ACT TAC		
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-A	ATA AAA TTC TTG AAG AC	1.075	14
	TEM-B	TTA CCA ATG CTT AAT CA		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-A	TGG TTA TGC GTT ATA TTC GCC	867	14
	SHV-B	GCT TAG CGT TGC CAG TGC T		
<i>bla_{PER}</i>	PER-A	AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA	933	14
	PER-B	ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC		
<i>bla_{VEB}</i>	VEB-A	CGA CTT CCA TTT CCC GAT GC	642	14
	VEM-B	GGA CTC TGC AAC AAA TAC GC		
<i>bla_{CTX-M-3}</i>	CTX3-A	GGT TAA AAA ATC ACT GCG TC	863	14
	CTX3-B	TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC		
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	CTX9-A	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA	870	14
	CTX9-B	CCC TTC GGC GAT GAT TCT C		
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	CTX2-A	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG	865	14
	CTX2-B	TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC		
<i>bla_{OXA-2}</i>	OXA-F	ATG GCA ATC CGA ATC TTC GCG AT	786	Este estudio
	OXA-R	CGC TTC AAT AGA GCG AAG GAT		
<i>bla_{GES-2}</i>	GES-C	GTT TTG CAA TGT GCT CAA CG	370	15
	GES-D	TGC CAT AGC AAT AGG CGT AG		
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT	892	16
	KPC-R	TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC		
5'-CS	INT5/CSBH	AGC TAG ATC CTT CTA GAA AAC CGA GGA TGC	Variable	17
3'-CS	INT3/CSJY2ER	AGC TAA AAT TGC GAT GCC ATA ACC GAT TAT GAC		
<i>intI2</i>	INT2-F	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	789	18
	INT2-R	GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G		
<i>intI3</i>	INT3-F	GGA ATT CCT GCA TGA ACA GGT ATA ACG G	1.044	19
	INT3-R	CGG GAT CCC GTC AGC CGG GCG ACA AGT GCA		
<i>aac(6)</i>	Aac6-F	CAA CAA TGC CGC AAT AGT TCT	Secuenciar	Este estudio
<i>aac(6)</i>	Avance1F	TCTCATCTGCTTCGCATC	Secuenciar	Este estudio
<i>aac(6)</i>	Avance2R	ACCAACATGGCAGCATCC	Secuenciar	Este estudio

detectar variantes de las BLEE, los cuales fueron previamente reportados por Jiang et al. (2006)¹⁴: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB y OXA; Bradford et al. (2004)¹⁵: KPC-2 (carbapenemasa que puede degradar ceftazidima), y Weldhagen y Prinsloo (2004)¹⁶: GES-2 (tabla 1). Las condiciones de reacción también fueron tomadas de los autores.

Detección y caracterización de los integrones de las clases 1, 2 y 3

Se realizó la detección de integrones en todas las cepas de estudio mediante la técnica de PCR empleando las condiciones de reacción recomendada por Yatsuyanagi et al. (2004)¹⁷ para la clase 1, por Ploy et al. (2000)¹⁸ para la clase 2 y por Collis et al. (2002)¹⁹ para la clase 3 (tabla 1). La caracterización de los integrones se realizó mediante PCR y secuenciación en avanzada, diseñándose iniciadores en cada avance, tomando como molde las secuencias parciales de los amplicones que se obtenían durante este proceso hasta completar la región interna del integrón. El diseño de los iniciadores se llevó a cabo empleando el programa Oligo-Perfect (Invitrogen) (tabla 1).

Purificación, secuenciación y análisis bioinformático de los amplicones

La purificación de los productos de PCR se efectuó con el sistema comercial DNAClean & concentrator-5TM (Zymo Research, Orange, California, EE.UU.). La secuenciación de los amplicones obtenidos se realizó con el sistema de Big Dye Terminator versión 3.1 (Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Foster City, California, EE.UU.) y un secuenciador automático ABIPRISM 3100 (Applied Biosystems). Cada uno de los amplificados fue sometido a un análisis con el programa BLASTn para corroborar la identidad, y posteriormente fueron comparados con el programa ClustalX 2.1.

