

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS SOBRE LA RESISTENCIA A AMINOGLICÓSIDOS EN
AISLADOS CLÍNICOS DE PSEUDOMONAS SPP.**

FRANCISCO J. RODRÍGUEZ ESPARRAGÓN

Las Palmas de Gran Canaria, Mayo de 1998

70/1997-98

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO**

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de SORRESALIENTE, CUM LAUDE
POR UNANIMIDAD

Las Palmas de Gran Canaria, a 14 de julio de 1998.

El/a Presidente/a: Dr. D. Antonio Rodríguez Torres,

El/a Secretario/a: Dr^a D^a. Milagros Torres García,

El/a Vocal: Dr. D. Zoilo González Lama,

El/a Vocal: Dr. D. Gerardo Pisabarro de Lucas,

El/a Vocal: Dr. D. Juan Carlos Rodríguez Pérez,

El/a Doctorando/a: D. Francisco Javier Rodríguez Esparragón,

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE G.C.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Ciencias Clínicas

**ESTUDIOS SOBRE LA RESISTENCIA A AMINOGLICÓSIDOS
EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas spp.***

**Memoria presentada para optar al Grado
de Doctor por el Lcdo. en Biología
Francisco J. Rodríguez Esparragón**

Las Palmas, Mayo de 1998

**M^a TERESA TEJEDOR JUNCO, PROFESORA TITULAR INTERINA DE
MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE G.C.,**

CERTIFICA:

Que la Tesis titulada “Estudios sobre la resistencia a aminoglicósidos en aislados clínicos de *Pseudomonas spp.*”, presentada por el Licenciado en Biología Francisco Javier Rodríguez Esparragón para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección y la codirección de la Dra. Margarita González Martín en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de G.C., cumpliendo todos los requisitos para ser elevada a la Comisión de Doctorado de la Universidad y juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación en las Palmas de G.C.,
Mayo de 1998.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo:

A las Prof. Dras. M^a Teresa Tejedor y Margarita González, codirectoras de esta Tesis, que me han alentado y animado durante todos estos años.

Al Prof. Dr. Zoilo González Lama por su apoyo y cooperación y por iniciarme en la Microbiología.

Al Prof. Dr. Carmelo Monzón por su ayuda y por sus valiosos consejos.

Al Prof. Dr. Pablo Lupiola por sus enseñanzas en el campo de la Microbiología.

A los compañeros del Area de Microbiología del Departamento de Ciencias Clínicas y al Servicio de Microbiología del Hospital Insular sin cuyo apoyo y amabilidad este trabajo no hubiese sido posible.

A Manola con cuya ayuda y colaboración pude contar durante la última etapa de este trabajo.

A los Dptos. de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud por su colaboración.

Al Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Insular, especialmente a Manoli y a Juani.

A mis nuevos compañeros de la Unidad de Investigación, especialmente al Prof. Dr. José Carlos Rodríguez Pérez por permitirme compatibilizar dos actividades diferentes.

Al equipo de investigación en Aminoglicósidos de Schering-Plough, especialmente al Dr. G.H. Miller y a la Dra. K.J. Shaw.

A mis padres y hermanos, por su paciencia.

A mis padres

ÍNDICE.-

• INTRODUCCIÓN	1
• REVISIÓN Y ANTECEDENTES	4
CAPÍTULO I.- TAXONOMÍA	5
1.1. Género <i>Pseudomonas</i>	
1.2. Clasificación	
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
1.4. Epidemiología e importancia clínica	
CAPÍTULO II.- AMINOGLICÓSIDOS	15
2.1. Historia	
2.2. Clasificación y estructura química	
2.3. Propiedades	
2.4. Mecanismo de acción	
2.5. Toxicidad y dosis única	
2.6. Espectro de acción	
CAPÍTULO III.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICÓSIDOS	29
3.1. Resistencia ribosómica	
3.2. Resistencia por alteraciones en el transporte del antibiótico	
3.3. Resistencia por impermeabilidad de la membrana externa	
3.4. Resistencia adaptativa	
3.5. Resistencia enzimática	
CAPÍTULO IV.- ENZIMAS MODIFICADORES DE AMINOGLICÓSIDOS	39
4.1. Nomenclatura	
4.2. Acetilinasas	
4.3. Adenilasas	
4.4. Fosforilasas	
4.5. Origen de los genes de resistencia a aminoglicósidos. Evolución	
4.6. Métodos para la detección de enzimas modificadores	
4.7. Detección de genes de resistencia	

CAPÍTULO V.- GENÉTICA	61
5.1. Bases genéticas de la resistencia a antibióticos	
5.2. Mutaciones puntuales	
5.3. Transferencia de información genética entre bacterias	
5.4. Elementos genéticos transponibles: transposones y secuencias de inserción	
5.5. Elementos de integración del ADN: integrones	
• MATERIAL Y MÉTODOS.-	72
CAPÍTULO VI.- MEDIOS DE CULTIVO	73
CAPÍTULO VII.- IDENTIFICACIÓN	79
7.1. Identificación bioquímica	
7.2. Pruebas adicionales	
CAPÍTULO VIII.- SEROTIPADO	81
CAPÍTULO IX.- ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	83
9.1. Antibiograma	
9.2. Concentración Mínima Inhibitoria	
CAPÍTULO X.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS	86
CAPÍTULO XI.- DETECCIÓN DE ENZIMAS INACTIVADORES	88
11.1. Ensayo radioenzimático	
11.2. Antibiogramas para la detección del fenotipo de resistencia	
CAPÍTULO XII.- DETECCIÓN GENES DE RESISTENCIA A AMINOGLICÓSIDOS	98
CAPÍTULO XIII.- TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO	100
13.1. Conjugación	
13.2. Movilización	
13.3. Transformación	
13.4. Curación	

CAPÍTULO XIV.- PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN	106
14.1. Extracción de ADN plasmídico	
14.2. Extracción de ADN total	
• RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117
• ANEXO	137
• CONCLUSIONES	203
• BIBLIOGRAFÍA	207

INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN.-

Desde 1944 en que se aisló la estreptomicina de *Streptomyces griseus*, y durante mas de cuatro décadas, los antibióticos aminoglicósidos han sido una parte importante del arsenal de fármacos antibacterianos.

Los aminoglicósidos muestran una actividad bactericida dependiente de la concentración e independiente del inóculo, con una actividad in vitro predecible contra *Pseudomonas aeruginosa* y, en general, la gran mayoría de los bacilos aerobios gramnegativos. Su actividad antimicrobiana puede ser aditiva o sinérgica con β -lactámicos o cefalosporinas.

Presentan como mayor inconveniente el ser potencialmente nefrotóxicos, ototóxicos y, ocasionalmente, producir bloqueo neuromuscular.

La especie *Pseudomonas aeruginosa* sigue siendo un patógeno nosocomial importante que plantea problemas por su resistencia a antibióticos y, entre ellos, a los aminoglicósidos.

Los mecanismos de resistencia presentes en éste microorganismo están bien caracterizados y pertenecen a cinco clases: alteración ribosomal, cambios mutacionales y adaptativos en la permeabilidad, alteración en el transporte del antibiótico, resistencia adaptativa y modificación enzimática (66).

En *Pseudomonas aeruginosa* destacan tres mecanismos de resistencia simples: la acetilasa AAC(6')-II, la adenilasa ANT(2'')-I y las alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa.

Antes de 1983, la gran mayoría de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a gentamicina, tobramicina, netilmicina y amikacina, presentaban un único enzima: acetilante, fosforilante o adenilante. Aunque desde entonces hasta el momento presente se viene observando un incremento en la diversidad de mecanismos en *Pseudomonas*, esto no ocurre en mas del 1% de los aislamientos resistentes (66,140).

Los nuevos β -lactámicos y las fluoroquinolonas comparten el mismo espectro antimicrobiano y la eficacia de los aminoglicósidos frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, el rápido

incremento de resistencias a β -lactámicos y la eficacia de utilización de las terapias de combinación de aminoglicósidos han preservado su importancia y presagian una necesidad continuada.

Por otro lado, las nuevas estrategias de administración en dosis única, reducen el potencial nefrotóxico y ototóxico, sobre todo si se administran con determinadas sustancias de efecto protector.

Además, el efecto postantibiótico, es decir, la supresión persistente del crecimiento bacteriano después de una exposición breve del antimicrobiano, aumenta significativamente en *Pseudomonas aeruginosa* con las terapias de dosis única

Por todo esto consideramos de interés escoger una población de *Pseudomonas aeruginosa* procedente de muestras clínicas del Hospital Insular, estudiar los mecanismos de resistencia a aminoglicósidos presentes en estos aislados, así como su codificación cromosómica o extracromosómica.

REVISION Y ANTECEDENTES

1. TAXONOMIA.-

1.1. Género *Pseudomonas* (49,165,196,197).

El género *Pseudomonas* está constituido por bacilos Gram-negativos, rectos o ligeramente curvados, de entre 0.5-1.0 μm de diámetro por 1.5-5.0 μm de longitud. Son especies móviles por uno o varios flagelos polares; algunas cepas poseen flagelos laterales de diferente longitud y muchas poseen fimbrias. Carecen de cápsula y no forman esporas.

Recientemente se ha revisado el género, de forma que, ninguna de las especies actualmente incluidas, acumulan poli- β -hidroxibutirato (PHB) como reserva de carbono. Son catalasa y, normalmente, oxidasa positivas. Pueden crecer entre 4°C y 43°C.

Quimioorganotrofos. Aerobios estrictos de metabolismo oxidativo, nunca fermentativo, utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones si bien, en algunos casos, pueden emplear el nitrato y crecer en anaerobiosis. La relación G+C varía entre 58-70 moles%.

El género posee especies saprofiticas o patógenas oportunistas de animales y plantas y patógenas para plantas.

1.1.1. Características (49,165,170,197).

- **Pigmentos.**

La producción de pigmentos fue considerada durante mucho tiempo como un carácter genérico, sin embargo, *Pseudomonas* incluye actualmente especies pigmentadas y no pigmentadas. Entre los pigmentos mejor estudiados se encuentran los derivados fenacínicos, como la piocianina, producida por el 70% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Es un pigmento hidrosoluble de color azul-verdoso, químicamente

derivado de la α -oxifenazona, y posee una función antimicrobiana que no está claramente definida.

Los pigmentos fluorescentes constituyen un segundo grupo. Fluorescen bajo luz ultravioleta variando su intensidad según la longitud de onda empleada, con un máximo en torno a los 400 nm.

La pioverdina (fluoresceína) es de color amarillo-verde o amarillo-marrón y, además de por *Pseudomonas aeruginosa*, es producida por *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*. La combinación de los pigmentos hidrosolubles piocianina y pioverdina produce el color verde brillante, característico de algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La pioverdina funciona como agente quelante para el hierro.

Otros pigmentos fluorescentes incluyen derivados pteridínicos, como el denominado pigmento eritrogénico. Todos son hidrosolubles.

Muchos otros pigmentos permanecen asociados a estructuras celulares y no son hidrosolubles. Se agrupan bajo la denominación de pigmentos carotenoides si bien su estructura química no se asemeja a éstos.

• Metabolismo de compuestos aromáticos.

Pseudomonas se caracteriza por su versatilidad para usar distintos compuestos como fuente de carbono. El metabolismo oxidativo de algunos sustratos orgánicos implica la participación de mono y dioxigenasas (1,2- ó 2,3-dioxigenasas) que, asociadas a una amplia variedad de donadores de electrones, actúan sobre compuestos alifáticos y aromáticos.

La apertura del anillo de distintos compuestos aromáticos puede efectuarse mediante 1,2-dioxigenasas (apertura en “orto”), o mediante 2,3-dioxigenasas (apertura en “meta”). La presencia de estas enzimas constituye uno de los criterios taxonómicos clásicos, empleados en la subdivisión del género. Distintos compuestos aromáticos metabolizados con la participación de 1,2-dioxigenasas convergen en un intermediario metabólico común, el β -cetoadipato (ácido β -cetoadípico).

- **Propiedades bioquímicas.**

La citocromo c oxidasa está presente en todos los miembros del género con la excepción de algunas especies patógenas para plantas.

Todas las especies producen catalasa; pocas descarboxilan la lisina y la ornitina o hidrolizan la esculina. Algunas forman amoníaco partiendo de la arginina por medio de una hidrolasa. No forman Indol. Producen una gran cantidad de enzimas extracelulares que incluye proteasas, lipasas, elastasas, colagenasas, lecitinasas y esterases.

1.2. Clasificación (60,105,106,149,165,171,196,197).

Pseudomonas es uno de los géneros más complejos y con mayores problemas taxonómicos entre las bacterias Gram-negativas.

En la novena edición del Manual Bergey, se subdivide el género en cinco grupos en función de la homología de sus ARNr. Sin embargo, esta clasificación en los denominados “Grupos de homología de ARNr I, II, III, IV y V” ha sufrido en la última década una reorganización, de forma que se han creado nuevos géneros a partir de ellos y una nueva familia.

Así, las especies que constituían el “Grupo de homología de ARNr II”, pasan a constituir los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia* con las especies tipo, *Burkholderia cepacia* y *Ralstonia pickettii* respectivamente.

El “Grupo de homología de ARNr III”, pasa a constituir la familia *Comamonadaceae*, con tres géneros: *Comamonas*, *Acidovorax* e *Hydrogenophaga*. Todos estos géneros incluían anteriormente especies de *Pseudomonas*.

Las especies que pertenecían al “Grupo de homología de ARNr IV”, constituyen ahora el género *Brevundimonas*, mientras que las del “Grupo de homología V” constituyen el género *Stenotrophomonas*.

Por último, quedan por reconocer por el Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriana las

especies *Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens* y *Sphingomonas (Pseudomonas) paucimobilis*.

1.2.1. Criterios de clasificación.

La caracterización fenotípica de las especies de *Pseudomonas* ha sido realizada por diversos autores (Stanier, 1967; Palleroni y Doudoroff, 1972; Palleroni, 1978) lo que ha llevado a la creación de distintos agrupamientos. Entre las características empleadas por estos autores, las más importantes taxonómicamente fueron: el número y la posición de los flagelos, la producción de pigmentos, la reacción de la oxidasa y el metabolismo respiratorio.

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y, en especial, los trabajos de homología ARNr/ADN efectuados inicialmente por Palleroni et al. en 1973, permitieron realizar estudios sistemáticos de acuerdo con las características filogenéticas. Los agrupamientos así obtenidos no diferían, sustancialmente, de los efectuados exclusivamente mediante criterios fenotípicos.

A los criterios anteriores se han de sumar las investigaciones sobre rutas metabólicas particulares y sobre los mecanismos implicados en su regulación, estudios inmunológicos y de composición de la pared celular, así como otros aspectos bioquímicos.

Los trabajos más recientes (Yabunchi et al., 1990 y 1992; Willems et al., 1991 y 1992; De Ley, 1992; Gillis et al., 1995; Moore et al., 1996) se basan en estudios más detallados de la homología de los ARNr, porcentajes de homología ADN:ADN y ARNr:ADN y secuenciación de ARNr 16S, lípidos celulares, composición en ácidos grasos así como características fenotípicas.

1.2.2. Grupos de homología de ARNr I .

El grupo de homología de ARNr I, también denominado grupo “fluorescens”, está constituido por

mas de treinta especies, de las cuales once están bien caracterizadas. *Pseudomonas fluorescens* contiene cinco biotipos (denominados I, II, III, IV y V), mientras que *Pseudomonas putida* contiene dos (A y B).

Las especies de este grupo se caracterizan por no requerir factores de crecimiento ni acumular poli- β -hidroxibutirato. Incluye a la especie “tipo” del género, *Pseudomonas aeruginosa*, que junto a especies saprofitas y fitopatógenas productoras de pigmentos fluorescentes constituye un subgrupo denominado “fluorescens”. El subgrupo “stutzeri”, está formado por especies no pigmentadas (Tabla 1).

Las especies fluorescentes producen pigmentos hidrosolubles, pioverdina (*Pseudomonas fluorescens*) y pseudobactina (*Pseudomonas* fitopatógenas), junto a otros pigmentos derivados fenacínicos. Las especies saprofitas son arginindeshidrolasa (ADH) y oxidasa positivas, nutricionalmente muy versátiles, capaces de utilizar entre sesenta y ochenta compuestos orgánicos diferentes. Las fitopatógenas son ADH negativas y oxidasa negativas (las únicas entre las especies de *Pseudomonas*). Son, además, nutricionalmente menos versátiles.

1.3. *Pseudomonas aeruginosa* (50,60,171,173,196).

En 1850, Sedillot notó la presencia de decoloraciones en materiales quirúrgicos. Luke, en 1862, asoció estas decoloraciones con la infección y observó formas bacilares. *Pseudomonas aeruginosa* fue aislada por Gessard en 1882 con el nombre de *Bacillus pyocyaneus*.

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo aerobio Gram-negativo no esporulado, que suele encontrarse sólo o por parejas, móvil por flagelo polar monotrico. Produce pigmentos difusibles fluorescentes incluyendo pioverdina y el pigmento fenacínico piocianina. Posee también fimbrias polares. Algunas cepas producen pigmentos marrones y negros (piorrubina y piomelanina respectivamente).

Al menos 3 morfotipos coloniales se encuentran en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

La mayoría de los aislados produce un moco o “slime” que es un polisacárido extracelular. Las cepas mucosas aisladas de pacientes con fibrosis quística crean una matriz extracelular de polisacáridos

similar en su estructura química al que se encuentra en algunas algas, de aquí que se denomine alginato. El “slime” es químicamente distinto del polímero de alginato. Este último presenta una estructura compleja con acetilación de unidades de disacáridos, lo que le confiere especial adherencia a las paredes del epitelio pulmonar y resistencia a la fagocitosis.

1.3.1. Identificación.

Pseudomonas aeruginosa oxida azúcares tales como la glucosa y la xilosa pero no la maltosa. Es oxidasa positivo, dehidroliza la arginina pero no descarboxila la ornitina ni la lisina. Indol negativo. La mayoría de las cepas posee un olor característico debido a la producción, a partir de triptófano, de o-aminoacetofenona. Produce, además, gelatinasa y es capaz de reducir los nitratos.

1.3.2. Toxinas, bacteriocinas y bacteriófagos.

El pigmento piocianina actúa inhibiendo enzimas mitocondriales.

Produce distintas enzimas proteolíticas, de las cuales tres están bien caracterizadas, así como dos hemolisinas, una termolábil (fosfolipasa C) y una termoestable. La fosfolipasa C, hidroliza la fosfatidilcolina de la membrana eritrocitaria.

Hay dos exotoxinas que son ADP-ribosiltransferasas, denominadas exotoxina A y exotoxina S. La exotoxina A inhibe la síntesis proteica al impedir la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD al factor de elongación 2. Es un mecanismo similar al de la toxina diftérica. Se ha demostrado que es de 10.000 a 20.000 veces más letal para ratones que el lipopolisacárido (LPS). La exotoxina S, menos estudiada, no es tóxica para ratones y ha demostrado ser inmunológicamente distinta de la toxina A.

Sensakovic y Bartell demostraron en 1974 que el moco o “slime”, es decir, el polisacárido extracelular purificado, poseía también efecto tóxico.

El lipopolisacárido (LPS) representa la endotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* y a pesar de ser estructuralmente similar al de Enterobacterias, difiere en algunos agrupamientos químicos. El LPS de *Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por su alto contenido en fósforo y por contener fucosamina y quinovosamina, así como tri o tetrasacáridos ricos en aminoazúcares N-acetilados.

Las bacteriocinas (piocinas) producidas por *Pseudomonas aeruginosa* son de tres tipos. Las piocinas R son estructuras fágicas defectivas que se diferencian en su morfología de las denominadas piocinas F. Las R y las F, son producidas por el 90% de las cepas. Alrededor de un 70% sintetizan piocinas S, que se caracterizan por ser difusibles en agar.

Respecto a los bacteriófagos, se ha establecido que aproximadamente el 90-100% de las cepas son lisogénicas. Esto no ha impedido el aislamiento de algunos fagos que en su mayoría pertenecen al tipo A de Bradley. Su ácido nucleico puede ser ADN o ARN. El receptor fágico suele ser el LPS, pero algunos se adsorben a proteínas de membrana externa o a fimbrias.

1.3.3. Estructura antigénica.

- **Antígeno O.**

Se encuentra en el lipopolisacárido (LPS), es termoestable y responsable de la especificidad antigénica y de la susceptibilidad a bacteriocinas y fagos. Permanece unido a través de un núcleo común de oligosacáridos al lípido A.

La heterogeneidad antigénica ha sido utilizada por diversos autores para establecer un sistema de tipificación. Entre ellos, el sistema empleado por Liu et al. (1983) es uno de los más empleados. Reconoce 17 serogrupos.

- **Antígeno H.**

Se han diferenciado dos antígenos flagelares termolábiles. Uno de ellos es “uniforme”, es decir, serológicamente indivisible. El otro, “complejo”, está compuesto de 5-7 factores.

- **Otros Antígenos.**

La membrana externa (OM) de *Pseudomonas aeruginosa* contiene numerosas proteínas antigénicas, seis de ellas están bien caracterizadas. Destacan, la proteína F (fuertemente antigénica), la proteína I y las proteínas H (H1 y H2) que son comunes entre *Pseudomonas aeruginosa* y otras *Pseudomonas*. (Hancock y Carey, 1979; Mutharis y Hancock, 1985).

1.4. Epidemiología e importancia clínica (32,60,105,170,173).

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo ubicuo presente en todo tipo de ambientes, en el agua, suelo y vegetación, de todo el mundo y entre un 10-20% de la población sana como constituyente de la flora normal.

La infección por *Pseudomonas aeruginosa*, aún siendo rara en individuos sanos, puede producir otitis graves (otitis del nadador, otitis necrotizante), infecciones posquirúrgicas del ojo muy graves, queratitis por el uso de lentes de contacto, bacteriemias en adictos a drogas, etc. Su versatilidad para sobrevivir en cualquier tipo de ambiente, le permite crecer en medios tan inusuales como medicamentos, soluciones desinfectantes, aerosoles, sueros, agua de diálisis, y en general en lugares donde exista un cierto grado de humedad. Todo ello le convierte en un patógeno oportunista típico, responsable de un gran número de infecciones nosocomiales.

La infección nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa* ha aumentado en los últimos años. En

España se considera que es responsable del 10% de las infecciones nosocomiales, ocupando el segundo lugar en importancia.

Pseudomonas afecta principalmente a inmunodeprimidos, sometidos a terapéutica antibiótica, traumatizados, traqueotomizados, intubados y en general en los procesos que requieran manipulación y estancia hospitalaria larga.

La infección de la piel es sistemática en pacientes con quemaduras graves. También puede afectar a la herida quirúrgica.

Las infecciones nosocomiales del tracto urinario afectan, principalmente, a personas sondadas durante mucho tiempo, a transplantados de riñón y a sometidos a diálisis.

Las infecciones pulmonares del tipo neumonías, abscesos, etc, son importantes cuando afectan a sometidos a intubación o respiración asistida. También tienen particular importancia las infecciones asociadas a leucemias mielocíticas, por su alta frecuencia y elevada mortalidad (80%).

Pseudomonas aeruginosa puede producir endocarditis en inmunosuprimidos y, con mucha menor frecuencia, meningitis graves.

La infección por cepas mucoides de *Pseudomonas aeruginosa*, asociada con la fibrosis quística, se considera también sistemática. Su incidencia varía entre un 70-80% de los afectados.

Tabla 1. Características diferenciales de *Pseudomonas* spp. aisladas de muestras clínicas

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. mendocina</i>
<i>Piocianina</i>	70	0	0	0	0
<i>Oxidasa</i>	100	100	100	100	100
<i>CREC. 42° C</i>	100	0	0	90	100
<i>CREC. 4° C</i>	0	V	100	¿?	¿?
<i>Red. Nitratos</i>	74	19	0	100	100
<i>Gas de Nitratos</i>	60	4	0	100	100
<i>Pioverdina</i>	69	91	82	0	0
<i>ADH</i>	99	99	99	0	100
<i>LDC</i>	0	0	0	0	0
<i>Phe/ala</i>	8	3	2	55	50
<i>Gelatinasa</i>	46	100	0	0	0
<i>N° de flagelos</i>	1	>1	>1	1	1
<i>Indol</i>	0	0	0	0	0
<i>G+Cmoles%</i>	67.2	59.4–61.3	60.7–62.5	60.6–66.3	¿?

ADH: arginina deshidrolasa

LDC: lisina descarboxilasa

Phe/ala: fenilalanina desaminasa

V: algunas cepas crecen a 4° C

2. AMINOGLICÓSIDOS.-

2.1. Historia (43,52,55,117,118,184,217)

El primer antibiótico aminoglicósido descubierto fue la ESTREPTOMICINA (Schatz et al., 1944). El descubrimiento se produjo a partir de una cepa de *Streptomyces griseus* que fue mutada por irradiación por Waksman y Lechevalier en 1953.

La estreptomicina unió a su actividad frente a gram-negativos el hecho de ser el primer antibiótico eficaz frente a *Mycobacterium tuberculosis*. A pesar de este éxito inicial, ya en 1949 aparecen las primeras resistencias en bacilos gram-negativos, sin embargo, su actividad frente al *Mycobacterium* se ha preservado hasta la actualidad, normalmente asociado a otros antibióticos de acción sinérgica.

La NEOMICINA fue aislada por Waksman y Lechevalier en 1949 a partir de *Streptomyces fradiae*. La neomicina aislada contenía dos componentes activos denominados Neomicinas B y C. La Neomicina A era un producto de degradación de las dos anteriores.

Decaris en 1953 obtuvo, a partir de *Streptomyces lavandulae*, la FRAMICETINA que resultó ser químicamente análoga a la Neomicina C.

Umezawa en 1953, aisló de *Streptomyces kanamyceticus*, la KANAMICINA. La Kanamicina contenía tres productos denominados Kanamicina A, B y C. La Kanamicina B o KANENDOMICINA es la aminodesoxikanamicina A.

Partiendo de *Streptomyces rimosus var. paromomicinus* se obtuvo la PAROMOMICINA. Se aislaron dos compuestos Paromomicinas I y II. Químicamente análogas a la Paromomicina I son la AMINOSIDINA, CATENULINA e HIDROXIMISINA. La aminosidina se aisló a partir de *Streptomyces chrestomyceticus* y en 1965, de una cepa de *Streptomyces fradiae*.

Más adelante se intentó la modificación química de los aminoglicósidos que hasta entonces se habían obtenido para intentar lograr una mayor efectividad y una menor toxicidad de estas sustancias. Fue un

proceso que no produjo demasiados resultados, de forma que la búsqueda de nuevos aminoglicósidos se extendió a otros microorganismos. El equipo de investigación de Schering Corporation analizó un grupo poco conocido, los micromonosporas. De esta forma Weinstein y cols., en 1963, obtuvieron de *Micromonospora purpurea* la GENTAMICINA. La Gentamicina es un complejo de cinco productos (A, B, C₁, C_{1a} y C₂). Su estructura fue descubierta por Cooper y cols., en 1971.

La NEBRAMICINA fue un complejo obtenido en 1967 de *Streptomyces tenebrarius*. De este complejo el denominado factor 6, es la TOBRAMICINA.

En 1961 se desarrolló la ESPECTINOMICINA a partir de *Streptomyces spectabilis* y *Streptomyces flavopersicus*.

Las LIVIDOMICINAS A y B son productos aislados en 1971, a partir de *Streptomyces lividus*.

La RIBOSTAMICINA se obtuvo de *Streptomyces ribosidificus* en 1970.

Las BUTIROSINAS A y B son producidas por *Bacillus circulans*.

La SISOMICINA denominada inicialmente Rickamicina fue aislada de *Micromonospora inyoensis* en 1970.

La reducción de los grupos hidroxilo de los carbonos 3 y 4 de la Kanamicina llevó en 1971, a la obtención de la DIBEKACINA (3',4'-didesoxikanamicina B).

La AMIKACINA es también un derivado semisintético obtenido de la Kanamicina A.

De la Sisomicina se han obtenido varios derivados semisintéticos de ellos el más eficaz es la N-etilsisomicina (NETILMICINA).

2.2. Clasificación y estructura química (29,43,117,118).

Los aminoglicósidos se definen químicamente como alcoholes cíclicos aminosustituidos (aminociclitoles), unidos mediante enlaces glicosídicos a uno o más aminoazúcares. Dentro de los aminoglicósidos se incluyen también la ESPECTINOMICINA, DIHIDROESPECTINOMICINA y

TROSPECTOMICINA a pesar de que son aminociclitolos puros (sin aminoazúcares), caracterizados por el aminociclitol ACTINAMINA.

Habitualmente se clasifican, en función del número de aminoazúcares unidos al aminociclitol, en pseudodisacáridos, pseudotrisacáridos y pseudotetrasacáridos.

Los pseudodisacáridos se caracterizan por presentar el aminociclitol fortamina 6-monosustituido e incluye las FORTIMICINAS A (ASTROMICINA), C y D, DACTIMICINA e ISTAMICINAS A y B.

Los pseudotrisacáridos se subdividen a su vez según posean como aminociclitol la ESTREPTIDINA o bien, 2-DESOXIESTREPTAMINA. Al primer grupo pertenecen las estreptomicinas. Entre los que presentan 2-desoxiestreptamina como aminociclitol nos encontramos con compuestos 4-monosustituidos como la APRAMICINA, 4,5-disustituidos como BUTIROSINA y RIBOSTAMICINA y 4,6-disustituidos que incluye el grupo de las Kanamicinas y al grupo de las Gentamicinas (Tabla 2).

Los pseudotetrasacáridos poseen como aminociclitol 2-desoxiestreptamina disustituida en posición 4,5 en NEOMICINA, LIVIDOMICINA B y PAROMOMICINA.

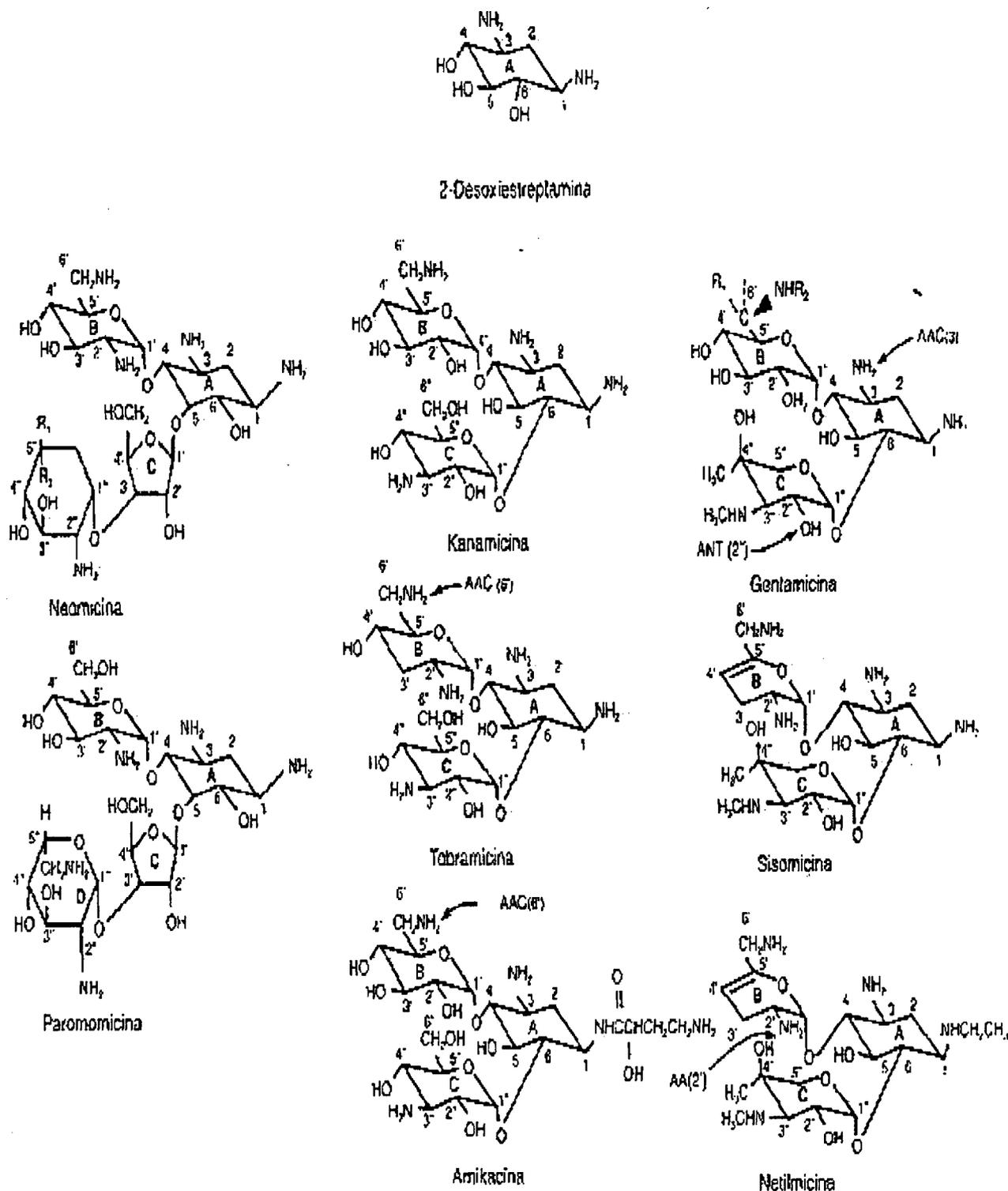
Existe otro sistema de clasificación en uso, basado en la presencia de estreptidina o de desoxiestreptamina como aminociclitol característico.

El grupo de la estreptidina incluiría las estreptomicinas A y B, hidroxiestreptomicina y dihidroestreptomicina (Figura 2).

El grupo de la desoxiestreptamina incluiría la familia de las Neomicinas (sustituidas en posiciones adyacentes 4,5), la familia de las Kanamicinas (sustituidas en 4,6) y la familia de las Gentamicinas (sustituidas en 4,6) y la Apramicina (Figura 1).

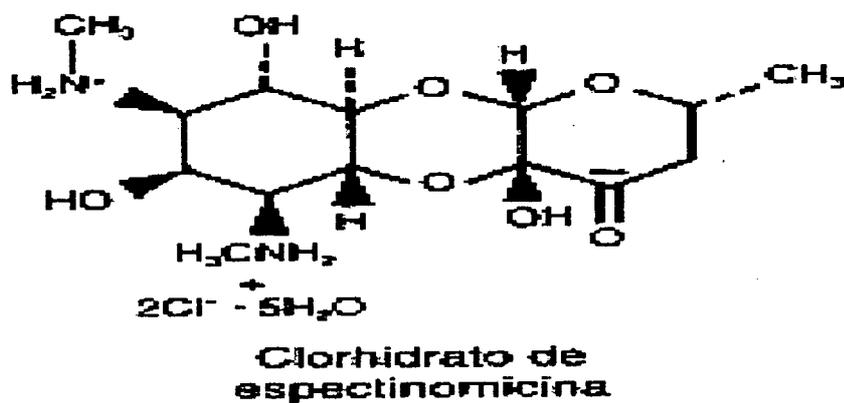
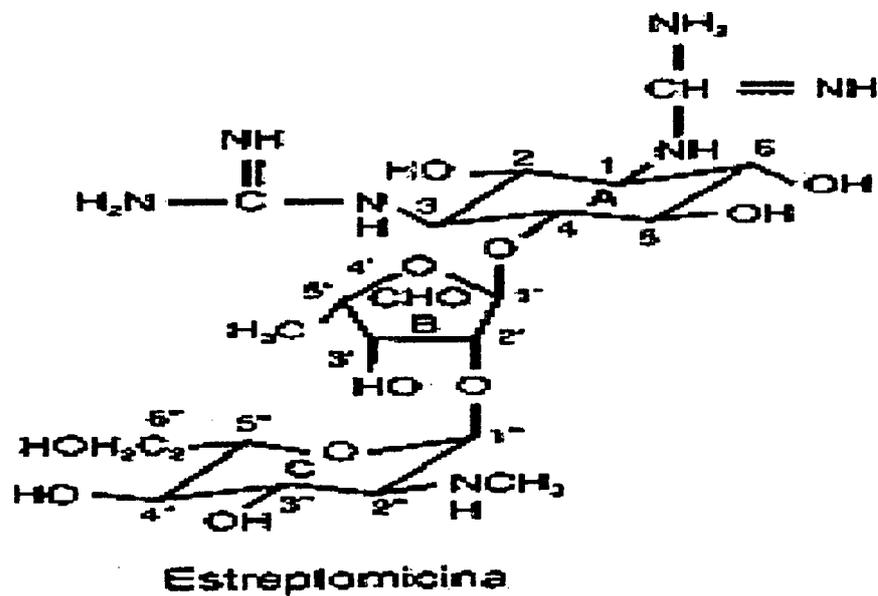
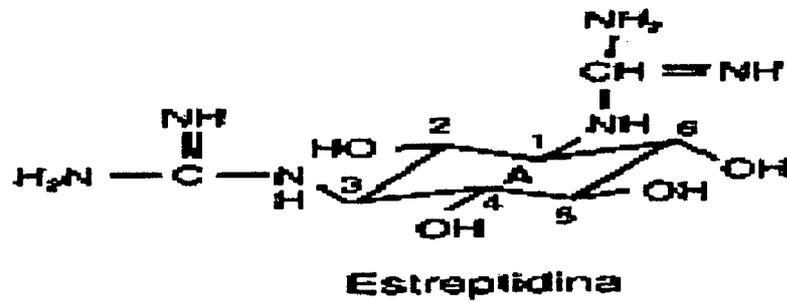
Los carbonos en el aminociclitol (desoxiestreptamina o estreptidina) se numeran del 1 al 6. Los átomos de carbono del grupo unido al carbono 4 de la desoxiestreptamina (o estreptidina en la estreptomicina) se numeran del 1' a 6', mientras que los átomos de carbono en el grupo sustituido en 5 o en 6 del anillo de la desoxiestreptamina se numeran del 1'' al 6''.

Figura 1.- Estructura química de los aminoglicósidos 2-desoxiestretaminados



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Figura 2.- Estructura química del aminociclitol Estreptidina y de la Estreptomicina



2.3. Propiedades.

Los aminoglicósidos, son antibióticos polares, solubles en agua y policationicos, generalmente estables al calor y a cambios de pH en el rango de 5 a 8. En general presentan una gran eficacia frente a gram-negativos aerobios e incluso frente a algunos anaerobios capaces de crecer en aerobiosis. Son antibióticos de acción bactericida, dependiente de la concentración y se ven poco influenciados por el inóculo. Presentan un efecto post-antibiótico (PAE) prolongado y son activos incluso por debajo de su concentración mínima inhibitoria (CMI). El efecto post-antibiótico o efecto de persistencia del antibiótico, se define como el periodo de tiempo de supresión del crecimiento bacteriano que sigue a una exposición corta (1 o 2 horas) de un antimicrobiano dado.

Su acción es sinérgica con antibióticos β -lactámicos y otros antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana.

Son antibióticos potencialmente nefrotóxicos y ototóxicos.

2.4. Mecanismo de acción.

Los aminoglicósidos ejercen su acción en una serie de etapas que culminan con la entrada del antibiótico en la bacteria y su unión al ribosoma. Esta unión produce errores en la pauta de lectura del ARNm durante la síntesis proteica. Aunque este efecto no explicaría por sí solo la acción bactericida de estos antibióticos es importante conocer los mecanismos por los que acceden al interior celular.

La acumulación del antibiótico se produce obedeciendo a tres fases. La primera de ellas es una unión iónica a la superficie celular, que no requiere energía (EIP), mientras que las dos fases siguientes requieren de un aporte energético (EDP-I y EDP-II).

2.4.1. Etapa inicial de unión iónica. (EIP).

Los aminoglicósidos se caracterizan por poseer a pH fisiológico de 3 a 6 cargas positivas netas debido a la presencia de grupos amino que poseen un elevado pK (44). La unión electrostática a la superficie bacteriana, cargada negativamente, se produce de manera casi instantánea. Esta unión inicial es reversible y va a depender de la fuerza iónica del medio, por tanto, puede ser inhibida por la acción competitiva de otros agentes catiónicos especialmente por cationes divalentes. El antagonismo entre aminoglicósidos y cationes divalentes es un fenómeno bien caracterizado (198).

En bacterias gram-negativas estos lugares de unión aniónicos son, en la superficie celular, los residuos de fosfato del LPS y distintas proteínas de la membrana externa (OM) y en la membrana celular las cabezas polares de los fosfolípidos (153).

Tras esta unión los aminoglicósidos difunden a través del espacio periplásmico hacia la membrana citoplasmática por difusión hidrofílica por medio de poros constituidos por proteínas de membrana externa (porinas) o a través de los intersticios celulares de la pared de las bacterias gram-positivas (44).

A pesar de que *Pseudomonas aeruginosa* posee un límite de exclusión de poro mayor que el de Enterobacterias y que por tanto éste no supondría una barrera frente a la entrada de compuestos hidrofílicos, su actividad es sustancialmente menor (73,77,221). Se ha estimado que solamente entre el 0.2-1% de las moléculas de porinas forman canales funcionales abiertos. Esta es una de las propiedades que explican la baja permeabilidad intrínseca en *Pseudomonas aeruginosa*, a distintos compuestos hidrofílicos incluidos los antibióticos.

La contribución de la ruta de difusión hidrofílica para la acumulación de aminoglicósidos en *Pseudomonas aeruginosa* es por tanto menor (74,75).

En 1981, Hancock, propuso el “mecanismo autopromotor” como ruta principal de difusión en *Pseudomonas aeruginosa*. Esta vía implica el desplazamiento competitivo de cationes divalentes, principalmente Mg^{2+} , por parte de estos antibióticos. Este desplazamiento destruye las uniones que estos

caciones establecen entre moléculas de LPS adyacentes con la consiguiente desestabilización de la estructura de la membrana externa (1,74,75,147,155,168,179). La base molecular de la integridad de la membrana externa radica en el LPS, de forma que, al quedar afectada, aumenta la difusión pasiva del antibiótico hacia el periplasma (211).

El mismo efecto desestabilizador sobre *Pseudomonas aeruginosa*, lo ejercen otros compuestos policationicos como detergentes, poliaminas, polimixinas, Tris, etc. (157).

El efecto desestabilizador se ha podido observar por microscopía electrónica sobre la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*, sometida a concentraciones subinhibitorias de gentamicina (123) y amikacina (216).

2.4.2. Fase de entrada dependiente de energía I. (EDP-I).

La segunda fase de entrada del antibiótico al interior celular, es la primera que requiere energía y varía en duración dependiendo de la concentración externa del antibiótico (198).

Durante esta fase, el antibiótico atraviesa la membrana celular a expensas de un gasto energético. Esta energía proviene de los mecanismos celulares implicados en el mantenimiento del metabolismo aerobio (cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa). Se ha demostrado que los inhibidores de uno u otro proceso así como los agentes desacoplantes producen una disminución significativa de esta fase (24,25,26,27,28,44).

El metabolismo aerobio permite mantener un gradiente de protones ΔpH respecto al exterior y un potencial de membrana negativos $\Delta\Psi$. Ambos valores son parámetros de la fuerza protón-motriz.

La diferencia de potencial de membrana juega un importante papel en el establecimiento de esta fase ya que es la fuerza conductora que permite la entrada del antibiótico (25,44) encontrándose de hecho, que existe una relación directa entre $\Delta\Psi$, la velocidad de entrada del antibiótico y su acción bactericida (53).

Hölje, en 1978, sugirió que los aminoglicósidos atravesaban la membrana plasmática como

policaciones, en respuesta a dicha diferencia de potencial. Sin embargo, Bryan demostró, que para la entrada de los aminoglicósidos debían existir transportadores, y señaló además a las Quinonas respiratorias como posibles candidatos a este papel (25).

Se han propuesto otras moléculas como posibles transportadores, por ejemplo, los citocromos (Campbell y Kadner, 1980), y aunque existen evidencias de que pueda estar involucrado algún sistema de transporte específico, parece más plausible pensar en la existencia de distintas moléculas que funcionan como transportadores (44), incluyendo sistemas de transporte para azúcares, aminoácidos, poliaminas, etc. (44,53). La naturaleza del transportador sigue sin conocerse.

Durante esta fase la célula permanece viable y la síntesis proteica continúa, aunque se pueden producir errores (53). El transporte del antibiótico unido a un transportador no saturable se realiza gracias a la fuerza conductora del $\Delta\Psi$.

2.4.3. Fase de entrada dependiente de energía II. (EDP II)

Es el proceso que permanece menos claro. Durante esta fase se produce una aceleración lineal de la velocidad de entrada del aminoglicósido, se inhibe la síntesis proteica y comienza la muerte celular. Se requiere un aporte energético que proviene de la cadena transportadora de electrones y probablemente de la hidrólisis de ATP (53, 198).

Para la inducción de esta fase son necesarios una serie de prerequisites en el interior celular. El factor más importante es la presencia de ribosomas sensibles a los aminoglicósidos. Estos ribosomas sensibles han de estar "activos" es decir, se requiere que la síntesis proteica continúe (44). Los inhibidores de la síntesis proteica inhiben también esta fase.

La interacción del antibiótico con los ribosomas se traduciría teóricamente, en una caída del potencial de membrana y aunque se produce una marcada pérdida de K^+ , esta caída del potencial no se observó (28).

Bryan elaboró un modelo en el que la transferencia progresiva del antibiótico causa una degradación de polisomas y acumulación de ribosomas libres e inhibición de la síntesis proteica. Estos ribosomas libres actuarían ahora como dianas para el antibiótico acelerando el proceso. Esta entrada compromete la integridad de la membrana y su funcionamiento, llevando por último a la muerte celular (28,53,198).

Davis introdujo una serie de modificaciones en el modelo anterior. En la EDP II se produce además la incorporación a la membrana celular de proteínas erróneas o aberrantes que funcionan como canales no específicos lo que explicaría el aumento en la velocidad de entrada del antibiótico durante esta fase en un ciclo autocatalítico. Estas modificaciones crean sin embargo, algunos problemas termodinámicos que están aún por considerar (198).

2.5. Toxicidad y dosis única (42,58,62,92,99,117,127,131,156,166,185,218).

Todos los aminoglicósidos presentan efectos potencialmente tóxicos, aunque en distinto grado dependiendo de cada antibiótico en particular. Estos efectos se manifiestan como ototoxicidad, nefrotoxicidad y parálisis neuromuscular. El mecanismo molecular subyacente está aún por determinar aunque implica la interacción de estos agentes policationicos con polianiones tales como el fosfatidilinositol, fosfatidilinositol di y trifosfato.

La parálisis neuromuscular es un fenómeno clínico raro aunque grave. Se puede manifestar cuando la concentración del antibiótico es lo suficientemente alta tras la administración parenteral o intravenosa o bien por la absorción desde los espacios pleural o peritoneal. Hay una mayor predisponibilidad en pacientes con insuficiencia renal, miastenia gravis, tratados con curarizantes o anestésicos.

La parálisis tiene lugar como resultado de la inhibición presináptica en la liberación de acetilcolina. También se produce un bloqueo postsináptico de los receptores para la acetilcolina.

La ototoxicidad de los aminoglicósidos se produce tanto a nivel cloclear como vestibular. Va a depender del tiempo de tratamiento y de la concentración del antibiótico administrado. Es un proceso

acumulativo que puede acarrear daños irreversibles. A nivel vestibular es donde se produce una mayor afectación.

El mecanismo implica la destrucción selectiva de las células ciliadas externas e internas del órgano de Corti. Las células se ven afectadas por la concentración del antibiótico en la perilinfa y endolinfa que baña a estas células.

Clínicamente la ototoxicidad afecta a un 3-5% de los pacientes que reciben gentamicina, tobramicina o amikacina.

Todos los aminoglicósidos son capaces de producir nefrotoxicidad aunque existen diferencias individuales entre ellos con respecto a su potencial nefrotóxico.

El mecanismo molecular involucra un transporte rápido, acumulación extensiva y retención "ávida" del antibiótico por períodos de tiempo prolongados. El proceso implica la unión inicial iónica al fosfatidilinositol de las células tubulares proximales. Una vez dentro de la célula interfieren con los lisosomas al estar estos cargados negativamente. No se sabe si el daño en las células tubulares es un efecto atribuible al lisosoma o si este es extralisosomal. Morfológicamente originan una acumulación de estructuras multilamelares denominadas cuerpos mieloides.

Clínicamente, la nefrotoxicidad se define como la reducción de la velocidad de filtración glomerular (elevación de la creatinina del suero). Esto ocurre en un 5 -25% de los tratamientos.

El potencial nefrotóxico de los aminoglicósidos es, por orden de importancia: neomicina, gentamicina, sisomicina, kanamicina, amikacina y tobramicina.

Durante mucho tiempo se ha tratado de establecer la medida clínica que preservase el potencial antibacteriano y simultáneamente disminuyese el potencial nefrotóxico y ototóxico. Se ha encontrado por ejemplo, que la administración concomitante de ticarcilina reduce el riesgo de nefrotoxicidad mientras que otros antibióticos como la vancomicina, anfotericina B o ciclosporinas la aumentan. Recientemente se ha establecido el concepto de dosis única en las terapias de administración de aminoglicósidos. Distintos estudios han demostrado que la incidencia de la nefrotoxicidad y ototoxicidad no solo no aumenta sino que de hecho

disminuye cuando estos antibióticos se administran en dosis única frente al tratamiento tradicional que divide la dosis diaria. Su utilización en una única dosis al día, consigue mantener niveles plasmáticos elevados y mantener su eficacia gracias a la duración del efecto postantibiótico.

2.6. Espectro de acción.

Los aminoglicósidos son efectivos frente a bacilos gram-negativos aerobios y facultativos incluyendo *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y otros no fermentadores nosocomiales. También son efectivos frente a *Staphylococcus aureus*. Aproximadamente el 75% del total de las cepas analizadas son sensibles.

Los aminoglicósidos son considerados como una excelente elección frente a infecciones graves especialmente las causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

Los cationes divalentes tales como el calcio y el magnesio en el medio ejercen un profundo antagonismo sobre la actividad “in vitro” de estos antibióticos especialmente en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* de forma que, cuando se estudia la sensibilidad en medio líquido, se ha de suplementar con concentraciones fisiológicas de estos cationes.

La gentamicina, tobramicina, netilmicina y la amikacina son activas frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque la gentamicina y la tobramicina presentan un patrón de actividad similar, la gentamicina es más potente frente a *Serratia* y la tobramicina frente a *Pseudomonas*. Ni la estreptomina ni la kanamicina son activas frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Entre los gram-positivos la mayor eficacia es frente a *Staphylococcus* aunque no suelen ser el tratamiento de elección ya que existen otros antibióticos con mayor eficacia clínica. Los Enterococos y los Estreptococos son resistentes a los aminoglicósidos aunque ocasionalmente puede administrarse penicilina o vancomicina en tratamientos sinérgicos con gentamicina.

Son activos frente a *Haemophilus* y *Legionella*. También el aminociclitol espectinomina es efectivo frente a *Neisseria*. *Listeria monocytogenes* es susceptible y se administran asociados a ampicilina.

La estreptomina se considera el antibiótico de elección frente a *Francisella tularensis* y *Yersinia pestis* y a menudo, en brucellosis. Sin embargo, su actividad principal la ejerce frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

La paromomicina tiene actividad frente a varios parásitos: *Entamoeba histolytica*, *Taenia sagitata*, *Taenia solium*, *Dipylidium caninum*, *Diphyllobothrium latum* e *Hymenolepis nana*.

Tabla 2. Familias de antibióticos aminoglicósidos.

<i>Aminociclitol</i>	<i>Familia</i>	<i>Antibiótico</i>
<i>Estreptidina</i>	<i>Estreptomicina</i>	<i>Estreptomicina A y B</i>
		<i>Hidroxiestreptomicina</i>
		<i>Dihidroestreptomicina</i>
<i>Desoxiestreptamina</i>	<i>Kanamicinas</i>	<i>Kanamicina A, B y C</i>
		<i>Amikacina</i>
		<i>Dibekacina</i>
		<i>Tobramicina</i>
	<i>Gentamicinas</i>	<i>Gentamicina C₁, C_{1a} y C₂</i>
		<i>Sisomicina</i>
		<i>Episisomicina</i>
		<i>Netilmicina</i>
		<i>Isepamicina</i>
	<i>Neomicinas</i>	<i>Neomicinas A, B y C</i>
		<i>Paromomicinas</i>
		<i>Lividomicinas A y B</i>
		<i>Ribostamicina</i>
<i>Aminociclitoles puros:</i>		<i>Butirosinas A y B</i>
		<i>Espectinomicina</i>

3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLICÓSIDOS.-

Se conocen cinco tipos principales de mecanismos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos: resistencia ribosómica, alteración en el sistema de transporte, impermeabilidad de la membrana externa, resistencia adaptativa y modificación enzimática del aminoglicósido.

3.1. Resistencia ribosómica.

La resistencia ribosómica a los aminoglicósidos, se produce por mutaciones puntuales que afectan a proteínas ribosomales que constituyen la diana de dichos antibióticos (53,38,117,118).

Su importancia clínica es escasa debido a que es un fenómeno poco frecuente. Se ha encontrado principalmente frente a la estreptomina y la espectinomicina (117,118).

En los aislados con resistencia ribosómica, se ve inhibida la etapa EDP-II del mecanismo de entrada de los antibióticos aminoglicósidos (74).

La resistencia ribosómica es espontánea, irreversible y hereditaria. Se ha encontrado en aislados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Algunas mutaciones ribosomales han sido muy bien caracterizadas. Así, la mutación puntual *rpsL* en *E. coli k-12* cambia un aminoácido de la proteína S12 de la subunidad 30S. Dado que la estreptomina tiene su principal lugar de unión en la proteína S12, la mutación produce resistencia de alto nivel a la estreptomina (34,117).

Otras mutaciones ribosomales descritas afectan a la proteína S7 confiriendo resistencia a neamina (mutaciones *nea B* y *rps Q* (*nea A*)), proteínas S5 y S7 confiriendo resistencia a la espectinomicina y también a la neamina por mutaciones que afectan a las proteínas S7, S12 y S17 (29,53).

La mutación **Ksg A** confiere resistencia a kasugamicina modificando la S-adenosilmetionina-adenosil (ARNr)-dimetil transferasa del ARNr 16S. La mutación **Ksg C** afecta a la proteína S2 (29,53).

La resistencia ribosómica a antibióticos aminoglicósidos desoxiestreptaminados no puede lograrse en un único evento mutacional. Esto refleja probablemente, la existencia de numerosos puntos de unión de estos antibióticos en el ribosoma bacteriano (53,117,118).

Se han aislado mutantes de resistencia a Gentamicina que se caracterizaban por poseer la mutación **rplF** que afecta a la proteína ribosomal L6 pero en combinación con la mutación **unc** que reduce el transporte de aminoglicósidos a través de la membrana externa (2,27,53).

3.2. Resistencia por alteraciones del transporte del antibiótico.

La entrada de los aminoglicósidos al interior celular, tras la unión iónica inicial, se produce en dos fases que requieren de un aporte de energía (EDP-I y EDP-II).

La producción de energía deriva del metabolismo aerobio a través del acoplamiento de la cadena transportadora de electrones y de la fosforilación oxidativa lo que permite además, el mantenimiento de la fuerza protón-motriz (24,25).

En general, las mutaciones que modifican el transporte son de dos clases. Aquellas que alteran el transporte aeróbico (mutaciones que, por ejemplo, afectan a citocromos y quinonas respiratorias) y una segunda clase constituida por mutaciones de efecto desacoplador.

Este tipo de mutaciones de cualquier componente implicado en la producción de energía, producen resistencias cruzadas a todos los aminoglicósidos ya que se impide el acceso del antibiótico a su diana. La fase afectada es la EDP-I (25).

Se han aislado mutantes de resistencia que presentaban deficiencias tanto en componentes de la cadena transportadora de electrones como de la fosforilación oxidativa (2,24,25,28,44).

En *Pseudomonas aeruginosa* el mutante PAO 2401 seleccionado mediante mutagénesis química, presentaba resistencia cruzada a todos los aminoglicósidos evaluados. La mutación, denominada **agl A** se manifestaba en una reducción del contenido en citocromo C₅₅₂ y una disminución de la actividad nitrato reductasa (Nar) así como, un cambio en la actividad oxidasa terminal (26).

De igual manera a partir del aislado de *P. aeruginosa* PAO 503 resistente a Gentamicina, se aislaron otros dos mutantes. El aislado PAO 2403 y el aislado PAO 2402 ambos caracterizados por no presentar citocromo d e igualmente presentar una disminución de la actividad nitrato reductasa (27).

En *Pseudomonas aeruginosa*, la mutación **unc** que afecta al transporte asociada a la alteración de la proteína ribosomal L6 resulta en resistencia a Gentamicina (2).

Al contrario que en *E. coli*, en *Pseudomonas aeruginosa* no se han detectado mutantes que presenten un desacoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa probablemente, porque este tipo de mutaciones serían letales en esta bacteria, cuyo metabolismo es estrictamente respiratorio tanto aerobio como anaerobio (26,27,29,44).

3.3. Resistencia por “impermeabilidad” de la membrana externa.

Numerosos aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* presentan resistencia cruzada y estable, a todos los antibióticos aminoglicósidos incluyendo los desoxiestreptaminados importantes. En este tipo de aislados no se encuentran ni enzimas modificadores ni mutaciones ribosomales ni alteraciones en componentes de la cadena transportadora de electrones o de la fosforilación oxidativa, que den cuenta de esta resistencia.

Esta resistencia fue denominada, en ausencia de cualquier otro mecanismo que la justificase, como resistencia por “permeabilidad” o más adecuadamente por “impermeabilidad” de la membrana externa ya que se observó una disminución de la acumulación celular de estreptomicina y de gentamicina marcadas radioactivamente. Gentamicina y estreptomicina, son habitualmente, los dos

antibióticos más utilizados en el estudio de la cinética de entrada del antibiótico en este tipo de resistencias (77,143).

Aunque la resistencia por impermeabilidad de la membrana externa no está restringida a *Pseudomonas aeruginosa*, es con mucho en este microorganismo, donde con mayor frecuencia aparece. También se ha descrito en otros gram-negativos, particularmente en *Klebsiella pneumoniae*.

El transporte del antibiótico al interior celular es un proceso multifactorial que se realiza en sucesivas etapas. En *Pseudomonas aeruginosa*, al contrario que en *E. coli*, la etapa de unión iónica inicial y la difusión siguiente del antibiótico hacia el espacio periplásmico, se realiza de manera particular a través del denominado mecanismo autopromotor (74,79).

El estudio de la base molecular de la resistencia por impermeabilidad de la membrana externa, en *Pseudomonas aeruginosa*, se ha centrado en los lugares de unión iónica inicial (etapa EIP) de los aminoglicósidos en la superficie bacteriana. Estos “sitios de unión” se establecen principalmente en el lipopolisacárido (LPS) y en distintas proteínas de la membrana externa (71,81,125,126).

3.3.1. Alteraciones mutacionales y adaptativas en las proteínas de membrana externa.

La descripción del mecanismo autopromotor en *P. aeruginosa* por Hancock et al. (72,74,77,148), en 1981, derivó del estudio de un mutante de resistencia que se caracterizaba por la sobreproducción de la proteína de membrana externa H1 (opr H1). Estos autores comprobaron además, que no era necesario el aislamiento de mutantes para la sobreexpresión de la proteína, ya que esta se producía de igual manera, bajo determinadas condiciones de crecimiento utilizando medios de cultivo deficientes en Mg^{2+} (222).

Tanto en el mutante como en el aislado en el que se indujo la producción de la proteína H1, la sobreproducción significaba una disminución de la susceptibilidad a gentamicina y estreptomycin. A partir de estos resultados, se concluyó que existe un lugar en la superficie de la membrana externa (OM) que es protegido de la acción de distintos compuestos catiónicos como gentamicina y

estreptomicina por la proteína H1(13,74,78,120,145,155,168). La opr H1, actuaría reemplazando cationes divalentes probablemente en el LPS, de forma que este sitio queda protegido del desplazamiento competitivo por cationes divalentes o por antibióticos catiónicos o por otras sustancias catiónicas (14,16,17,134,211,222).

La hipótesis de Hancock que contribuiría a explicar en parte la resistencia por impermeabilidad de la membrana, no es compartida por otros autores.

Gilleland y Conrad, estudiando este tipo de mutantes de permeabilidad, no encuentran cambios significativos en el número y concentración de las proteínas de membrana externa (oprs) (17).

Maloney et al. (122), en *P. aeruginosa* aisladas antes y después del tratamiento con amikacina y que desarrollaron resistencia por impermeabilidad, no encontraron diferencias en los perfiles plasmídicos, o cambios en las proteínas de membrana externa o en el LPS.

También se han obtenido resultados del estudio de mutantes supersusceptibles a antibióticos y de sus revertantes. En los revertantes del mutante supersusceptible *P. aeruginosa* Z61 se pudo comprobar que la baja permeabilidad de la membrana externa se debía a la baja proporción de porinas funcionales abiertas (6,111).

Se han caracterizado, molecular y funcionalmente, numerosas porinas de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* (75,80,134,158,159,160) pero al contrario de lo que sucede en *E. coli* ninguna de ellas parece intervenir, de forma específica, en la difusión de aminoglicósidos.

En *E. coli* la difusión de estos antibióticos se produce de manera muy eficaz aunque sus pesos moleculares estén próximos o incluso sean mayores que el límite de exclusión de las porinas (73,79,153,221).

3.3.2. Alteraciones mutacionales y adaptativas del LPS.

Las alteraciones en el Lipopolisacárido (LPS) constituyen una parte muy importante en el estudio de los mecanismos de resistencia por impermeabilidad. Experimentalmente se ha podido comprobar que las moléculas aisladas del LPS de *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de unir gentamicina. Al igual que ocurre con los puntos de unión en proteínas de la membrana externa, la formación de complejos LPS-gentamicina puede ser desplazada “in vitro” por la adición de cationes divalentes, especialmente Mg^{2+} y Ca^{2+} (1,81,147).

El análisis químico y cromatográfico de las cadenas laterales del LPS purificado entre estirpes susceptibles y de sensibilidad normal refleja únicamente pequeños cambios o microheterogeneidades (81,111,180).

En 1984, Bryan et al.(30), caracterizaron dos aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* como resistentes por impermeabilidad. Cada uno de los aislados poseía un plásmido. La transformación de la cepa PAO 503 con el ADN plasmídico producía transformantes resistentes a gentamicina, a un nivel inferior que el de la cepa original. La conjugación con este ADN plasmídico no tuvo éxito. La transducción del ADN cromosómico a una cepa receptora resultaba también en un bajo nivel de resistencia a gentamicina, menor que el obtenido en los transformantes. Según estos autores, en estas cepas, la resistencia vendría codificada al menos por dos genes. Un gen cromosómico y otro plasmídico. La resistencia de bajo nivel, se produciría a través del cambio del fenotipo del LPS de “liso” a “rugoso” y su codificación sería cromosómica ya que, este cambio en el LPS, no se observó en los transformantes pero sí en los transductantes. La resistencia a un mayor nivel tendría una codificación plasmídica (30,157,179,220).

La caracterización del LPS como “liso” o “rugoso” fue establecida para diferenciar a aquellos mutantes que pierden el fenotipo normal denominado “liso” y presentan el alterado o “rugoso”. Químicamente el LPS de los mutantes rugosos presenta una notable reducción en las cadenas laterales de azúcares (fundamentalmente fucosamina y derivados del ácido manurónico) así como de

componentes del “core” (glucosa, ramnosa y glucosamina), y un aumento de componentes más internos del “core” (KDO, alanina y galactosamina). También se les denomina mutantes “deep rough” (30,80,220). Las diferencias entre ambos tipos de LPS se observan en un gel de electroforesis de acrilamida como una disminución en el patrón de bandas obtenido.

La aproximación experimental al mecanismo de resistencia por permeabilidad realizado por otros autores no se ajusta a cambios únicos del LPS o de proteínas de membrana externa como responsables de la resistencia por permeabilidad. En cepas resistentes a gentamicina y/o carbenicilina se comprobó mediante microscopía electrónica, la presencia de plegamientos particulares en la membrana externa (102,123). Estas cepas presentaban además, una pérdida del contenido de proteínas totales de membrana externa, del LPS y del contenido en fosfolípidos. En cepas de sensibilidad normal tratadas con aminoglicósidos se ha podido comprobar que se produce también una pérdida de proteínas de membrana externa, de LPS y fosfolípidos (216).

En los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística (CF), se ha venido comprobando la pérdida de especificidad antigénica (8,76). Estructuralmente el LPS puede ser dividido en tres regiones: el lípido A, el “core” o cuerpo central de oligosacáridos y las cadenas laterales de polisacáridos O-antigénicas. La heterogeneidad del O-polisacárido es la que permite diferenciar los distintos serotipos. Estudios recientes indican que *Pseudomonas aeruginosa* puede producir dos formas distintas, química e inmunológicamente, del LPS denominadas Banda A y Banda B (112). La Banda B constituye la forma conservada responsable de la especificidad serológica, es de alto peso molecular y fuertemente aniónica. La Banda A está constituida por azúcares predominantemente neutros y además pierde el contenido en fosfatos que es sustituido por cantidades estequiométricas de sulfato. En numerosos aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística se produce la sustitución de la Banda B por la A y la pérdida consiguiente del serotipo (98,112,119,181,195). Se ha estudiado la interacción de la unión iónica de gentamicina en los derivados isogénicos resistentes A^+B^- , A^-B^+ , A^-B^- comprobándose que la afinidad del antibiótico es

mayor en cepas que poseen únicamente la Banda B si bien esta afinidad mayor no parece ser responsable del alto nivel de resistencia por permeabilidad que se presenta en estas cepas (119,181).

3.4. Resistencia adaptativa.

El uso de aminoglicósidos frente a *Pseudomonas aeruginosa*, a menudo se ve acompañado del fracaso del tratamiento ya que, cepas inicialmente sensibles, son reisladas mostrando resistencia cruzada a todos los aminoglicósidos clínicos importantes aún cuando el tratamiento se haya realizado con un único antibiótico (41,42,121,125,135,154).

Estas cepas descritas inicialmente como resistentes por impermeabilidad de membrana, no muestran sin embargo, las características de la impermeabilidad. Es decir, son cepas que presentan alteraciones morfológicas mínimas, no se observan alteraciones de Opr H1, no hay alteraciones en el contenido en fosfolípidos y la adaptación a un aminoglicósido no confiere resistencia a otros antibióticos catiónicos como polimixinas ni a otros compuestos catiónicos como EDTA o Tris sino únicamente a aminoglicósidos. Por el contrario, estas cepas presentan una serie de particularidades que las caracterizan: alteraciones en el tiempo de generación que, normalmente, es el doble del tiempo de generación de una cepa de sensibilidad normal, disminución general en el contenido de proteínas de membrana externa en el rango de 73-69 Kda aunque es más obvia entorno a los 69 Kda (la Opr H1 no se ve afectada), y lo que es más importante, la resistencia es inestable, solamente se mantiene en presencia del antibiótico (15,59,100,219).

Esta resistencia, denominada adaptativa, necesita de un periodo de tiempo denominado "crecimiento adaptativo" (de una a dos horas tras la exposición inicial) que termina con el desarrollo de refractariedad a todos los aminoglicósidos. En medios libres de antibiótico la resistencia inestable revierte después de varias horas (41,42,59,92).

La resistencia adaptativa es un fenómeno de caracterización reciente, descrito inicialmente en *Pseudomonas aeruginosa* durante el uso de aminoglicósidos. Sin embargo la pérdida de sensibilidad

que se produce se ha demostrado también en otros microorganismos y frente a otros antibióticos como betalactámicos y quinolonas (121,166).

Algunos autores consideran que la resistencia adaptativa es una forma de resistencia que se puede incluir dentro de un fenómeno más general denominado “persistencia adaptativa” (10).

Las nuevas terapias de administración de aminoglicósidos en dosis única se han desarrollado para evitar la aparición de resistencias adaptativas en el curso de los tratamientos continuados (10,27,42,58,99,100,131,156,185,219).

Han surgido distintos modelos experimentales que permiten aislar cepas con resistencia adaptativa. En este tipo de cepas se ha podido establecer parte del mecanismo responsable de la resistencia. La adaptación, que aparece como respuesta a la presencia del antibiótico, parece debida a una desregulación de la segunda fase energética que permite la entrada del aminoglicósido al interior celular (EDP-II). La causa última que origina esta desregulación no se conoce (41,42).

3.5. Resistencia por modificación enzimática del aminoglicósido.

La resistencia a antibióticos aminoglicósidos, mediada por la producción de enzimas modificadores, es el mecanismo más habitual y de mayor importancia desde el punto de vista clínico, ya que la mayoría de las enzimas se encuentran codificadas en plásmidos y/o en trasposones (5,29,63,37,38,45,53,125,169,223).

La producción de enzimas modificadores es, en general, constitutiva es decir, independiente de la presencia del antibiótico (37,63). Únicamente el gen *aac(6')-Ic* de *Serratia marcescens* y el gen *aac(2')-Ia* de *Providencia stuartii*, presentan cierto grado de regulación (189).

En un mismo aislado puede encontrarse más de un enzima modificador.

La síntesis de enzimas no implica necesariamente la adquisición de un fenotipo de resistencia, ya que esta va a depender cualitativamente y cuantitativamente del hospedador. Experimentalmente se ha podido comprobar que la tasa de modificación, esto es, la K_m del enzima, es crucial en la aparición

de la resistencia a los aminoglicósidos, al igual que ocurre con la velocidad de entrada del antibiótico al interior celular. Una gran afinidad del enzima y una baja velocidad de entrada del antibiótico, contribuyen a que el enzima presente en un determinado aislado bacteriano, pueda modificar un mayor número de moléculas del antibiótico. Por tanto, la aparición de resistencias, va a depender del balance que se establece entre la velocidad de entrada del antibiótico y su tasa de detoxificación en el interior celular (23,37,63,66).

Durante mucho tiempo se ha pensado que estos enzimas se encontraban localizados en el espacio periplásmico. Sin embargo, el hecho de necesitar como cofactores moléculas altamente energéticas como el ATP o el Acetil CoA hacía difícil imaginar como esto era posible. Posteriormente se ha demostrado la localización citoplasmática de algunos enzimas como la APH(3') en *E. coli* o la acetilasa AAC(3)-IVa (53,167,189). Otras como la adenilasa ANT(3'')-Ia tienen una localización periplásmica (189).

4. ENZIMAS MODIFICADORES DE AMINOGLICÓSIDOS.-

4.1. Nomenclatura.

Se conocen tres clases de enzimas modificadores de aminoglicósidos: N-acetiltransferasas o acetilasas (AAC), O-fosfotransferasas o fosforilasas (APH) y O-nucleotidiltransferasas o adenilasas (AAD o ANT).

Las acetilasas catalizan la transferencia de grupos acetilo desde el Acetil Co-A a un grupo amino diana en el aminoglicósido. Las acetilasas solo modifican aminoglicósidos que contengan 2-desoxiestreptamina o fortamina y por tanto no modifican la estreptomicina (Sm) ni la espectinomicina (Spcm).

Las fosforilasas catalizan la transferencia de grupos fosfato desde el ATP, GTP, CTP o UTP a un grupo hidroxilo en el antibiótico.

Las adenilasas catalizan la transferencia de nucleótidos desde desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos trifosfato a un grupo hidroxilo del antibiótico(63).

Cada una de estas clases incluye varias subclases: AAC(1), AAC(3), AAC(6') y AAC(2'); APH(3'), APH(3''), APH(2'') y APH(5''); ANT(6), ANT(9), ANT(2'')(3'') y ANT(4',4''). El número entre paréntesis indica las posiciones o sitios de modificación en los aminoglicósidos. Cada subclase se clasifica en isoenzimas por su perfil de sustrato lo que se indica, mediante números romanos por ejemplo, AAC(3)-I, AAC(3)-II (29,66). Las proteínas únicas se indican, finalmente, mediante letras: AAC(6')-Ia, AAC(6')-Ib, etc. A medida que se han ido clonando y secuenciando genes se han ido nombrando con distintas nomenclaturas. La mas aceptada actualmente es la propuesta por Mitsuhashi que nombra al gen como al enzima pero escrito en minúscula por ejemplo aac(6')-Ia, aac(6')-Ib, etc (189).

4.2. Acetilinasas.

Se han descrito cuatro clases de N-acetiltransferasas o acetilinasas, que modifican un grupo amino de los aminoglicósidos susceptibles en las posiciones 1-, 3-, 6'- y 2'- (15,189).

AAC(1).

Lovering y col., comprobaron la modificación del grupo amino en la posición 1 de la Apramicina (Apra) y las posiciones 1- y 6'- de la Neomicina (Neo) y Ribostamicina (Rm) que producía un aislado veterinario de *E. coli* J62-1 (63,189).

El enzima AAC(1), se caracteriza por generar un fenotipo de resistencia a Apra, Lividomicina (Lm), Rm y Paromomicina (Pm). Se ha comprobado que "in vitro", modifica la butirosina (Bm) y Neomicina (Nm).

El gen no ha sido clonado (189).

AAC(3).

Hasta el momento se ha determinado la secuencia y deducido la proteína de catorce genes distintos que producen cinco patrones de resistencia diferentes (189). Cuatro de estos genes se han clonado de *Actinomycetes* (192).

Todos los aminoglicósidos activos poseen un grupo amino en posición 3. Este grupo parece jugar un importante papel en la unión del antibiótico con el enzima y con los ribosomas. La pérdida por modificación de este grupo significa la pérdida total de actividad del antibiótico. (142)

• AAC(3)-I.

Mitsuhashi y col., describieron la inactivación por acetilación de las posiciones 3- de las Gentamicinas C_{1a}, C₁ y C₂ en extractos enzimáticos de *P. aeruginosa* (22,67,183). Brezezinska y col., describieron una actividad similar usando extractos parcialmente purificados también de *P. aeruginosa*

(67,137,189,192,210).

Los aislados que poseen el enzima AAC(3)-I presentan un fenotipo de resistencia a Gentamicina (Gm), Astromicina (Astm) y Sisomicina (Sis). A pesar de haberse observado inicialmente en *P. aeruginosa* se encuentra ámpliamente distribuida en Enterobacterias (189,192) y en menor medida en aislados clínicos de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (4,189,192).

La acetilasa AAC(3)-I fue purificada y caracterizada por Williams y Northrop, posee un peso molecular de 63.000 ± 6.300 y está constituida por cuatro subunidades de 17.000 ± 1.700 D (45,223).

Se han clonado dos genes de resistencia distintos *aac(3)-Ia* y *aac(3)-Ib* (187,189,204). El gen *aac(3)-Ia* se clonó de los plásmidos pJR88, R1033(*Th*1696) y PU0901 originales de Enterobacterias, *Pseudomonas* y *Serratia* (192). El gen *aac(3)-Ia* es uno, de los muchos genes de resistencia, de los que se ha demostrado que están presentes en "integrones". Schowoch y col., clonaron de *P. aeruginosa* STONE 130 un segundo gen *aac(3)-Ib*. Estos autores postularon también la existencia de un tercer gen ya que encontraron que un 29% de los aislamientos que expresaban el fenotipo AAC(3)-I no hibridaron con sondas específicas para *aac(3)-Ia* y *aac(3)-Ib* (192). Entre los dos genes clonados hay una homología en la secuencia nucleotídica del 74%. La proteína deducida es similar en un 88% (189,192).

El término AAC(3)-Ia se ha usado para definir un fenotipo de resistencia a la Gm, Netilmicina (Net) y de sensibilidad para la Tobramicina (Tm) que se ha encontrado únicamente en *Pseudomonas aeruginosa*. (169) En este sentido los fenotipos AAC(3)-Ia y AAC(3)-III serían exclusivos del género *Pseudomonas*. Por el contrario, Bryan y col., no consideran el patrón de resistencia AAC(3)-Ia como un fenotipo diferente. Según estos autores, el fenotipo es similar al producido por el enzima AAC(3)-I y la explicación de la resistencia ampliada a Net, 2'-Netilmicina (2'-Net) y 6'-Netilmicina (6'-Net) y Sis radicaría en estas cepas, en la combinación de una permeabilidad reducida mas la presencia del enzima.

• AAC(3)-II.

Descrita por Le Goffic y col., codificada en un plásmido conjugativo de *Klebsiella* (45,53,169).

La presencia del enzima produce resistencia a Gm, Tm, Dbk, Net, 6'-Net y Sis (189).

Durante un tiempo se pensó que el enzima AAC(3)-V constituía un fenotipo diferente. Sin embargo, cuando pudo obtenerse el gen y se secuenció, se comprobó, que era idéntico al gen aac(3)-II (4,187).

El enzima AAC(3)-II se encuentra principalmente en Enterobacterias aunque también aparece en *Acinetobacter*, *Serratia* y, en menor medida, *Pseudomonas* (4,187,189).

Se han clonado tres genes: aac(3)-IIa, aac(3)-IIb y aac(3)-IIc. El gen aac(3)-IIa es el más frecuente y se encuentra en el 84.8% de los aislamientos que presentan este enzima. Posee un 97% de homología con el gen aac(3)-IIc diferenciándose únicamente en 26pb lo que resulta en 12 aminoácidos sustituidos. Las sondas desarrolladas a partir de estos genes hibridan, pero no lo hacen con el gen aac(3)-IIb. El gen aac(3)-IIb fue clonado de *Serratia marcescens* y se encuentra únicamente en un 5.9% de los aislamientos AAC(3)-II (4,11,176,189,206,214).

• AAC(3)-III.

Biddlecome y col. encontraron la actividad acetilante AAC(3)-III en un aislado de *P. aeruginosa* PST en 1976. Es exclusiva del género *Pseudomonas* (18,43,45,67,169,214).

El enzima modifica la Gm, Tm, Dbk, 5-epi, Sis, Km, Nm, Pm y Lm (18). Es la única acetilasa capaz de inactivar la 5-episisomicina, lo que permite su correcta identificación (64).

Se han identificado tres genes. El gen acc(3)-IIIa se clonó de *P. aeruginosa* PST-I y los genes aac(3)-IIIb y aac(3)-IIIc de *Pseudomonas* spp (189,215).

• AAC(3)-IV.

Davies y O'Connor aislaron en 1978 este enzima y comprobaron que puede acetilar la Apramicina (Apra) lo que permite distinguirla de la AAC(3)-III (45,53,137,169).

Las cepas que poseen el enzima AAC(3)-IV son resistentes a la Gm, Tm, Dbk, Net, 6'-Net, 2'-Net, Apra y Sis.

Hedges y Shannon aislaron una AAC(3)-IV de una estirpe de *E. coli* codificada en el

transposón *Tn800* (67).

Se ha clonado el gen *aac(3)-IVa* de *Salmonella*.

Es un enzima que se aísla muy raramente (189).

• **AAC(3)-VI.**

Papanicolau y col., detectaron este enzima en Enterobacterias resistentes a la Gm (207).

Los aislados que poseen el enzima AAC(3)-VI, presentan un fenotipo de resistencia a Gm, 6'-Net y Sis y, aunque no confiere resistencia, se ha detectado que también presenta una baja actividad enzimática frente a Tm, Net, 5-epi y Km (189).

El gen *aac(3)-VI* se clonó de un plásmido conjugativo (≥ 70 kb) de *E. cloacae* 88020217. Posteriormente se comprobó que el gen se encuentra en un integrón en la misma secuencia codificadora que el gen *ant(3'')*-I. La proteína AAC(3)-VIa es idéntica en un 48% a la proteína AAC(3)-IIa y en un 39% con la proteína AAC(3)-VII (177,189).

• **AAC(3)-VII, AAC(3)-VIII, AAC(3)-IX y AAC(3)-X.**

Son acetilasas aisladas de *Actinomycetes*. Se han clonado los genes *aac(3)-VIIa*, *aac(3)-VIIIa*, *aac(3)-IXa* y *aac(3)-Xa* (189).

AAC(6').

Umezawa y col. describieron, en un plásmido de resistencia de *E. coli* K12 R5 y Benveniste y Davies en *E. coli* W677 una acetiltransferasa que era capaz de modificar los grupos amino en posición 6'- de la Kanamicina y de la 3',4'-didesoxikanamicina B. Se encontró también en *Pseudomonas aeruginosa* GN315 que modificaba aminoglicósidos de importancia clínica como la Tm, Net, Amikacina (An), Astm, Sis, GmC₁ y GmC₂ y, en menor medida, GmC₁ e Isepamicina (Ise) (189,210).

Debido a que existían diversos patrones de resistencia producidos por enzimas AAC(6'), Mitsuhashi y Kawabe propusieron, basándose en estos patrones, una primera división en los tipos I a IV (169). En la clasificación de Mitsuhashi, la AAC(6')-I modifica a la KmA, KmB y Nm. La

AAC(6')-II ampliaría su espectro a la GmC_{1a} y GmC_{2a}; la AAC(6')-III además de los anteriores también modificaría la Dbk y la AAC(6')-IV a la An. Haas y col. observaron que las acetilasas caracterizadas diferían en su capacidad de modificar la amikacina (An) (45). Basándose en esta característica Meyer y Wiedemann (205) propusieron una clasificación mas simple que únicamente reconocía dos tipos las AAC(6')-I y AAC(6')-II.

• AAC(6')-I.

Aislada por Benveniste y Davies en 1971 y por Yagisawa y col., en 1975 (137).

Las cepas portadoras presentan un patrón de resistencia característico a la Tm, Dbk, Net, An, 2'-Net, 5-epi, Sis. In vitro modifica también a la Isepamicina pero sin producir resistencia (137,189).

El enzima AAC(6')-I modifica todos los antibióticos con grupos amino primarios en 6' - , la 6'-Net y la GmC₁ no son modificados ya que poseen grupos amino secundarios en esta posición.

Se han clonado y secuenciado hasta el momento diez genes distintos (114,115,137,189).

El gen aac(6')-Ia clonado de *Citrobacter diversus*, se encuentra raramente y codifica una proteína de 185 aminoácidos. Posee secuencias flanqueantes relacionadas con el transposón Tn21 (56,116).

El gen aac(6')-Ib, que se encuentra en el 70.6% de los aislamientos que poseen el fenotipo AAC(6')-I, (20,56,116,189) fue clonado por vez primera de un plásmido de resistencia de *Serratia marcescens*. El gen clonado y secuenciado de 600bp codificaba para una proteína de 22.4 Kda con un punto isoeléctrico de 5.35. El gen formaba parte de un "cluster" de genes de resistencia y su expresión se encontraba bajo control de las secuencias reguladoras de la β-lactamasa de Tn3 (208). Nobuta y col. caracterizaron el gen aac(6')-Ib en el transposón Tn1331 de *Klebsiella pneumoniae* (56). También se ha clonado el gen en la cepa *P. aeruginosa* BM2656. El gen clonado de *Pseudomonas* posee dos secuencias de lectura abierta (ORF). La primera de ellas (ORF1) codifica la acetilasa y la segunda codifica probablemente el enzima ANT(3'')(9). La identidad entre la secuencia ORF1 del gen aac(6')-Ib de *Pseudomonas* y el codificado en el "casette" génico del trasposón Tn1331 de *Klebsiella* es del

99.2% (56,208).

El gen *aac(6')-Ic* es cromosómico en *Serratia marcescens* de donde fue clonado. El gen se encuentra independientemente de que se exprese o no la resistencia y es exclusivo del género *Serratia* (188,189).

El gen *aac(6')-Id* es muy raro y se clonó del trasposón *Tn4000* (189).

El gen *aac(6')-Ie* constituye la porción amino terminal de la denominada enzima bifuncional AAC(6')+APH(2"). Este enzima es habitual en gram positivos y solo recientemente se ha podido localizar en gram negativos (116,189,208).

Los genes *aac(6')-Ig*, *aac(6')-Ih* y *aac(6')-Ij* se han clonado de *Acinetobacter spp* (114,115,189). El gen *aac(6')-Ig* es cromosómico en *Acinetobacter haemolyticus* BM2685 y puede por tanto usarse para la identificación sp mediante "dot blot" de la especie (114). Los genes *aac(6')-Ij* y *aac(6')-Ih* fueron clonados de *Acinetobacter* 13BM2689 y de *Acinetobacter baumannii* BM2686 respectivamente. El primero es cromosómico y su secuencia de 441 bp codifica una proteína de 16.698 Da. El segundo se localizó en un plásmido no conjugativo de 13.7 Kb y su proteína es de 16.677 Da.

El gen *aac(6')-Ii* fue clonado de *E. faecium* (115,189) y el gen *aac(6')-If* de *Enterobacter cloacae* (189).

• AAC(6')-II.

Su patrón de resistencia a Gm, Tm, Dbk, Net, 2'-Net, 5-epi y Sis, se ha observado principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* (53,186,189).

Se han clonado dos genes, *aac(6')-IIa* y *aac(6')-IIb* (116,189).

Existe una importante diferencia en su capacidad de modificación, entre las acetilasas AAC(6')-I y AAC(6')-II. Mientras que AAC(6')-I modifica la An y no la Gm, la AAC(6')-II modifica la Gm pero no la An (116,186,187,189,208). A pesar de esta diferencia existe un porcentaje de homología del 74% en la secuencia nucleotídica de los genes *aac(6')-IIa* y *aac(6')-Ib*. La comparación de las proteínas deducidas muestra que son similares en un 82% (175).

El resultado del intercambio de dominios que se establece cuando se crean híbridos fusionando las regiones 5' del gen *aac(6')*-I y la región 3' del gen *aac(6')*-II y al contrario es decir 5' *aac(6')*-II/*aac(6')*-I 3' ha demostrado que los aminoácidos de la región carboxiterminal son los responsables de la especificidad de sustrato del enzima.

El análisis de la secuencia nucleotídica de mutantes espontáneos con especificidad alterada es decir, mutantes que a pesar de poseer el gen *aac(6')*-I muestran un fenotipo de *AAC(6')*-II revela que distintos cambios de bases causan la misma sustitución de un aminoácido, una leucina por una serina en la posición 119. Esta sustitución se presenta de forma natural en la proteína *AAC(6')*-II. Usando mutagénesis directa con oligonucleótidos con el fin de producir el mismo cambio de aminoácido (Ser→Leu) en la proteína *AAC(6')*-II se demostró un cambio en la especificidad ya que la proteína pasó a presentar el fenotipo *AAC(6')*-I (116,175).

Lambert, T. y col., han aislado un gen *aac(6')*-Ib' de la estirpe *Pseudomonas fluorescens* BM 2687 (116). La cepa modificaba escasamente la amikacina (20%) y el gen poseía una única mutación puntual en 757 de la cadena nucleotídica. A partir de los datos obtenidos estos autores postulan, que la identificación fenotípica o por medio de hibridación con sondas específicas de los fenotipos *AAC(6')*-I y *AAC(6')*-II es de escasa validez dada la elevada homología que existe entre los genes *aac(6')*-Ib y *aac(6')*-IIa (116,205). Desarrollan además, un método de identificación por PCR que utiliza "primers" o cebadores específicos para cada gen.

AAC(2').

Se aisló originalmente de una cepa de *Providencia stuartii* que también producía la endonucleasa Pst I (45).

Los aislados que presentan este enzima, son resistentes a Gm, Tm, Net, Nm, Dbk, Sis y Lm (189).

En *Providencia* el gen responsable es cromosómico mientras que Davies y Smith descubrieron

el gen plasmídico en *Proteus* (169). El enzima AAC(2') parece estar restringida al grupo *Providencia* / *Proteus* aunque también se ha encontrado en *Pseudomonas* (169,189).

El gen *aac(2')*-Ia fue clonado de *Providencia stuartii*. El gen posee una única secuencia de lectura abierta que codifica una proteína de 179 aminoácidos.

3.4. Adenilasas.

Las adenilasas u O-nucleotidiltransferasas (AAD o ANT) catalizan la transferencia de nucleótidos a un grupo hidroxilo en los aminoglicósidos susceptibles. Pueden modificar las posiciones 2''-, 3''-, 6-, 9- y 4-.

ANT(2'').

- ANT(2'')-I.

La actividad ANT(2'')-I fue descrita por Benveniste y Davies en un plásmido de una cepa de *Klebsiella* resistente a Gm, Tm y Km (45,169). El enzima utiliza como cofactores tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos. Se ha encontrado también en los transposones *Tn* 1700 y *Tn*732 y en distintos plásmidos de *Serratia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Citrobacter* y *E. coli* (68,189).

Los aislados portadores de este enzima se caracterizan por presentar un fenotipo de resistencia a la Gm, Tm, Dbk, Sis y Km. No modifica a la Isepamicina (Ise), An y Net a pesar de que estos antibióticos poseen un grupo hidroxilo en 2''. Esto se debe, a que poseen sustituyentes en el grupo amino en posición 1 que producen impedimentos estéricos que o bien impiden o bien disminuyen la tasa de modificación. (142)

ANT(3'').• **ANT(3'')-I.**

Caracterizada por Umezawa y col. (48), confiere resistencia únicamente a la estreptomicina (Sm) y a la espectinomicina (Spcm) ya que modifica los grupos 3'' hidroxilo de la estreptomicina y 9' hidroxilo de la espectinomicina (45,187). Se ha encontrado en plásmidos y en los transposones *Tn4*, *Tn21*, *Tn2425* y *Tn7* (19,45).

ANT(4').

Los enzimas adenilantes en la posición 4' fueron descritos inicialmente por Kayser y col., en *Staphylococcus*.

• **ANT(4')-I.**

Las adenilasas ANT(4')-I, modifican también los grupos 4''-hidroxilo en la posición ecuatorial de algunos antibióticos como la Dbk (67). También es denominada ANT(4',4'').

Presenta un fenotipo de resistencia a la Tm, An, Isep y Dbk. El enzima ANT(4')-I se aísla preferentemente en gram-positivos de donde se ha clonado el gen *ant(4')-Ia*. (189)

En 1989, Kettner y col. detectaron actividad ANT(4',4'') en *Enterobacterias* (96).

• **ANT(4'')-II.**

Modifica la Tm, An e Isep. No modifica los grupos 4''-hidroxilo de la Dbk (96,189).

El gen *ant(4'')-IIa* fue encontrado y clonado de un aislado de *Pseudomonas aeruginosa* en 1981 (190).

Show y col. comprobaron que no existía homología en la secuencia de los genes *ant(4')-Ia* y *ant(4'')-IIa*. El primero hibridaba exclusivamente con aislados gram positivos y el segundo con gram negativos.