Identificación de los patrones clonales de las cepas en estudio mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE)

Se siguió el procedimiento operativo estándar para PFGE de *Salmonella*, establecido por el CDC en la página del PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm>), con ligeras modificaciones, utilizando la enzima BcuI (SpeI) (Fermentas, Lituania) y el equipo CHEF Mapper® XA (Bio-Rad). La interpretación de los patrones de restricción obtenidos se realizó con base en los criterios de Tenover et al.^{20,21}.

Resultados

Sensibilidad antimicrobiana y fenotipo BLEE

De las 148 cepas de *P. aeruginosa* incluidas en este estudio, 64 (43,2%) fueron sensibles y 84 (56,8%) fueron resistentes al menos a uno y hasta a 8 de los 11 antibióticos probados, detectándose resistencia principalmente a los antibióticos ceftazidima (52%), ceftazidima (14,9%), piperacilina (10,8%), imipenem (8,8%) y ofloxacino (8,8%). Se observó que las 22 cepas resistentes a la ceftazidima presentaron resistencia a uno y hasta a 7 antibióticos más (tabla 2).

Posteriormente se realizó un análisis de las 22 cepas que resultaron resistentes a la ceftazidima, que fueron recuperadas de 11 pacientes seguidos a lo largo de su tratamiento en el INP. En el paciente 3 se aislaron cinco cepas durante el periodo de atención de su enfermedad. Los valores de la CIM para las cepas fueron de 32–256 µg/ml. En 13/22 (59,1%) de las cepas resistentes a la ceftazidima se observó que la prueba de sinergismo de doble disco en la que se usaron discos de amoxicilina-ácido clavulánico y ceftazidima con una separación de 6 mm, produjo una sinergia discreta (diferente al resultado franco que presenta la enterobacteria utilizada como testigo), lo que sugirió la presencia de BLEE (tabla 2).

Tabla 2Características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística

Paciente	Fecha	Clave de la cepa ^a	Marcadores de resistencia	Fenotipo de BLEE ^b	Genotipo de BLEE ^c	Integrón de la clase 1	Patrones de PFGE ^d
PVJ	12/08/1997	22r	CAZ, IPM, NET, ZOX, PIP	–	OXA-141	+	A
GLG	02/09/1997	25m	CAZ, IPM, NET, ZOX	+	OXA-141	+	A
	20/04/1998	41m	CAZ, IPM, NET, ZOX	+	OXA-141	+	A1
	20/04/1998	41r	CAZ, IPM, NET, ZOX	+	OXA-141, GES	+	A
GLC	04/06/1998	45r	CAZ, NET, ZOX	+	OXA-141, GES	+	A2
	04/06/1998	45m	CAZ, IPM, NET, ZOX	+	–	–	D
	01/03/2000	88r	CAZ, IPM, NET, ZOX	+	GES	–	F
	05/06/2000	102r	CAZ, IPM, NET, ZOX	–	OXA-141, GES	+	H
	04/07/2000	106r	CAZ, ZOX, PIP, ATM, CIP, OFX	+	–	–	D
MYE	14/04/1998	39r	CAZ, ZOX, PIP, ATM, CIP, OFX	+	GES	–	B
TJA	25/06/1999	68r	CAZ, IPM, ZOX, PIP, ATM	–	–	–	C1
	03/08/1999	74m	CAZ, ZOX, PIP, CIP, OFX, NOR	+	GES	–	C
	03/08/1999	74r	CAZ, ZOX, PIP, CIP, OFX, NOR	+	GES	–	C
AGR	25/06/1999	69r	CAZ, ZOX, PIP	–	GES	–	D
	02/05/2000	95m	CAZ, ZOX, PIP, OFX	–	GES	–	D
OCRG	21/07/1999	73r	CAZ, ZOX, PIP, ATM, OFX	+	GES	–	B
	04/04/2000	91m	CAZ, ZOX, PIP, ATM, CIP, OFX, NOR, FEP	–	–	–	G
	04/04/2000	91r	CAZ, ZOX, PIP, ATM, CIP, OFX, NOR	+	–	–	B
HGMJ	24/09/1999	78r	CAZ, IPM, ZOX, PIP, OFX	+	–	–	B
SCE	14/03/2001	132r	CAZ, ZOX, ATM	–	–	–	I
GCP	06/11/1991	27rA	CAZ, IPM	–	GES	–	J
VOA	22/07/1992	84rA	CAZ, ZOX, PIP	–	–	–	K
MVLD	02/07/1999	71r	IPM, ZOX	–	OXA-141	+	E

ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; FEP: cefepima; IPM: imipenem; NET: netilmicina; NOR: norfloxacino; OFX: ofloxacino; PIP: piperacilina; ZOX: ceftizoxima.

^a m: cepa mucóide; r: cepa no mucóide.

^b La prueba de sinergismo resultó discreta.

^c La detección de la β -lactamasa tipo GES se realizó por PCR.

^d Se refiere a electroforesis por campos pulsados.

Identificación genotípica de BLEE

En las 148 cepas en estudio se realizó la búsqueda de los genes más frecuentes que codifican para BLEE en *P. aeruginosa*, empleando los iniciadores indicados en la tabla 1. No se detectó la presencia de BLEE de los tipos TEM, SHV, PER, VEB, CTX-2, CTX-3, CTX-9 y OXA-10. Sin embargo, con los iniciadores dirigidos al gen *bla*_{OXA-2} se detectó la presencia de la BLEE OXA-2 en 7/148 cepas de estudio, las cuales, con excepción de una cepa, resultaron resistentes a la ceftazidima, además de provenientes de 4 pacientes. El análisis de cada una de las secuencias de los 7 amplificados reveló una identidad del 100% con OXA-141, del 99% con las variantes OXA-2, 15, 34, 143 y 144, y del 90% con la variante OXA-3. El alto porcentaje de identidad entre las variantes 15, 34, 141, 143 y 144 con la variante OXA-2 se debe a que son derivadas de esta última. Posteriormente, se corroboró la variante OXA presente en las cepas de estudio mediante alineamientos de las secuencias obtenidas para el gen *bla*_{OXA-2} en este estudio y las secuencias disponibles en el servidor NCBI para las variantes de *bla*_{OXA-(2, 3, 15, 34, 141, 144 y 161)}, códigos de acceso en GenBank: FJ855130, L07945, U63835, AF350424, EF552405, FJ617207, GQ202693, respectivamente. Empleando el programa Chromas Pro 1.5 (Technelysium Pty Ltd.) y ClustalX2.1, encontramos que las siete cepas de *P. aeruginosa* mostraron una BLEE del tipo y variante OXA-141, caracterizada por el cambio nucleotídico de G162S (posición tomada con base en la secuencia de la variante OXA-2) (tabla 2).

Para entender el resultado fenotípico con ausencia de un gen correspondiente en las cepas resistentes a la ceftazidima se realizó la búsqueda de genes menos frecuentes que codifican para β -lactamasas en *P. aeruginosa*, empleando los iniciadores indicados en la tabla 1. No se detectó la presencia de la β -lactamasa del tipo KPC; sin embargo, con los iniciadores dirigidos al gen *bla*_{GES} se detectó un amplicón del tamaño esperado en 11 cepas, incluso en 3 que presentaron también el gen *bla*_{OXA-141} (tabla 2).

Caracterización de los integrones detectados

En ninguna de las 148 cepas se obtuvo una PCR positiva para la detección de los genes *intI2* e *intI3*. Únicamente se logró amplificar el gen de la integrasa de clase 1 (*intI1*) en las 7 cepas que presentan la BLEE del tipo OXA-141 (tabla 2).