Las sondas desarrolladas a partir de los dos genes clonados no hibridaron con algunos de los aislados que presentaron el fenotipo ANT(4',4'') lo que indica la probable existencia de al menos un

tercer gen (45,187).

ANT(6).

- ANT(6)-I.

Kawabe y col., detectaron la actividad adenilante en posición 6 en aislados de *Staphylococcus aureus* resistentes a la estreptomicina (189).

Se ha clonado el gen ant(6)-Ia.

ANT(9).

- ANT(9)-I.

Fue inicialmente descrita por Le Blanc y col.. La presencia del enzima únicamente produce resistencia a la espectinomicina (Spcm).

El gen fue aislado de un transposon el *Tn554* de *Staphylococcus aureus* 1206. (45). Su secuencia es similar en un 34% con la secuencia ANT(3'')-I.

Se ha detectado también en *Pseudomonas aeruginosa*

4.4. Fosforilasas.

Modifican los aminoglicósidos susceptibles transfiriendo grupos fosforilo a los grupos hidroxilo en las posiciones 3', 2'', 3'', 5'', 6 y 4. Probablemente son los enzimas modificadores de mas amplia distribución (12,45).

APH(3').

Modifican el grupo 3'-hidroxilo de la aminohexosa de la Kanamicina (Km), Neomicina (Nm) y antibióticos relacionados y el grupo 5'' -hidroxilo de la lividomicina (Lm).

Se han identificado siete isoenzimas distintas según su especificidad de sustrato y secuencia génica (45,189).

• **APH(3')-I.**

Su actividad fue descrita por Umezawa y col. en una estirpe de *E. coli* que portaba un plásmido de resistencia de *Shigella sonnei* (128,211). Doi y col., la identificaron también en *Pseudomonas aeruginosa*.

El enzima APH(3')-I modifica la Km, Nm, Pm, Rm, Lm, GmB pero no la Bm ni la Isep. Se ha encontrado en Enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Campylobacter*, *Haemophilus* y *Acinetobacter* pero no en gram positivos (169).

Se han clonado tres genes distintos. El gen *aph(3')-Ia* del transposón *Tn903*, el gen *aph(3')-Ib* del plásmido RP4 y el gen *aph(3')-Ic* de *klebsiella pneumoniae*. Los genes *aph(3')-Ia* y *aph(3')-Ic* son prácticamente idénticos, diferenciándose únicamente en siete nucleótidos. La sonda desarrollada a partir del gen *aph(3')-Ia* hibrida con el 90.5% de las cepas resistentes a la Nm y Km (189).

• **APH(3')-II.**

La actividad que caracteriza a este enzima fue identificada por Yagisawa y col. en *E. coli* JR66/W677 e independientemente por Brezzinska y Davies en *Pseudomonas aeruginosa* H9, B13 y Ps49 (128,161).

Los aislados productores de APH(3')-II, modifican la Km, Nm, Pm, Rm y Gm. También modifican a la An y Bm pero sin producir resistencia (189).

Se ha encontrado en *P. aeruginosa*, Enterobacterias, *Acinetobacter* y en *Bacillus circulans* y, aunque se ha descrito actividad APH(3')-II desde 1975, su incidencia es en general escasa en cepas clínicas (70,189).

Okii y col. demostraron en 1983 que el gen responsable se encontraba en el cromosoma de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO) entre los loci *trp-6* y *pro-82*. El gen denominado *aphA* es originariamente metabólico en *Pseudomonas aeruginosa* (161).

El gen *aph(3')-IIa* fue clonado del trasposón *Tn5* (137). Recientemente (1996), se ha clonado y caracterizado un nuevo gen *aph(3')-IIb* de *P. aeruginosa* 005. Este último codifica una proteína de 268 aminoácidos que presenta un 57% de identidad y un 66.5% de similaridad con la proteína APH(3')-II de *Tn5*. Se cree que es este el gen, responsable de la resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* a la Kanamicina (70).

Mediante el método radioenzimático usado para la detección de enzimas modificadores, la actividad APH(3')-I, se define como la capacidad de incorporación de ^{32}P desde el ATP a la lividomicina en presencia del enzima. La actividad detectada para la lividomicina ha de ser a un nivel de cinco a diez veces mayor que para la butirosina. La actividad APH(3')-II, es justo al contrario. Cuando la actividad es similar se interpretaba que coexistían ambos enzimas o bien el enzima APH(3')-III. El uso de sondas ha permitido comprobar que esta interpretación era incorrecta. En numerosos aislados de este tipo se ha comprobado que solamente se encontraba el gen del enzima APH(3')-I (223).

Se han desarrollado sondas a partir de los genes clonados APH(3')-I de *Tn* 903 y APH(3')-II de *Tn5* (3). Cuando estas sondas se usaron frente a aislados de *Pseudomonas aeruginosa* se comprobó, que no había hibridación en un cierto porcentaje de las cepas clasificadas mediante el método radioenzimático como portadoras de actividad APH(3')-I y/o APH(3')-II (223). Esto se debe a la presencia de más de un gen estructural en *P. aeruginosa*. En este sentido Matsushashi y col. ya habían puesto de manifiesto, diferencias en peso molecular, comportamiento cromatográfico, pH óptimo y constante de inhibición, entre los enzimas APH(3')-I de *E. coli* RII-2, *P. aeruginosa* TI-13 y *P. aeruginosa* B 13.

• APH(3')-III.

Su actividad fue caracterizada por Umezawa y col., en 1975 en *Pseudomonas aeruginosa*.

El enzima APH(3')-III, modifica los grupos 3'-hidroxi de la Km, Nm, Pm, Rm, Lividomicina (Lm), Butirosina (Bm) y GmB y también modifica, aunque a bajo nivel y sin producir resistencia, la An



e Ise (189).

Se detecta habitualmente en gram positivos aunque también se ha identificado en *Campylobacter* spp y *Pseudomonas aeruginosa* (45).

El gen aph(3')-IIIa se ha clonado y secuenciado de plásmidos conjugativos de *Staphylococcus aureus* y de *Streptococcus faecalis* y en el transposón Tn1545 de *Streptococcus pneumoniae*. (189,209).

• APH(3')-IV.

Herbert y col., detectaron esta actividad en *Bacillus circulans* productor de butirosina.

La distribución de la actividad APH(3')-IV no ha sido estudiada.

Los aislados portadores del enzima presentan un fenotipo de resistencia a la Km, Nm, Pm, Rm y Bm. No fosforila la Gm ni la Ise.

Se ha clonado el gen aph(3')-IV de *Bacillus circulans*.

• APH(3')-V.

Se ha encontrado en *Streptomyces fradiae* productor de la Neomicina. El enzima modifica la Nm, Rm y Pm.

No se ha examinado su distribución en otros microorganismos.

Partiendo de aislados de *Streptomyces* se han clonado tres genes. El gen aph(3')-Va de *Streptomyces fradiae*, el gen aph(3')-Vb de *Streptomyces ribbosidificus* y el gen aph(3')-Vc de *Micromonospora chalcea*.

• APH(3')-VI.

Su actividad fue descrita por Lambert y col..

Las cepas portadoras son resistentes a la Km, Nm, Pm, Rm, Bm, GmB, An e Ise.

Se han clonado los genes aph(3')-VIa de *Acinetobacter baumannii* (113) y aph(3')-VIb de *K. pneumoniae*. La sonda desarrollada a partir del gen clonado aph(3')-VIa hibrida con el 82.7% de los aislados que expresan este fenotipo (113).

• APH(3')–VII.

Los aislados que poseen este enzima, son resistentes a la Km, Nm e in vitro a la An.

El gen *aph(3')–VIIa* ha sido clonado de *Campylobacter jejuni* (189,203).

APH(2'').

La actividad del enzima fosforilasa APH(2'') va siempre unida a la del enzima AAC(6') en el enzima bifuncional AAC(6')+ APH(2''). Fue aislada por Dowding y col. en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la Gm (45).

Las cepas que poseen el enzima bifuncional son resistentes a la Gm, Tm, Km y también, aunque en menor medida, a la Sis, An y Net (207).

La actividad APH(2''), puede separarse de la acetilante mediante electroforesis en gel de acrilamida (45).

APH(3'').**• APH(3'')–I**

Fue caracterizada por Ozanne y col. (207).

Modifica el grupo 3''–hidroxi de la estreptomicina.

El gen *aph(3'')–I* se clonó de una cepa de *Streptomyces griseus* N 2–3–11 (Tn 5) productora de estreptomicina.

Existen también dos genes de resistencia a estreptomicina denominados *strA* y *strB* clonados del plásmido RSF1010. Scholz y col. han comprobado que la proteína producida por *strA* es idéntica en un 50% con la proteína *aph(3'')–Ia*.

APH(6).• **APH(6)–I.**

Modifica el 6–hidroxi del grupo estreptidina de la estreptomicina (45).

El gen *aph(6)–Ia* se ha clonado de *Streptomyces griseus* N 2–3–11 (productor de estreptomicina), el gen *aph(6)–Ib* de *Streptomyces glaucescens* (productor de hidroxiestreptomicina) y el gen *aph(6)–Ic* del transposón *Tn 5*. Existe un cuarto gen *aph(6')–Id* que puede estar relacionado con el gen *strB*.

APH(4).• **APH(4)–I.**

Las cepas productoras son resistentes a la higromicinaB (*hygB*).

Este enzima fue aislado por vez primera de *Streptomyces hygroscopicus*. También de *E. coli* por Rao y col..

Se han clonado dos genes *aph(4)–Ia* de una cepa de *E. coli* portador del plásmido pJR225 y *aph(4)–Ib* de *Streptomyces hygroscopicus* (189).

4.5. Origen de los genes de resistencia a aminoglicósidos. Evolución.

En microorganismos productores de antibióticos aminoglicósidos, los genes de resistencia, constituyen un mecanismo de autoprotección. En este sentido, estos genes probablemente ya existían y su evolución evitaría el suicidio celular (63,189). De hecho, distintos genes de resistencia se han clonado de microorganismos productores de antibióticos: *aph(3')–Va*, *aph(3')–Vb*, *aph(3')–Vc*, *aac(3)–VIIa*, *aac(3)–VIIIa*, *aac(3)–Ixa* y *aac(3)–Xa*. Otros, como el gen *aph(6)–Ia* están genéticamente ligados a genes que codifican los enzimas involucrados en la síntesis de aminoglicósidos (189).

Estos microorganismos constituirían además, el origen de la diseminación de los genes de

resistencia. En aislados productores de aminoglicósidos, se encuentran mecanismos de resistencia de cepas clínicas y viceversa aunque existen excepciones, como ocurre con las adenilasas, que no se encuentran en microorganismos productores (63).

Una segunda aproximación al origen de los genes de resistencia a aminoglicósidos considera que estos surgieron por derivación de genes del metabolismo bacteriano. La presión selectiva, originada por la presencia de antimicrobianos, produciría mutaciones que alterarían la expresión normal de estos enzimas, resultando en la habilidad de modificar aminoglicósidos. Ejemplo de esto es el gen *aac(6')-Ic* de *Serratia marcescens* ya que por estudios de hibridación, se observa que el gen está presente en todos los aislados de *Serratia*, independientemente de su perfil de resistencia (63,189).

El número creciente de genes de resistencia a aminoglicósidos secuenciados y de proteínas analizadas, ha permitido esclarecer las relaciones evolutivas entre ellos. A través del análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican, se ha establecido una clasificación en siete subfamilias que presentan una gran homología:

1.- Las fosforilasas APH(3').

Las fosforilasas APH(3') se caracterizan por poseer tres dominios funcionales altamente conservados relacionados con la transferencia catalítica del fosfato terminal, con el sitio de unión a nucleótidos y con la hidrólisis del ATP (189).

2.- AAC(6')-Ib, AAC(6')-IIa, AAC(6')-IIb y AAC(6') de la enzima bifuncional AAC(6')+APH(2'').

Entre los genes *aac(6')-IIa* y *aac(6')-IIb* la secuencia es similar solamente en un 66%, si embargo, las proteínas son idénticas en un 80%. Entre los genes *aac(6')-Ib* y *aac(6')-IIa* el porcentaje de homología en la secuencia nucleotídica, se eleva a un 74% y las proteínas son similares en un 85%. La sonda elaborada a partir del gen clonado *aac(6')-Ib*, se utiliza en la práctica para detectar, por hibridación, el gen *aac(6')-IIa*, en los aislados que expresan el fenotipo AAC(6')-II (141).

3.- ANT(9) y ANT(3'').

4.- AAC(3)-Ia y AAC(3)-Ib.

5.- Enzimas APH(6')-I.

6.- AAC(6')-Ic, AAC(6')-Id, AAC(6')-If y puromicín acetiltransferasas (PUAT) (188)

7.- Enzimas AAC(3).

Se ha observado que las acetilasas AAC(3) poseen secuencias altamente conservadas, en las proteínas, que permiten una subdivisión en tres grupos. Las acetilasas AAC(3)-VIIa, AAC(3)-VIIIa, AAC(3)-IXa y AAC(3)-Xa derivadas de *Actinomyces*. Las acetilasas AAC(3)-IIa y AAC(3)-IIb (los genes son prácticamente idénticos) y la acetilasa AAC(3)-VIa. Por último, los enzimas AAC(3)-III todas producidas a partir de genes clonados de *Pseudomonas* (189).

4.6. Métodos para la detección de enzimas modificadores.

4.6.1. Métodos para la detección de enzimas.

El método mas simple de detección es el ensayo microbiológico. Un extracto celular se incuba en presencia de un aminoglicósido, buffer y cofactor. Se trata de medir la actividad modificadora residual por test de sensibilidad en disco. Presenta numerosos problemas, entre otros que no permite distinguir adeniltransferasas de fosfotransferasas y que la modificación no siempre conlleva la aparición de resistencias (29).

Se han desarrollado diversos métodos espectrofotométricos para la detección de cada mecanismo de modificación. Son métodos muy laboriosos y poco utilizados para la detección de enzimas cuando se trata de un elevado número de aislados. Sin embargo han sido empleados por distintos autores en la determinación de valores de cinética para estos enzimas, especialmente adenilasas.

El método desarrollado por Ozanne y col. en 1969 de detección radioenzimática es el mas

utilizado. Se basa en la unión de aminoglicósidos modificados o sin modificar, a papel de fosfocelulosa, debido a la carga positiva del antibiótico. El ensayo utiliza como cofactores [^{14}C] acetato, [^{14}C] ATP, [^{32}P] ATP y consiste en medir la transferencia de actividad desde el cofactor marcado al antibiótico que quedará posteriormente fijado al papel de fosfocelulosa. Una variación de este método, consiste en pasar la mezcla de reacción a través de Amberlita CG-50 de intercambio catiónico y fue utilizada por Matsushashi para la determinación de la K_m de la APH(3') (29,45,210).

4.6.2. Antibiogramas.

La identificación de enzimas modificadores mediante el patrón de resistencia que se obtiene por antibiograma es un método utilizado por diversos autores en distintos estudios epidemiológicos (9, 44, 138,139,140,187,191).

El antibiograma es útil si el aislado que se examina produce un único enzima modificador y si se dispone de una gran variedad de discos de antibióticos aminoglicósidos, que permitan caracterizar patrones de resistencia difíciles de diferenciar. Si la cepa produce más de un enzima, la interpretación se complica (44,142).

Por ejemplo, con discos de estreptomomicina y espectinomomicina puede discriminarse a los enzimas APH(3'') de ANT(3'') y de la fosforilasa APH(6) de *Pseudomonas aeruginosa*. El patrón de resistencia K_m^R , N_m^R y L_m^R es característico del enzima APH(3')-I, si en lugar de la L_m , la resistencia es a B_m entonces se trata del enzima APH(3')-II. Sin embargo, si el patrón de resistencia es a la K_m , N_m , L_m y B_m , entonces puede tratarse del enzima APH(3')-III o de la presencia en un mismo aislado de los enzimas APH(3')-I y APH(3')-II. Para diferenciar se utiliza un disco de bleomicina ya que, únicamente el enzima APH(3')-II, es resistente a este antibiótico. La acetilasa AAC(3)-I produce un patrón de resistencia a la G_m , Sis y A_{stm} mientras que la AAC(3)-II a la G_m , Sis , K_mA , T_m , Dbk y Net . La AAC(3)-III además a la 5-episisomicina. La estrategia es similar con el resto de las

fosforilasas, adenilasas y acetilasas (44,137,191).

4.6.3. Detección del mecanismo de resistencia mediante el fenotipo de resistencia.

El uso de antibiogramas para la identificación de enzimas modificadores no solo se complica cuando existe más de un único enzima. Además, su interpretación varía, dependiendo de la susceptibilidad relativa de distintos aislados a un mismo antibiótico y de un mismo aislado con respecto a varios antibióticos.

Se ha desarrollado un sistema que utiliza doce discos de aminoglicósidos que están cargados de tal forma que se compensan las diferencias individuales en la susceptibilidad con respecto a cada uno de estos antibióticos. La carga de los discos varía entre 10 y 100 µg. (142).

Los discos se han elegido de manera que permitan caracterizar no solo el patrón de resistencia que produce un determinado enzima si no además, las combinaciones de enzimas más frecuentes que caracterizan a un determinado género y la resistencia por permeabilidad.

Los antibióticos utilizados son la Apramicina (Apra), Astromicina (Astm), 6'-Netilmicina (6'-Net), 2'-Netilmicina (2'-Net), Gentamicina (Gm), Tobramicina (Tm), Amikacina (An), Isepamicina (Isep), Netilmicina (Net), 5-episisomicina (5-epi), Kanamicina (Km) y Neomicina (Nm).

Los discos de Gm, Tm, Dbk y Km permiten la identificación de adenilasas. La ANT(2'')-I es la causa más común de resistencia a los antibióticos anteriores en *Enterobacterias* y en *Pseudomonas*. La ANT(4')-II es mucho menos frecuente y de los aminoglicósidos utilizados solamente la Tm, An, Isep y Km poseen grupos hidroxilo en 4' (63,64,142,189).

Todas las fosforilasas APH(3') tienen la capacidad de modificar la Km y Nm. De entre los siete isoenzimas caracterizados únicamente la APH(3')-I y APH(3')-II son habituales en gram negativos. El resto se encuentran, habitualmente, en gram positivos [APH(3')-III], en *Bacillus* y *Streptomyces* [APH(3')-IV y V], en *Acinetobacter* [APH(3')-VI] y en *Campylobacter* [APH(3')-

VII]. Las APH(3')-I y II pueden entonces diferenciarse además de por su habilidad de modificar la Km y la Nm por sus diferentes susceptibilidades frente a Lm y Bm (64,142).

La acetilasa AAC(2') modifica el grupo amino en 2'- de la Tm, Net, y Dbk y se encuentra preferentemente en *Providencia stuartii* (142,189).

Las acetilasas AAC(6')-I modifican todos los aminoglicósidos con grupos amino primarios en esta posición salvo la Isep. La Gm es una mezcla de tres componentes GmC₁, GmC_{1a} y GmC₂, la GmC₁ posee sin embargo un grupo amino secundario en 6'- y no es por tanto modificada, lo que se utiliza para caracterizar a este enzima. Por el contrario la acetilasa AAC(6')-II puede acetilar la Gm, Tm, Net, Km y Dbk pero no la An e Isep. Esta importante diferencia permite distinguir a ambas acetilasas (64,142,189).

Las acetilasas AAC(3) pueden también diferenciarse por su fenotipo. La AAC(3)-I modifica la Gm y Astm, la AAC(3)-II la Gm, Tm, Net y la 2'-Net y 6'-Net. La AAC(3)-III puede modificar la Gm, Tm y Km, y es además, la única que modifica la 5-episisomicina. La AAC(3)-IV modifica la Gm, Tm y Net, y también a la Apra, 2'-Net y 6'-Net. La AAC(3)-VI modifica la Gm, Tm y Net y solamente la 6'-Net lo que permite diferenciarla de la AAC(3)-III y IV (142).

4.7. Detección de genes de resistencia.

4.7.1. Sondas.

El disponer de un número creciente de genes de resistencia a aminoglicósidos, clonados en vectores plasmídicos, ha permitido desarrollar sondas a partir de cada uno de ellos (3,4,11,68,167,204,205,206,223).

Mediante el uso de sondas que hibridan específicamente frente a estos genes, se podría evitar la aplicación de otros métodos que, como el radioenzimático, son más laboriosos e implican la utilización

de radioisótopos. Se evitaría además la aparición de falsos positivos.

La metodología mas empleada consiste en fijar el ADN de las cepas de interés a filtros de nitrocelulosa mediante “dot blotting”. El ADN fijado y desnaturalizado se hibrida con la sonda marcada en condiciones mas o menos rigurosas, dependiendo de la especificidad de la sonda. Se realizan varios lavados y la sonda quedará unida a su secuencia complementaria, revelando la presencia del gen.

Su empleo en epidemiología molecular es cada vez mayor y ha permitido conocer que enzimas se encuentran de forma característica en distintos géneros e incluso a nivel de algunas especies de microorganismos (68,140,141,138,139,187,191,206,223).

4.7.2 PCR.

La aparición de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ha significado una autentica revolución tanto en la investigación como en el diagnóstico clínico. Es un método rápido, con una elevada especificidad y sensibilidad, mayor aún que la que se obtiene mediante el uso de sondas.

Una vez que se conoce la secuencia de un gen, se pueden entonces desarrollar primers o cebadores específicos de esa secuencia y amplificarlos por PCR.

Se han descrito varios protocolos de amplificación de genes de resistencia a aminoglicósidos, tanto para gram negativos como para gram positivos, fundamentalmente las isoenzimas AAC(3), algunas adenilasas y el enzima bifuncional (212).

Lambert y col., describieron los cebadores utilizados en las amplificaciones que permiten diferenciar los genes *aac(6')-Ib* y *aac(6')-IIa* (116).

5. GENÉTICA.-

5.1. Bases genéticas de la resistencia a antibióticos.

La variabilidad genética en las bacterias se origina por la aparición de mutaciones puntuales (cambios microevolutivos), o por grandes reordenamientos génicos: deleciones, inserciones y transposiciones (cambios macroevolutivos), mediados en su mayoría por elementos génicos transponibles o a través de la herencia de ADN exógeno adquirido por conjugación, transducción y, en menor medida, por transformación (85,83,95).

5.2. Mutaciones puntuales.

Las mutaciones puntuales o mutaciones que afectan únicamente a un par de bases en la secuencia del ADN cromosómico bacteriano producen, por lo general, proteínas u otras macromoléculas alteradas pero habitualmente funcionales (46).

Se han descrito en aislados resistentes a aminoglicósidos mutaciones puntuales que afectan o bien al sistema de transporte del antibiótico al interior celular o la diana de los mismos, es decir, los ribosomas (2,24,28,118,184).

Algunas de estas mutaciones se encuentran muy bien caracterizadas como es el caso, por ejemplo, de las mutaciones que confieren alto nivel de resistencia a la estreptomicina *rpsL* (*strA*) en *E. coli* (proteína ribosomal S12) y *strB* también en *E. coli* (29,53).

En *Pseudomonas aeruginosa* también se han caracterizado este tipo de mutaciones. No siempre implican un único suceso mutacional. Por ejemplo, la mutación L6 asociada a una mutación en el sistema de transporte es responsable de niveles de resistencia elevados a la Gm. También se ha comprobado en *Pseudomonas aeruginosa*, la presencia de mutaciones que afectan únicamente al

sistema de transporte del antibiótico al interior celular como las defectivas en nitrato reductasa o en citocromo c-552 (2,24,25,26,27).

5.3. Transferencia de información genética entre bacterias.

5.3.1. Conjugación.

Durante la conjugación una cadena de ADN de una cepa donadora se transfiere a la célula receptora en donde se utilizará para la síntesis de la cadena complementaria (83,85,95).

La conjugación fue primeramente descrita en *E. coli*, mediada por los denominados factores de fertilidad, factores sexuales o plásmidos F. En *E. coli* la integración del plásmido F en el cromosoma genera cepas Hfr, que se caracterizan por presentar, una elevada frecuencia de transmisión de marcadores cromosómicos.

Mediante la conjugación una cepa donadora puede transferir a una receptora ADN plasmídico (todo o solo algunos marcadores) o bien mediante la integración del plásmido en el cromosoma, marcadores cromosómicos y, en último lugar, el propio plásmido.

En *Pseudomonas aeruginosa*, los primeros plásmidos conjugativos descubiertos, fueron los factores de fertilidad a los que se denominó FP para diferenciarlos de los de *E. coli*. Otros plásmidos conjugativos son la mayoría de los plásmidos de resistencia o plásmidos R y algunos metabólicos.

La transferencia por conjugación de plásmidos de resistencia o plásmidos R constituye un método eficaz de diseminación de genes de resistencia a antibióticos (101,110,129,152).

Para que un plásmido sea conjugativo ha de poseer, además de los genes para la replicación autónoma, genes que especifiquen y regulen la maquinaria de transferencia (genes tra) que son los encargados de formar unos apéndices especiales denominados “pili”, involucrados en la transferencia. Puesto que se requiere una serie mínima de genes, un plásmido conjugativo, debe tener un tamaño que

no puede ser menor de 20×10^6 daltons. Los plásmidos más pequeños aunque pueden detectarse por métodos físicos o por su fenotipo, no suelen ser conjugativos.

Se han desarrollado numerosos sistemas que permiten conjugar cepas de interés. Se suelen utilizar huéspedes o receptores deficientes para la recombinación rec^- ya que no es necesaria la integración del plásmido para su mantenimiento.

En *Pseudomonas aeruginosa* se han desarrollado diversos sistemas de conjugación especialmente para mapeo cromosómico (83,84,85,86,95). En estos sistemas donador y receptor han de ser compatibles ya que uno de las dos cepas utilizadas (donadora y/o receptora), puede producir una bacteriocina o ser lisogénica para un determinado bacteriófago, que puede ser letal para el otro miembro del par. En la práctica se suelen utilizar varias cepas receptoras antes de afirmar que un plásmido es no conjugativo (33).

a.- Plásmidos de *Pseudomonas*.

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que presentan una replicación autónoma es decir, independiente del cromosoma bacteriano. A pesar de que no se consideran esenciales para las células portadoras ya que no aportan funciones vitales, si lo son bajo determinadas condiciones.

En *P. aeruginosa* se han descrito cuatro tipos de plásmidos: los factores de fertilidad, los plásmidos de resistencia o plásmidos R, los plásmidos metabólicos y los plásmidos crípticos (5,33,101,110,152).

• Factores de fertilidad. Plásmidos FP.

Los factores de fertilidad o factores sexuales fueron los primeros plásmidos descubiertos en *Pseudomonas aeruginosa*. El fenotipo asociado a la presencia de estos plásmidos es la habilidad que

confiere a la cepa portadora de actuar, durante la conjugación, como donadora de marcadores del cromosoma bacteriano, abreviadamente actividad Cma (chromosome mobilizing ability) (95).

Los distintos factores de fertilidad o plásmidos FP que se han ido describiendo, actúan siempre como donadores del cromosoma de *Pseudomonas* a partir de un único punto que es idéntico en todos los plásmidos FP con la excepción de FP39 y FP110. Esta característica ha contribuido a diferenciarlos puesto que poseen pocos rasgos fenotípicos distintivos propios.

Se ha estimado que existen 1 o 2 plásmidos FP por célula.

El descubrimiento de plásmidos FP en *Pseudomonas*, permitió el establecimiento de mapas genéticos mediante la técnica de apareamientos interrumpidos, principalmente, en las cepas PAO y PAT de *Pseudomonas aeruginosa* (33,47,83,86,95). Los más utilizados fueron los plásmidos FP2 (Cma, Hg^R), FP39 (Cma, leu⁺ supr), FP5 (Hg^R), FP110 (187) y el plásmido híbrido R68.45 (84,150) con características de movilidad aumentadas (Ecm). R68.45 no es un factor de fertilidad.

Al contrario que en *E. coli* en *Pseudomonas aeruginosa* no se han detectado cepas Hfr ya que ni los plásmidos FP ni los plásmidos con actividad Ecm como R68.45 se integran en el cromosoma con lo que la eficacia del mapeo con este tipo de plásmidos fue mucho menor (201). Hasta el año 1981 no pudo establecerse, genéticamente, la circularidad del cromosoma de *P. aeruginosa* PAO (183).

Experimentalmente se ha comprobado que algunos plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad P-1, IncP-1, sobre todo los portadores del transposón *Tn2521*, pueden integrarse en el cromosoma de *Pseudomonas*, creando cepas con características Hfr (Hfr-Like) (84,85).

Existen diversos métodos para caracterizar plásmidos FP. El más habitual requiere del aislamiento de numerosos auxótrofos que provean de marcadores contraselectivos frente a los de las cepas que se quieren examinar (47).

- **Plásmidos de Resistencia.**

Estos plásmidos se encuentran ampliamente distribuidos entre distintos géneros y su frecuencia y características dependen normalmente de la localización geográfica (46,33,103,104).

La mayoría de los enzimas modificadores de aminoglicósidos presentan una codificación plasmídica. Los plásmidos de resistencia constituyen la forma más habitual de herencia de este tipo de genes de resistencia (5,46,110).

En *Pseudomonas aeruginosa* se han caracterizado numerosos plásmidos de resistencia codificadores de enzimas modificadores con actividad tanto acetilante como adenilante o fosforilante (57,93,103,104,124,136,162,163,164).

Sin embargo, en *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que la frecuencia estimada de plásmidos FP es del 20–30% la frecuencia de plásmidos R es mucho menor y varía entre el 2% (182) y el 6–11% en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas (95). Sinclair y Holloway analizaron más de 3000 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, encontrando que únicamente el 1% de los plásmidos R eran transferibles por conjugación. En el 80% de las cepas con resistencias múltiples, la transmisión por conjugación no pudo ser detectada. Esto se debe o bien a la existencia de plásmidos deficientes para la conjugación, o bien a que los determinantes de resistencia se encuentran localizados en el cromosoma (193).

Se ha comprobado que en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras de plásmidos de resistencia a aminoglicósidos, existe una pérdida de correlación entre el patrón de resistencia a aminoglicósidos y la actividad enzimática que se encuentra en los extractos celulares. Esto es indicativo del importante papel que juega la permeabilidad de la membrana incluso en cepas productoras de enzimas modificantes (93,174).

En *Pseudomonas aeruginosa* también se han descrito plásmidos de resistencias a aminoglicósidos no asociados con la producción de enzimas modificadores, especialmente a Sm y Km (29,46).

Así mismo, es característico de los plásmidos de resistencia de *Pseudomonas* la dificultad de su aislamiento debido a que algunos son demasiado grandes para que tengan éxito las técnicas de extracción habituales (82,95). Chakrabarty y col., suponen además, que algunos plásmidos de *Pseudomonas* permanecen asociados a membranas o al ADN cromosómico lo que contribuye a aumentar la dificultad de su aislamiento (83,136).

Al igual que los plásmidos FP, los plásmidos R poseen cierta capacidad de movilizar el cromosoma. Sin embargo, las frecuencias de transferencia de marcadores cromosómicos, son demasiado bajas como para resultar útiles en la práctica.

- **Plásmidos metabólicos.**

Son plásmidos implicados en la degradación de compuestos orgánicos complejos. Algunos como los plásmidos NAH (degradación del naftaleno), SAL (degradación de salicilatos) o CAM son conjugativos; otros como los plásmidos OCT (n-octano), XYL (p o m-xileno) o TOL (p o m-tolueno) no son conjugativos.

- **Plásmidos crípticos.**

En *Pseudomonas aeruginosa* se han podido caracterizar pequeñas moléculas de ADN circular y sin función conocida. Su tamaño oscila entre 1Mdal. y 6Mdal.

b.- Criterios de clasificación plasmídica.

Uno de los criterios mas usados en la clasificación de plásmidos, hace referencia a la capacidad o no que tienen dos plásmidos determinados de coexistir en el mismo hospedador.

Se dice que dos plásmidos son compatibles si pueden coexistir en la misma célula; en caso contrario son incompatibles. Esta característica permitió el establecimiento de agrupaciones de plásmidos clasificados en distintos grupos de incompatibilidad o Inc.

En *Pseudomonas aeruginosa* se han establecido más de trece grupos de incompatibilidad. Normalmente los plásmidos que pertenecen a un mismo grupo de incompatibilidad presentan propiedades fenotípicas comunes, poseen además una cierta homología en su secuencia y tienen un peso molecular similar (61,88,90,94,151,182).

c.- Curación.

En ocasiones ocurre que, durante la replicación bacteriana, el ADN plasmídico no se segrega a una de las células hijas que pierde por tanto, la información codificada en el plásmido. Este proceso se denomina curación (83,95).

Aunque la curación es un fenómeno que sucede de forma espontánea, determinados agentes químicos que interfieren con la replicación del ADN, aumentan la frecuencia de la curación ya que afectan más al ADN plasmídico que al cromosómico.

El tratamiento de las cepas portadoras de ADN plasmídico con este tipo de agentes sirve para demostrar su presencia debido a la pérdida que se produce, del fenotipo asociado a la presencia del plásmido.

En el caso de plásmidos de resistencia, en ausencia de presión selectiva es decir en ausencia de antibióticos, la pérdida por curación del ADN plasmídico se puede poner de manifiesto por la pérdida del fenotipo de resistencia.

5.3.2. Transformación.

La transformación tal como la describieron Avery, MacLeod y McCarty en 1944, es la transferencia de información genética a bacterias receptoras por medio de ADN lineal exógeno.

Sin embargo, actualmente se hace referencia con el término “transformación”, al proceso experimental mediante el cual se transfiere ADN plasmídico aislado desde un donador a un receptor bacteriano.

La transformación requiere que las bacterias receptoras del ADN plasmídico sean “competentes”. La competencia permite a la bacteria incorporar ADN plasmídico y es un proceso que implica cambios en la pared celular.

La formación de células competentes en *E. coli* requiere un tratamiento con CaCl_2 . En *P. aeruginosa* Mercer, A y Loutit, J (132) demostraron que las frecuencias óptimas, tanto de transformación como de transfección (introducción de ADN fágico), se obtenían mediante tratamiento con MgCl_2 0,15M.

5.3.3. Transducción.

La transducción es la transmisión de ADN desde una célula bacteriana donadora hasta una receptora por medio de un bacteriófago. La transducción puede ser generalizada si el fago transporta cualquier marcador cromosómico de la célula donadora o especializada si solamente son unos pocos marcadores donados. Esto va a depender del ciclo de vida lítico o lisogénico del fago (20,95).

En *P. aeruginosa*, la presencia de fagos lisogénicos es común. Probablemente todas las cepas sean lisogénicas para al menos un fago, aunque no siempre ha quedado bien establecido si se trata de verdadera lisogenia o, por el contrario, la cepa lleva el fago a modo de infección persistente en un estado denominado de pseudolisogenia (165).

El establecimiento de sistemas de transducción generalizada para análisis genético ha sido relativamente fácil dado el elevado número de fagos existentes. Dos sistemas de transducción generalizada que hacen uso de los fagos F116, (F116L) y G101 han sido los más empleados.

Los fagos y los plásmidos pueden interactuar de distintas formas. Algunos plásmidos conjugativos de *Pseudomonas aeruginosa* confieren a sus huéspedes características de susceptibilidad frente a determinados fagos. En otros casos la lisogenia transforma a la cepa en un pobre receptor para determinados plásmidos, aunque también puede ocurrir que sean genes plasmídicos los que interfieran en la propagación de determinados fagos.

La transferencia por transducción de genes de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*, ha sido demostrada por numerosos autores (21,87,108).

5.4. Elementos genéticos transponibles: Transposones y Secuencias de inserción.

Los elementos genéticos transponibles, están constituidos por secuencias de ADN que son capaces de transponerse o translocarse desde el lugar en que se encuentran ubicadas (un plásmido o el cromosoma normalmente) a otra parte del mismo plásmido o del cromosoma, a otro plásmido coexistente o a un fago.

Poseen un sistema de recombinación especializado que es independiente del generalizado para secuencias homólogas (sistema *recA*). Carecen de sistemas de replicación por lo que han de ser mantenidos en un replicón: cromosoma, plásmido o fago (129).

Existen dos clases de elementos genéticos transponibles, las secuencias de inserción o elementos IS y los transposones propiamente dichos. Las secuencias de inserción fueron descritas en *E. coli* inicialmente y su longitud varía entre 800 y 1400 bp. No llevan más genes que los directamente implicados en la transposición. Los transposones se encuentran en distintos géneros y son por lo general mayores de 2000bp. Poseen además genes no relacionados con la inserción con características fenotípicas asociadas.

Los transposones juegan un importante papel en la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos en bacterias. La mayoría de los transposones identificados se han encontrado formando parte del genoma plasmídico y algunos del cromosoma (89,130,133,146,193,213).

Transposones y secuencias de inserción IS poseen secuencias de ADN repetidas y situadas en orientación inversa en ambos extremos.

La inserción de elementos IS o de transposones puede producir la inactivación o la activación de genes. En *E. coli* algunas secuencias IS poseen promotores y están involucradas en la disociación reversible de los plásmidos integrados en el cromosoma.

La transposición determina, por lo general, la replicación localizada del elemento transponible, es decir, de la secuencia original así como, la integración de la copia en el ADN receptor, proceso denominado transposición replicativa. En *Streptococcus faecalis* y en estafilococos, se han descrito una nueva clase de elementos transponibles que tienen la capacidad de integrarse desde el cromosoma de una bacteria al de otro, sin incorporarse a un plásmido o a un bacteriófago son los denominados transposones conjugativos (129).

5.5. Elementos de integración del ADN: Integrones.

Se ha venido observando que los genes responsables de la resistencia a antibióticos, suelen estar estrechamente vinculados en parte de su secuencia y en la posición que ocupan. Muchos se encuentran a modo de tándem a lo largo del cromosoma o del plásmido bacteriano.

El análisis genético de las secuencias adyacentes a estos genes de resistencia a antibióticos, ha revelado la existencia de unidades de integración únicas situadas cerca de sitios o regiones promotoras.

Estos elementos de integración conocidos como integrones funcionan como puntos calientes de recombinación sitio específica *recA*-independientes, capaces de capturar genes. Se observa además un sitio de integración común consistente en una secuencia de 59pb altamente conservada y que se

mantiene en el extremo 3' de los genes de resistencia a antibióticos insertados. El elemento de 59pb es un sitio de recombinación que es reconocido específicamente por la integrasa del integrón (31,35,36,129).

Los integrones permiten la captura de genes de resistencia formando entonces los denominados cassettes génicos es decir, unidades móviles discretas que contienen la región codificadora y un sitio de recombinación (el elemento de 59pb).

Hasta el momento se han secuenciado dos secuencias promotoras en los cassettes génicos caracterizados, denominadas P_{ant} y P2. En algunos integrones solo se encuentra la región promotora P_{ant} y en otros las dos. La cercanía a estas regiones promotoras es la que determina el nivel de expresión de los genes de resistencia situados en un cassette génico (31,35,36,129).

MATERIAL Y METODOS

6. MEDIOS DE CULTIVO.-

• Medio Cled (Difco):

Composición:

Bacto-Extracto de carne	3g.
Bacto-Peptona	4g.
Bacto-Triptona	4g.
Bacto-L-Cisteína	0,128g.
Bacto-Lactosa	10g.
Bacto-Agar	15g.
Bacto-Azul de Bromotimol	0,02g.
pH (25° C):	7,3 ± 0,2

Preparación:

Se rehidratan 36 gramos del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Cuando el medio alcanza 55° C se distribuye en placas de Petri de 10 cm de diámetro y se espera hasta que se solidifique. Las placas se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

• Agar de Mueller-Hinton (Difco):

Composición:

Infusión de carne	300g.
Ácidos de Casamino	17,5g.
Almidón	1,5g.

Agar 17g.

pH (25° C): 7,3 ± 0,1

Preparación:

Se rehidratan 38 gramos del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Cuando el medio alcanza 55° C se dispensa en placas de Petri de 15 cm de diámetro y se espera hasta que se solidifique. Las placas se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

• **Agar de infusión cerebro-corazón (Difco):**

Composición:

Infusión de cerebro de ternera 200g.

Infusión de cerebro de buey 250g.

Proteosa-Peptona 10g.

Dextrosa 2g.

Cloruro Sódico 5g.

Fosfato disódico 2,5g.

Agar 15g.

pH (25° C): 7,4 ± 0,2

Preparación:

Se rehidratan 52 gramos del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Cuando el medio alcanza 55° C se dispone en placas de Petri de 10 cm de diámetro y se espera hasta que se solidifique. Las placas se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

- **Agar infusión cerebro-corazón con antibióticos.**

Preparación:

Se prepara de la forma anteriormente descrita pero, antes de dispensar el medio en las placas, se deja enfriar hasta 55° C añadiendo a continuación, las soluciones de antibióticos.

- **Medio TSA (Difco):**

Composición:

Bacto-Triptona	15g.
Bacto-Soitona	5g.
Cloruro Sódico	5g.
Bacto-Agar	15g.

pH (25° C): 7,3 ± 0,2

Preparación:

Se rehidratan 40 gramos del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Cuando el medio alcanza 55° C se distribuye en placas de Petri de 10 cm de diámetro y se espera hasta que se solidifique. Las placas se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

- **Medio mínimo M9.**

Composición:**Solución base:**

5 ×

NaHPO ₄	30g.
KH ₂ PO ₄	15g.
NH ₄ Cl	5g.
NaCl	2,5g.
CaCl ₂	15mg.

Solución de MgSO₄ · 7H₂O 1M

Solución de D-glucosa: Glucosa al 20% en agua destilada. La solución se esteriliza por filtración (filtros de un solo uso, Millex-G5 0,22 µm de MILLIPORE).

Preparación:

Se diluye el medio al 1× y se añaden 13 gramos de Bacto-Agar (Difco). Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se deja enfriar hasta 55° C y se añaden: 1ml de MgSO₄·7H₂O y 10ml de solución de glucosa al 20%.

- **Medio mínimo M9 suplementado con Leucina o con Triptófano.**

Preparación:

Se prepara como se ha descrito anteriormente pero, una vez estéril y a 55° C, se añaden además 40µg/ml del L-aminoácido escogido para suplementar.

L-Triptófano (Sigma)

L-Leucina (Sigma)

- **Caldo de Infusión cerebro-corazón (Difco):**

Composición:

Infusión de cerebro de temera	200g.
-------------------------------	-------

Infusión de corazón de buey	250g.
Proteosa-Peptona	10g.
Dextrosa	2g.
Cloruro Sódico	5g.
Fosfato disódico	2,5g.

Preparación:

Se rehidratan 37 gramos del medio en un litro de agua destilada agitando hasta su total disolución. Se dispensa la cantidad deseada en tubos y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se incuba a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

• Medio LB (“Luria-Bertani”):**Composición:**

Bacto-Tripton (Difco)	10g.
Extracto de levadura (Difco)	5g.
CINa (Panreac)	5g.

Preparación:

Se resuspenden los ingredientes en un litro de agua destilada y se agita la mezcla hasta su total disolución. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

• Caldo de Mueller-Hinton (Difco):**Composición:**

Infusión de carne	300g.
-------------------	-------

Ácidos de Casamino	17,5g.
Almidón	1,5g.
pH (25° C):	7,3 ± 0,1

Preparación:

Se rehidratan 21 gramos del medio en un litro de agua destilada agitando hasta su total disolución. Se dispensa la cantidad deseada en tubos y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se incuba a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

• **Medio de conservación:**

Preparación:

A 1ml de caldo de Mueller-Hinton preparado como se ha descrito anteriormente, se le añadió 0,1% de glicerol estéril.

7. IDENTIFICACIÓN.-

7.1. Identificación bioquímica.

Hemos utilizado el sistema *API 20 NE* de identificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes a la familia de las enterobacterias.

El sistema *API 20 NE* permite realizar 20 pruebas en microtubos. Cada microtubo contiene los medios y/o substratos deshidratados. Una prueba adicional de identificación, la número 21, es la de la oxidasa.

El sistema permite realizar 8 tests convencionales y 12 de asimilación. Los tests convencionales permiten observar si se produce la reducción de nitratos, la formación de Indol, la fermentación de la glucosa, si el aislado posee el enzima ADH, si hidroliza la esculina y la gelatina y, finalmente, si produce ureasa, mediante virajes colorimétricos espontáneos o revelados tras la adición de reactivos. Los tests convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana realizada en solución salina estéril. Los tests de asimilación se inoculan en medio mínimo. Las bacterias crecen si son capaces de utilizar el substrato correspondiente: glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetilglucosamina, maltosa, gluconato, caprato, adipato, malato, citrato y fenilacetato, lo que se manifiesta como turbidez cuando la reacción es positiva.

La identificación se realiza tras incubación a 37° C durante 24-48 horas.

7.2. Pruebas complementarias.

P. aeruginosa y *P. fluorescens*, presentan numerosas características bioquímicas comunes que dificultan su diferenciación mediante los sistemas estandarizados.

Todos lo aislados multirresistentes fueron sometidos a pruebas de identificación adicionales en las que se comprobó el crecimiento a 4° C y a 42° C, la producción de pigmentos fluorescentes difusibles y la sensibilidad a la Kanamicina (Km) y Carbenicilina (Cb).