En las 6 cepas resistentes a la ceftazidima (22r, 25m, 41m, 41r, 45r y 102r) se obtuvieron amplificadas del mismo tamaño de ~3,5 kb en la región que abarca de la región conservada de la *IntI1* a la región variable 3' que contiene a los casetes de resistencia, mientras que la cepa sensible a la ceftazidima (71r) generó un fragmento de ~1,5 kb (fig. 1). La estructura del integrón clase 1 de la cepa 71r mostró un solo casete, el *aadA7*, que codifica para una 6-adenil transferasa, pero no se ubicó en este el casete que codifica para *bla*_{OXA-141} y *bla*_{GES}. Tomando como molde las secuencias parciales de los integrones detectados, se llevó a cabo el diseño de iniciadores para realizar PCR y secuenciaciones en avanzada, determinando de esta forma la zona variable de los integrones de clase 1 de mayor tamaño. Las regiones variables de todos estos integrones están constituidas por el gen *aac(6'-IIc)*, que se relaciona con la resistencia a aminoglucósidos, seguido río abajo por *aadA1*, que también confiere resistencia a los aminoglucósidos y finalmente *bla*_{OXA-141}, pero en ningún integrón se detectó la presencia del gen *bla*_{GES} (fig. 2).

Caracterización clonal de las cepas resistentes a la ceftazidima

Para establecer la relación epidemiológica de las 22 cepas resistentes a la ceftazidima y con respecto a las 7 cepas que presentan el gen *bla*_{OXA-141}, se realizó un análisis de PFGE. Se detectaron 11 patrones clonales designados de la A-K (fig. 2); además, el análisis de las bandas obtenidas en las cepas con el patrón A permitió detectar dos subtipos, A1 y A2. Encontramos que cepas aisladas de dos hermanos presentaron patrones clonales relacionados, independientemente del fenotipo bacteriano en primer aislamiento

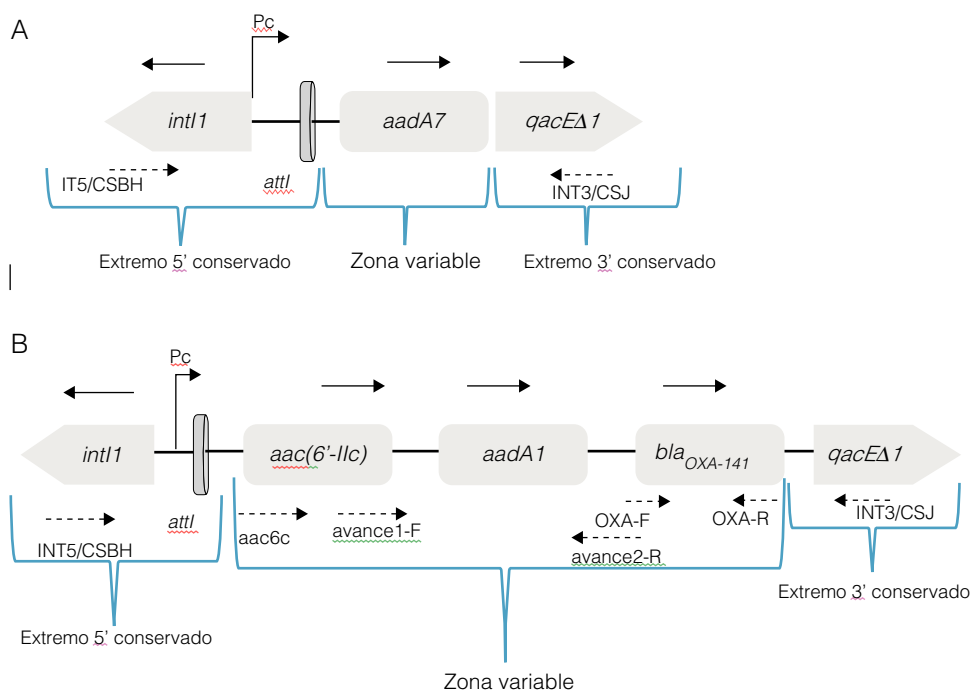


Figura 1. Estructura esquemática (no a escala) de los integrones de clase 1 caracterizados en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística. En A) se representa la organización del integrón de ~1,5 kpb de la cepa 71r de *P. aeruginosa*, que presenta identidad con *intl1* [integradora], *aadA7* (GenBank número de acceso: DQ899757) [resistencia a aminoglucósidos] y *qacΔE1* [gen que codifica la resistencia a las sales cuaternarias de amonio]. En B) se representa el integrón de ~3,5 kpb conservado en las 6 cepas de *P. aeruginosa*, que presentando identidad con *intl1* [integradora], *aac(6'-IIC)* (GenBank número de acceso: AF162771) [resistencia a aminoglucósidos], *aadA1* (GenBank número de acceso: HQ454494) [resistencia a aminoglucósidos], *bla_{OXA-141}* (GenBank número de acceso: EF552405) [β-lactamasa de espectro extendido] y *qacΔE1* [gen que codifica la resistencia a las sales cuaternarias de amonio]. Las flechas completas indican la orientación de la transcripción. Las flechas punteadas muestran los iniciadores empleados.

(mucoide o no mucoide) y de la fecha de aislamiento (cepas 25m, 41m y 41r del paciente GLG y cepa 45r del paciente GLC). También encontramos que una cepa aislada de otro paciente sin relación familiar con los anteriores (cepa 22r del paciente PVJ) mostró el mismo patrón de PFGE. En el caso del paciente GLC se pudo establecer la presencia de 5 clones de *P. aeruginosa* diferentes (A2, D,

F, H y G) durante el tiempo de estudio; además de compartir el tipo clonal D con el paciente AGR, con quien no tiene relación familiar. De igual manera, se observó que algunos pacientes únicamente estuvieron infectados por un solo clon de *P. aeruginosa*, el cual no se presentó en algún otro paciente. La cepa tipo B fue identificada en 3 pacientes sin relación familiar (tabla 2).

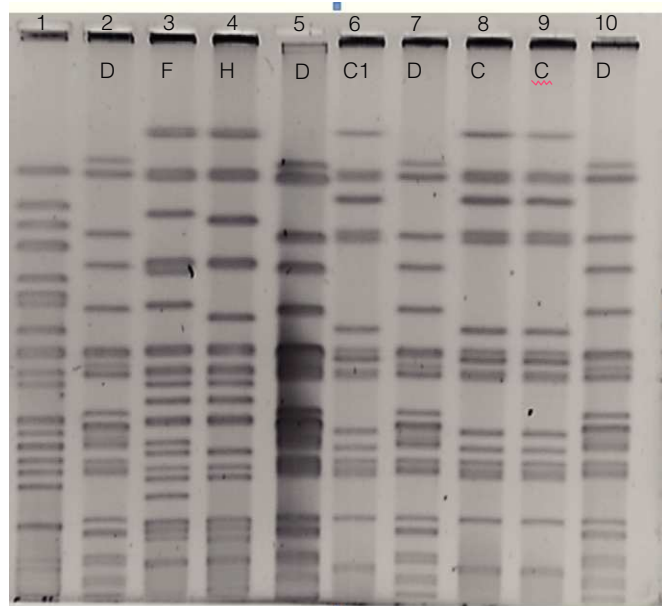


Figura 2. Electroferograma obtenido por PFGE con BclI de 9/23 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística. Carril 1: PAO1; carril 2: 45m; carril 3: 88r; carril 4: 102r; carril 5: 106r; carril 6: 68r; carril 7: 69r; carril 8: 74m; carril 9: 74r; carril 10: 95m.

Discusión

Los pacientes con fibrosis quística presentan exacerbaciones respiratorias, lo que hace necesario un tratamiento con antibióticos para restaurar las funciones básicas de los pulmones y así evitar complicaciones respiratorias. El tratamiento convencional incluye una combinación de antibióticos antipseudomonas, empleando un antibiótico β-lactámico como piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, meropenem, imipenem o aztreonam, así como un aminoglucósido, que puede ser amikacina, gentamicina o tobramicina²². Los pacientes de este estudio recibieron tratamientos a base de ceftazidima, tobramicina, amikacina o combinación de ceftazidima y alguno de los aminoglucósidos, lo que debió favorecer en ellos la selección de cepas resistentes a los β-lactámicos y a los aminoglucósidos. Algunas cepas demostraron resistencia al imipenem, lo que no se debe a una presión selectiva, ya que según los expedientes clínicos y los protocolos establecidos en el nosocomio, los pacientes no recibieron ese carbapenem para su tratamiento. En *P. aeruginosa* un mecanismo común de resistencia a la ceftazidima corresponde a la producción de BLEE y carbapenemasas que actúan contra las cefalosporinas y/o contra los carbapenems²³, lo que ha quedado documentado en reportes de brotes causados por cepas de *P. aeruginosa* que producen BLEE del tipo OXA²⁴.