• **Producción de pigmentos fluorescentes.**

Pseudomonas aeruginosa produce principalmente 2 pigmentos: la piocianina, de color azul y la pioverdina, de color amarillo/verde que también es producida por *P. fluorescens*. La piocianina se caracteriza porque no produce fluorescencia sometida a la acción de rayos ultravioletas mientras que la pioverdina sí. *Pseudomonas aeruginosa* posee otros pigmentos fluorescentes y difusibles de color rojo o negro que pueden apreciarse por su color observable bajo luz ultravioleta y porque difunden en agar de Mueller–Hinton o cualquier otro tipo de agar sin coloración.

Todos los aislados multirresistentes se sembraron en agar de Mueller–Hinton y tras la incubación de 24 horas a 37° C se observó la producción de fluorescencia y el color de la misma bajo luz ultravioleta a distintas longitudes de onda.

Características diferenciales de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>
Producción Pig. Fluoresc.	+	+
Piocianina	+* ¹	–
Pioverdina	+	+
Crecimiento a 42°C	+	–* ²
Crecimiento a 4°C	–	+
Kanamicina	R	S
Carbenicilina	S	R
Hidrólisis Gelatina	V*	+

*1 Producido por el 70% de las cepas. Pigmento no fluorescente.

*2 Algunas cepas crecen a 42°C.

V* Aproximadamente el 46% de las cepas.

8. SEROTIPADO.-

• Serotipado.

La tipificación serológica de *P. aeruginosa* es una reacción de aglutinación rápida, que se realiza utilizando antisueros frente a antígenos somáticos.

El sistema de serotipado mas utilizado es el recomendado por la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología denominado “Sistema de Tipado Antigénico Internacional” que hace uso de 17 antisueros.

Se ha estimado que aproximadamente el 5% de las cepas de *P. aeruginosa* son autoaglutinables.

También se pueden observar aislados que aglutinan con mas de un antisuero (poliaglutinables) y aislados no aglutinables.

• Método.

La serotipia se efectuó mediante la técnica de aglutinación en portaobjetos.

Utilizamos los antisueros 1 a 17 (STAI) de Difco.

Las cepas a serotipar se sembraron en césped en placas de TSA. Después de incubar a 37° C durante 18–24 horas, se recogió el cultivo con un hisopo en 2ml de solución salina estéril y se homogeneizó con un agitador “vortex” hasta obtener una suspensión de apariencia lechosa.

Se numeraron 17 portaobjetos. Sobre cada uno de ellos se depositó, con una pipeta de Pasteur, unas gotas de la suspensión bacteriana. A continuación se añadió, en el portaobjeto número 1, unas gotas de antisuero 1, sobre el portaobjeto número 2, unas gotas del antisuero correspondiente y así sucesivamente.

Movimos cada portaobjeto durante un minuto de manera que se observó rotar la mezcla de la suspensión bacteriana con cada uno de los sueros.

Las reacciones de no aglutinación o de aglutinación positiva se observan bajo lupa con iluminación directa sobre el portaobjeto.

9. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.-

9.1. Antibiograma.

El antibiograma constituye el sistema de difusión más rápido y eficaz para determinar las características de susceptibilidad de microorganismos de crecimiento rápido frente a distintos antimicrobianos.

Puede utilizarse para análisis cualitativos y semicuantitativos pero normalmente solo se emplea para un análisis cualitativo, indicando si un microorganismo dado es sensible, moderadamente susceptible (intermedio) o resistente frente a cada uno de los antibióticos empleados.

Mediante el antibiograma se trata de conseguir *in vitro*, una aproximación a las características que el microorganismo encuentra *in vivo*, en el huésped. Para evitar errores y conseguir la máxima reproducibilidad de las pruebas, las técnicas requieren una realización cuidadosa. Empleamos el método de difusión de discos de Kirby-Bauer (1966).

El inóculo se realiza de forma directa tomando una o dos colonias aisladas de un cultivo de 24 horas.

Se realiza una suspensión bacteriana en solución salina estéril equivalente a unas 10^6 UFC/ml. Con un hisopo estéril humedecido en la solución se impregna uniformemente una placa de agar de Mueller-Hinton (Difco) que posee una concentración de cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} conocida.

Una vez seca, se colocan los discos de antibióticos y se incuban a 37°C durante 24 horas. Los discos, cargados con una concentración de antibiótico conocida, se humedecen al entrar en contacto con la superficie del agar de forma que el antibiótico difunde, creándose un gradiente de concentración.

Las bacterias crecen alrededor del disco, si su crecimiento no es inhibido por el antibiótico y no se observará crecimiento en los alrededores del disco en aquellas zonas en las que la concentración

del antibiótico sea inhibitoria para la bacteria. El halo de inhibición que se crea, será mayor cuanto mayor sea la susceptibilidad frente a un antimicrobiano.

9.2. Método de dilución en agar. Concentración Mínima Inhibitoria.

La concentración mínima inhibitoria (C.M.I) para una cepa y antimicrobiano determinado, se define como la menor concentración de antibiótico en la que no hay crecimiento visible.

Permite un análisis cuantitativo en las determinaciones de la susceptibilidad. El método que hemos empleado es el de macrodilución en placa con el replicador de Steer.

Preparamos diluciones seriadas de distintos antibióticos de tal forma que cada una sea la mitad de la anterior. Cada dilución se prepara en un volumen de 2ml de agua destilada estéril. El rango de concentraciones que hemos empleado en el estudio inicial de las cepas variaba desde 128 μ g/ml a 0,06 μ g/ml.

Se prepararon tubos que contenían 18ml de agar de Mueller–Hinton y se mantenían a 50–55°C en un baño termostático. A cada tubo se le añadía los 2ml de su correspondiente disolución de antibiótico, se vertía sobre una placa estéril y se dejaba enfriar.

Las suspensiones bacterianas se prepararon en solución salina estéril hasta obtener una turbidez semejante a la del patrón McFarland 0,5 que se corresponde con $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Los pocillos del replicador se rellenan con 400 μ l de la suspensión y se procede a la réplica en placa.

Las placas una vez secas, se incubaron a 37°C durante 24 horas.

DISCOS DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LOS ANTIBIOGRAMAS.

<i>ANTIBIÓTICO</i>	<i>ABREV.</i>	<i>CARGA</i>
AMINOGLICÓSIDOS		
<i>AMIKACINA</i>	<i>AN</i>	<i>30µg.</i>
<i>GENTAMICINA</i>	<i>GM</i>	<i>10µg.</i>
<i>TOBRAMICINA</i>	<i>TM</i>	<i>10µg.</i>
<i>NETILMICINA</i>	<i>NET</i>	<i>30µg.</i>
<i>KANAMICINA</i>	<i>K</i>	<i>30µg.</i>
<i>SISOMICINA</i>	<i>SIS</i>	<i>10µg.</i>
QUINOLONAS		
<i>ÁCIDO NALIDÍXICO</i>	<i>NA</i>	<i>30µg.</i>
<i>NORFLOXACINA</i>	<i>NOR</i>	<i>10µg.</i>
PENICILINAS		
<i>AZLOCILINA</i>	<i>AZ</i>	<i>75µg.</i>
MONOBACTAMAS		
<i>AZTREONAM</i>	<i>ATM</i>	<i>30µg.</i>
CARBAPENEMS		
<i>IMIPENEM</i>	<i>IPM</i>	<i>10µg.</i>
CEFALOSPORINAS		
<i>CEFOTAXIMA</i>	<i>CTX</i>	<i>30µg.</i>

10. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.-

• Obtención de extractos enzimáticos.

Cada cepa en estudio se inoculó en 100–150ml de caldo de infusión de cerebro–corazón (BHI).

Tras incubarlas a 37° C en agitación orbital (lab-line Instruments, Inc) durante 24 horas, se recogieron los cultivos en tubos de centrifuga estériles de 200ml.

Se centrifugó durante 10 minutos a 8000 r.p.m. en una centrifuga refrigerada a 4°C(Beckman J2-HS, rotor JA14). Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento resuspendiéndolo en 10ml de tampón de sonicado frío (4° C). Se centrifugó y eliminó el sobrenadante 2 o 3 veces más en las mismas condiciones.

Después de la última centrifugación se resuspende el sedimento en 1ml de tampón de sonicado frío y se transfiere con una pipeta Pasteur a un tubo de vidrio cónico. Se deja en un baño de hielo para posteriormente proceder al sonicado.

La sonicación se realizó a una amplitud de 70 vatios con un sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole-Parmer Instruments Co.). Se dan pulsos de sonicación de 40 segundos y 20 segundos posteriores sin sonicar, hasta completar 5 o 6 minutos.

El producto obtenido de la sonicación se transfiere mediante una pipeta Pasteur a tubos de centrifuga de 10 ml y se centrifuga a 20.000 r.p.m (Bekman J2-HS, rotor JA 20.1) durante 30 minutos a una temperatura de 4°C.

Después de la centrifugación se recoge el sobrenadante y se distribuye en alícuotas que se conservan a –20°C y a –70°C hasta su posterior utilización.

• Reactivos.–

Tampón de sonicado: Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, NH₄Cl 25mM, β-mercaptoetanol 0,6mM, pH: 7,6–7,8.

Composición:

Tris-HCl 50mM		200 ml
Trizma-HCl	5,72g.	
Trizma-base	1,66g.	
Agua destilada csp	1000 ml	
MgCl₂. 6H₂O		2,0330g.
NH₄Cl		1,3375g.
β-mercaptoetanol (δ: 1, 1168 g/ml)		0,42 ml
Agua destilada csp		1000 ml

Preparación:

Se mezclan los componentes hasta que están bien disueltos. El pH se ajusta entre 7,6 y 7,8 con HCl o con NH₄OH.

11. DETECCIÓN DE ENZIMAS INACTIVADORES DE AMINOGLICÓSIDOS.-

11.1. Ensayo radioenzimático

El método radioenzimático de unión a papel de fosfocelulosa es el más utilizado para la caracterización de diferentes enzimas modificadores presentes en un determinado extracto celular.

El ensayo se basa en la unión del antibiótico, cargado positivamente, modificado o sin modificar, a papel de fosfocelulosa cargado negativamente. Los antibióticos aminoglicósidos poseen un carácter fuertemente básico, debido a la presencia de grupos amino que se mantienen además, cargados positivamente a rangos de pH que pueden variar entre 5 y 9.

Si el enzima modificador que se busca está presente en el extracto enzimático, utilizará cofactores marcados radioactivamente para modificar el antibiótico.

Lo que se mide es, por tanto, la transferencia de radioactividad desde el cofactor marcado al antibiótico que es posteriormente fijado a papel de fosfocelulosa.

La mezcla de reacción consta de un tampón específico para cada clase de enzima, el extracto enzimático, el cofactor marcado radioactivamente y la solución de antibiótico.

Una vez transcurrida la reacción, una cantidad de la mezcla se transfiere a un papel de fosfocelulosa. A continuación se lava, eliminando todo lo que no haya quedado fijado y se deja secar. Se mide posteriormente si hay actividad radioactiva; si se detecta, indica la existencia de un enzima en el extracto.

Se utilizan tubos de plástico de un solo uso que se numeran y se disponen sobre un baño de hielo. Según la actividad que queramos detectar la mezcla de reacción contendrá:

Ensayo de fosforilación:

10µl de tampón de fosforilasas.

10µl de solución de ³²P-ATP.

10µl de extracto enzimático.

2µl de solución de antibiótico (10mg/ml)

Ensayo de nucleotidilización:

10µl de tampón de adenilasas.

10µl de solución ^{14}C -ATP.

10µl de extracto enzimático.

2µl de solución de antibiótico (1 mg/ml).

Ensayo de acetilación:

10µl de tampón de acetilasas.

10µl de solución de ^{14}C -Acetil-Coenzima A.

10µl de extracto enzimático.

2µl de solución de antibiótico (1 mg/ml).

Los ensayos radioenzimáticos se realizaron en el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Insular.

En cada ensayo de fosforilasas, adenilasas o acetilasas, se utilizaron además, dos tubos controles que contenían todos los componentes de la mezcla de reacción excepto uno. En uno no se añadió solución de antibiótico y en el otro no se añadió extracto enzimático.

Los tubos de cada ensayo con todos los componentes de la mezcla de reacción se agitaron en un agitador vortex y se incubaron en un baño termostatzado a 30° C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo los tubos se colocaron nuevamente en un baño de hielo y se transfirieron 20µl de la mezcla de cada tubo a un cuadrado (1cm²) de papel de fosfocelulosa Whatman P-81 (Boston LTD, England) que había sido previamente numerado a lápiz y sujeto con alfileres a un bloque de poliuretano.

Después de 30 segundos a temperatura ambiente, los papeles con sus correspondientes alfileres se introdujeron con pinzas en un vaso de precipitados de 500ml con agua a 80°C para detener la reacción. Los papeles se dejaron 3 o 4 minutos en el agua.

A continuación eliminamos el agua y lavamos los papeles tres o cuatro veces con agua destilada fría. El lavado elimina todos los componentes de la mezcla de reacción, incluyendo el

cofactor marcado y no utilizado, exceptuando al antibiótico que queda fijado al papel. Los papeles se pincharon nuevamente para dejarlos secar bajo una lámpara de rayos infrarrojos.

Por último depositamos los cuadrados de papel de fosfofocelulosa en viales que contenían 5 ml de solución de líquido de centelleo y se determinó la radioactividad emitida.

Reactivos.-

Tampón de fosforilasas: Tris-HCl 1M, MgCl₂ 1M, NH₄Cl 2M, Ditiotreitól 0,5M.

Composición:

Tris-HCl 1M		2ml
Trizma-HCl	14,04g	
Trizma-base	1,34g	
Agua destilada	100ml	
MgCl₂ 1M		1,25ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O	20,33g	
Agua destilada csp	100ml	
NH₄Cl 2M		6,00ml
NH ₄ Cl	10,69ml	
Agua destilada csp	100ml	
Ditiotreitól 0,5M		0,10ml
DTT	3,86ml	
Agua destilada csp	50ml	
Agua destilada		15,00ml
Acido maléico 1M		

Preparación:

Se mezclan los componentes y se ajusta el pH a 7,1 (4° C) con ácido maléico 1M. Se completa con agua destilada hasta 30ml y se vuelve a ajustar el pH. Si es ácido se ajusta con amoniaco.

Tampón de adenilasas:**Composición:**

Tris-HCl 1M	2,00ml
MgCl ₂ 1M	1,25ml
NH ₄ Cl 2M	6,00ml
Ditiotreitol 0,5M	0,10ml
Agua destilada	15,00ml
Ácido maléico	

Preparación:

Mezclar y disolver bien. Ajustar el pH a 8,0 (4° C) con ácido maléico y se completa hasta 30ml con agua destilada. Ajustar el pH de nuevo. Si es ácido se ajusta con amoniaco.

Tampón de acetilasas:**Composición:**

Tris-HCl 1M	25ml
MgCl ₂ 1M	5ml
NH ₄ Cl 1M	10ml
Ditiotreitol 0,5M	1ml
Agua destilada	40ml

Preparación:

Se mezclan los componentes hasta su completa disolución. Se ajusta el pH a 7,1 (30° C) con HCl o con ácido maléico y se completa hasta 100ml con agua destilada.

Solución de ^{32}P -ATP:**Composición:**

ATP 50mM pH: 7,2		15 μl
ATP	0,2756g	
Agua destilada	10ml	
γ - ^{32}P -ATP (actividad específica: 30Ci/mmol)		10–100 μl

(Amersham LIFE SCIENCE)

Debido a que el isótopo del fósforo ^{32}P tiene una vida media muy corta (14,2 días), pasado un mes de la fecha de marcaje del ATP hay que añadir 10 μl mas por cada semana que pase. Sólo se puede llegar hasta 100 μl ya que pasado ese tiempo el ^{32}P ha perdido completamente su actividad.

Preparación:

Se mezcla cada componente y se mide la actividad de la preparación. Se considera una actividad útil unas 20000 cpm/ μl de solución.

Solución de ^{14}C -ATP (10 $\mu\text{Ci/ml}$):**Composición:**

ATP 0,1M		5 μl
ATP	0,05072g	
Agua	1ml	
^{14}C -ATP solución acuosa (actividad: 25 $\mu\text{Ci/ml}$)		200 μl

(Amersham LIFE SCIENCE)

Agua destilada	295µl
----------------	-------

Preparación:

Mezclar los componentes y comprobar la actividad.

Solución de ¹⁴C-Acetil-Coenzima A:**Composición:**

¹⁴C-Acetil-Coenzima A (actividad específica: 57mCi/mmol)

(Amersham LIFE SCIENCE)

Acetil-Coenzima A trilitium	3,52mg
-----------------------------	--------

Agua destilada	6ml
----------------	-----

Preparación:

Al vial que contiene el Acetil-Co A liofilizado y marcado, se le añaden 2ml de agua destilada hasta que se disuelva completamente. Los 3,52mg de Acetil-Co A sin marcar se disuelven en 4ml de agua. Posteriormente se mezclan las dos soluciones y se comprueba la actividad.

Solución de antibióticos:

Para los ensayos de fosforilasas se emplearon concentraciones de 10mg/ml. Para los ensayos de acetilasas y adenilasas los antibióticos se utilizaron a una concentración de 1mg/ml.

Líquido de centelleo:**Composición:**

PPO (2,5-Difeniloxazol)	3,0g
-------------------------	------

POPOP (1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]benceno)	0,1g
---	------

Tolueno	1000ml
---------	--------

Líquido de centelleo:

Beckman

11.2. Antibiógramas para la detección del fenotipo de resistencia.

Cada enzima modificador se caracteriza por utilizar distintos sustratos y generar por tanto, distintos patrones de resistencia.

Mediante distintos estudios epidemiológicos, se ha podido caracterizar que enzimas se encuentran de forma prevalente en aislados resistentes a aminoglicósidos, tanto de especies gram negativas como gram positivas.

Basándonos en estas características, si se utiliza un número suficiente de antibióticos aminoglicósidos, es posible determinar los enzimas modificadores más habituales que se encuentran en distintos géneros y especies bacterianas, en función de su perfil o patrón de resistencia.

Para la determinación del fenotipo mediante antibiógramas, hemos utilizado un kit que consta de 12 discos de antibióticos aminoglicósidos. Algunos de los discos se han escogido con el propósito expreso de distinguir distintos patrones de resistencia. El kit de identificación fue diseñado por el Equipo de Investigación en Resistencias a Aminoglicósidos del Instituto de Investigación Schering-Plough.

La actividad relativa de cada aminoglicósido frente a aislados de susceptibilidad normal es diferente, sin embargo, se puede ajustar la carga de los discos de forma que se compensen estas diferencias en la susceptibilidad. Los discos utilizados se han ajustado de esta manera de forma que la carga varía entre 10 y 100µg.

El principio más importante de utilización de estos discos consiste, en que no se determina la actividad absoluta de un aminoglicósido dado, sino la susceptibilidad relativa considerando el grupo de 12 discos "ajustados" en su conjunto.

Un segundo punto a tener en cuenta es la utilización de inóculos homogéneos que permitan una correcta interpretación del mecanismo de resistencia.

Los antibiogramas se realizaron siguiendo la metodología recomendada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). El medio utilizado fue agar de Mueller-Hinton (Difco) suplementado a concentraciones fisiológicas con cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Todos los medios se prepararon a partir de un mismo lote de agar. Las placas utilizadas de 150mm de diámetro permiten la colocación de los discos en una misma placa. Se dispusieron 70ml de medio por placa.

Se tomaron dos colonias, aisladas de un cultivo de 24 horas del microorganismo, y se inocularon en 5ml de caldo de infusión cerebro-corazón. El cultivo líquido se mantuvo a 37°C durante 4-6 horas hasta que la turbidez observada fuese similar a la de un patrón McFarland del 0,5.

Las placas se sembraron utilizando hisopos estériles y, una vez secas, se colocó cada disco de antibiótico con ayuda de unas pinzas. Tras 24 horas de incubación se midieron los halos alrededor de cada disco.

Se emplearon como controles las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y ATCC 25668.

Para la interpretación de los resultados, se han de considerar los 12 discos de antibióticos aminoglicósidos en su conjunto, y se siguen una serie de pasos:

1.- Observamos si se producen cambios en la susceptibilidad de la Apra, con respecto al resto de los aminoglicósidos utilizados. El mecanismo de resistencia propuesto si el cambio observado fuese éste, sería AAC(3)-IV o bien alteraciones de la permeabilidad. La AAC(3)-IV es la única acetilasa capaz de modificar la Apramicina.

2.- Si no se observa modificación de la Apra pero si de Astm, el mecanismo de resistencia propuesto sería AAC(3)-I o combinaciones de otros enzimas modificadores con la AAC(3)-I.

3.- Si no se observan cambios en la Apra/Astm pero si en 2'-Net y/o en 6'-Net entonces el mecanismo puede ser:

a.- Si los cambios son similares en 2'-Net y en 6'-Net, entonces el mecanismo propuesto sería AAC(3)-II o AAC(3)-?.

b.- Si cambia la 6'-Net pero no lo hace la 2'-Net, entonces el mecanismo propuesto sería AAC(2')-I o AAC(3)-VI.

c.- Si cambia la 2'-Net pero no lo hace 6'-Net, entonces el mecanismo de resistencia propuesto sería AAC(6')-I o AAC(6')-II o bien combinaciones de AAC(6')-I con ANT(2'')-I o con AAC(3)-I

d.- Si se observan cambios tanto en la 2'-Net como en la 6'-Net pero el cambio es mayor para la 2'-Net, entonces el mecanismo sería AAC(6')-I + AAC(3)-II.

Si no se observan cambios ni en Apra, Astm, 2'-Net ni 6'-Net pero si ocurre en la Gm y Tm, entonces el mecanismo de resistencia propuesto sería la adenilasa ANT(2'')-I o la acetilasa AAC(3)-III.

Si no cambian ni la Apra, Astm, 2'-Net, 6'-Net ni la Gm, pero si lo hace la Tm, el mecanismo de resistencia sería solamente ANT(4')-II.

Por último si no se observa variación ni en Apra, Astm, 2'-Net, 6'-Net, Gm, Tm y únicamente cambia la An el mecanismo de resistencia sería entonces debido a la fosforilasa APH(3')-VI.

DISCOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN FENOTÍPICA.

ANTIBIÓTICO	ABREV.	CONCENTRACION
APRAMICINA	APRA	100µg.
FORTIMICINA	ASTM	100µg.
6'-NETILMICINA	6'-NET(SCH-21562)	¿?
2'-NETILMICINA	2'-NET(SCH-21561)	¿?
GENTAMICINA	GM	10µg.
TOBRAMICINA	TM	10µg.
AMIKACINA	AN	30µg.
ISEPAMICINA	ISE(SCH-21420)	30µg.
NETILMICINA	NET	30µg.
5-EPISISOMICINA	5-EPI(SCH-22591)	10µg.
KANAMICINA	K	30µg.
NEOMICINA	N	30µg.

12. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A AMINOGLICÓSIDOS.-

Establecimos la relación existente entre el fenotipo de resistencia determinado previamente y el obtenido mediante ensayo radioenzimático con el resultado de los estudios de hibridación efectuados utilizando 17 sondas génicas de distintos enzimas modificadores de aminoglicósidos.

Los estudios de hibridación fueron el resultado de la colaboración con el Instituto de Investigación de Schering-Plough. Nosotros preparamos 20 filtros de nylon mediante "dot blotting" mientras que la hibridación y el revelado se realizaron en los laboratorios Schering.

Protocolo de dot blotting.

Utilizamos 20 filtros de nylon que colocamos sobre papel Whatman 3MM. El papel Whatman se empleó para depositar los cultivos y para secar los filtros. Cada filtro estaba dividido en cuadrados numerados.

Se marca un extremo de cada filtro con un número de identificación y se depositan 10µl de un cultivo de 48 horas de cada una de las cepas de interés, sobre cada uno de los cuadrados. Se dejan secar a temperatura ambiente.

Una hoja de papel Whatman 3MM se satura con NaOH 1N y con ayuda de unas pinzas se deposita cada filtro sobre la hoja de papel Whatman durante 5 minutos.

Una segunda hoja de papel Whatman 3MM se satura con Tris 1M pH 7.0 y con ayuda de unas pinzas se transfiere cada filtro desde la hoja saturada de NaOH a esta segunda hoja durante 5 minutos.

Finalmente, cada filtro se va depositando, durante 3 minutos, en un recipiente que contiene 500ml de Tris 1.0M pH 7.0. Se sacan y se dejan secar sobre papel a temperatura ambiente.

Hibridación y revelado.

La prehibridación se realizó durante 4 horas a 42° C en una bolsa Ziploc con:

Formamida	50%
SDS	1%
NaCl	1M
Sulfato dextrano	10%
ADN de esperma de salmón sonificado	100µg/ml

Se eliminó el exceso de solución y se añadió la sonda (1×10^6 dpm/ml), marcada mediante “traslación de mella” (nick translated), en 5ml de solución de prehibridación.

La hibridación de los filtros se realizó toda la noche a 42° C.

Se lavó cada filtro en solución precalentada a 55° C SSC 2× con SDS al 1%.

Se repitieron dos lavados de 30 minutos cada uno, en solución SSC 2× con SDS al 1% a 55°

C.

Se lavó una vez con solución SSC 0,1× y 1% de SDS durante 30 minutos a 55° C.

Los filtros se secaron a temperatura ambiente y se expusieron a película de rayos X durante dos días.

13. TRANSFERENCIA DEL MATERIAL GENÉTICO.-

13.1. CONJUGACIÓN.

La conjugación se realizó en medio líquido utilizando como receptores las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO 38 (leu 38 str7) (str^s) (FP2⁻) y PAO 2535(3) (FP⁻) (trp⁻ 54) (rif-3 fon-101).

La cepa PAO 38 es resistente a la rifampicina y auxotrófica para la leucina. La cepa PAO 2635(3) es resistente a la rifampicina y auxotrófica para el triptófano.

Inoculamos 5ml de caldo de infusión cerebro-corazón o LB con las cepas donadoras y receptoras.

Incubamos en agitación orbital a 37° C durante 24 horas. La conjugación se realizó también, incubando las cepas receptoras a 41° C.

Posteriormente, inoculamos dos tubos de BHI o de LB con 0,5ml de la cepa donadora y con 0,5ml de cada una de las receptoras. Inoculamos también tubos controles con las cepas donadoras y receptoras por separado. Los tubos se dispusieron en agitación orbital muy suave durante 4 horas. Tomamos alícuotas de 100µl a las 2 y 4 horas de conjugación que se extendieron con ayuda de una pipeta de Pasteur de vidrio sobre placas de agar de cerebro-corazón conteniendo rifampicina mas el antibiótico aminoglicósido de elección.

Las concentraciones de antibiótico escogidas han de ser lo suficientemente bajas para permitir la transferencia de plásmidos R, pero lo suficientemente altas como para poder limitar la aparición de mutantes de resistencia espontáneos y, principalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, la aparición de resistencias adaptativas.

Las concentraciones de rifampicina utilizadas fueron de 250µg/ml y 500µg/ml. A partir de cada una de estas concentraciones, se prepararon placas que contenían, además, gentamicina o

tobramicina a distintas concentraciones 20µg/ml, 32µg/ml y 64µg/ml y rifampicina y amikacina a 10µg/ml, 20µg/ml y 30µg/ml.

Las placas se incuban 24 horas a 37° C y a 41° C. Posteriormente se comprueba si las colonias que hayan podido crecer son transconjugantes a través de su fenotipo de resistencia mediante antibiograma, sus características bioquímicas mediante API 20 NE y comprobando la auxotrofia. Si el receptor utilizado fue la cepa PAO 38 la colonia se resiembró en medio mínimo y en medio mínimo suplementado con leucina. Si el receptor utilizado fue la cepa PAO 2635(3) la colonia se resiembró en medio mínimo y en medio mínimo suplementado con triptófano.

La conjugación se realizó también en Eppendorf con 100µl de la cepa donadora y 100µl de la cepa receptora en 1ml de medio añadiendo, tras 2 horas de conjugación, algunas gotas de antisuero frente al receptor PAO 38. Se le da un pulso en la centrifuga y se tomaron alícuotas de 100µl a las 2 y 4 horas de conjugación.

13.2. MOVILIZACIÓN.

Mediante la movilización pretendemos detectar la presencia de plásmidos no conjugativos, que pudieran estar presentes en las cepas donadoras, haciendo uso de las propiedades de transferencia de plásmidos conjugativos.

Aunque no se conoce la causa, solamente algunos plásmidos conjugativos son capaces de movilizar un plásmido no conjugativo determinado. Esto significa que, en la práctica, se han de probar diferentes plásmidos conjugativos para intentar movilizar un plásmido no conjugativo.

Hemos utilizado los plásmidos R2 y RP4 para la movilización. Las estrategias empleadas con cada uno de ellos difieren.

- **Movilización desde una cepa con doble plásmido. Plásmido R2.**

El plásmido R2 de *Pseudomonas aeruginosa*, pertenece al grupo de incompatibilidad P-9 (Inc P-9). Posee un peso molecular de 44,0Mda y el patrón de resistencias: Cb^R (Carbenicilina), Km^R (Kanamicina), Sm^R (estreptomicina) y Su^R (sulfamidas).

El procedimiento más sencillo consiste en transferir mediante conjugación el plásmido R2 desde la cepa donadora, a cada una de las cepas no conjugativas que actuarían como receptoras. La selección se realiza en placas de agar de cerebro-corazón que contienen gentamicina y estreptomicina. En estas condiciones solamente crece el receptor, resistente a aminoglicósidos, que además adquiera el plásmido R2 que confiere resistencia a alto nivel a la estreptomicina.

La conjugación se realizó, como ya ha sido descrita, en placas de agar cerebro-corazón con 800µg/ml de estreptomicina mas gentamicina, tobramicina o netilmicina a una concentración de 60µg/ml. La selección de transconjugantes se llevó a cabo, mediante el cálculo de la C.M.I. para la estreptomicina y mediante API 20NE.

En un segundo paso los transconjugantes que portan el plásmido conjugativo y, teóricamente el no conjugativo, actuarían como donadores de la conjugación frente a un receptor no plasmídico y con marcadores de selección adecuados.

Los receptores utilizados fueron las cepas PAO 38 y PAO 2635(3). La conjugación se realizó en placas de agar de cerebro-corazón que contenía rifampicina a una concentración de 500µg/ml y gentamicina, tobramicina o netilmicina a 40µg/ml y 60µg/ml.

Los receptores utilizados se emplearon haciendo crecer los cultivos a 37° C y 41° C.

- **Apareamiento triparental. "Triparental Mating". Plásmido RP4.**

RP4 es un plásmido de *E. coli* de 36Md perteneciente al grupo de incompatibilidad P. (IncP, Tra⁺).

La estrategia del apareamiento triparental, es similar a la anteriormente descrita, únicamente varía en que no se hacen dos conjugaciones separadas.

Se preparan placas de agar de MacConkey con rifampicina a una concentración de 250µg/ml y gentamicina, tobramicina o netilmicina a 60µg/ml. Mezclamos 0,05ml de un cultivo reciente de la cepa donadora que posee el plásmido conjugativo y 0,05ml de la cepa intermedia que lleva el plásmido no conjugativo, sobre las placas sembradas con 0,1ml de un cultivo reciente de cada uno de los receptores.

13.3. TRANSFORMACIÓN.

El protocolo de transformación utilizado para *P. aeruginosa* PAO 38 es, básicamente, el de Mercer y Loutit como es descrito por Kato, T. (101,132)

- **Preparación de células competentes.**

Inoculamos 10ml de LB con las bacterias a transformar e incubamos a 37° C durante 18 horas.

Tomamos 1ml de este cultivo reciente e inoculamos 150ml de LB que disponemos en agitación orbital a 37° C tomando alícuotas de 1ml que se miden a partir de las 2 horas hasta obtener una densidad óptica de 0,5 a 550nm. ($DO_{550}=0,5$), lo que equivale a 5×10^7 células/ml.

Centrifugamos en tubos de centrifuga estériles de 200ml a 8000 r.p.m. 5 minutos a 4° C, eliminamos el sobrenadante y resuspendemos con la mitad del volumen inicial de $MgCl_2$ 0,15M estéril y frío.

Centrifugamos 5 minutos a 8000 r.p.m. a 4° C. Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos nuevamente con la mitad del volumen inicial de $MgCl_2$ 0,15M estéril y frío. Dejamos los tubos de centrifuga 20 minutos a 4° C.

Centrifugamos en idénticas condiciones y, después de eliminar el sobrenadante, resuspendemos en 0,1 del volumen inicial de $MgCl_2$.

Las células competentes se guardan en alícuotas de 500 μ l conservadas a 4° C o congeladas a 70° C.

• **Transformación.**

Se preparan tubos Eppendorf con 200 μ l de células competentes que se depositan sobre un baño de agua y hielo. A continuación se añaden de 10 o 15 μ l de la solución de ADN y los dejamos de 30 a 45 segundos en el hielo.

Pasamos los tubos a un baño a 37° C durante 3 minutos y tras el choque térmico los introducimos nuevamente en el hielo durante 15 minutos.

Posteriormente, añadimos la mezcla a 700 μ l de LB y dejamos incubar a 37° C durante 1 o 2 horas. Se toman alícuotas de 100 μ l que se extienden con ayuda de una pipeta Pasteur doblada sobre placas de agar de cerebro-corazón conteniendo amikacina o gentamicina a distintas concentraciones.

13.4. CURACIÓN.

Aunque la curación no es un método de transferencia de material genético entre bacterias, nos ayuda a detectar plásmidos de resistencia. Las cepas portadoras de plásmidos de resistencia que se curan pierden parte o todo de su fenotipo de resistencia.

Hemos utilizado como agentes curantes: SDS, naranja de acridina y bromuro de etidio. Cada protocolo de curación se realizó a 37° C y a 41° C ya que el crecimiento continuado a esta temperatura produce también la curación de algunos tipos de plásmidos.

La curación con SDS se realizó inoculando 2ml de LB con SDS al 10% con 20 μ l de un cultivo reciente de 18 horas de la cepa a curar.

Incubamos a 37° C y a 41° C durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, preparamos diluciones (1/100.000) en solución salina estéril y tomamos 100µl de la dilución que se extienden sobre placas de agar infusión cerebro-corazón. Incubamos las placas a 37° C y a 41° C.

Las colonias crecidas se replican, por medio de terciopelo estéril, en placas de agar de infusión cerebro-corazón con distintas concentraciones de antibióticos aminoglicósidos. Se observa que colonias no han crecido con respecto a la placa original.

La curación con naranja de acridina y con bromuro de etidio se realiza preparando diluciones crecientes del agente curante en 2ml de medio LB e inoculando 20µl de un cultivo de 18 horas de la cepa a curar. Incubamos 18-24 horas a 37° C y a 41° C.

Se prepara una dilución 1/100.000 en solución salina estéril a partir del tubo con crecimiento inmediatamente anterior al valor de su concentración mínima inhibitoria. Tomamos 100µl de la dilución que se extienden sobre una placa de agar de infusión de cerebro-corazón y se incuba a 37° C.

Se realiza la réplica en placa de forma idéntica a la anteriormente descrita.

14. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.-

14.1. Extracción de ADN plasmídico.

Los protocolos de extracción que se utilizan de manera habitual frente a distintos géneros de bacterias gram negativas presentan, en el género *Pseudomonas*, numerosas dificultades. Debido a que el rendimiento de las extracciones es menor en *Pseudomonas aeruginosa*, hemos utilizado diferentes protocolos alternativos.

- **Lisis alcalina de Kado y Liu (40). (Lisis alcalina en calor).**

Método.

Se inoculan tubos con 5ml de medio LB o TSB con las cepas de interés, añadiendo las concentraciones de antibióticos adecuadas para cada una de ellas. Después de 24 horas de incubación a 37° C, se recogen por volcado sobre tubos Eppendorf estériles, 1,5ml de los cultivos, centrifugando al máximo de revoluciones durante 3 minutos (Centrífuga Eppendorf 5415C).

Eliminamos el sobrenadante con una pipeta Pasteur y resuspendemos el sedimento en 200µl de tampón TEK.

Añadimos 400µl de tampón de lisis de Kado, mezclamos por inversión repetidamente e incubamos en un baño termostático a 55° C durante 30 minutos.

Posteriormente añadimos 300µl de fenol y 300µl de cloroformo y agitamos hasta obtener un aspecto homogéneo de la suspensión. Centrifugamos 7 minutos al máximo de revoluciones.

Recogemos el sobrenadante cuidando de no arrastrar la interfase blanquecina y lo depositamos en un nuevo tubo Eppendorf estéril.

Añadimos 100µl de acetato potásico 3M pH: 4,8 mezclando por inversión. Dejamos los tubos 10 minutos en hielo y posteriormente centrifugamos 5 minutos al máximo.

El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo Eppendorf, añadimos 800µl de etanol absoluto frío y mezclamos por inversión.

Dejamos toda la noche a -20°C .

Centrifugamos 7 minutos al máximo y eliminamos el etanol, cuidando de no arrastrar también el ADN precipitado.

Añadimos 500µl de etanol al 70% y centrifugamos 5 minutos. Eliminamos el alcohol y dejamos los Eppendorf abiertos secándose en una estufa.

El ADN se resuspende finalmente en 50µl de agua bidestilada estéril y fría o en tampón TE.

Reactivos.-

Tampón TEK: Trizma-base 40mM, EDTA 2mM.

Preparación: Mezclar los componentes hasta su disolución, ajustar a pH: 8,0 y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C .

Tampón de lisis de Kado:

a.- **NaOH 4M.** Conservar en alícuotas a -20°C .

b.- **Solución base de Kado:** Trizma-base 50mM, SDS al 3%.

Preparación: En el momento de usar el tampón de lisis de Kado se añaden 200µl de NaOH 4M en 10ml de solución base.

Solución de Acetato potásico 3M. Conservar a 4°C .

Acetato potásico 5M	60ml
Ácido acético glacial	11,5ml
Agua destilada	28,5ml

Preparación:

Mezclar y comprobar que el pH sea 4,8; en caso contrario ajustar. Conservar a 4°C y utilizar hasta dos semanas después de su preparación.

Fenol:

El fenol sólido se licúa calentándolo en un baño a 68° C. Una vez líquido, añadimos un volumen igual de tampón Tris 1M a pH: 8. Se mezcla bien y se deja reposar en un embudo de decantación. Una vez que las fases estén separadas, se recoge la fase de fenol y se vuelve a añadir un volumen de Tris 1M repitiendo el proceso. Finalmente se recoge la fase inferior fenólica saturada de Tris y se conserva con una capa de Tris.

Cloroformo:

Utilizamos una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 v/v) saturado con Tris 1M a pH: 8.

• Protocolo de extracción de J. Grinsted y P. M. Bennet. (51)

El protocolo de extracción de Grinsted y Bennet es, básicamente, una modificación del de Ish-Horowicz y Burke de 1981.

Método:

Centrifugamos 1,5ml del cultivo apropiado recogido por volcado en un tubo Eppendorf, 10 minutos al máximo de revoluciones.

Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos en 0,2ml de agua destilada, añadimos a continuación 0,4ml de SDS al 1% en 0,2M de NaOH y mezclamos por inversión.

Añadimos 0,3ml de solución de acetato potásico 3M, ácido acético 2M y EDTA 1mM y mezclamos.

Centrifugamos 5 minutos al máximo recogiendo el sobrenadante con pipeta o por decantación en un nuevo tubo Eppendorf estéril.

Añadimos 0,5ml de solución de fenol. Agitamos en un agitador "vortex" y centrifugamos 1 minuto al máximo de revoluciones. La fase superior acuosa se recoge en un nuevo Eppendorf.

Añadimos 0,1ml de acetato potásico 4M pH: 6,0 y 0,5ml de Isopropanol. Mezclamos por inversión y centrifugamos 5 minutos. El sobrenadante se recogió en un nuevo Eppendorf.

Añadimos 1ml de etanol absoluto y centrifugamos 1 minuto. El sobrenadante se deshecha.

A continuación añadimos 1ml de éter y centrifugamos 1 minuto. Deshechamos el sobrenadante.

Se deja secar y se añaden 100µl de TE.

Reactivos.-

SDS al 1% en NaOH 2M

Solución de acetato potásico 3M, ácido acético 2M, EDTA 1mM.

Solución de fenol:

Fenol	500g.
NaOH 2M	7,5ml
Tris-ClH 1M, pH: 7,5	6ml
Agua destilada	130ml

Acetato potásico 4M pH: 6,0

Isopropanol

Etanol

Dietil éter

TE: Tris-ClH 10mM, pH: 7,5, EDTA 0,1mM

- **Protocolo de extracción con Tritón X-100. "Hot tritón". (39,40)**

Método.

Las cepas de interés se sembraron en matraces de 100ml con 40ml de BHI y las concentraciones de antibióticos apropiadas.

Después de 24 horas de incubación en agitación a 37°C, recogimos los cultivo en tubos de centrífuga estériles de 200ml y centrifugamos a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Eliminamos el sobrenadante.

Añadimos 5ml de buffer TES repitiendo el centrifugado. Eliminamos el sobrenadante resuspendiendo en 2ml de solución A, transferimos a tubos de 10ml y los dejamos 20 minutos en hielo.

Posteriormente añadimos 0,4ml de solución de lisozima, dejando los tubos otros 20 minutos en hielo.

Transcurrido este tiempo añadimos 0,8ml de EDTA 0,5M pH: 8,0 y la lisis se efectuó con 4,4ml de la mezcla lítica de tritón, dejando los tubos en un baño termostatzado a 65°C durante 20 minutos.

Centrifugamos a 16000 r.p.m. durante 40 minutos.

Recogimos el sobrenadante y ajustamos la solución a 0,5M en ClNa y 10% en polietilenglicol a partir de soluciones concentradas de ClNa 5M y 40% en polietilenglicol.

Dejamos toda la noche a 4° C.

Centrifugamos a 5000 r.p.m. durante 10 minutos y posteriormente resuspendimos el sedimento en 1 o 2ml de ClNa 0,25M, EDTA 0,001M y Tris-ClH 0,01M a pH: 8,0.

El ADN se precipita añadiendo dos volúmenes de etanol del 95% a -20° C. Se guardan a esta temperatura hasta el día siguiente.

Centrifugamos a 16000 r.p.m. durante 10 minutos y eliminamos el sobrenadante. Añadimos dos volúmenes de etanol al 70% repitiendo la centrifugación.

Finalmente el ADN se resuspende en TES.

Reactivos.-

Tampón TES: Tampón estéril de Trizma-base 0,05M, EDTA 0,005M, ClNa 0,05M a pH:

8,0

Solución A: Solución estéril compuesta de un 25% de sucrosa en EDTA 0,001M, Trizma-base 0,05M a pH: 8,0

Solución de lisozima: lisozima a una concentración de 10mg/ml en Tris, pH: 8,0

EDTA 0,5M pH: 8,0

Mezcla lítica de tritón:

Tritón X-100 al 10% en Tris 0,01M, pH: 8,0	1ml
EDTA 0,25M, pH: 8,0	25ml
Tris 1M, pH: 8,0	5ml
Agua destilada	69ml

CINa 5M

Polietilenglicol 40% (PM. 1000 a 6000)

• **Lisis alcalina fría y protocolo de extracción en fenol ácido. (39,40)**

Método.

Centrifugamos durante 1 minuto en una centrífuga Eppendorf, 1,5ml de cultivo y eliminamos el sobrenadante.

Resuspendemos el sedimento añadiendo 100µl de solución I.

Añadimos a continuación, 200µl de la solución de lisis (solución II) mezclando suavemente, hasta observar que se produce un aclaramiento y un aumento de la viscosidad.

Neutralizamos añadiendo 150µl de solución III fría. Mezclamos por agitación vigorosa debiéndose observar la formación de un precipitado blanco.

Centrifugamos 5 minutos al máximo de revoluciones. Posteriormente transferimos al menos 400µl del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf estéril y añadimos 1ml de etanol absoluto frío.

El ADN plasmídico se recoge por centrifugación durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se añade 1ml de etanol frío al 70%. Centrifugamos nuevamente y, tras eliminar el sobrenadante, dejamos secar a temperatura ambiente.

Resuspendemos el ADN en 50µl de buffer TE.

El método del fenol ácido se basa en la adición de fenol acidificado en la extracción alcalina fría. Teóricamente la adición de fenol ácido permite obtener ADN plasmídico de la misma calidad que el obtenido por centrifugación en gradiente de CICs.

Método.

Es similar en los primeros pasos a la lisis alcalina fría. Una vez producida la lisis y la neutralización, se transfieren 400µl aproximadamente a un nuevo tubo Eppendorf.

Se adicionan 400µl de fenol ácido, se mezcla en un agitador vortex y se separan las capas por centrifugación en microcentrifuga durante 5 minutos al máximo.

La fase superior se transfiere a un nuevo Eppendorf y se añade un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico mezclando por inversión y separando las capas por centrifugación.

La fase superior se recoge en un nuevo tubo Eppendorf y se añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío.

El ADN se recoge por centrifugación durante 5 minutos. Eliminamos el sobrenadante y añadimos 500µl de etanol al 70%. Repetimos la centrifugación, eliminamos el sobrenadante y dejamos secar.

Resuspendemos el sedimento en 50µl de agua bidestilada y fría o en tampón TE.

Reactivos.-

*** Lisis alcalina:**

Solución I: Solución de glucosa 50mM en Tris-ClH 25mM (pH: 8,0) y EDTA 10mM (pH: 8,0)

Solución II: NaOH 0,2N y SDS al 1%

Solución III: acetato potásico 3M

Acetato potásico 5M	60ml
Ácido acético glacial	11,5ml
Agua destilada	28,5ml

*** Fenol ácido:**

Preparación:

El fenol sólido se licúa calentándolo a 68° C. Se dispone en un embudo de decantación y se añade un volumen de acetato sódico 0,05M (pH: 4,0) se mezcla bien y se espera hasta que se separan las fases recogiendo la fenólica y descartando el ácido. El proceso se repite varias veces hasta obtener fenol saturado.

Cloroformo/alcohol isoamílico (24: 1)

• Protocolo de Eckhardt. (51)

Permite observar en un gel de agarosa vertical ADN plasmídico con un tamaño de entre 2 y 150Mda. Al contrario que en el resto de los métodos descritos, en el protocolo de Eckhardt, la lisis bacteriana se realiza en el mismo gel de electroforesis.

Se toman dos colonias de las cepas de interés y se van depositando sobre los pocillos de un gel de agarosa vertical con ayuda del asa de siembra. Se añaden 15µl de la solución de lisozima y, posteriormente, 30µl de la solución de SDS mezclando suavemente con el asa 2 veces.

A continuación se añade a cada pocillo 100µl de solución para cubrir y se sellan los pocillos con agarosa a 50°C.

Reactivos.-

Solución de lisozima:

Lisozima 7500U/ml en buffer TB

Ribonucleasa I (0,3U/ml)

0,05% de azul de bromofenol

Tampón TBE: Trizma-base 89mM, EDTA 12,5mM, ácido bórico 89mM. Al tampón preparado se le adiciona un 20% de Ficoll 400.000 (Sigma)

Solución de SDS: 0,2% de SDS en tampón TBE con un 10% de Ficoll 400.000

- **Sistemas de purificación comerciales: Wizard Minipreps (PROMEGA).**

Hemos utilizado el sistema de extracción y purificación Wizard que permite aislar plásmidos de entre 200 y 20.000bp.

El sistema hace uso de una resina que permite una rápida rehidratación del ADN.

Los pasos de purificación se realizaron siguiendo las instrucciones descritas en el método.

14.2. Preparación de ADN genómico.

- **Minipreparado de ADN genómico.**

Inoculamos las cepas de interés en 5ml de LB e incubamos a 37° C durante 24 horas.

Centrifugamos 1,5ml del cultivo en microcentrifuga durante 2 minutos o hasta la formación de un sedimento compacto. Eliminamos el sobrenadante.

Resuspendemos el sedimento con ayuda de una micropipeta en 567µl de buffer TE. Añadimos 30µl de SDS al 10% y 3µl de proteinasa K (20mg/ml). La mezcla nos da una concentración final de 100µg/ml de proteinasa K en 0,5% de SDS. Mezclamos vigorosamente e incubamos 1 hora a 37° C.

Añadimos 100µl de CINa 5M y mezclamos vigorosamente.

Añadimos 80µl de solución CTAB/CINa. Mezclamos e incubamos 10 minutos a 65° C.

Añadimos un volumen (0,7 a 0,8ml) de cloroformo-alcohol isoamílico, mezclamos y centrifugamos 4 o 5 minutos al máximo.

Recogemos el sobrenadante de consistencia viscosa en un nuevo tubo Eppendorf y añadimos un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), mezclamos hasta obtener un aspecto homogéneo y centrifugamos durante 5 minutos al máximo de revoluciones.

El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf y añadimos 0,6ml de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclamos por inversión hasta que se observe la formación de los filamentos de ADN. Los filamentos de ADN pueden entonces transferirse con ayuda de un asa a un nuevo tubo Eppendorf conteniendo etanol al 70% o bien centrifugamos para precipitar el ADN y posteriormente lavamos con etanol al 70%.

El ADN se resuspende en el etanol y se vuelve a centrifugar. Eliminamos con cuidado el etanol y dejamos secar.

El ADN se resuspende en 100µl de buffer TE.

Reactivos.-

Buffer TE: Tris-ClH 10mM y EDTA 1mM

SDS al 10%

Proteínasa K (20mg/ml). Conservada en pequeñas alícuotas a -20° C

CINa 5M

Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1

Fenol/Cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1

Isopropanol

Etanol al 70%

Solución CTAB/CINa: CTAB al 10% en CINa 0,7M

Preparación:

Disolvemos 4,1 gramos de C1Na en 80ml de agua y añadimos lentamente 10g de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) calentando y agitando. Si es necesario se calienta a 65° C hasta que esté completamente disuelto. Ajustamos el volumen a 100ml.

• Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

Los geles se prepararon disolviendo la agarosa por calentamiento en 70ml de tampón Tris-acetato (TAE) tanto para las extracciones de ADN genómico como plasmídico excepto en el protocolo de extracción de Eckhardt en el que se utilizó buffer TBE.

La concentración de agarosa empleada fue normalmente del 0,7% aunque en ocasiones se utilizó al 0,6 y 0,5%.

El ADN se observó por tinción del gel con Bromuro de Etidio (0,4–1,0µg/ml) durante 15 minutos y posterior exposición a la luz ultravioleta con un transiluminador LKB 2011 MACROVUE.

Reactivos.–

TAE: Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM. Se prepara concentrado 50 veces (TAE 50×).

Preparación:

Disolver los componentes ajustar a pH: 8,0 y esterilizar en autoclave.

TBE: Trizma-base 89mM, EDTA 2,5mM y ácido bórico 89mM.

Tampón de carga: 0,25% de azul de bromofenol y 40% de sacarosa en agua destilada. Se conserva en pequeñas alícuotas a 4° C.

RESULTADOS Y DISCUSION

INTRODUCCIÓN.-

Los objetivos básicos de nuestro trabajo son:

Determinar los mecanismos de resistencia a aminoglicósidos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes del Hospital Insular.

En aquellos aislados cuya resistencia esté mediada por la producción de enzimas modificadores, caracterizar e identificar que enzima o enzimas están presentes y determinar si su codificación es cromosómica o extracromosómica.

Comparar sistemas de identificación fenotípicos con el genotipo obtenido mediante la hibridación con sondas génicas.

Cepas estudiadas.

Se recogieron 155 aislados a los que se les asignó un número de identificación. Las cepas procedían de muestras clínicas de distinto origen y fueron cedidas por el Servicio de Microbiología del Hospital Insular de Las Palmas

El 96,1% de los aislamientos se identificaron mediante *API 20 NE*, como *Pseudomonas aeruginosa* mientras que el 3,8% restante se identificó como *Pseudomonas fluorescens*.

El origen de los aislamientos se muestra en la gráfica 1. El 40% de las cepas se aislaron a partir de orinas y heridas.

Pruebas adicionales de identificación.

Los aislados identificados como *Pseudomonas fluorescens*, se sometieron a pruebas adicionales de identificación.

Observamos la producción de pigmentos fluorescentes, el crecimiento a 4° C y a 42° C y la sensibilidad a carbenicilina y kanamicina.

De los aislados, inicialmente identificados como *Pseudomonas fluorescens*, todos excepto uno resultaron productores de pigmentos fluorescentes, todos crecían a 42° C y ninguno lo hacía a 4° C. Todos los aislados resultaron resistentes a kanamicina y carbenicilina.

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.

• Antibiogramas y Concentraciones Mínimas Inhibitorias.

Los resultados obtenidos en los antibiogramas se presentan en la tabla A.

La amikacina se muestra, de entre los aminoglicósidos utilizados en los antibiogramas, como el antibiótico más eficaz con un 92,1% de aislamientos sensibles. La sensibilidad obtenida frente a la sisomicina fue del 90,1% seguida de la tobramicina con un 88,7%, la netilmicina con un 83,4% y la gentamicina con un 82,8%.

Unicamente obtuvimos un 2,6% de aislamientos sensibles a la kanamicina, el 11,9% con sensibilidad intermedia mientras que el 85,4% restante eran resistentes.

Los porcentajes de aislados sensibles, de sensibilidad intermedia y resistentes a aminoglicósidos y a los restantes antibióticos empleados fueron:

	<i>S(%)</i>	<i>I(%)</i>	<i>R(%)</i>
<i>An</i>	92.1	3.3	4.6
<i>Gm</i>	82.8	2.6	14.6
<i>Tm</i>	88.7	2.6	8.5
<i>Net</i>	83.4	2	14.6
<i>Siso</i>	90.1	0.7	9.3
<i>K</i>	2.6	11.9	85.4
<i>Atm</i>	81.5	11.5	7.3
<i>Az</i>	86.8	---	13.2
<i>Ctx</i>	19.2	52.3	28.5
<i>Ipm</i>	93.4	1.3	5.3
<i>Na</i>	2	8.6	89.4
<i>Nor</i>	83.2	---	16.8

Los valores de CMI se muestran en la tabla B.

Los valores de CMI₂₅, CMI₅₀, CMI₇₅ y CMI₉₀ se muestran en la tabla C.

Las frecuencias y porcentajes obtenidos para cada antibiótico y sus correspondientes valores de CMI se muestran en las tablas D-1 a D-11.

Cuantitativamente, de los aminoglicósidos utilizados en las CMIs, la tobramicina es el antibiótico más potente. Como se muestra en la tabla C, la CMI₉₀ para este antibiótico fue de 8µgr/ml, mientras que para la amikacina y gentamicina el valor de CMI₉₀ obtenido fue de 32µgr/ml. La netilmicina es el aminoglicósido menos útil con un valor de CMI₉₀ de 64µgr/ml.

Existe una excelente correlación entre los datos obtenidos y el comportamiento “in vitro” esperado de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa*. Ni la kanamicina (Km) ni la estreptomycinina (Sm) tienen actividad frente a *P. aeruginosa* siendo la Tm más eficaz que la Gm. La amikacina (An) es el menos potente de los aminoglicósidos, sin embargo, existen muy pocos enzimas capaces de modificar a este antibiótico de forma que deja un mayor porcentaje de cepas sensibles (9,12,62,117,171).

Para continuar con el estudio, seleccionamos, a aquellos aislados que presentasen resistencia a dos o más de los aminoglicósidos de uso clínico habitual.

En los antibiogramas observamos básicamente, dos tipos de patrones de resistencia. Por un lado, cepas con el patrón An^S Gm^R Tm^R Net^R Siso^R, por otro lado cepas An^R Gm^R Tm^S Net^R Siso^S.

Patrón de resistencias	%*
An ^S Gm ^R Tm ^R Net ^R Siso ^R	8,6
An ^R Gm ^R Tm ^S Net ^R Siso ^S	6,6
An ^R Gm ^R Tm ^S Net ^R Siso ^R	0,6

* Respecto al total de cepas

Correlacionando con los valores de CMI observamos que 13 aislados (8,5%) presentaban valores de CMI para la Gm, Tm y Net ≥ 128µgr/ml y correspondían al primer fenotipo de resistencia determinado por antibiograma. Los valores de CMI obtenidos para la An resultaron sin embargo más

variables. Así, 9 aislados (5,9%) presentaban sensibilidad intermedia (CMI=16µgr/ml), 3 aislados (1,9%) resistentes (CMI=64µgr/ml) y 1 (0,6%) sensible (CMI=8µgr/ml).

Los aislados con el fenotipo An^R Gm^R Tm^S Net^R presentaban valores de CMI de resistencia para la amikacina, la gentamicina y la netilmicina que, en todos los casos, resultaban siempre < 128µgr/ml.

En los valores de CMIs observamos 14 aislados (9,2%) resistentes a la amikacina y a la gentamicina de los cuales 7 (4,6%) eran además sensibles a la tobramicina (CMI<8µgr/ml), 6 (3,9%) de sensibilidad intermedia (CMI=8µgr/ml) y 1 aislado (0,65%) resistente (CMI=16µgr/ml). En dos aislados los valores de resistencia obtenidos en las CMIs no correlacionaban con los obtenidos por antibiograma.

DETECCIÓN DE ENZIMAS MODIFICADORES.

• Ensayo radioenzimático.

La detección de la actividad enzimática para los aislados de interés, se realizó mediante ensayo radioenzimático. Inicialmente, utilizamos a modo de screening, unos pocos antibióticos aminoglicósidos para comprobar si existía actividad modificadora. Dependiendo del tipo de actividad a detectar, los antibióticos utilizados fueron:

ACETILASAS: Gm, Km, Tm

ADENILASAS: Sm, Spc, Gm, Km, Tm

FOSFORILASAS: Sm, Nm, Km

Los resultados del screening se muestran en la tabla E.

Se obtuvo actividad acetilasa en el 52,1% de las cepas y actividad fosforilasa en el 100% de las cepas. No se detectó actividad adenilasa.

En aquellos aislados en los que se observa actividad enzimática, se realiza la identificación del enzima o de los enzimas presentes en cada estirpe utilizando una gama mayor de sustratos.

En el caso de las acetilasas fueron:

ANTIBIÓTICOS: GmC₁, GmC_{1a}, Gm, Siso, KmA, KmB, Km, Tm, Nm, Bm, Pm, Lm, Rm, An, Net, 2'-Net, 6'-Net, 5-epi, Dact.

Y, en el caso de las fosforilasas:

ANTIBIÓTICOS: Km, KmA, KmB, Nm, Bm, Lm, Pm, Rm, An, Sm, Gm

No se realizaron perfiles de adenilasas ya que, en ningún aislado se detectó esta actividad.

Los perfiles de sustrato de las cepas con actividad acetilasa se muestran en la tabla F. Los perfiles de sustrato de las cepas con actividad fosforilasa, se muestran en la tabla G.

Los valores expresados en las tablas corresponden a los centelleos por minuto (cpm) y al porcentaje relativo de actividad.

Para obtener este porcentaje, se consideran los centelleos obtenidos por un determinado antibiótico menos los centelleos del blanco como valor 100 y la actividad del blanco como valor 0 de forma que el porcentaje de actividad para un determinado antibiótico se expresa como:

$$\% = (A_y - B / A_x - B) \times 100$$

donde:

B: Actividad del blanco

A_x: Actividad del aminoglicósido de referencia

A_y: Actividad del aminoglicósido a calcular

En los perfiles de acetilasas se ha considerado como valor de referencia la actividad de la GmC_{1a}. En los perfiles de fosforilasas se ha considerado como valor de referencia la actividad de la Nm.

- Interpretación de los resultados gráficos.

Los screening muestran actividad acetilasa, que se observa claramente en los aislados 4, 18, 34, 40, 62, 68, 95, 110, 119 y 154 y, de forma más dudosa, en los aislados 81 y 155.

Realizamos perfiles de acetilasas de los aislados 4, 18, 40, 62, 68, 81, 95, 110, 133, 154 y 155. Incluimos los aislados 81 y 155 puesto que presentan el mismo perfil de resistencia por antibiograma y CMIs que el resto de las cepas con actividad acetilasa.

Los screening muestran actividad fosforilasa en todos los aislados.

Las gráficas 2 a 12, muestran los porcentajes de modificación obtenidos en los perfiles de acetilasas.

La interpretación de los resultados obtenidos mediante ensayo radioenzimático es, en el caso de las acetilasas, complicada.

Como posteriormente se muestra, todos los aislados presentan un único enzima modificador con actividad acetilasa, sin embargo, los resultados gráficos no representan, como cabría esperar, un perfil homogéneo.

Existen una serie de pautas a seguir en la interpretación de los resultados obtenidos. Para ello se correlaciona el perfil de resistencia obtenido mediante antibiograma con los valores de las CMIs y con el porcentaje de modificación obtenido por cada antibiótico (65).

También resulta importante conocer previamente, que enzimas se encuentran de forma prevalente en los aislados. Así, en *Pseudomonas aeruginosa* se ha podido comprobar en distintos estudios a nivel mundial, que son tres los mecanismos de resistencia a aminoglicósidos más habituales: las alteraciones en la permeabilidad, la modificación enzimática por la acetilasa AAC(6')-II y la adenilasa ANT(2'')-I (107,116,137,138,139,140,191).

Los mecanismos simples, son los más frecuentes, encontrándose en el 63% de los aislamientos. Se está observando un incremento de mecanismos de resistencia combinados, sin

embargo, esto no ocurre en mas de un 1% de los aislamientos, siendo la combinación AAC(6')-II + permeabilidad la más común (140).

Examinando el porcentaje de modificación obtenido en los perfiles, se puede observar que en todos los aislados estudiados hay un importante porcentaje de modificación de la tobramicina, de la sisomicina (aunque menor en los aislados 62, 68 y 133), de la kanamicina B y de la Gentamicina C_{1a}.

Se descartan los enzimas AAC(2') y AAC(3)-I y II, porque no modifican ni a la neomicina ni a la kanamicina.

En los aislados con actividad AAC(3)-IV, tampoco se observa modificación de la kanamicina.

La acetilasa AAC(3)-III modifica la Gm, Tm, 5-epi, Siso, Km y Neo. También se observa un importante porcentaje de modificación de Pm y Lm pero carece de actividad frente a Netilmicina.

Los perfiles de las cepas 4, 68, 81, 110, 133 y 155 son los que mejor se corresponde con la presencia del enzima AAC(6')-II. La AAC(6')-II, modifica preferentemente la GmC_{1a} frente a la GmC₁. Esto se debe a que la Gentamicina C_{1a} posee, en 6', un grupo amino primario al igual que ocurre con la Gentamicina C₂ por el contrario, la gentamicina C₁ posee en esta posición un grupo amino secundario y es, por tanto, menos modificada por la acción de la AAC(6')-II

Modifica también la Km que, por lo general, es mejor sustrato que la Gm. La Sisomicina y la tobramicina son también sustratos para la acetilasa AAC(6')-II al igual que ocurre con la 5-epi y con la Net, siendo la 2'-Net mejor sustrato que 6'-Net. Además, la diferencia entre el porcentaje de modificación de 2'-Net y 6'-Net suele ser más relevante en la actividad de la AAC(6')-I que en la de la AAC(6')-II.

La An posee también un grupo amino primario en 6', sin embargo, es menos modificada que el resto de los antibióticos de la familia de las kanamicinas por poseer un voluminoso grupo en 1 que, presumiblemente por impedimentos estéricos, dificulta la acción de la AAC(6')-II.

En el resto de los perfiles, la identificación de la clase de acetilasa presente resulta mas complicado ya que se obtuvo actividad en prácticamente todos los antibióticos utilizados pero sin diferencias importantes entre la actividad de los más representativos.

Los enzimas 6'-N-acetiltransferasas poseen un particular interés clínico ya que prácticamente, modifican a todos los antibióticos aminoglicósidos importantes.

Los perfiles de fosforilasas resultan por el contrario mucho más homogéneos.

En todos los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra actividad APH(3') que es la responsable de la resistencia intrínseca a la kanamicina y neomicina.

Las gráficas 13 a 35 muestran los porcentajes de modificación obtenidos en los perfiles de fosforilasas.

Puesto que los enzimas APH(3')-I y APH(3')-II poseen el mismo patrón de resistencias por antibiograma, el criterio más aceptado para caracterizarlas mediante los ensayos radioenzimáticos, se basa en los porcentajes de modificación obtenidos frente a Lm y Bm. Se considera que si se obtiene un porcentaje de modificación de la Lm de 5 a 10 veces superior a Bm el enzima presente en el extracto es APH(3')-I. En caso contrario se trata de APH(3')-II (3,223).

El enzima APH(3')-I se encuentra ampliamente distribuido en Enterobacterias y se encuentra ocasionalmente en *Pseudomonas*. El fenotipo APH(3')-II, es raro en aislados clínicos, aunque se encuentra mas comúnmente en *Pseudomonas* que en Enterobacterias (142). El enzima APH(3')-III se ha caracterizado en *Pseudomonas aeruginosa* y en *Campylobacter spp* (45).

En todos los perfiles, se observa un importante porcentaje de modificación de la KmB, Nm y Lm y, en menor medida, de Pm, Rm y Bm y prácticamente, no se detecta actividad modificadora para An, Sm y Gm. Exceptuando el aislado 110 en todos los demás se comprueba que el porcentaje de modificación de la Lm es siempre mayor que el de la Bm pero nunca superior en mas de tres veces al valor de la Bm. En el aislado 85 no hay modificación de la Bm.

Cuando los valores son próximos se considera que coexisten ambos enzimas o bien que se trata del enzima APH(3')-III. Sin embargo, Young et al., (206) estudiando diversos géneros mediante hibridación, comprobaron que en este tipo de aislamientos, el gen caracterizado resultaba siempre aph(3')-I.

Los ensayos radioenzimáticos muestran que en prácticamente todos los aislados, independientemente de otros mecanismos de resistencia, se encuentra actividad APH(3') acorde con la coexistencia de los enzimas APH(3')-I y APH(3')-II o bien APH(3')-III, aunque se muestra mas claramente en el aislado 110 en el que los porcentajes de modificación de Bm y Lm son idénticos (152,4%). En el aislado 85 los porcentajes de modificación obtenidos demuestran la presencia del enzima APH(3')-I, pero no de APH(3')-II. En este caso, se produce modificación de la Lm, pero no de la Bm.

Calculamos los valores de CMI de las cepas resistentes a la kanamicina (Km), neomicina (Nm), paromomicina (Pm), butirosina (Bm) y lividomicina (Lm). Consideramos como resistentes a aquellos aislados que presentaban un valor de CMI > 64 µg/ml para cada uno de estos antibióticos (3).

Correlacionando los perfiles de fosforilasas resultantes con los valores de CMI obtenidos, se observa que todos los aislados, excepto en el 85, presentaban el fenotipo de resistencia (Km-Nm-Pm-Lm-Bm)^R.

• Detección fenotípica de los mecanismos de resistencia.

La caracterización de los mecanismos de resistencia (permeabilidad, diferentes enzimas modificadores) se llevó a cabo también mediante la detección fenotípica haciendo uso de 12 discos de antibióticos aminoglicósidos cargados de tal forma, que se compensan las diferencias individuales en la susceptibilidad de un determinado aislado frente a cada antibiótico y sólo se observará variación en los diámetros obtenidos, si se encuentra algunos de los mecanismos de resistencia mas habitualmente caracterizados.

Mediante su utilización puede determinarse, en bacilos gram-negativos, las acetilasas: AAC(2')-I, AAC(6')-I, AAC(6')-II, AAC(3)-I, AAC(3)-II, AAC(3)-III, AAC(3)-IV, AAC(3)-VI y otros fenotipos de dudosa clasificación considerados como AAC(3)-?; las adenilasas ANT(2'')-I, (la mas frecuente en *Pseudomonas*), y ANT(4')-II, y la fosforilasa APH(3')-VI.

Los diámetros obtenidos se muestran en la tabla H.

Siguiendo el orden secuencial descrito en material y métodos, podemos diferenciar tres tipos de aislados:

En las cepas 62, 68, 81 y 133, no se observan cambios en la susceptibilidad de la Apra/Astm pero si, en la 2'-Net y no cambia la 6'-Net por lo tanto, el mecanismo de resistencia propuesto se debe a la acetilasa AAC(6')-I o AAC(6')-II o las combinaciones de AAC(6')-I con ANT(2'')-I o con AAC(3)-I. Para diferenciar si se trata de AAC(6')-I o AAC(6')-II, se utiliza como criterio el hecho de que mientras que AAC(6')-I modifica la An pero no la GmC₁, la AAC(6')-II modifica la Gm pero no la An. En la tabla H puede observarse claramente, que no se producen cambios en la susceptibilidad de la An pero si en la Gm por lo tanto el mecanismo de resistencia propuesto es AAC(6')-II.

Considerando los 12 discos la diferenciación sería:

Mecanismo	Apra	Astm	6'-Net	2'-Net	Gm	Tm	An	Ise	Net	5-epi	K	Nc
AAC(6')-I	-	-	+	-	(+/-)	+	+	(+/-)	+	+	+	-
AAC(6')-II	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-

Los aislados 4, 18, 40, 95 y 110, muestran el mismo perfil anterior pero los diámetros obtenidos son algo menores para An, Ise, 6'-Net, Astm y Apra, lo que indica que, en estos aislados el mecanismo de resistencia es la combinación AAC(6')-II más una significativa disminución de la permeabilidad.

En los aislados 20, 25, 35, 64, 69 y 83 no pudo detectarse ningún enzima modificador. El fenotipo que se obtiene, muestra una disminución general de los diámetros en todos los antibióticos utilizados lo que es característico de la resistencia por impermeabilidad de la membrana externa.

Aunque en todos los aislados se observan cambios en la susceptibilidad de la Km y Neo, en ningún caso pueden atribuirse a la presencia de la fosforilasa APH(3')-VI que es la única que puede distinguirse por su fenotipo mediante los discos.

GENOTIPO DE LA RESISTENCIA.

Mediante la hibridación con sondas específicas puede determinarse que gen o genes son los responsables de un determinado fenotipo de resistencia. No obstante, la presencia del gen es condición necesaria pero no suficiente para que se exprese la resistencia. En ocasiones, puede determinarse la presencia del gen y observarse in vitro modificación enzimática, mediante ensayo radioenzimático, sin que in vivo se alcance a obtener un fenotipo de resistencia detectable por antibiograma.

Utilizamos 16 sondas génicas que reconocen específicamente genes de resistencia que codifican enzimas modificadores de aminoglicósidos y una sonda frente a ARNr que permite determinar si el proceso de fijación y desnaturalización ha sido correcto.

Las sondas utilizadas reconocen los genes de las acetilasas:

aac(3)-Ia, aac(3)-Ib, aac(3)-Va, aac(2')-Ia, aac(6')-Ib, aac(6')-Ic, aac(6')-If, aac(6')-In y aac(6')-IIb.

De las adenilasas:

ant(2'')-a y ant(4')-I.

Y de las fosforilasas:

aph(3')-I, aph(3')-II, aph(3')-III y aph(3')-VI, así como del enzima bifuncional aph(2'')+6'.

Los resultados obtenidos en los estudios de hibridación se muestran en la Tabla I.

Los únicos resultados positivos se obtienen para los aislados 4, 18, 40, 62, 68, 81, 95, 110, 154 y 155, con el uso de las sondas aac(6')-Ib y aac(6')-IIb.

Correlacionando el fenotipo obtenido anteriormente, tanto mediante ensayo radioenzimático como con el uso de los discos, se puede entonces determinar que el gen responsable de la actividad acetilasa es, probablemente, aac(6')-IIa.

Para ello nos basamos en que se observa que la hibridación fue claramente positiva con la sonda aac(6')-Ib pero débilmente con la sonda aac(6')-IIb. Como se ha comentado anteriormente a

pesar de que poseen distintos patrones de resistencia, entre los genes *aac(6')-Ib* y *aac(6')-IIa*, existe un porcentaje de homología entre sus secuencias de un 74%. Las proteínas son similares en un 82% y por tanto los aislados que expresan uno u otro fenotipo, cohibridan con cada una de las sondas. De hecho, normalmente se utiliza la sonda *aac(6')-Ib* para detectar el gen *aac(6')-IIa*. Por el contrario, la sonda *aac(6')-IIb* no hibrida con el gen *aac(6')-Ib* y solo lo hace débilmente con el gen *aac(6')-IIa*. El gen *aac(6')-IIa* se encuentra en más del 92% de las cepas que expresan actividad AAC(6')-II (141,187).

No se obtuvo ningún resultado positivo con las distintas sondas de fosforilasas utilizadas, a pesar de haberse obtenido actividad en todos los aislados. Este hecho no resulta sorprendente si se considera que, en *Pseudomonas aeruginosa*, es frecuente detectar actividad fosforilasa tanto APH(3')-I como APH(3')-II mediante ensayo radioenzimático, sin que se obtengan resultados de hibridación positivos.

Young et al. (3,223) encontraron que, en aproximadamente la mitad de las cepas en las que se había detectado actividad APH(3'), no se producía hibridación frente a sondas APH(3')-I y APH(3')-II. Álvarez y Mendoza (3) determinaron en distintos géneros, que no se producía hibridación en un 14,67% de los aislamientos. El porcentaje en el caso de *Pseudomonas* únicamente, se elevaba al 57,1% de los aislamientos. Estos autores plantean que probablemente existan otros genes APH(3')

En este sentido se ha de considerar, que de los tres genes caracterizados que codifican para la fosforilasa APH(3')-I, denominados *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Ib* y *aph(3')-Ic*, el gen *aph(3')-Ia* clonado del transposón *Tn903* hibrida con aquellos aislados que poseen el gen *aph(3')-Ic*, pero no lo hace con los que presentan el gen *aph(3')-Ib*, con el que posee únicamente, un 60% de homología en su secuencia (189).

Por otro lado, también se han caracterizado nuevos genes que codifican para la fosforilasa APH(3')-II. El gen *aph(3')-IIa* fue clonado del transposón *Tn5* y el gen *aph(3')-IIb* del cromosoma de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 005 (62,208). La homología en la secuencia entre ambos genes es de únicamente un 56,8%. Hächler et al., plantean la hipótesis de que este gen *aph(3')-IIb* se

encuentre distribuido universalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, donde constituiría un gen metabólico normal pero cuya desregulación llevaría a expresar el fenotipo APH(3')-II. La presencia del gen contribuiría a explicar, al menos en parte, la resistencia uniforme de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* a la Km.

SEROTIPADO.

El serotipado de las 23 cepas multirresistentes mostró que el serotipo O:11 es el más frecuente, encontrándose en 15 (65.2%) de los aislamientos. En 4 (17.4%) cepas el serotipo asignado fue O:6.

El serotipo O:11 predominó en los aislados resistentes por modificación enzimática mientras que el O:6 en las cepas resistentes por impermeabilidad de membrana.

La cepa 4 aglutinó con los sueros O:1 y O:13, las cepas 20 y 83 resultaron no aglutinables mientras que, la cepa 85 aglutinó con todos los sueros.

La mayoría de los aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* pertenecen a los serotipos O:1, O:10, O:11, O:6 y O:12 (144,178,199).

Especialmente importante resulta el serotipo O:12 puesto que se asocia con un fenotipo de multiresistencia. En los brotes epidémicos son los serotipos O:11 y O:12 los más frecuentes.

La asociación entre el serotipo O:11 y la producción de enzimas modificadores ha sido puesta de manifiesto por otros autores. Kettner, M. et al. estudiando 16 aislamientos de serotipo O:11 comprobaron, que 13 aislados producían los enzimas AAC(6')-I, APH(2'') y APH(3)-VI, 4 de estas cepas producían además las acetilasas AAC(3)-II. Solamente 3 aislados no producían enzimas modificadores (107,202).

TRANSFERENCIA DE INFORMACIÓN GENÉTICA.

• Extracción de ADN plasmídico.

No se obtuvo ADN plasmídico en ningún de los aislamientos poseedores del enzima AAC(6')-II, ni en la mayoría de las estirpes resistentes por impermeabilidad.

Sin embargo si se obtuvo ADN plasmídico, cuando las extracciones se realizaban añadiendo An o Gm en el medio, con el aislado 20 resistente por impermeabilidad de la membrana externa.

En *Pseudomonas aeruginosa*, se han descrito plásmidos de resistencia a estreptomycin y kanamicina, no asociados con la producción de enzimas modificadores. En este sentido, se señala también, que se han caracterizado algunos plásmidos de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* aparentemente no productores de enzimas modificadores que sin embargo, sintetizaban el enzima AA(6') a un nivel muy bajo, pero suficiente para producir resistencia (29,53).

Bryan et al., caracterizaron un plásmido de un aislado de *Pseudomonas aeruginosa* que producía resistencia a gentamicina y, a bajo nivel, a otros antibióticos aminoglicósidos sin que se detectase producción de enzimas modificadores. Aunque no se pudo determinar el mecanismo responsable de la resistencia mediada por el plásmido, la combinación de un gen cromosómico y otro plasmídico producía resistencia a alto nivel a la gentamicina (12).

• Conjugación, movilización y transformación.

Los experimentos se realizaron utilizando dos cepas auxotróficas de la línea PAO, PAO-38 y PAO 2535 (3), de forma que los transconjugantes se detectarían verificando su resistencia y comprobando la auxotrofia.

En ninguno de los aislados con actividad AAC(6')-II pudo detectarse transferencia de la resistencia.

Comprobamos la posibilidad de una codificación plasmídica en plásmidos no conjugativos, mediante experimentos de movilización, haciendo uso de los plásmidos movilizadores R2 y RP4. No se obtuvieron transconjugantes.

Tampoco fue posible curar ninguna de las características de la resistencia utilizando diversos agentes curantes (SDS, naranja de acridina y bromuro de etidio) solos y en combinación con distintas temperaturas.

En los aislados resistentes por impermeabilidad los experimentos de conjugación se realizaron empleando concentraciones de aminoglicósidos menores que en las cepas con actividad AAC(6')-II. A las concentraciones utilizadas se obtuvieron tres tipos de colonias, sin embargo, la mayoría de las colonias obtenidas resultaron prototróficas y por tanto crecían tanto en medio mínimo como en medios suplementados.

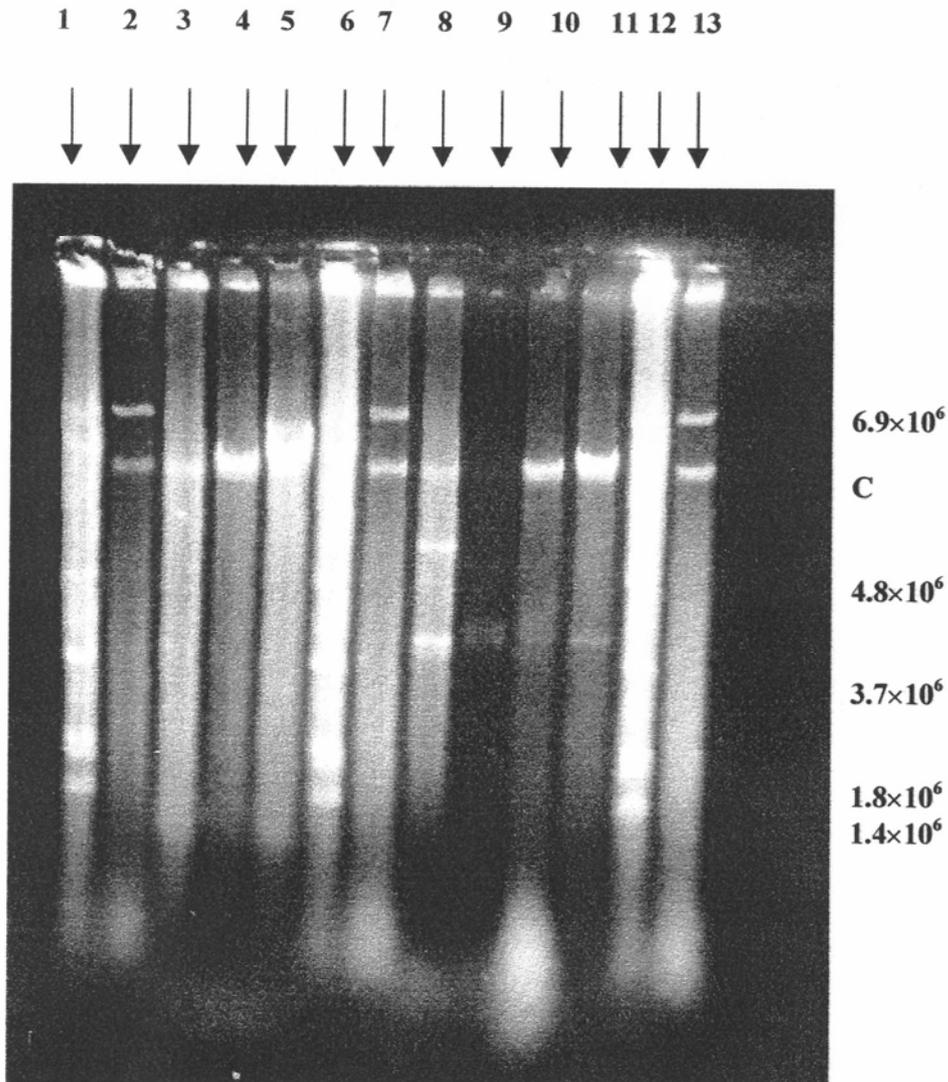
Estos tres tipos de colonias obedecían a fenómenos distintos pero bien caracterizados en *Pseudomonas*.

En primer lugar, colonias que presentaban resistencia estable, a todos los aminoglicósidos utilizados y que resultaron mutantes de resistencia del donador a la rifampicina. La rifampicina se utilizó como antibiótico contraselectivo en los experimentos de conjugación. Se ha demostrado que la rifampicina produce un aumento sinérgico del efecto postantibiótico (PAE) inducido en *Pseudomonas aeruginosa* por la tobramicina (58,173).

En segundo lugar, colonias auxotróficas que presentaban resistencia a todos los antibióticos aminoglicósidos utilizados, pero cuya resistencia resultó inestable perdiéndose tras cinco pases por medio libre de antibiótico. Este tipo de resistencia inestable obedece a un fenómeno de reciente caracterización en *Pseudomonas aeruginosa* denominado resistencia adaptativa y es debido a una desregulación de la etapa EDP-II del mecanismo de entrada de aminoglicósidos.

En tercer lugar, colonias auxotróficas de resistencia estable pero sin codificación plasmídica que correspondían a mutantes de resistencia del receptor.

Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las cepas señaladas.



Calles 1, 6 y 12: V517

Calles 2, 7 y 13: DSM5218

Calle 3: Cepa 4

Calle 4: Cepa 18

Calle 5: Cepa 62

Calle 8: Cepa 20 (Gm 16µg/ml)

Calle 9: Cepa 20 (An 10µg/ml)

Calles 10 y 11: Transconjugantes PAO 2635(3) de la cepa 20

Ninguno de los aislamientos presentó actividad acetilasa mediante screening y tampoco se detectaron genes de resistencia mediante sondas, en los aislados auxotróficos de resistencia estable.

Únicamente con el aislado 20 y utilizando el receptor PAO 2535, se obtuvieron transconjugantes en los que se pudo recuperar ADN plasmídico.

La codificación plasmídica de enzimas modificadores es habitual, sin embargo, el aislamiento de plásmidos que confieran características de resistencia por impermeabilidad es muy poco frecuente (29,30,43,53,129).

GENOTIPO VERSUS FENOTIPO EN LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA.

De los datos obtenidos tanto mediante detección fenotípica como mediante el uso de sondas pueden determinarse que existen al menos tres tipos de mecanismos de resistencia:

Cepas resistentes por modificación enzimática que poseen el enzima AAC(6')-II y las fosforilasas APH(3')-I y APH(3')-II o bien APH(3')-III (20%).

Cepas resistentes que combinan el poseer actividad modificadora mediante el enzima AAC(6')-II con una permeabilidad reducida al acceso del antibiótico al interior celular y las fosforilasas APH(3')-I y APH(3')-II o APH(3')-III (35%).

Cepas en las que no se detecta actividad modificadora por acetilasas o adenilasas que den cuenta de la resistencia frente a la mayoría de los antibióticos de uso clínico habitual y que presentan por tanto una disminución de la permeabilidad como mecanismo de resistencia. Estos aislados poseen también las fosforilasas APH(3')-I y APH(3')-II o APH(3')-III, exceptuando el aislado 85 que únicamente posee la fosforilasa APH(3')-I (45%).

La comprobación de la actividad acetilasa mediante el método radioenzimático es eficaz en los screening pero de difícil interpretación en los perfiles y por tanto, dificulta mucho la tipificación del enzima. Sin embargo, tanto mediante el uso del Kit de identificación como mediante sondas se

comprueba fácilmente la buena correlación existente entre el fenotipo observado y el genotipo obtenido. La combinación AAC(6')-II asociada a una disminución de la permeabilidad, únicamente puede detectarse mediante la utilización del Kit de identificación.

Por el contrario, la identificación de actividad fosforilasa y la tipificación del enzima APH(3') resulta mas adecuada mediante ensayo radioenzimático que mediante el kit de identificación. Las sondas aph(3')-I, aph(3')-II, aph(3')-III utilizadas no permite detectar el o los genes responsables del fenotipo de resistencia. Como anteriormente se ha expuesto, esto probablemente se deba a la existencia de mas de un gen para cada enzima (tabla J):

ANEXO

Gráfica 1. Distribución de los aislamientos

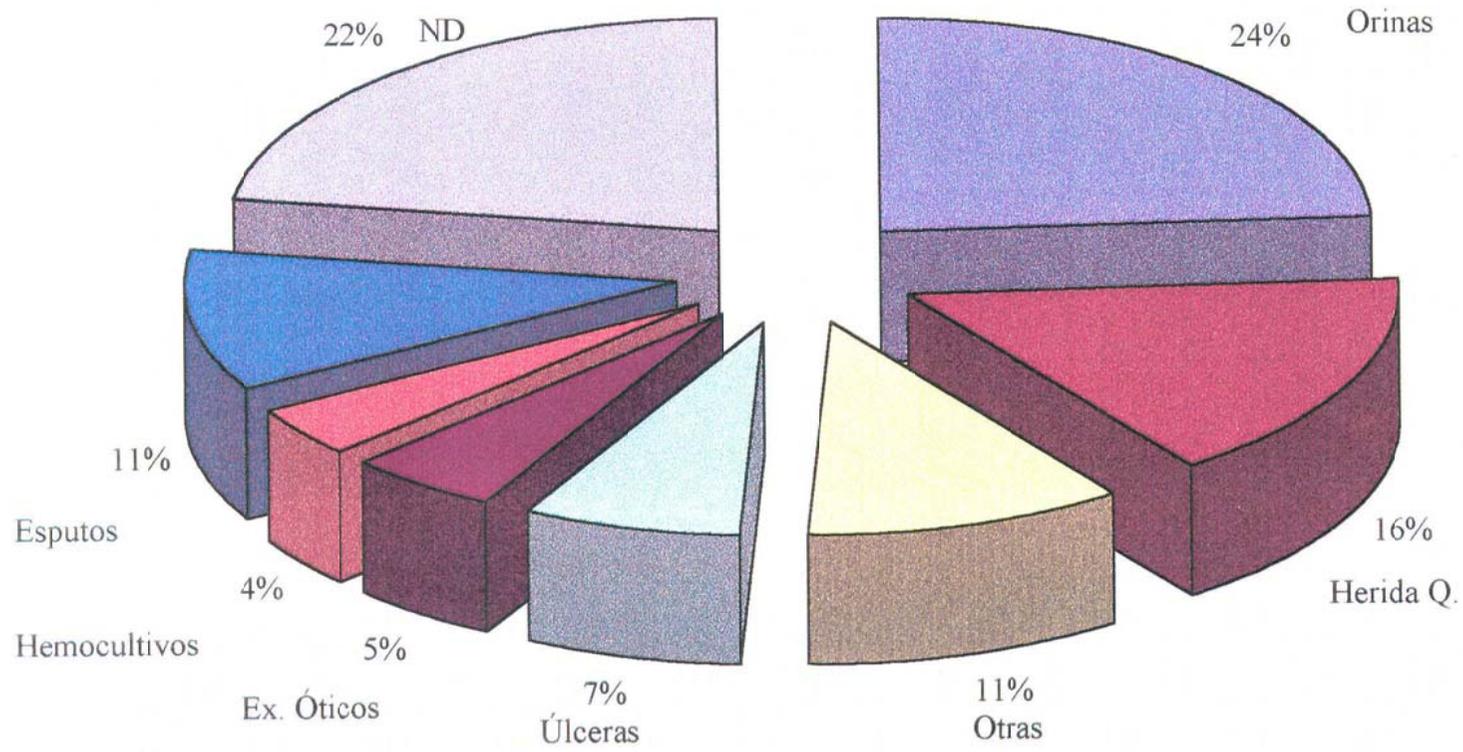


Tabla A. Resultados de los antibiogramas.