La detección en las enterobacterias de BLEE por métodos fenotípicos es fácil, pero en el caso de *P. aeruginosa* esto no resulta así, ya que las cepas pueden presentar varios mecanismos alternos de

resistencia, como son la sobreexpresión de la β -lactamasa AmpC y/o de las bombas de expresión activa, lo que puede enmascarar la inhibición realizada por el ácido clavulánico sobre la BLEE²⁵. En este estudio eso pudo suceder, ya que en varias cepas que se demostró la resistencia a la ceftazidima no se obtuvo un resultado positivo en la detección fenotípica de BLEE, pero se logró detectar la presencia de los genes *bla*_{OXA-141} y *bla*_{GES}.

La adquisición de los genes *bla*_{OXA} se ha asociado con elementos genéticos como los integrones de clase 1, transposones y secuencias de inserción²⁶. Este estudio es el primer informe en México de la identificación y caracterización de cepas clínicas de *P. aeruginosa* productoras de la BLEE OXA-141, y se observa una relación directa entre la presencia del gen OXA-141 e integrón de clase 1, hallazgo que concuerda con el de Laudy et al. en 2007 en Polonia [<http://www.lahey.org/studies/>]. Adicionalmente, la organización genética de los 6 integrones resultó ser la misma; este hecho es muy interesante, ya que de los 3 pacientes en los que se detectaron las cepas con integrones, solo 2 fueron convivientes, lo que sugiere que se pudo haber dado un cruce de cepas con el tercer individuo al asistir al hospital a recibir atención médica. Aún no hemos logrado esclarecer la localización del gen *bla*_{OXA-141} detectado en la cepa 71r de nuestro estudio, ya que no se encuentra dentro de la zona variable del integrón de clase 1 hallado, y esto es de gran interés debido a la ausencia de resistencia a β -lactámicos de espectro extendido y no así de carbapenemes. Todas las cepas *bla*_{OXA-141} presentaron resistencia a β -lactámicos y la presencia de los casetes *aac*(6'-II) y *aadA1* y *aadA7*, responsables de la resistencia al aminoglucósido probado, lo que representa un problema terapéutico en nuestra institución, ya que el régimen antimicrobiano para estos pacientes es a base de cefalosporinas de tercera generación en combinación con aminoglucósidos.

De los 76 pacientes incluidos en este proyecto, 4 presentaron siete cepas de *P. aeruginosa* con los genes *bla*_{OXA-141} e integrones de la clase 1. La caracterización genética por PFGE reveló que 5 de las cepas de los pacientes PVJ, GLG y GLC tienen una relación clonal, mientras que el aislamiento del paciente MVLN no presentó relación epidemiológica con ninguna de las cepas en estudio. El paciente GLG presentó 3 aislamientos del patrón A, mientras que su familiar GLC tiene 5 aislamientos pero únicamente uno del tipo A, lo que habla del recambio de cepas que puede darse a lo largo del tiempo en los pacientes con fibrosis quística. En este último se aprecia que el paciente fue infectado con 2 cepas que presentan el mismo integrón de clase 1 y la OXA-141; con todo, el patrón de PFGE de ambas cepas resultó diferente, por lo cual se puede sospechar una transferencia horizontal de información genética intraespecie. En otros pacientes no se detectó la presencia de OXA-141, pero puede participar la β -lactamasa GES detectada, la cual se presentó en cepas de los patrones A, B, C, D, F y H; aunque también puede ser atribuido a la participación de otros mecanismos de resistencia que pudieran presentarse, como bombas de expresión activa e impermeabilidad de la membrana, ya que pueden participar de forma individual o en conjunto en la resistencia a los antibióticos de cepas de *P. aeruginosa*³. En las cepas en las que fue posible detectar la presencia del gen *bla*_{OXA} encontramos que se trata de la misma variante, OXA-141, y este hallazgo concuerda con el de Laudy et al. en 2007 en Polonia en un aislado de *P. aeruginosa* [<http://www.lahey.org/studies/other.>]; hasta la fecha no se ha descrito dicha enzima en alguna otra parte del mundo (una oxacilinas de espectro extendido, de resistencia adquirida, reportada en *P. aeruginosa* y asociada a un integrón de clase 1).