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Siso</i>	<i>Ipm</i>	<i>Atm</i>	<i>Nor</i>	<i>Ctx</i>	<i>Az</i>
1	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
2	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S
3	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
4	<i>P. fluor.*</i>	S	R	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R
5	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	I	S	S	I	S	I	S
6	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	I	S	S	I	S	I	S
7	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
8	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
9	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
10	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
11	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S
12	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
13	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
14	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
15	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
16	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	R
17	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	I	S	S	R	S	I	S
18	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S
19	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
20	<i>P. aerug</i>	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	I	S
21	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
22	<i>P. fluor.*</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
23	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S
24	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S

* Identificación inicial

Tabla A. Resultados de los antibiogramas (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Siso</i>	<i>Ipm</i>	<i>Atm</i>	<i>Nor</i>	<i>Ctx</i>	<i>Az</i>
25	<i>P. aerug</i>	R	R	S	R	R	R	I	S	S	S	R	R
26	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	R	S	S	I	S
27	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
28	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
29	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
30	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S
31	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
32	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	I	S
33	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
34	<i>P. aerug</i>	I	I	S	I	I	I	S	S	S	S	I	S
35	<i>P. aerug</i>	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	R	S
36	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
37	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
38	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S
39	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
40	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R
41	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S
42	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	-	I	S
44	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	R	-	R	R
45	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S
46	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	I	R	S	S
47	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
48	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R

Tabla A. Resultados de los antibiogramas (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Siso</i>	<i>Ipm</i>	<i>Atm</i>	<i>Nor</i>	<i>Ctx</i>	<i>Az</i>
49	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	I	S
50	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S
51	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S
52	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S
53	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R	S
54	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R	R
55	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
56	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S
57	<i>P. aerug</i>	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	I	S
58	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
59	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
60	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S
61	<i>P. fluor*</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	I	S
62	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
63	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
64	<i>P. aerug</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	I	S
65	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
66	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
67	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
68	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
69	<i>P. aerug</i>	R	R	S	I	R	R	S	S	I	S	R	S
70	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
71	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R

Tabla A. Resultados de los antibiogramas (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Siso</i>	<i>Ipm</i>	<i>Atm</i>	<i>Nor</i>	<i>Ctx</i>	<i>Az</i>
72	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
73	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
74	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
75	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
76	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R
77	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
78	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	I	S
79	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
80	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
81	<i>P. fluor.*</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R
82	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
83	<i>P. fluor.*</i>	R	R	I	R	R	R	S	S	I	S	R	S
84	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
85	<i>P. fluor.*</i>	R	R	I	R	R	R	R	S	S	S	I	S
86	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
87	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
88	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	I	S
89	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
90	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
91	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R	S
92	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R
93	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
94	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	I	S

Tabla A. Resultados de los antibiogramas (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Siso</i>	<i>Ipm</i>	<i>Atm</i>	<i>Nor</i>	<i>Ctx</i>	<i>Az</i>
95	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R
96	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	I	S
97	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
98	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
99	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
100	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
101	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
102	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R	S
103	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
104	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R	S
105	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
106	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
107	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	I	S
108	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R	S
109	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S
110	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R
111	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
112	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R
113	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
114	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
115	<i>P. aerug</i>	S	I	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S
116	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S

Tabla A. Resultados de los antibiogramas (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Siso</i>	<i>Ipm</i>	<i>Atm</i>	<i>Nor</i>	<i>Ctx</i>	<i>Az</i>
117	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
118	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S
119	<i>P. aerug</i>	I	R	S	R	R	R	S	S	I	R	R	S
120	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S
121	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
122	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
123	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
124	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R
125	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S
126	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	R	R
127	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
128	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
129	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
131	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
133	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S
134	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	I	S
135	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S
136	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
137	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S
138	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S
139	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
140	<i>P. aerug</i>	I	R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	S
141	<i>P. aerug</i>	I	I	S	I	R	R	S	S	S	S	I	S

Tabla A. Resultados de los antibiogramas (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Siso</i>	<i>Ipm</i>	<i>Atm</i>	<i>Nor</i>	<i>Ctx</i>	<i>Az</i>
142	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
143	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
144	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S
145	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
146	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	I	S
147	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S
148	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S
149	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
150	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S
152	<i>P. aerug</i>	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	I	S
153	<i>P. aerug</i>	I	I	S	S	R	R	S	S	I	R	I	S
154	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	S
155	<i>P. aerug</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R

Tabla B. CMIs

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>Mz</i>	<i>Ipm</i>	<i>Tic</i>	<i>Atm</i>	<i>Pip</i>	<i>Cip</i>	<i>Nor</i>
1	<i>P. aerug</i>	16	8	1	8	64	2	64	16	16	1	8
2	<i>P. aerug</i>	8	4	0,5	4	32	4	16	2	8	2	16
3	<i>P. aerug</i>	8	4	0,5	4	16	1	4	1	16	2	16
4	<i>P. fluorescens</i>	32	>128	>128	>128	>128	2	>128	2	128	2	0,25
5	<i>P. aerug</i>	1	0,5	0,25	0,25	16	8	>128	16	4	0,06	0,25
6	<i>P. aerug</i>	1	1	0,25	0,25	16	8	>128	64	4	1	8
7	<i>P. aerug</i>	4	2	0,25	2	4	2	16	2	1	0,25	1
8	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	4	64	64	64	16	64
9	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	8	64	4	64	8	32	0,25	1
10	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	128	8	8	0,5	2
11	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	64	2	128	8	64	1	2
12	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	2	32	2	32	8	16	0,12	1
13	<i>P. aerug</i>	16	8	2	16	>128	2	64	8	64	0,5	2
14	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	2	64	2	64	4	8	0,12	0,5
15	<i>P. aerug</i>	16	8	2	8	64	4	64	8	38	5	1
16	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	4	32	2	64	8	8	0,25	2
17	<i>P. aerug</i>	1	1	0,25	0,25	32	8	>128	16	4	0,06	0,25
18	<i>P. aerug</i>	16	>128	>128	>128	64	8	>128	16	64	16	64
19	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	4	64	8	>128	16	32	0,25	1
20	<i>P. aerug</i>	64	32	8	8	64	4	64	8	32	64	>128
21	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	4	64	8	32	0,5	2
22	<i>P. fluorescens</i>	4	2	0,5	2	32	2	32	8	16	1	4
23	<i>P. aerug</i>	8	2	1	4	64	4	64	8	32	0,5	2
24	<i>P. aerug</i>	8	4	1	16	64	2	64	4	64	8	8
25	<i>P. aerug</i>	64	32	4	64	>128	1	128	16	64	0,5	2

Tabla B. CMI (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>Mz</i>	<i>Ipm</i>	<i>Tic</i>	<i>Atm</i>	<i>Pip</i>	<i>Cip</i>	<i>Nor</i>
26	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	8	32	8	64	8	32	0,12	0,5
27	<i>P. aerug</i>	8	4	1	8	>128	4	128	32	64	0,5	2
29	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	128	8	64	0,5	2
28	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	4	64	2	64	8	16	0,12	1
30	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	4	>128	4	32	4	32	0,25	1
31	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	64	16	32	0,5	2
32	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	32	2	32	8	16	0,5	2
33	<i>P. aerug</i>	32	>128	>128	>128	>128	1	>128	32	64	0,5	2
34	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	32	16	8	0,25	1
35	<i>P. aerug</i>	32	32	8	64	>128	2	128	32	32	0,5	2
36	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	64	2	32	8	8	0,5	0,5
37	<i>P. aerug</i>	8	4	2	4	64	2	64	32	32	4	32
38	<i>P. aerug</i>	8	2	2	32	16	2	8	32	8	2	16
39	<i>P. aerug</i>	8	4	0,5	8	64	2	64	8	8	0,25	1
40	<i>P. aerug</i>	16	>128	>128	>128	>128	2	>128	8	>128	16	64
41	<i>P. aerug</i>	16	8	2	32	64	2	32	8	16	16	64
42	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	32	8	16	16	64
44	<i>P. aerug</i>	16	16	2	32	>128	2	>128	64	>128	1	4
45	<i>P. aerug</i>	16	4	2	4	64	1	32	64	32	16	128
46	<i>P. aerug</i>	16	4	2	8	64	2	>128	64	>128	16	128
47	<i>P. aerug</i>	8	4	0,5	4	128	2	64	64	32	16	128
48	<i>P. aerug</i>	16	8	2	16	>128	2	>128	64	>128	4	32
49	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	64	16	8	16	64
50	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	32	16	8	16	64
51	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	64	8	16	16	64

Tabla B. CMI (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>Mz</i>	<i>Ipm</i>	<i>Tic</i>	<i>Atm</i>	<i>Pip</i>	<i>Cip</i>	<i>Nor</i>
52	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	64	8	16	16	64
53	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	>128	2	>128	32	32	0,5	2
54	<i>P. aerug</i>	8	4	1	8	>128	2	>128	16	32	0,5	2
55	<i>P. aerug</i>	8	4	1	8	32	2	32	8	8	0,5	1
56	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	2	32	8	16	16	64
57	<i>P. aerug</i>	8	8	1	8	64	2	64	16	16	2	2
58	<i>P. aerug</i>	4	1	0,25	2	64	4	32	16	16	0,25	1
59	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	32	8	32	16	8	0,5	2
60	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	64	8	64	16	16	0,5	1
61	<i>P. fluorescens</i>	2	0,5	0,5	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
62	<i>P. aerug</i>	16	>128	128	>128	>128	2	>128	16	>128	16	64
63	<i>P. aerug</i>	16	8	0,25	16	32	2	32	>128	16	0,5	2
64	<i>P. aerug</i>	64	32	8	64	128	2	64	4	16	2	8
65	<i>P. aerug</i>	4	1	0,25	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
66	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	32	2	32	8	8	0,25	1
67	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	2	>128	2	64	8	8	0,25	0,5
68	<i>P. aerug</i>	8	128	128	128	>128	2	>128	16	>128	64	128
69	<i>P. aerug</i>	64	32	8	64	64	2	128	16	16	1	4
70	<i>P. aerug</i>	16	4	1	8	32	2	32	8	8	0,25	0,25
71	<i>P. maltophilia</i>	8	8	2	2	>128	>128	>128	>128	>128	8	32
72	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	32	4	16	8	8	0,25	1
73	<i>P. aerug</i>	4	4	1	2	64	2	64	16	32	0,5	1
74	<i>P. aerug</i>	8	4	0,5	2	64	2	16	4	8	0,06	0,5
75	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	2	32	2	16	2	8	0,06	0,12
76	<i>P. aerug</i>	8	4	0,5	4	>128	2	>128	64	>128	0,25	1

Tabla B. CMI (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>Mz</i>	<i>Ipm</i>	<i>Tic</i>	<i>Atm</i>	<i>Pip</i>	<i>Cip</i>	<i>Nor</i>
77	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	>128	2	32	8	32	0,5	2
78	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	4	32	2	32	16	8	0,12	1
79	<i>P. aerug</i>	16	16	2	16	128	2	32	8	32	0,5	2
80	<i>P. aerug</i>	4	4	0,5	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
81	<i>P. fluorescens</i>	16	>128	>128	>128	>128	2	>128	32	>128	2	8
82	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	4	128	2	64	32	8	0,25	2
83	<i>P. fluorescens</i>	32	16	16	64	>128	16	128	64	32	1	4
84	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	2	128	2	128	8	8	0,25	0,5
85	<i>P. aerug</i>	64	32	4	64	64	2	32	8	16	0,25	1
86	<i>P. aerug</i>	16	4	1	8	128	2	128	16	8	0,25	0,5
87	<i>P. aerug</i>	16	8	2	16	64	2	128	32	16	0,5	2
88	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	2	32	32	64	16	16	0,5	2
89	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	2	16	4	32	32	8	0,25	1
90	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	2	32	4	32	8	8	0,25	1
91	<i>P. aerug</i>	8	4	0,5	2	128	4	64	32	32	0,25	1
92	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	2	>128	2	>128	128	>128	0,25	1
93	<i>P. aerug</i>	8	4	0,5	2	128	4	128	32	32	0,25	1
94	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	2	32	32	64	16	16	0,5	2
95	<i>P. aerug</i>	16	>128	>128	>128	>128	2	>128	16	>128	64	128
96	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	64	32	32	8	8	1	8
97	<i>P. aerug</i>	16	4	1	8	32	2	64	8	16	0,25	0,5
98	<i>P. aerug</i>	8	4	2	8	32	2	64	16	8	0,25	1
99	<i>P. aerug</i>	8	4	1	8	128	8	64	16	8	0,25	0,5
100	<i>P. aerug</i>	8	4	1	8	64	4	64	8	16	0,12	0,5
101	<i>P. aerug</i>	16	8	2	8	64	8	64	16	32	1	8

Tabla B. CMI's (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>Mz</i>	<i>Ipm</i>	<i>Tic</i>	<i>Atm</i>	<i>Pip</i>	<i>Cip</i>	<i>Nor</i>
102	<i>P. aerug</i>	16	8	2	16	>128	4	128	64	32	0,5	2
103	<i>P. aerug</i>	8	4	1	8	64	4	32	8	16	0,25	0,5
104	<i>P. aerug</i>	16	8	2	8	128	4	128	64	32	0,5	2
105	<i>P. aerug</i>	16	8	1	8	128	64	32	16	32	0,25	1
106	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	128	4	64	8	16	0,12	0,5
107	<i>P. aerug</i>	8	4	1	8	128	4	128	32	32	0,5	2
108	<i>P. aerug</i>	8	8	1	16	128	4	128	64	32	0,5	2
109	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	2	32	8	32	8	16	0,12	0,5
110	<i>P. aerug</i>	16	>128	>128	>128	>128	32	>128	8	>128	16	64
111	<i>P. aerug</i>	8	8	1	8	>128	8	32	8	8	0,25	1
112	<i>P. aerug</i>	32	16	2	16	>128	8	>128	128	>128	32	128
113	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	2	64	8	64	64	32	1	4
114	<i>P. aerug</i>	ND	ND	ND	ND	64	4	64	64	32	0,5	1
115	<i>P. aerug</i>	16	8	1	16	>128	8	>128	64	32	4	16
116	<i>P. aerug</i>	16	4	1	4	64	8	32	8	16	0,12	0,5
118	<i>P. aerug</i>	4	4	1	4	32	8	64	8	16	0,12	0,5
119	<i>P. aerug</i>	32	16	4	64	>128	8	>128	32	32	8	64
120	<i>P. aerug</i>	2	0,5	0,12	0,5	16	8	16	2	8	1	4
121	<i>P. aerug</i>	8	1	0,5	2	64	8	64	32	16	1	4
122	<i>P. aerug</i>	8	4	4	4	>128	8	32	8	32	0,12	0,5
123	<i>P. aerug</i>	2	2	0,25	2	128	8	8	2	16	0,5	2
124	<i>P. aerug</i>	16	>128	>128	>128	>128	4	>128	16	>128	16	64
125	<i>P. aerug</i>	4	2	2	0,5	64	4	32	8	16	0,12	1
126	<i>P. aerug</i>	16	4	1	8	>128	8	64	16	64	0,25	1

Tabla B. CMI's (continuación)

<i>Cepa</i>	<i>Identif.</i>	<i>An</i>	<i>Gm</i>	<i>Tm</i>	<i>Net</i>	<i>Mz</i>	<i>Ipm</i>	<i>Tic</i>	<i>Atm</i>	<i>Pip</i>	<i>Cip</i>	<i>Nor</i>
127	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	2	32	8	32	8	8	0,25	0,5
128	<i>P. aerug</i>	16	8	1	8	32	2	32	8	8	2	8
129	<i>P. aerug</i>	4	1	1	1	64	8	64	>128	8	1	16
130	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	64	16	64	16	16	0,25	0,5
131	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	64	4	64	8	16	0,25	0,5
132	<i>P. aerug</i>	4	2	0,5	2	32	4	32	4	8	0,12	0,5
133	<i>P. aerug</i>	16	>128	>128	>128	128	8	128	8	32	8	32
134	<i>P. aerug</i>	4	2	1	2	128	64	64	16	64	0,5	1
135	<i>P. aerug</i>	8	2	1	2	64	8	32	8	8	0,12	0,5
136	<i>P. aerug</i>	4	4	1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
137	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	128	8	64	16	16	0,12	0,5
138	<i>P. aerug</i>	4	4	1	2	128	8	64	32	16	0,5	2
139	<i>P. aerug</i>	8	2	0,5	4	128	8	64	16	32	0,12	1
140	<i>P. aerug</i>	64	32	8	64	128	8	64	32	16	0,5	2
141	<i>P. aerug</i>	32	32	4	64	>128	16	64	16	32	2	8
142	<i>P. aerug</i>	32	16	2	32	32	ND	32	8	8	0,5	2
143	<i>P. aerug</i>	16	8	2	8	128	8	32	16	16	0,12	0,5
145	<i>P. aerug</i>	32	8	1	16	64	16	16	8	8	1	1
146	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	128	8	128	32	32	2	0,5
148	<i>P. aerug</i>	8	2	1	4	128	8	128	32	32	2	8
149	<i>P. aerug</i>	16	8	2	32	128	8	64	16	32	0,5	2
150	<i>P. aerug</i>	8	4	1	4	64	8	32	32	8	4	8
153	<i>P. aerug</i>	64	64	8	64	>128	16	128	64	32	8	32
154	<i>P. aerug</i>	16	>128	>128	>128	>128	64	128	16	64	32	64
155	<i>P. aerug</i>	32	>128	>128	>128	>128	64	128	>128	64	32	64

Tabla C. Estadística de valores CMIs

	PERCENTILES			
	<i>CMI₂₅</i>	<i>CMI₅₀</i>	<i>CMI₇₅</i>	<i>CMI₉₀</i>
<i>An</i>	8	8	16	32
<i>Gm</i>	2	4	8	32
<i>Tm</i>	0.5	1	2	8
<i>Net</i>	4	8	16	64
<i>Atm</i>	8	16	32	64
<i>Cip</i>	0.25	0.5	2	16
<i>Ipm</i>	2	4	8	8
<i>Mz</i>	64	64	128	>128
<i>Nor</i>	1	2	8	64
<i>Pip</i>	8	16	32	>128
<i>Tic</i>	32	64	128	>128

Tabla D-1. Frecuencias AN

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum</i>
<i>Válidos</i> 1	3	2	2
2	3	2	3.9
4	23	15.1	19.1
8	54	35.5	54.6
16	51	33.6	88.2
32	10	6.6	94.7
64	7	4.6	99.3
128	1	7	100
<i>Total</i>	152	100	

Tabla D-2. Frecuencias GM

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 1</i>	9	5.9	5.9
<i>2</i>	33	21.7	27.6
<i>4</i>	44	28.9	56.6
<i>8</i>	38	25.0	81.6
<i>16</i>	6	3.9	85.5
<i>32</i>	8	5.3	90.8
<i>64</i>	1	0.7	91.4
<i>128</i>	1	0.7	92.1
<i>>128</i>	12	7.9	100
<i>Total</i>	152	100	

Tabla D-3. Frecuencias TM

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 0.12</i>	1	0.7	0.7
<i>0.25</i>	8	5.3	5.9
<i>0.5</i>	37	24.3	30.3
<i>1</i>	59	38.8	69.1
<i>2</i>	21	13.8	82.9
<i>4</i>	5	3.3	86.2
<i>8</i>	6	3.9	90.1
<i>16</i>	1	0.7	90.8
<i>64</i>	1	0.7	91.4
<i>128</i>	2	1.3	92.8
<i>>128</i>	11	7.2	100
<i>Total</i>	152	100	

Tabla D-4. Frecuencias NET

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 0.25</i>	3	2.0	2.0
<i>0.5</i>	2	1.3	3.3
<i>1</i>	2	1.3	4.6
<i>2</i>	30	19.9	24.5
<i>4</i>	32	21.2	45.7
<i>8</i>	26	17.2	62.9
<i>16</i>	28	18.5	81.5
<i>32</i>	5	3.3	84.8
<i>64</i>	10	6.6	91.4
<i>128</i>	1	0.7	92.1
<i>>128</i>	12	7.9	100.0
<i>Total</i>	151	100.0	

Tabla D-5. Frecuencias ATM

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válid. 1</i>	1	0.7	0.7
<i>2</i>	6	4.0	4.7
<i>4</i>	6	4.0	8.7
<i>8</i>	54	36.2	45.0
<i>16</i>	38	25.5	70.5
<i>32</i>	21	14.1	84.6
<i>64</i>	16	10.7	95.3
<i>128</i>	2	1.3	96.6
<i>>128</i>	5	3.4	100.0
<i>Total</i>	149	100.0	

Tabla D-6. Frecuencias CIP

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 0.06</i>	4	2.7	2.7
<i>0.12</i>	17	11.4	14.1
<i>0.25</i>	34	22.8	36.9
<i>0.5</i>	36	24.2	61.1
<i>1</i>	15	10.1	71.1
<i>2</i>	11	7.4	78.5
<i>4</i>	5	3.4	81.9
<i>8</i>	5	3.4	85.2
<i>16</i>	16	10.7	96.0
<i>32</i>	3	2.0	98.0
<i>64</i>	3	2.0	100.0
<i>Total</i>	149	100.0	

Tabla D-7. Frecuencias IPM

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 0.5</i>	1	0.7	0.7
<i>1</i>	4	2.7	3.4
<i>2</i>	63	42.9	46.3
<i>4</i>	27	18.4	64.6
<i>8</i>	39	26.5	91.2
<i>16</i>	5	3.4	94.6
<i>32</i>	4	2.7	97.3
<i>64</i>	4	2.7	100.0
<i>Total</i>	147	100.0	

Tabla D-8. Frecuencias MZ

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 4</i>	1	0.7	0.7
<i>16</i>	6	4.0	4.7
<i>32</i>	27	18.1	22.8
<i>64</i>	53	35.6	58.4
<i>128</i>	26	17.4	75.8
<i>>128</i>	36	24.2	100.0
<i>Total</i>	149	100.0	

Tabla D-9. Frecuencias NOR

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 0.12</i>	1	0.7	0.7
<i>0.25</i>	4	2.7	3.4
<i>0.5</i>	24	16.2	19.6
<i>1</i>	35	23.6	43.2
<i>2</i>	33	22.3	65.5
<i>4</i>	7	4.7	70.3
<i>8</i>	11	7.4	77.7
<i>16</i>	6	4.1	81.8
<i>32</i>	5	3.4	85.1
<i>64</i>	16	10.8	95.9
<i>128</i>	6	4.1	100.0
<i>Total</i>	148	100.0	

Tabla D-10. Frecuencias PIP

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 1</i>	1	0.7	0.7
<i>4</i>	3	2.0	2.7
<i>8</i>	39	26.2	28.9
<i>16</i>	38	25.5	54.4
<i>32</i>	39	26.2	80.5
<i>64</i>	13	8.7	89.3
<i>128</i>	1	0.7	89.9
<i>>128</i>	15	10.1	100.0
<i>Total</i>	149	100.0	

Tabla D-11. Frecuencias TIC

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje Acum.</i>
<i>Válidos 4</i>	1	0.7	0.7
<i>8</i>	2	1.3	2.0
<i>16</i>	7	4.7	6.7
<i>32</i>	40	26.8	33.6
<i>64</i>	52	34.9	68.5
<i>128</i>	22	14.8	83.2
<i>>128</i>	25	16.8	100.0
<i>Total</i>	149	100.0	

Tabla E. SCREENING ACETILASAS ADENILASAS Y FOSFORILASAS

CPM										
	ACETILASAS			ADENILASAS				FOSFORILASAS		
	GM	TM	KM	GM	TM	SM	SPC	SM	NM	KM
4	1073	4985	3510	98	154	157	163	1531	18720	4263
18	974	1391	1388	115	132	134	128	1537	11626	2966
20	337	217	677	70	76	73	69	1811	17488	3552
25	455	370	375	863	708	755	906	1353	18800	4443
34	1587	3729	5165	ND	ND	ND	ND	2191	7888	2404
35	142	130	150	28	49	41	51	3354	12722	3287
40	560	1171	1039	113	139	92	112	2577	11813	3175
62	711	1506	1097	436	355	485	623	2027	10302	2509
64	368	463	261	120	144	173	29	2290	17913	4094
68	658	1064	1488	80	120	177	276	4157	13815	5642
69	478	462	511	110	306	163	81	3383	8602	3846
81	599	890	718	358	489	527	433	2006	9993	2629
83	113	157	173	44	35	50	56	1951	6225	2183
85	122	133	114	ND	ND	ND	ND	1410	3453	1451
95	660	1162	1526	476	457	430	574	2275	14237	3227
110	957	1066	1103	101	128	108	126	1614	12388	3156
119	579	1491	988	663	806	524	612	2246	5642	1891
124	237	445	207	ND	ND	ND	ND	4786	12084	4208
133	650	706	512	379	505	369	399	2132	7832	2872
140	800	627	832	1196	2047	2198	2289	1600	14654	3171
153	380	229	233	454	ND	408	470	2394	8732	2361
154	649	1364	928	240	255	210	286	4782	10975	3649
155	371	630	497	152	161	112	186	2946	16161	3287

Tabla F. Perfiles Acetilasas

	CPM	%										
	4	4	18	18	40	40	62	62	68	68	81	81
<i>GmCl</i>	456	27,7	443	34,1	371	32,5	520	25,5	603	4,3	521	63,4
<i>GmCl_a</i>	1171	100	946	100	875	100	1505	100	7198	100	730	100
<i>Gm</i>	1244	107,4	490	40,3	609	64,4	713	40,1	1999	24,6	592	75,8
<i>Siso</i>	3368	322,1	650	61,2	550	56,5	709	39,8	2692	34,6	468	54,1
<i>KmA</i>	1195	102,4	901	94,1	853	97,0	789	45,8	4760	64,6	933	135,5
<i>KmB</i>	1824	166,0	953	101,0	898	103,0	1878	128,2	7757	108,1	1111	166,7
<i>Km</i>	1735	157,0	583	52,5	662	71,5	1368	89,6	6396	88,3	1230	187,5
<i>Tm</i>	1939	177,6	1929	228,6	1074	126,6	1404	108,2	2406	123,7	958	140,0
<i>Nm</i>	895	72,1	749	74,2	554	57,0	1158	73,7	2443	31,0	519	63,0
<i>Bm</i>	1541	137,4	729	71,6	763	85,0	846	50,1	1393	15,8	621	80,9
<i>Pm</i>	1138	96,6	728	71,4	809	91,1	660	36,1	1485	17,1	602	77,5
<i>Lm</i>	1089	91,7	836	85,6	1021	119,5	813	47,7	1285	14,2	640	84,2
<i>Rm</i>	295	11,4	989	105,6	671	72,7	1438	94,9	2574	32,9	526	64,2
<i>An</i>	1067	89,5	730	71,7	823	93	663	36,3	1588	18,6	613	79,5
<i>Net</i>	443	26,4	630	58,6	655	70,5	688	38,2	2040	25,2	557	69,7
<i>2'-Net</i>	1245	107,5	541	46,9	694	75,7	661	36,2	1855	22,5	769	106,8
<i>6'-Net</i>	1027	85,4	721	70,5	792	88,8	737	41,9	1399	15,9	584	74,4
<i>5-epi</i>	1042	86,9	754	74,8	759	84,4	613	32,5	1747	20,9	520	63,2
<i>Dact</i>	703	52,6	1015	109	664	71,7	595	31,2	1386	15,7	697	94,2

Tabla F. Perfiles Acetilinas (continuación)

	CPM	%								
	95	95	110	110	133	133	154	154	155	155
<i>GmCl</i>	349	5	603	56,7	599	13,4	434	43,2	539	25,4
<i>GmCl_a</i>	1207	100	942	100	2509	100	795	100	1231	100
<i>Gm</i>	1146	93,2	746	74,9	1995	76,7	783	98,1	861	60,1
<i>Siso</i>	1727	157,5	1303	146,1	1386	49,1	754	93,5	788	52,2
<i>KmA</i>	2085	197,1	985	105,5	2394	94,7	787	98,7	815	55,1
<i>KmB</i>	2505	243,5	1266	141,3	2977	121,2	885	114,1	1353	113,1
<i>Km</i>	2057	194,0	1066	115,8	3989	167,0	953	124,8	1365	114,4
<i>Tm</i>	1813	167,0	1600	184	2167	84,5	1008	133,5	1462	124,8
<i>Nm</i>	1127	91,1	880	92	2023	77,9	708	86,3	1566	136,0
<i>Bm</i>	1552	138,1	891	93,4	1739	65,0	714	87,2	705	43,3
<i>Pm</i>	1375	118,5	946	100,5	1231	42,0	725	88,9	1084	84,1
<i>Lm</i>	1594	142,8	1079	117,4	1582	57,9	435	43,4	862	60,2
<i>Rm</i>	1540	136,8	1153	126,9	1391	49,3	846	108,0	1069	85,5
<i>An</i>	1509	133,4	1134	124,5	1599	58,7	700	85,0	674	39,9
<i>Net</i>	1615	145,1	1252	139,6	1551	56,5	736	90,7	958	70,5
<i>2'-Net</i>	1238	103,4	1316	147,7	1698	63,2	560	63,0	966	71,4
<i>6'-Net</i>	1602	143,6	1263	140,9	1611	59,3	864	110,8	657	38,1
<i>5-epi</i>	1427	124,3	1635	188,5	1209	41,0	740	91,3	1223	99,1
<i>Dact</i>	1529	135,6	1076	117,1	910	27,5	536	59,2	707	43,5

Tabla G. Perfiles Fosforilasas

		<i>Km</i>	<i>KmA</i>	<i>KmB</i>	<i>Nm</i>	<i>Bm</i>	<i>Lm</i>	<i>Pm</i>	<i>Rm</i>	<i>An</i>	<i>Sm</i>	<i>Gm</i>
4	CPM	6436	8446	22991	30185	18482	38341	21115	24101	5185	2284	5379
	%	15,9	23	74,5	100	58,5	128,8	67,8	78,4	11,4	1,2	12,1
18	CPM	4753	6234	12393	15008	13672	23583	10877	11128	2763	2034	5660
	%	21,5	32,8	79,9	100	89,7	165,6	68,3	70,3	6,2	0,6	28,4
20	CPM	4896	6211	16133	23060	15886	35669	17446	17043	8796	7152	15184
	%	13,3	19,5	66,9	100	65,7	160,1	73,2	71,2	31,9	24	62,4
25	CPM	5652	7468	19149	19679	13459	34822	15435	19294	3876	2737	7290
	%	20,9	31,1	97	100	64,9	185,3	76	97,8	10,8	4,4	30,1
34	CPM	2165	1970	3863	4674	3642	8050	4403	4646	3003	2294	2732
	%	2,2	0	68,4	100	59,7	231,5	89,4	98,9	34,9	7,2	24,3
35	CPM	4050	5008	12971	15947	11201	20280	13218	12332	8409	5321	10004
	%	14	20,9	78,4	100	65,7	131,3	80,2	73,8	45,5	23,2	57
40	CPM	6796	7657	15709	23610	18365	26951	15850	7272	4602	2593	5526
	%	22,3	26,3	63,5	100	75,7	115,4	64,1	24,5	12,2	2,9	16,5
62	CPM	5394	6556	12835	16353	13113	23642	11577	3943	3886	2714	4395
	%	23,9	32	75,5	100	77,5	150,5	66,8	13,8	13,4	5,3	17
64	CPM	3893	5086	13117	17140	12711	22869	12373	11811	5475	2578	9006
	%	11,8	19,8	73,2	100	70,5	138,1	68,2	64,5	22,3	3,1	45,8
68	CPM	3035	3407	7204	9658	6999	12224	6430	6779	4885	2720	5654
	%	12,2	17,1	67,4	100	64,7	133,9	57,2	61,8	36,7	8	46,9
69	CPM	2958	2945	5645	9246	7086	11077	6381	6801	3726	2645	5506
	%	11,8	11,7	49,5	100	69,7	125,6	59,8	65,7	22,6	7,4	47,5
81	CPM	2733	2938	8102	10263	8184	14670	7723	7933	4448	2777	7938
	%	7,6	10,1	73,4	100	74,5	154	68,8	71,4	28,6	8,1	71,4

Tabla G. Perfiles Fosforilasas (continuación)

		<i>Km</i>	<i>KmA</i>	<i>KmB</i>	<i>Nm</i>	<i>Bm</i>	<i>Lm</i>	<i>Pm</i>	<i>Rm</i>	<i>An</i>	<i>Sm</i>	<i>Gm</i>
83	<i>CPM</i>	2561	2835	6517	6834	6208	10143	6203	5339	3205	2934	5496
	%	9,6	15,4	93,2	100	86,7	170	86,6	68,3	23,2	17,4	71,6
85	<i>CPM</i>	1289	1209	2076	2621	2055	3730	2273	2179	1845	1519	1802
	%	0	0	0	100	0	317	31,8	13,5	0	0	0
95	<i>CPM</i>	2694	3392	7913	10989	8239	15006	7809	8043	4963	2363	6337
	%	6,5	14,4	65,3	100	69	145,2	64,1	66,8	32,1	2,8	47,6
110	<i>CPM</i>	3857	3906	11139	15043	11261	21830	10444	10510	6146	3401	11923
	%	13,5	13,8	69,8	100	152,4	152,4	64,4	64,9	31,2	9,9	75,8
119	<i>CPM</i>	2720	3316	8043	8376	6094	9509	7871	7090	4885	3376	5655
	%	9,7	19,2	94,6	100	63,5	118	91,9	79,4	44,3	20,2	56,5
124	<i>CPM</i>	3241	4403	11075	16086	11696	22357	11066	10962	6316	3084	9681
	%	8	16,4	64,1	100	68,6	144,9	64	63,3	30,1	6,9	54,1
133	<i>CPM</i>	2750	4456	9225	7863	5989	5712	9504	6410	3518	2557	2851
	%	11,4	42	127,6	100	69,6	64,6	132,6	77,1	25,2	8	13,2
140	<i>CPM</i>	4367	5930	15482	20377	14160	29476	14225	15125	8742	4100	11157
	%	12,3	20,9	73,2	100	65,9	149,8	66,3	71,2	36,3	10,8	49,5
153	<i>CPM</i>	2382	2860	6469	8638	5693	9645	6077	7062	3445	2748	6236
	%	4,2	11,5	66,7	100	54,9	115,4	60,7	75,8	20,4	9,8	63,2
154	<i>CPM</i>	3687	4162	7891	11399	9114	15481	9110	9885	6045	4260	8738
	%	17	22,1	62,2	100	75,4	143,9	75,3	83,7	42,3	23,1	71,3
155	<i>CPM</i>	2864	3709	7838	11250	7818	13084	8587	7551	6498	3806	7403
	%	8,2	17,5	62,6	100	62,4	120	70,8	59,5	48	18,5	57,9

Tabla H. Detección fenotípica de las resistencias. Diámetros obtenidos.

Antibióticos

	Gm	Tm	An	Ise	Net	5-Epi	2'-Net	6'-Net	Astm	Apra	Km	Neo	
ATCC 27853	19	21	26	22	21	21	21	21	23	21	6	9	
ATCC 25668	18	20	21	22	19	19	19	18	21	20	7	13	
Aislado 4	6	6	18	16	6	7	7	13	15	18	6	8	AAC(6')-II + PERMEAB.
Aislado 18	6	6	20	18	6	7	7	14	16	18	6	9	AAC(6')-II + PERMEAB.
Aislado 20	8	13	11	9	11	11	7	7	7	9	6	6	PERMEABILIDAD
Aislado 25	12	17	15	13	12	12	11	10	10	13	6	7	PERMEABILIDAD
Aislado 35	11	16	17	15	11	13	10	9	9	14	6	8	PERMEABILIDAD
Aislado 40	6	6	18	18	6	7	7	15	16	18	6	9	AAC(6')-II + PERMEAB.
Aislado 62	6	6	19	19	6	7	7	15	16	19	6	9	AAC(6')-II
Aislado 64	11	18	13	11	11	12	9	9	7	13	6	6	PERMEABILIDAD
Aislado 68	6	6	19	17	6	7	7	13	17	18	6	6	AAC(6')-II
Aislado 69	15	17	16	16	15	17	13	13	13	16	6	13	PERMEABILIDAD
Aislado 81	6	6	20	19	6	7	7	14	16	20	6	10	AAC(6')-II
Aislado 83	13	15	15	14	11	14	9	8	7	13	6	9	PERMEABILIDAD
Aislado 95	6	6	19	18	6	7	7	14	16	18	6	10	AAC(6')-II + PERMEAB.
Aislado 110	6	6	18	17	6	7	7	13	16	17	6	8	AAC(6')-II + PERMEAB.

Tabla H. Detección fenotípica de las resistencias. Diámetros obtenidos (continuación)

Antibióticos

	Gm	Tm	An	Ise	Net	5-Epi	2'-Net	6'-Net	Astm	Apra	Km	Neo	
Aislado 119	9	15	14	11	10	11	7	7	7	11	6	6	PERMEABILIDAD
Aislado 133	6	6	19	19	6	7	7	15	17	19	6	10	AAC(6')-II
Aislado 140	9	12	12	11	10	7	7	9	8	11	6	6	PERMEABILIDAD
Aislado 153	9	14	14	11	11	9	9	7	7	12	6	6	PERMEABILIDAD
Aislado 154	6	6	20	17	6	7	7	13	15	17	6	8	AAC(6')-II + PERMEAB.
Aislado 155	6	6	19	16	6	7	7	13	16	19	6	10	AAC(6')-II + PERMEAB.

Tabla I. Resultados Hibridación

	ant(2'')a	aac(3)-Ia	aac(3)-Ib	aac(3)-Va	aac(2')-Ia	aph(3')-I	aph(3')-II	aph(3')-III
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
68	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
69	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
81	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
83	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
95	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
110	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
119	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
133	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
140	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
153	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
154	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
155	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla I. Resultados Hibridación (continuación)

	aac(6')-Ib	aac(6')-Ic	aac(6')-If	aac(6')-In	aac(6')-IIb	ant(4')-I	aph(2'")+6'	aph(3')-VI	ARNr
4	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
18	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
40	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
62	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
68	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
69	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
81	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
83	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
95	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
110	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
133	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
119	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
140	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
153	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
154	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
155	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (débil)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

Tabla J. Contraste de Métodos

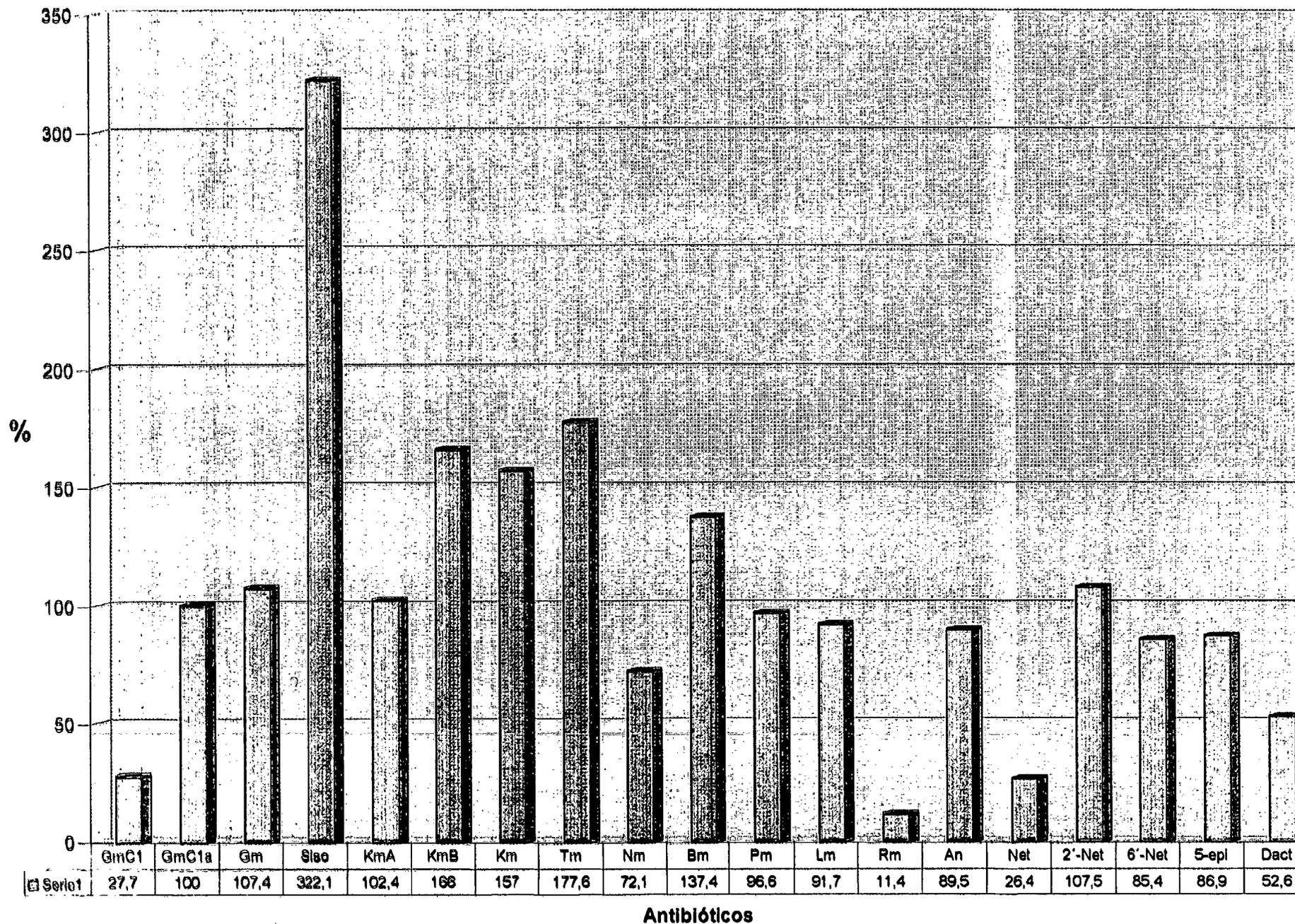
	Ensayo Radioenzimático		Kit de identificación		Sondas	
	Acetilinasas	Fosforilasas	Acetilinasas	Fosforilasas	Acetilinasas	Fosforilasas
4	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
18	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
20	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
25	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
35	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
40	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
62	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
64	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
68	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
69	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
81	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
83	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
85	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
95	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
110	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
119	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
133	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
140	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
153	PERMEAB.	+	PERMEAB.	(+/-)	PERMEAB.	-
154	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-
155	(+/-)	+	+	(+/-)	+	-