En conclusión, en 6 aislamientos de *P. aeruginosa* de niños con fibrosis quística se detectó la presencia del gen *bla*_{OXA-141} asociado a un integrón de clase 1, siendo el primer reporte de ello a nivel mundial. Así mismo se evidenció la presencia del gen *bla*_{GES} en 11 de las cepas resistentes a la ceftazidima, siendo este estudio pionero en el reporte de este tipo de BLEE en pacientes con fibrosis quística, lo

que alerta de la necesidad de establecer mecanismos permanentes de monitorización de los genes que confieren la resistencia a los antibióticos para frenar la selección y la dispersión de los genes que confieren resistencia.

Financiación

M.G.V. y J.E.D.R. recibieron beca y apoyo económico para realizar esta investigación por el CONACyT y el IPN, México. R.M.R.A. y G.A.O. son becarios de los programas COFAA-IPN y EDD-IPN. Esta investigación fue soportada por SIP-IPN-México; claves: 20091358 y 20101151. R.C.J. recibió apoyo del INP-SSA-México con clave 039/2008.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Jones AM, Dodd ME, Morris J, Doherty C, Govan JR, Webb AK. Clinical outcome for cystic fibrosis patients infected with transmissible *Pseudomonas aeruginosa*: an 8-year prospective study. *Chest*. 2010;137:1405–9.
- Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000;288:1251–3.
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009;58:1133–48.
- Tomás M, Doumith M, Warner M, Turtton JF, Beceiro A, Bou G, et al. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:2219–24.
- Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2010;300:371–9.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;54:969–76.
- Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:933–51.
- Zhao WH, Hu ZQ. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36:245–58.
- Ktari S, Mnif B, Znazen A, Rekik M, Mezghani S, Mahjoubi-Rhimi F, et al. Diversity of β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo- β -lactamase in two Tunisian hospitals. *Microb Drug Resist*. 2011;17:25–30.
- Juan C, Mulet X, Zamorano L, Albertí S, Pérez JL, Oliver A. Detection of the novel extended-spectrum β -lactamase OXA-161 from a plasmid-located integron in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:5288–90.
- Cuevas-Schacht F, Banegas-Matamoros J, Sosa de Martínez C, Coria-Jiménez R, Pérez-Fernández L, Gerónimo-Gallegos A, et al. Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes pediátricos con fibrosis quística. Cultivo de expectoración vs lavado broncoalveolar. *Acta Pediatr Méx*. 2001;22:419–23.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Vol. 30, No. 1, M02-A10 and M07-A8. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
- Vedel G. Simple method to determine β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:657–64.
- Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2990–5.
- Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*. 2004;39:55–60.
- Weldhagen GF, Prinsloo A. Molecular detection of GES-2 extended spectrum β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24:35–8.
- Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, et al. Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene *bla*VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:626–8.
- Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2684–8.
- Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol*. 2002;184:3017–26.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goening RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by

- pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33:2233–9.
21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for health care epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997;18: 426–39.
 22. Sordé R, Pahissa A, Rello J. Management of refractory *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Infec Drug Resist. 2011;4:31–41.
 23. Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:3908–13.
 24. Naas T, Namdari F, Bogaerts P, Huang TD, Glupczynski Y, Nordmann P. Genetic structure associated with blaOXA-18, encoding a clavulanic acid-inhibited extended-spectrum oxacillinase. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:3898–904.
 25. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, et al., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:1906–11.
 26. Poirel L, Nass T, Nordmann P. Minireview. Diversity, epidemiology, and genetics of class D-beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:24–38.