+ Identificación positiva

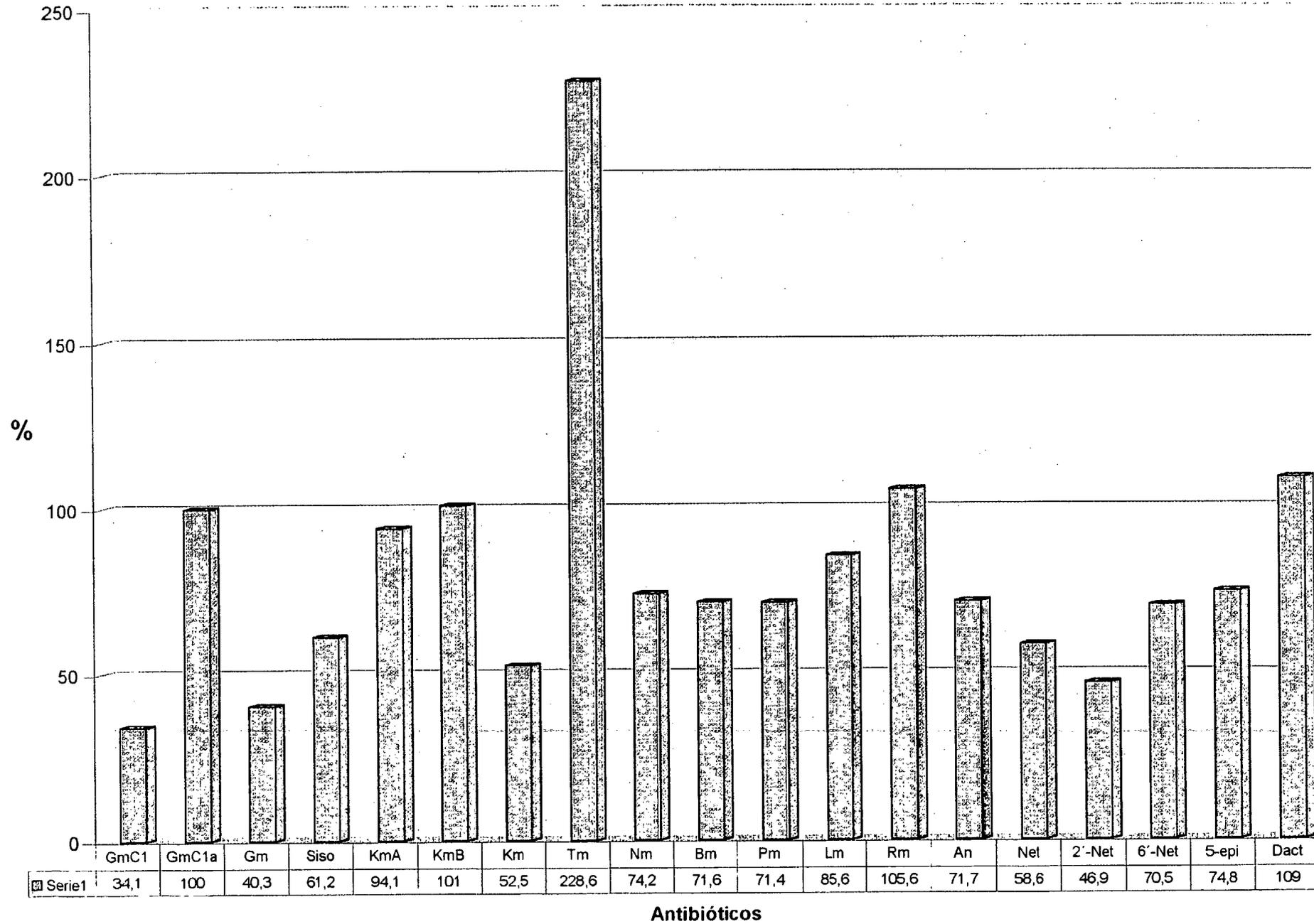
- No se identifica

± Difícil de identificar

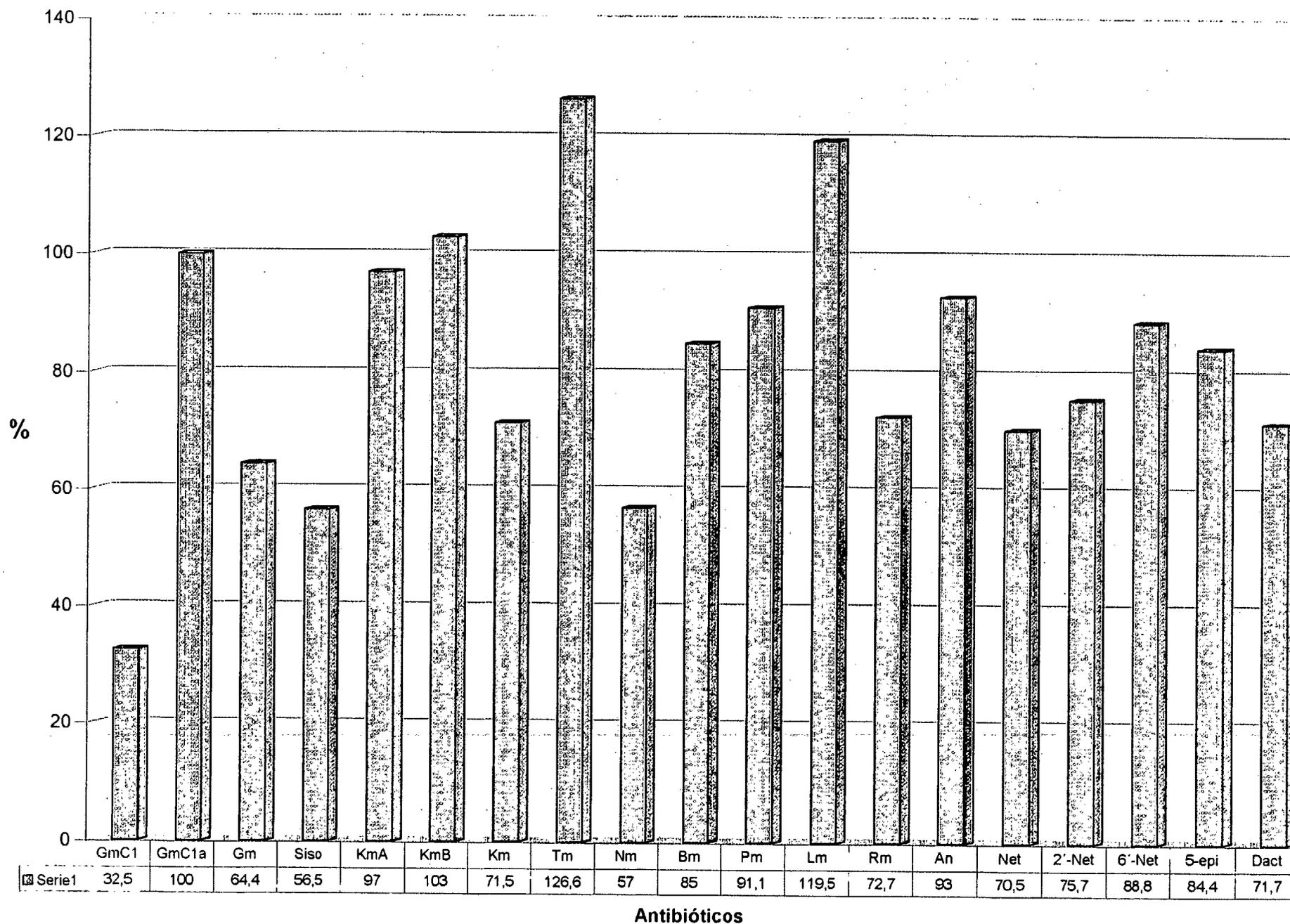
Gráfica 2 Perfil Acetilinas Cepa 4



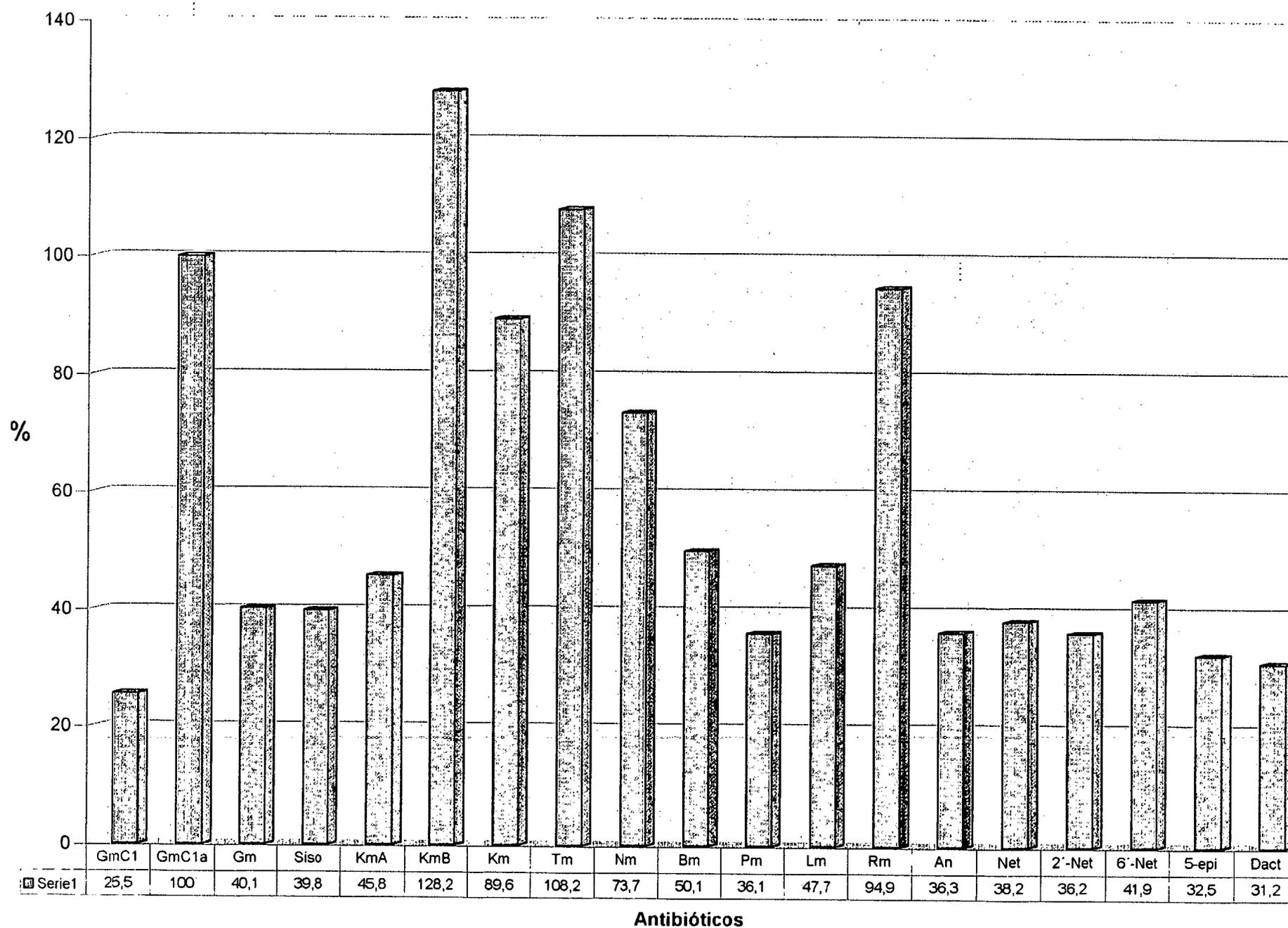
Gráfica 3 Perfil Acetilzasas Cepa 18



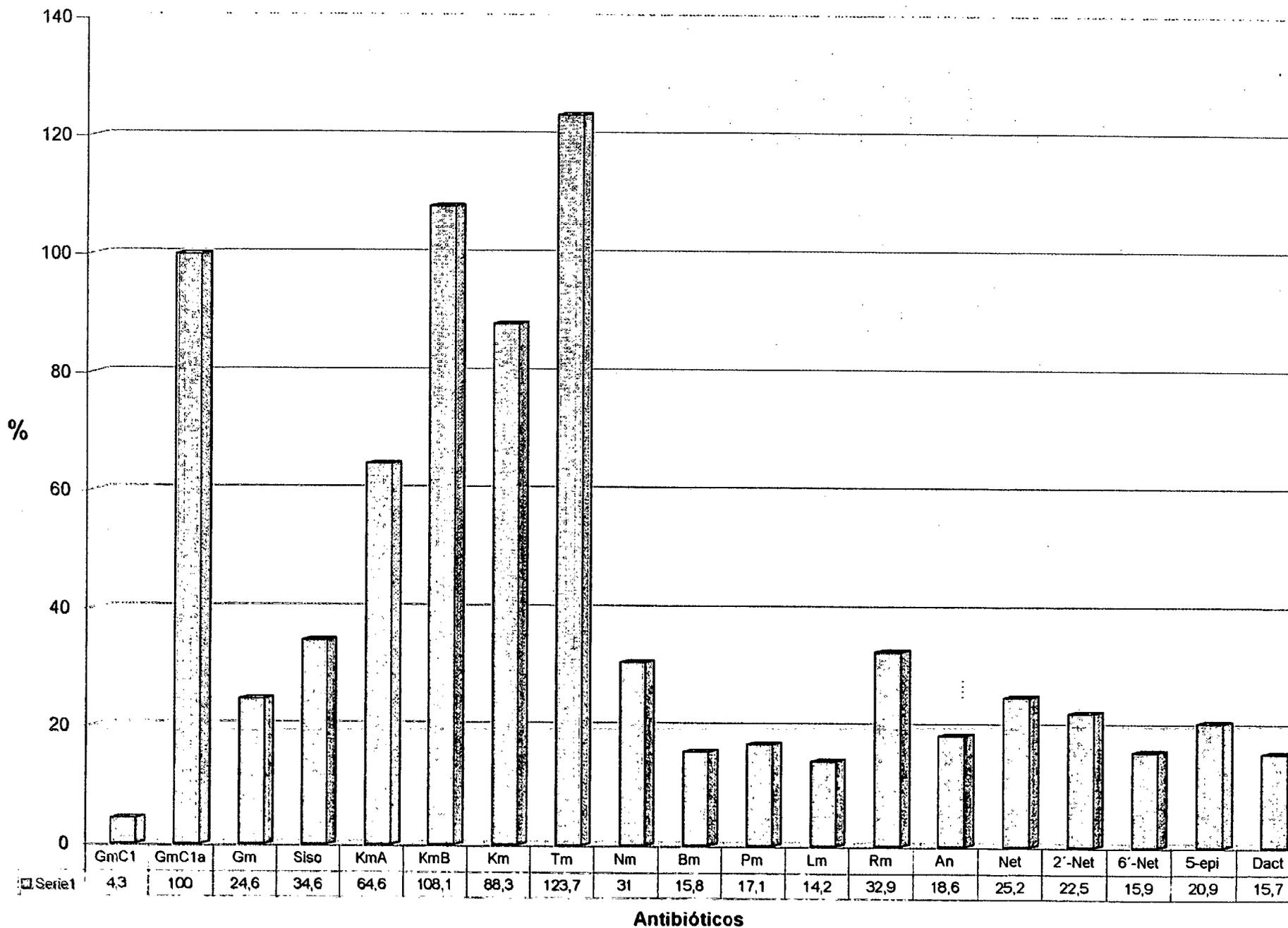
Gráfica 4 Perfil Acetilinas Cepa 40



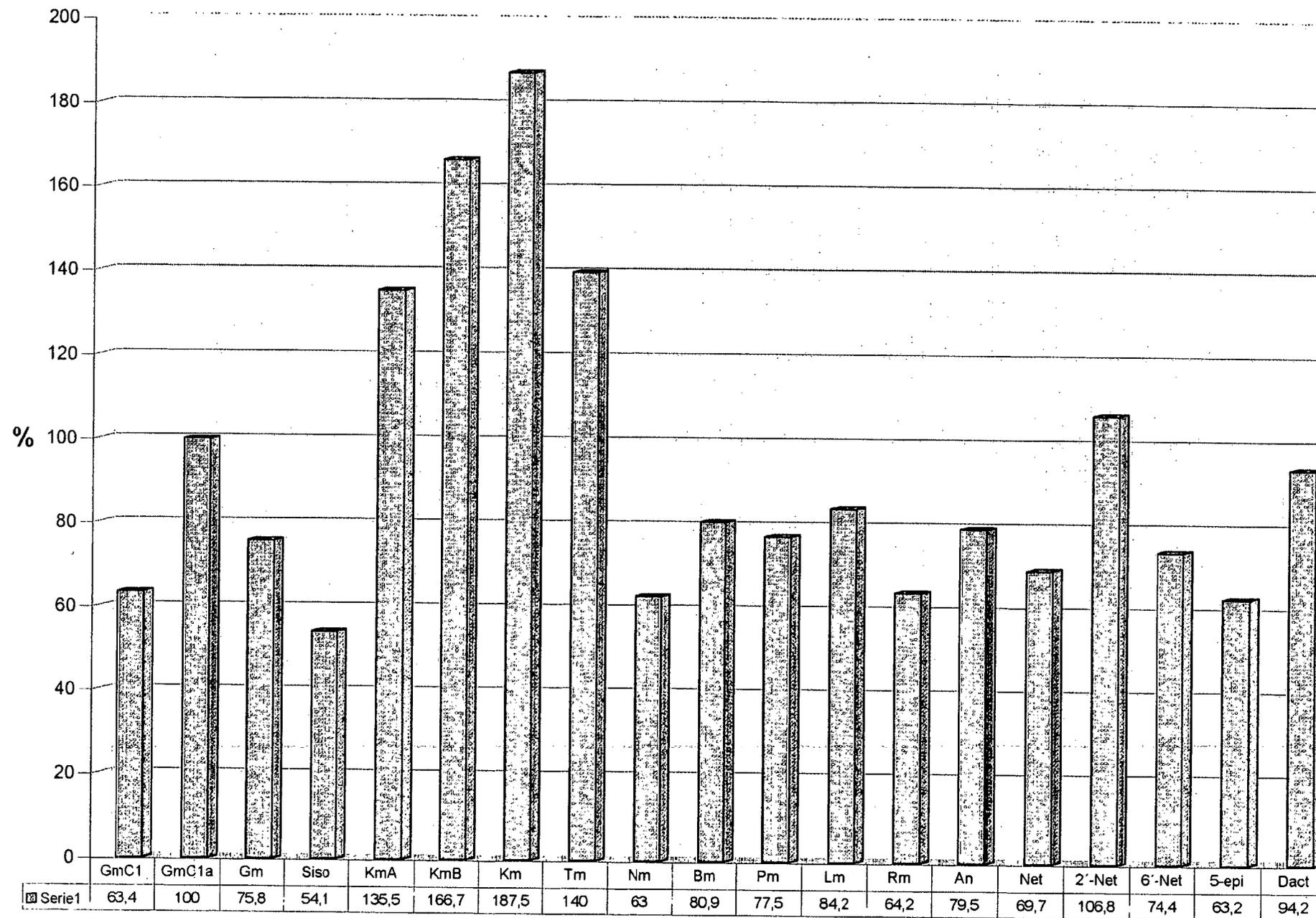
Gráfica 5 Perfil Acetilinas Cepa 62



Gráfica 6 Perfil Acetilinas Cepa 68

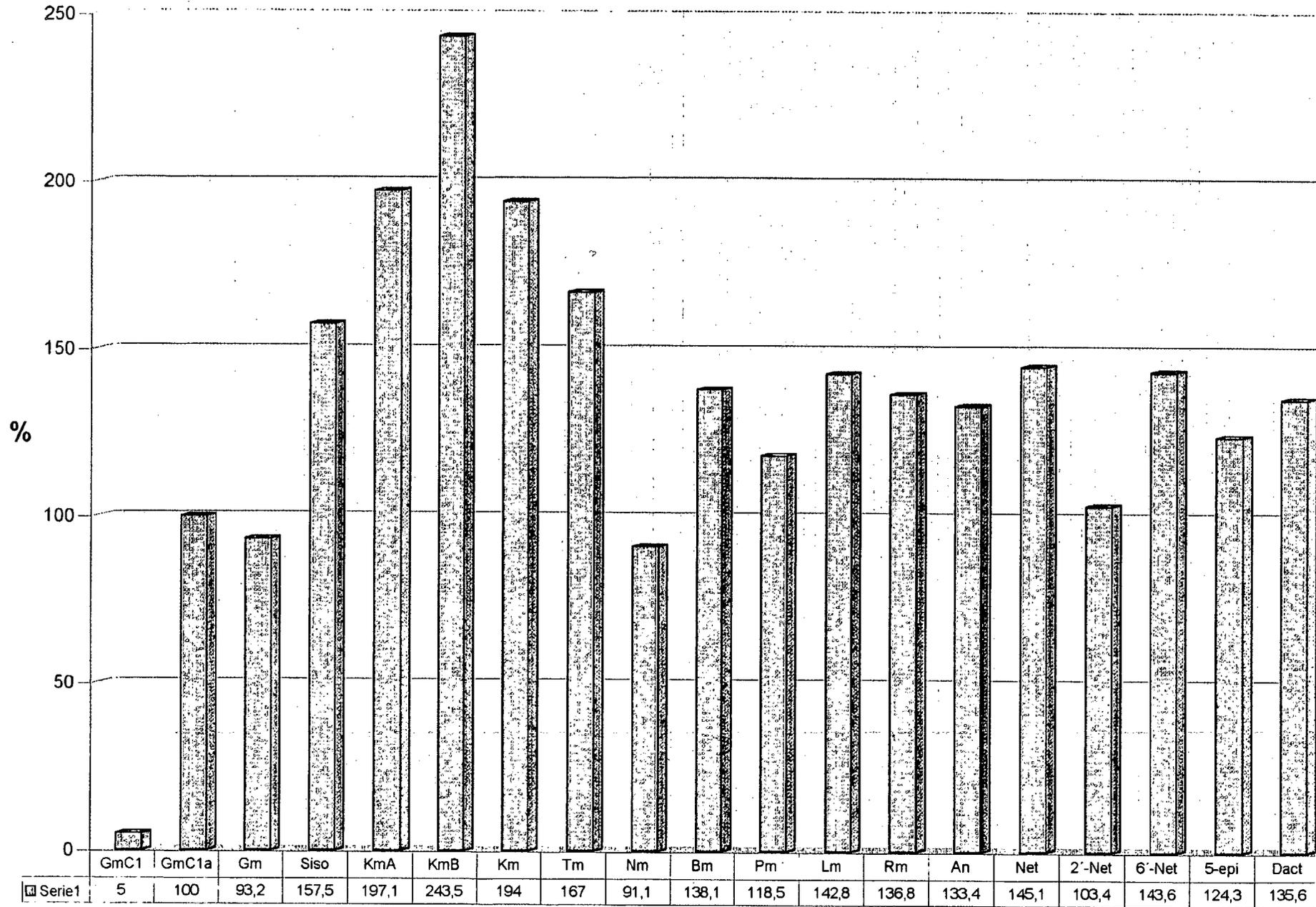


Gráfica 7 Perfil Acetilinas Cepa 81



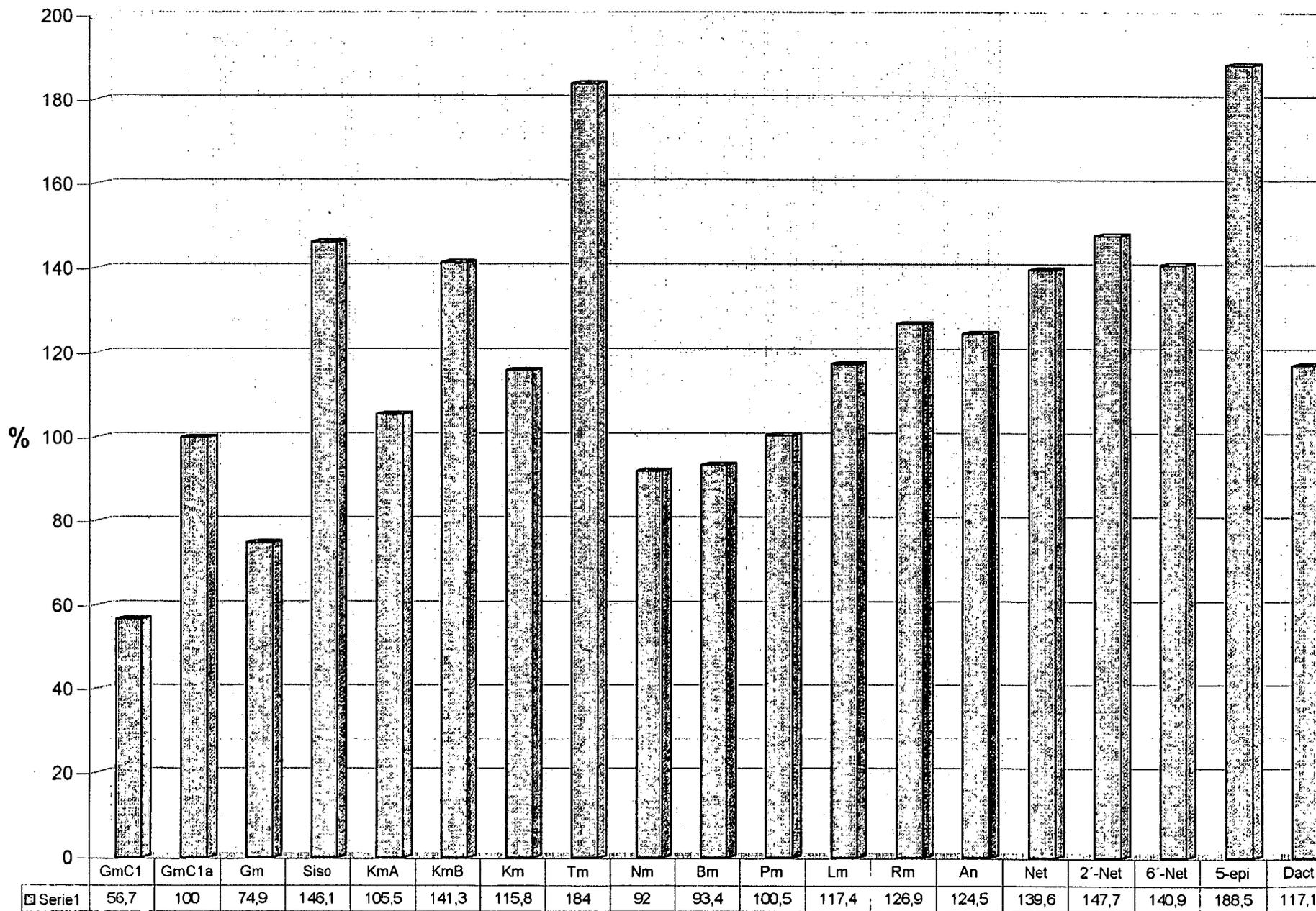
Antibióticos

Gráfica 8 Perfil Acetilinas Cepa 95



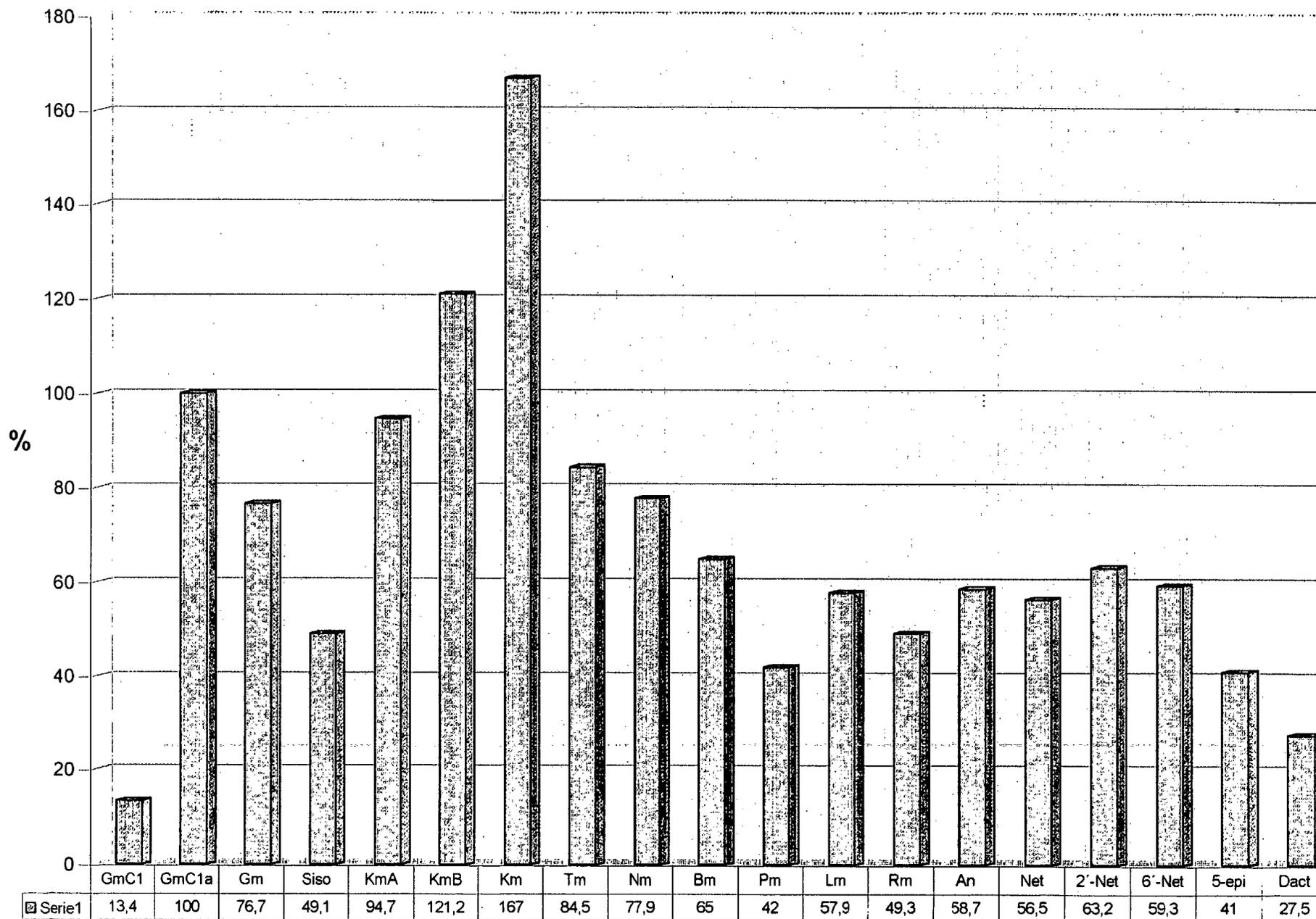
Antibióticos

Gráfica 9 Perfil Acetilinas Cepa 110



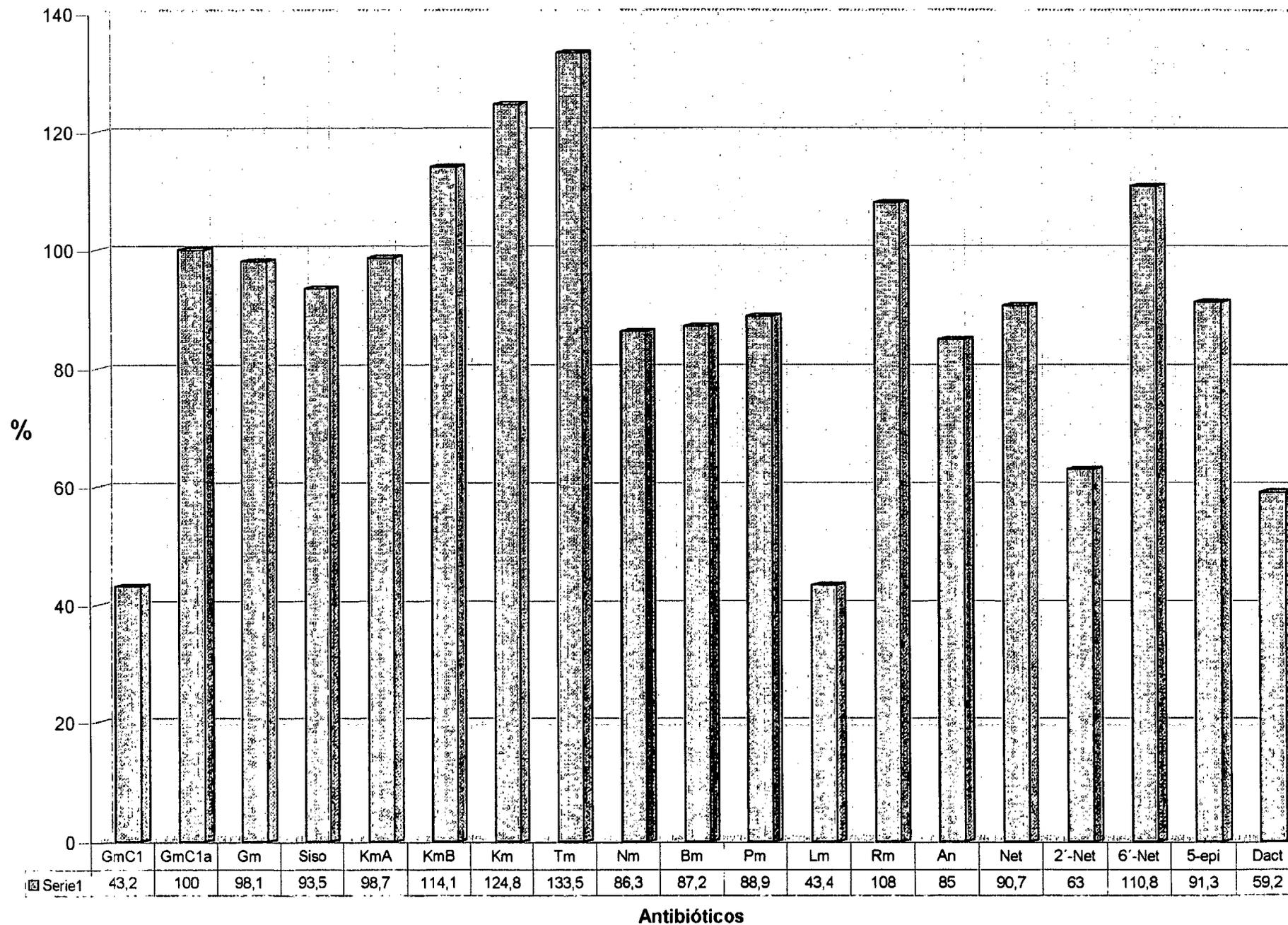
Antibióticos

Gráfica 10 Perfil Acetilinas Cepa 133

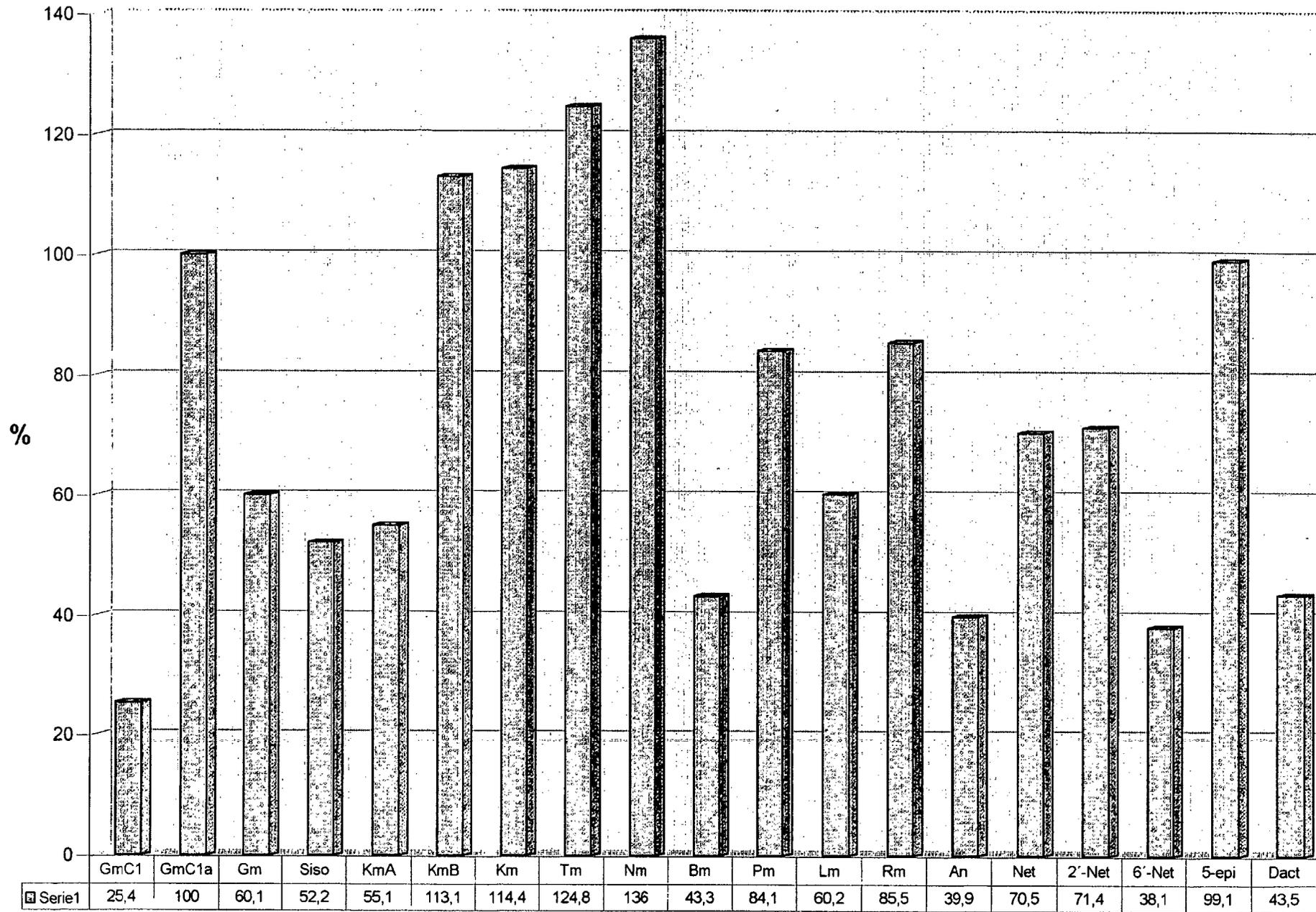


Antibióticos

Gráfica 11 Perfil Acetilinas Cepa 154

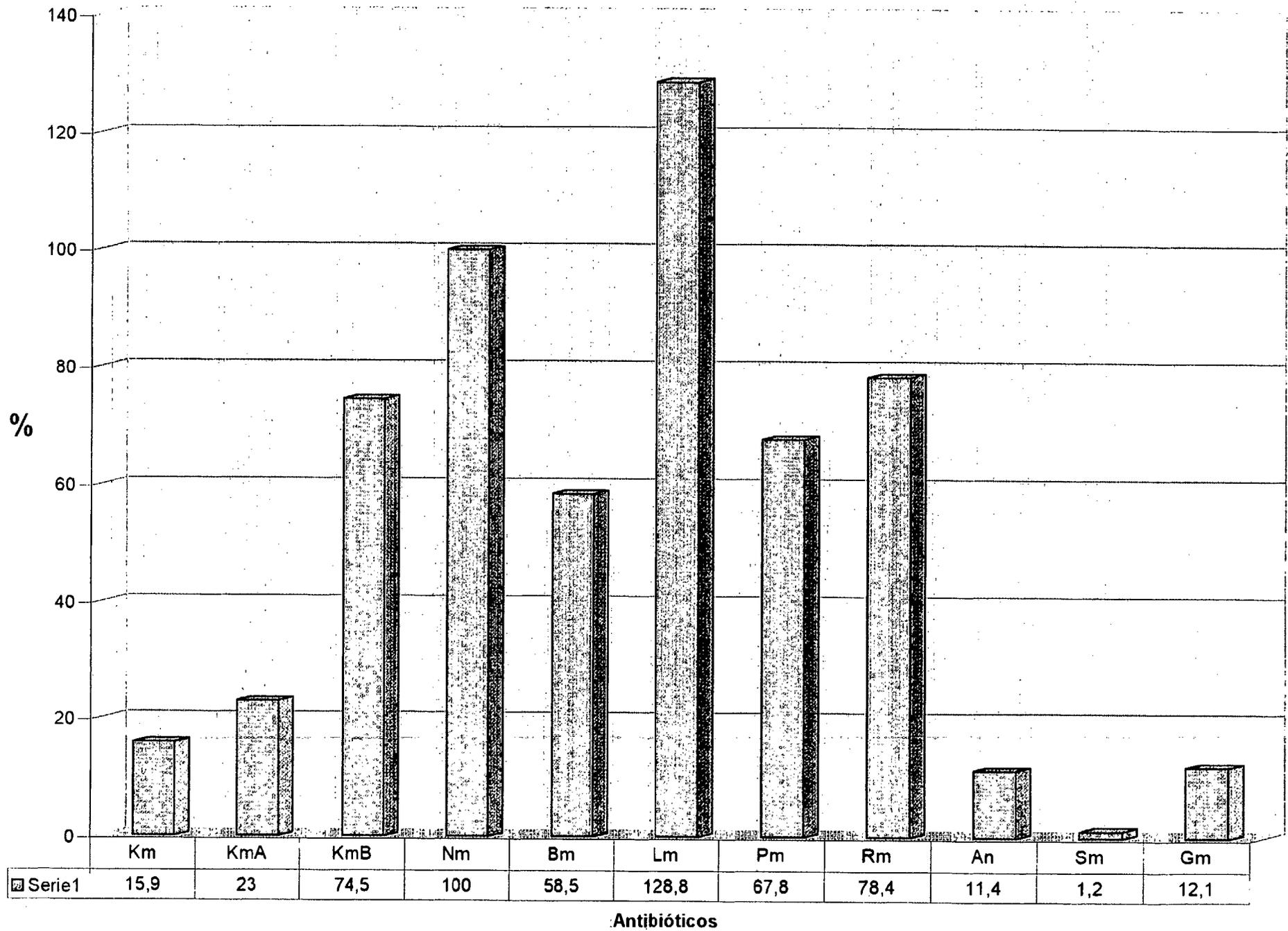


Gráfica 12 Perfil Acetilinas Cepa 155

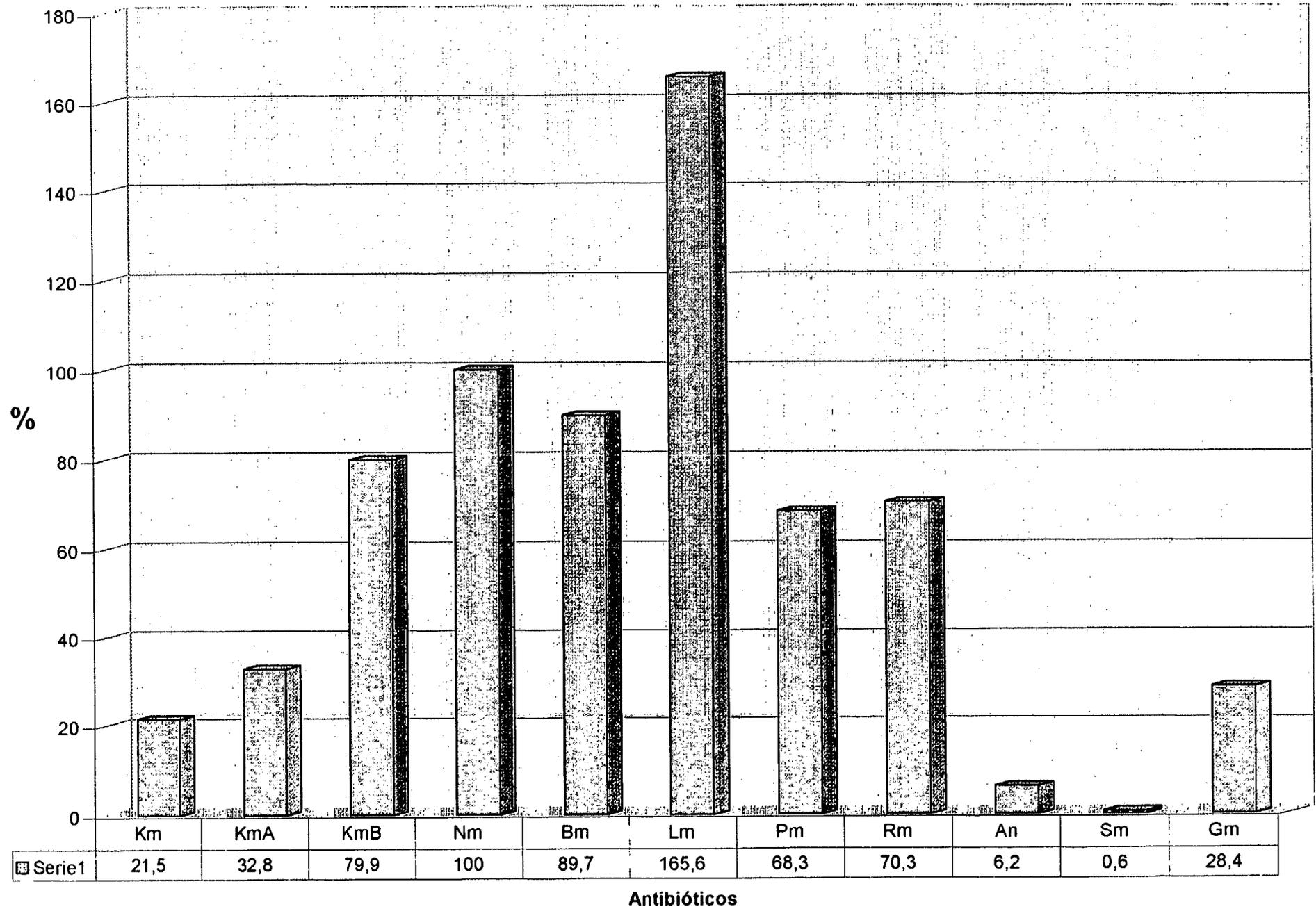


Gráfica 13

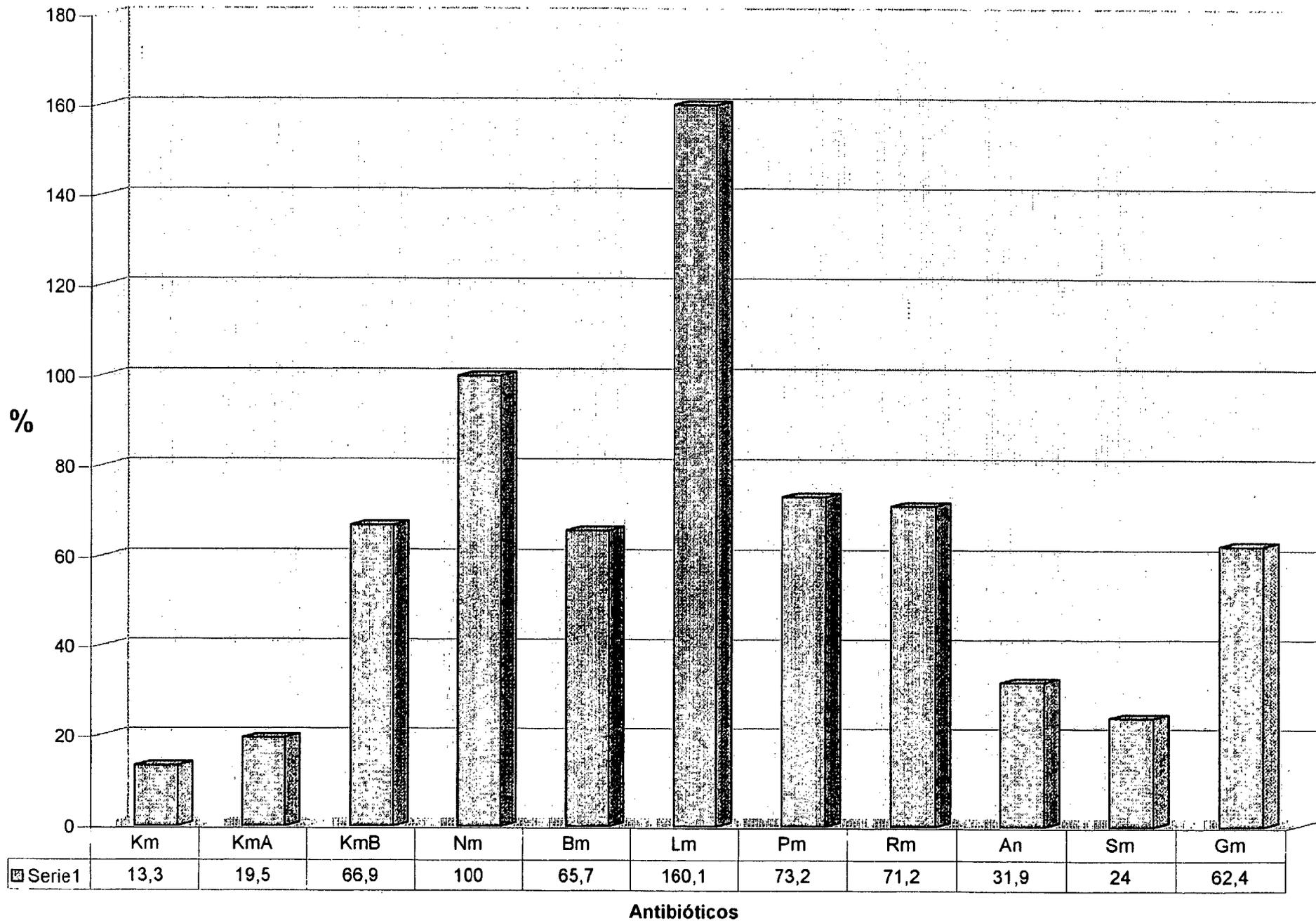
Perfil fosforilasas Cepa 4



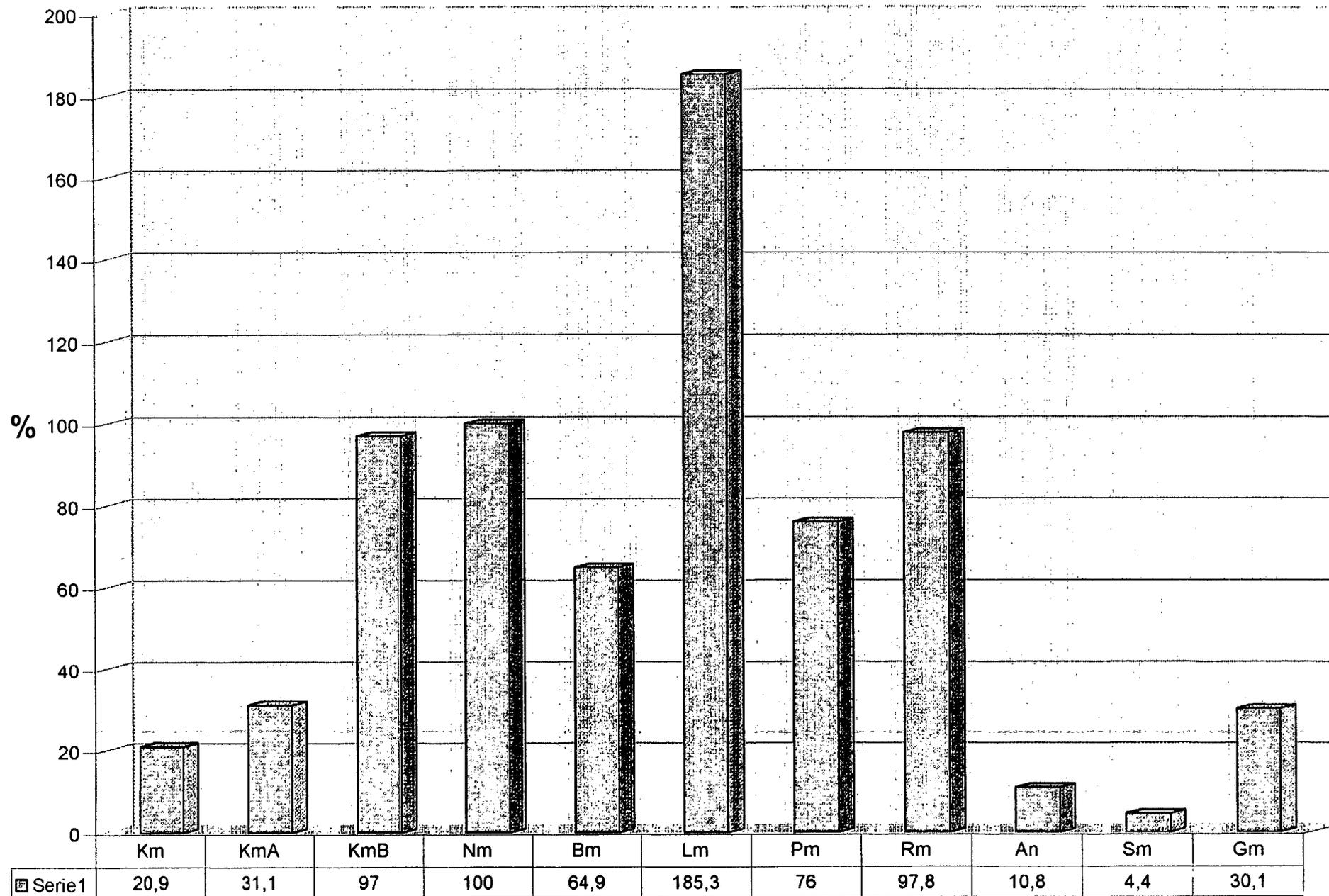
Gráfica 14 Perfil fosforilasas Cepa 18



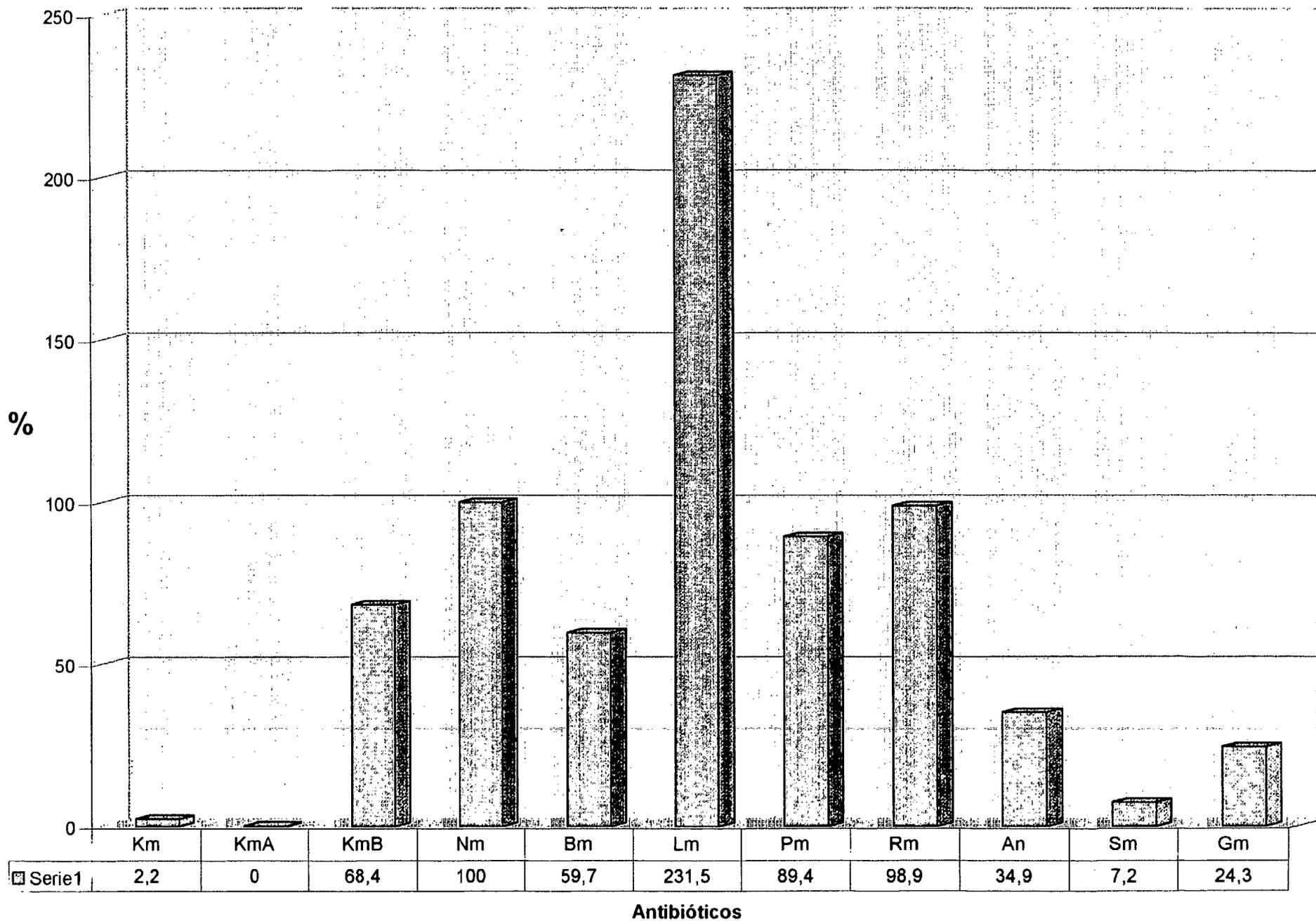
Gráfica 15 Perfil fosforilasas Cepa 20



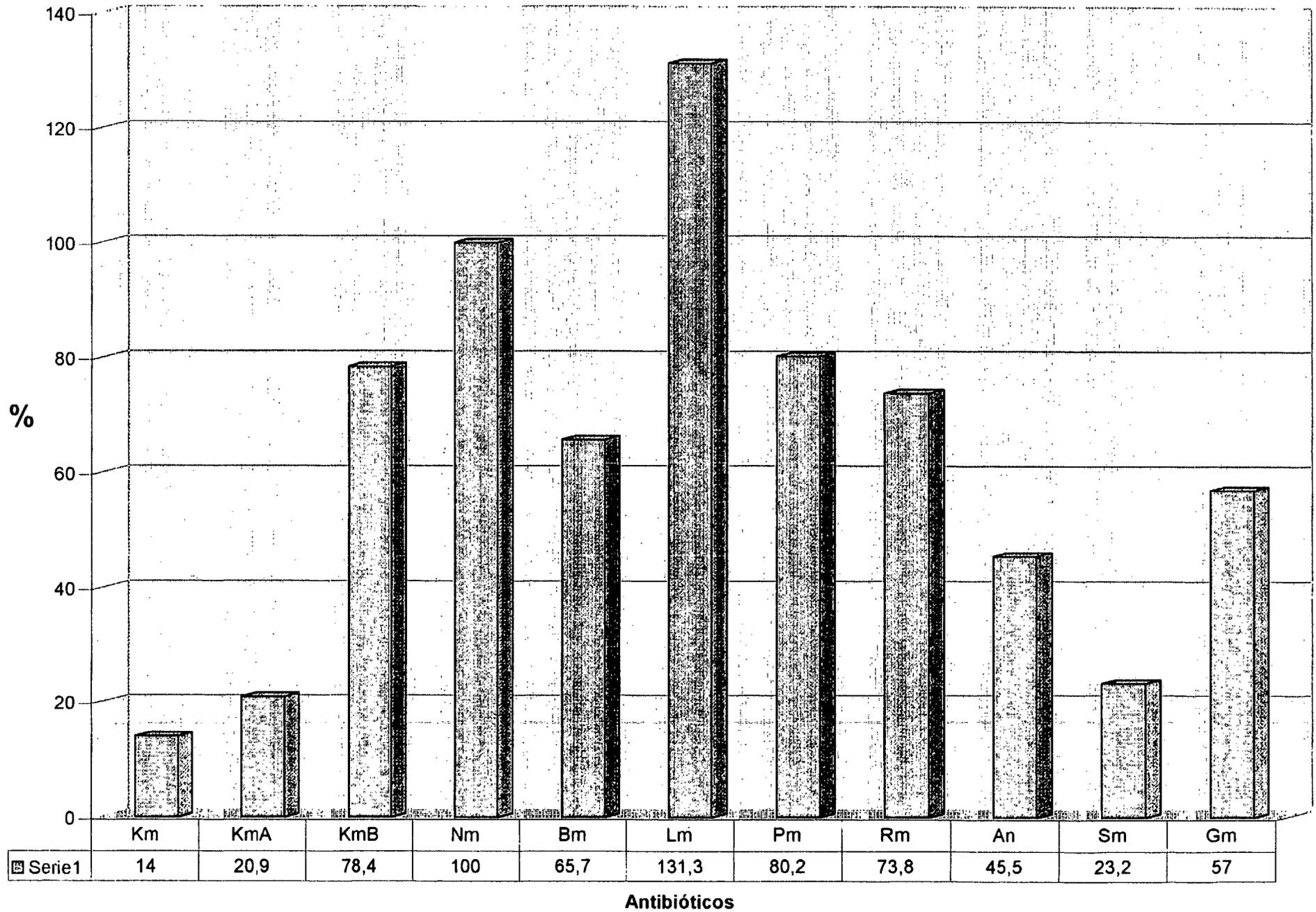
Gráfica 16 Perfil fosforilasas Cepa 25



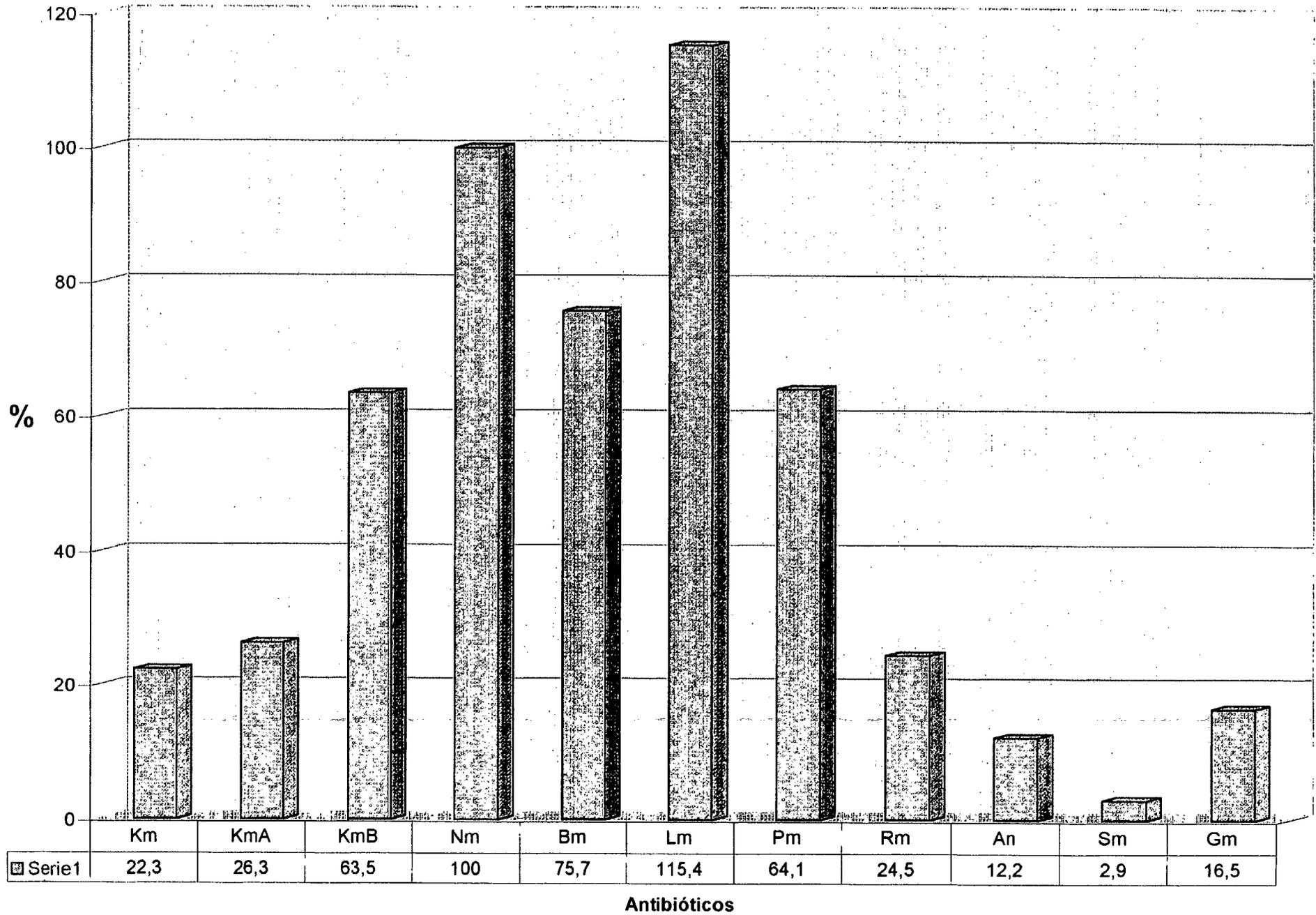
Gráfica 17 Perfil fosforilasas Cepa 34



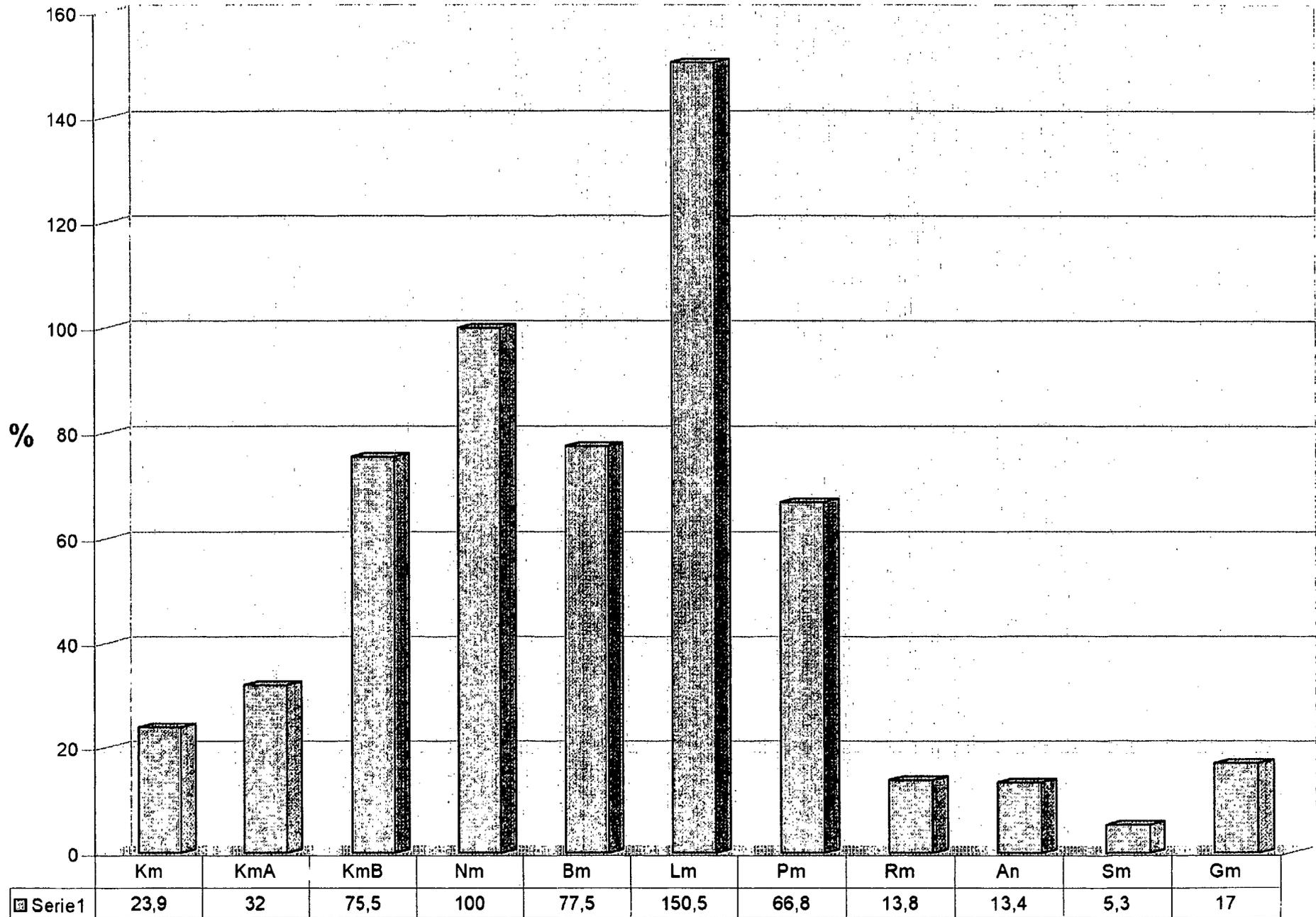
Gráfica 18 Perfil fosforilasas Cepa 35



Gráfica 19 Perfil fosforilasas Cepa 40

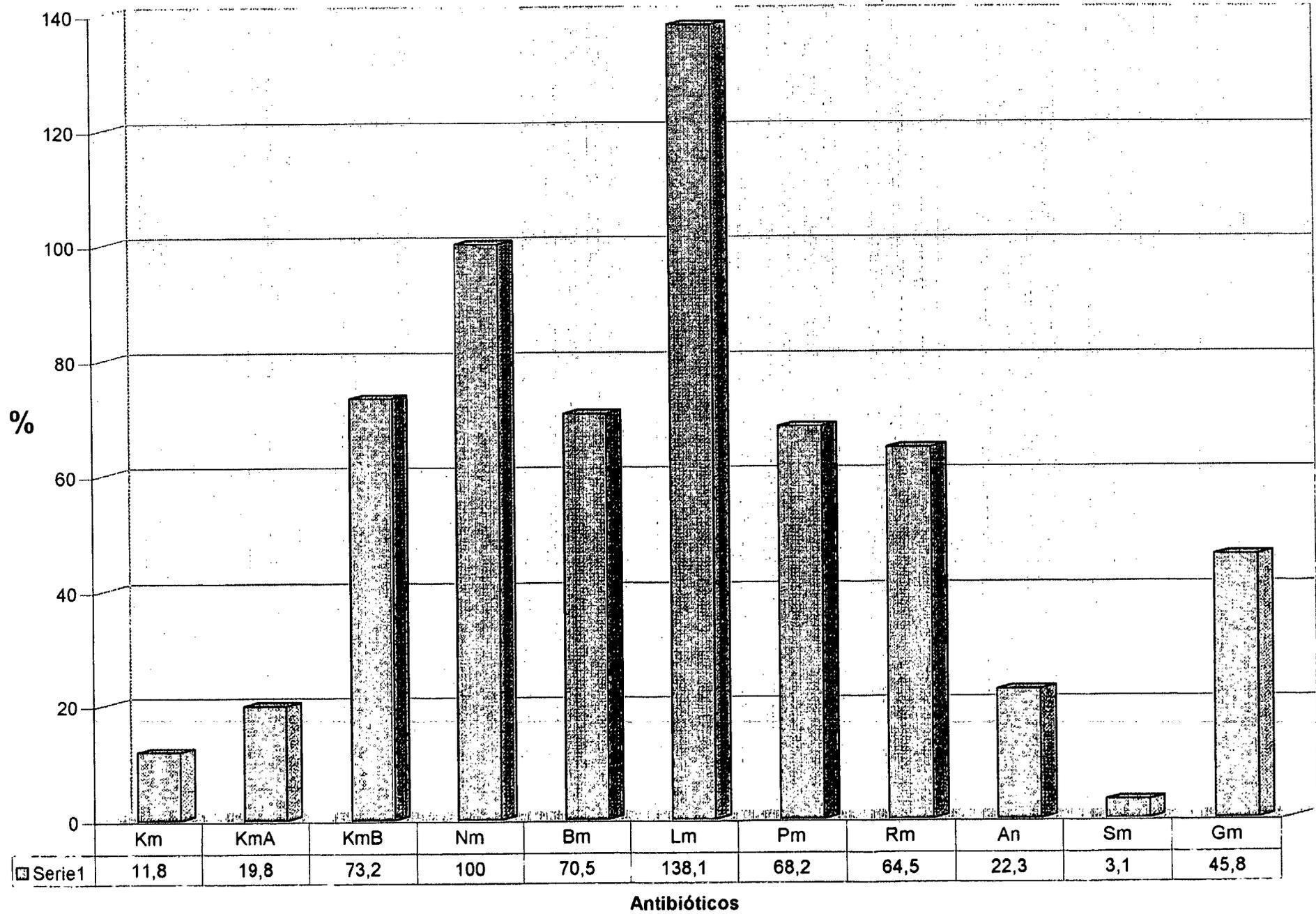


Gráfica 20 Perfil fosforilasas Cepa 62

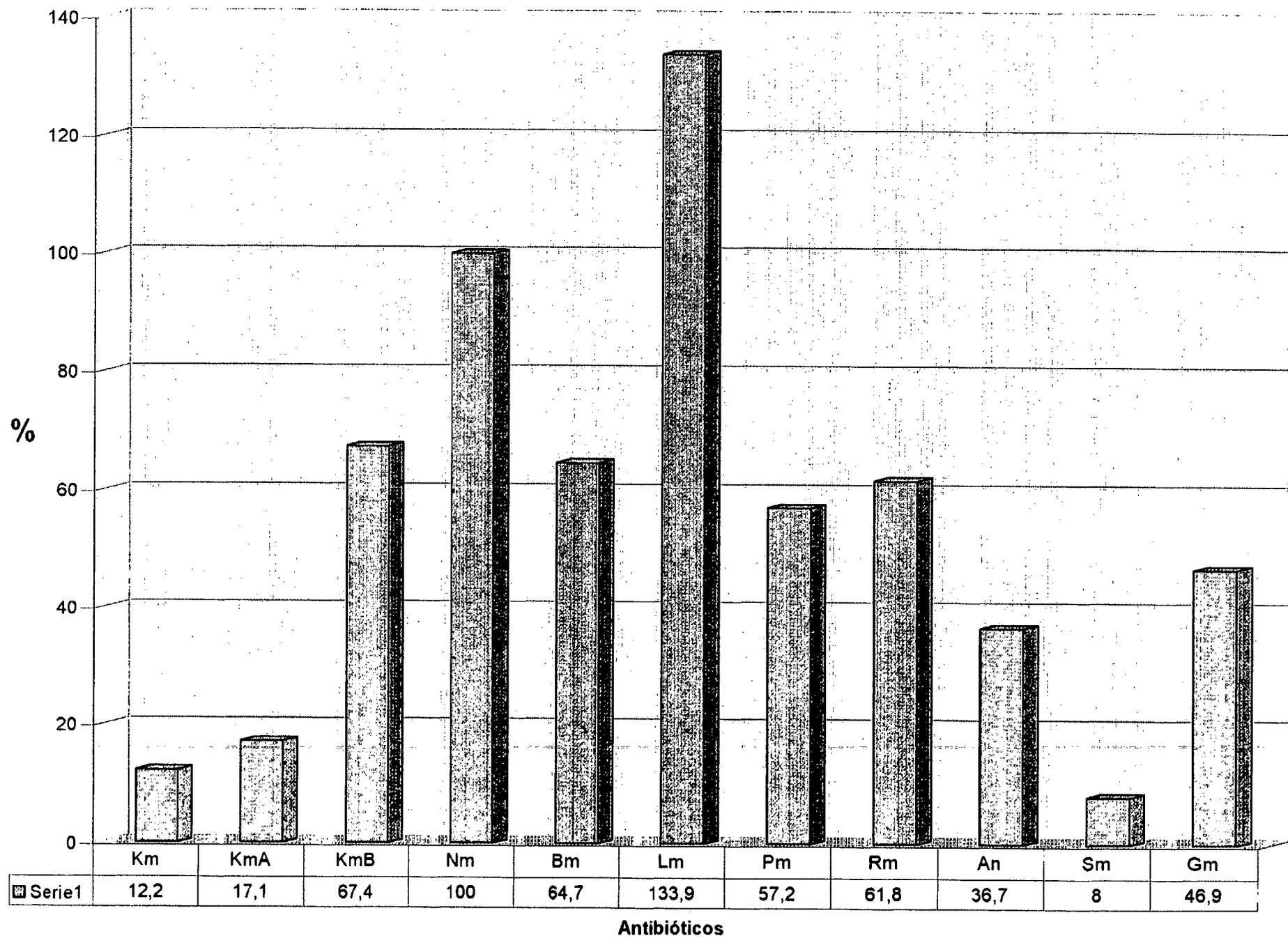


Antibióticos

Gráfica 21 Perfil fosforilasas Cepa 64

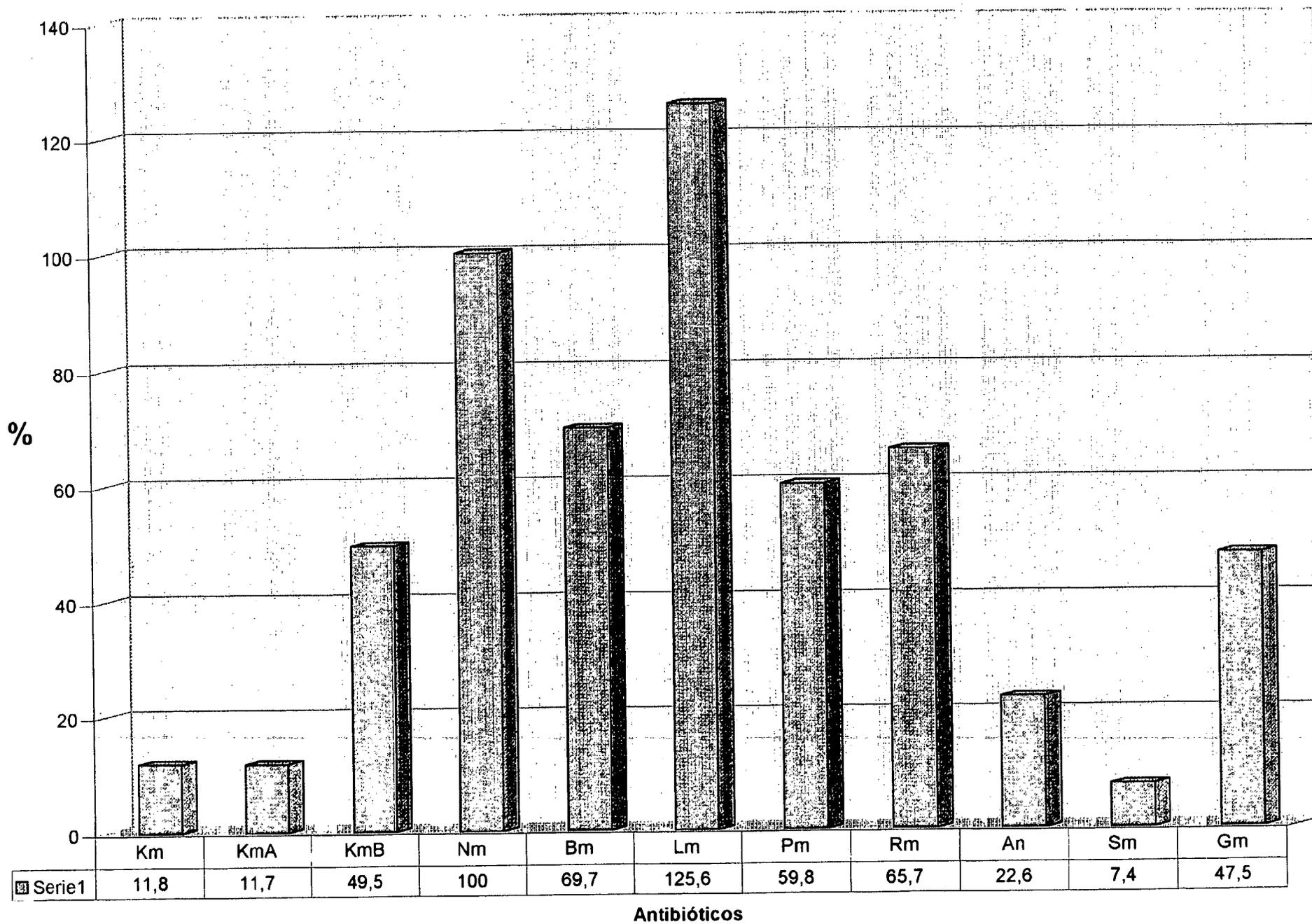


Gráfica 22 Perfil fosforilasas Cepa 68



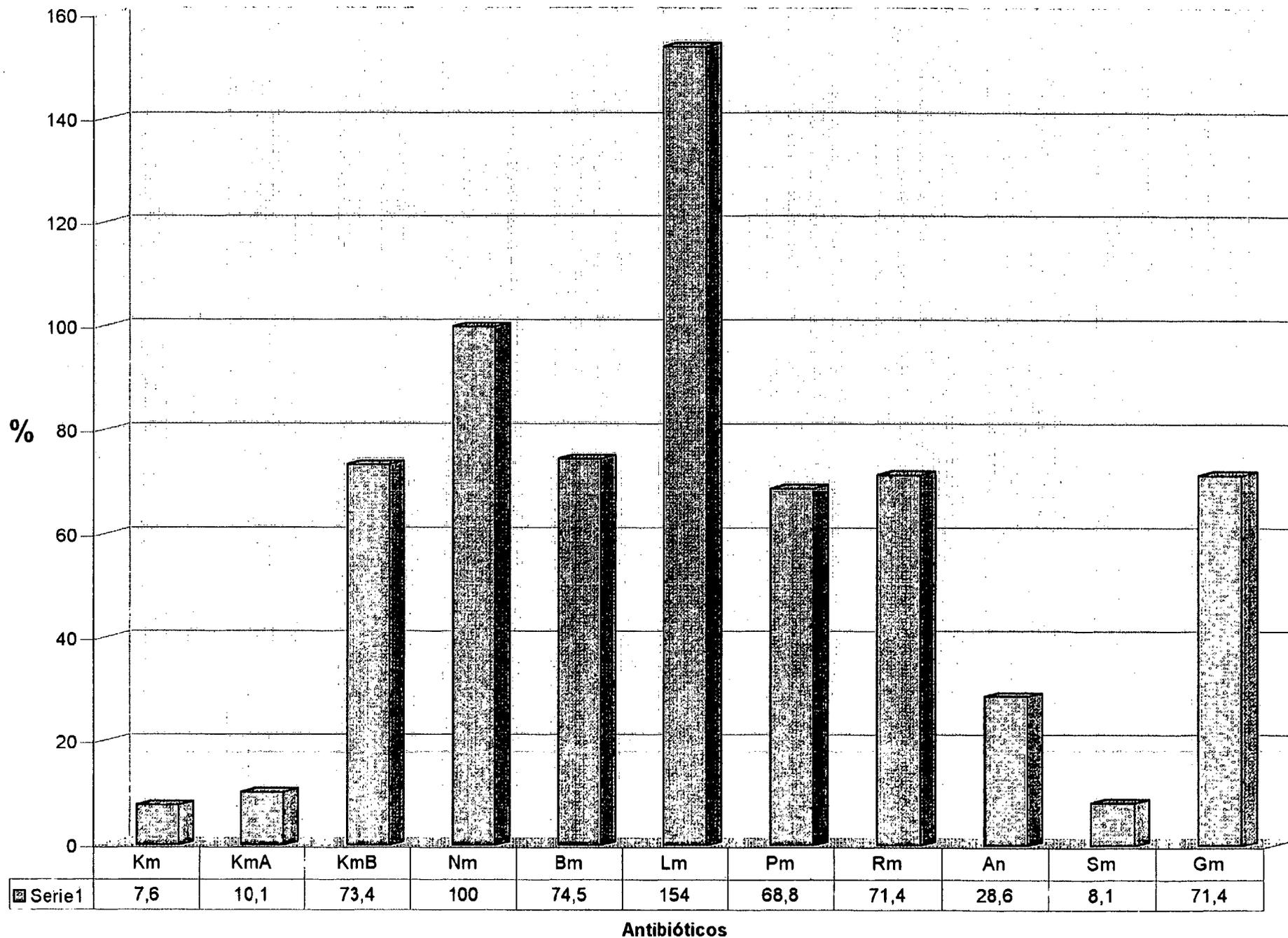
Gráfica 23

Perfil fosforilasas Cepa 69



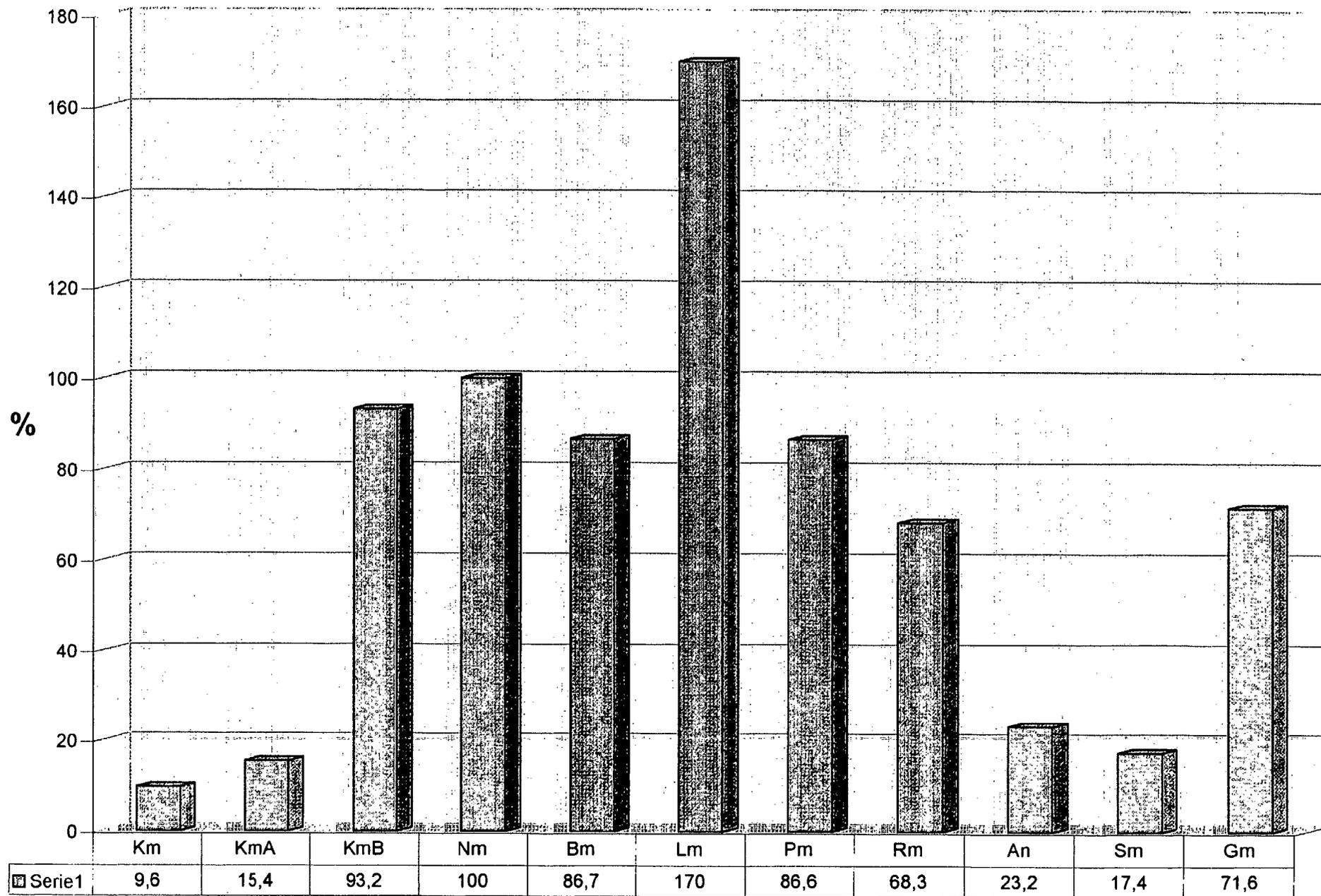
Gráfica 24

Perfil fosforilasas Cepa 81



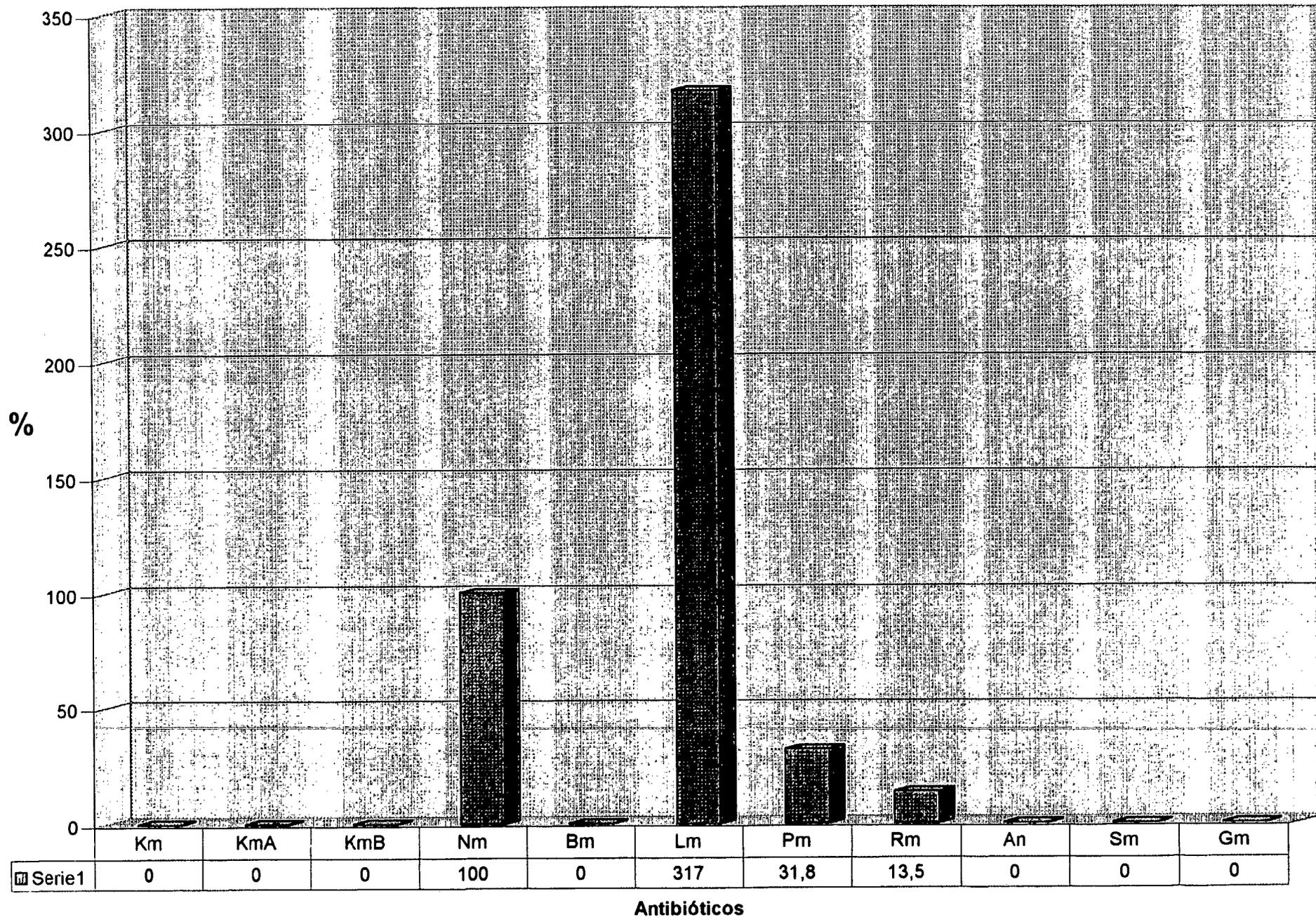
Gráfica 25

Perfil fosforilasas Cepa 83

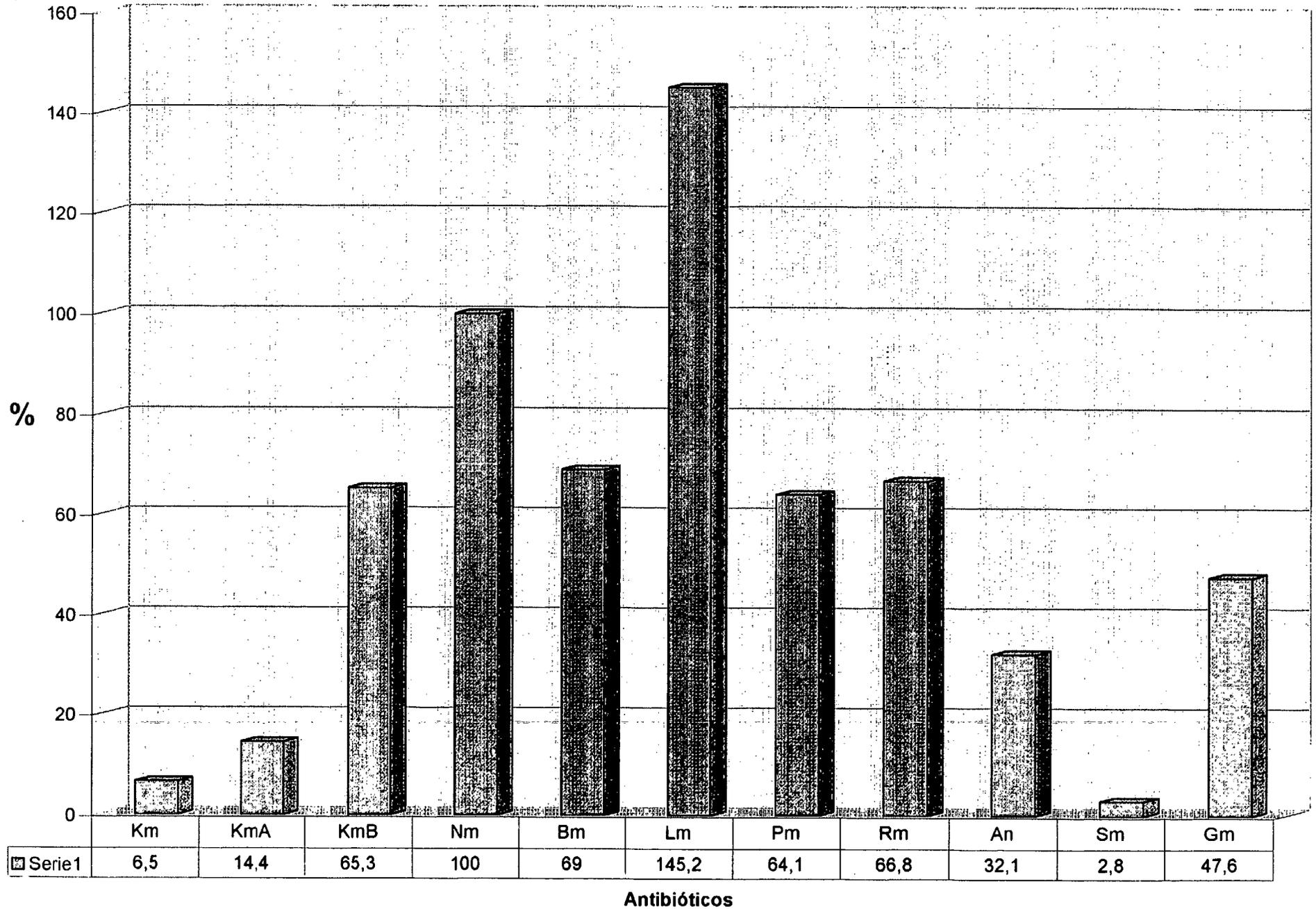


Antibióticos

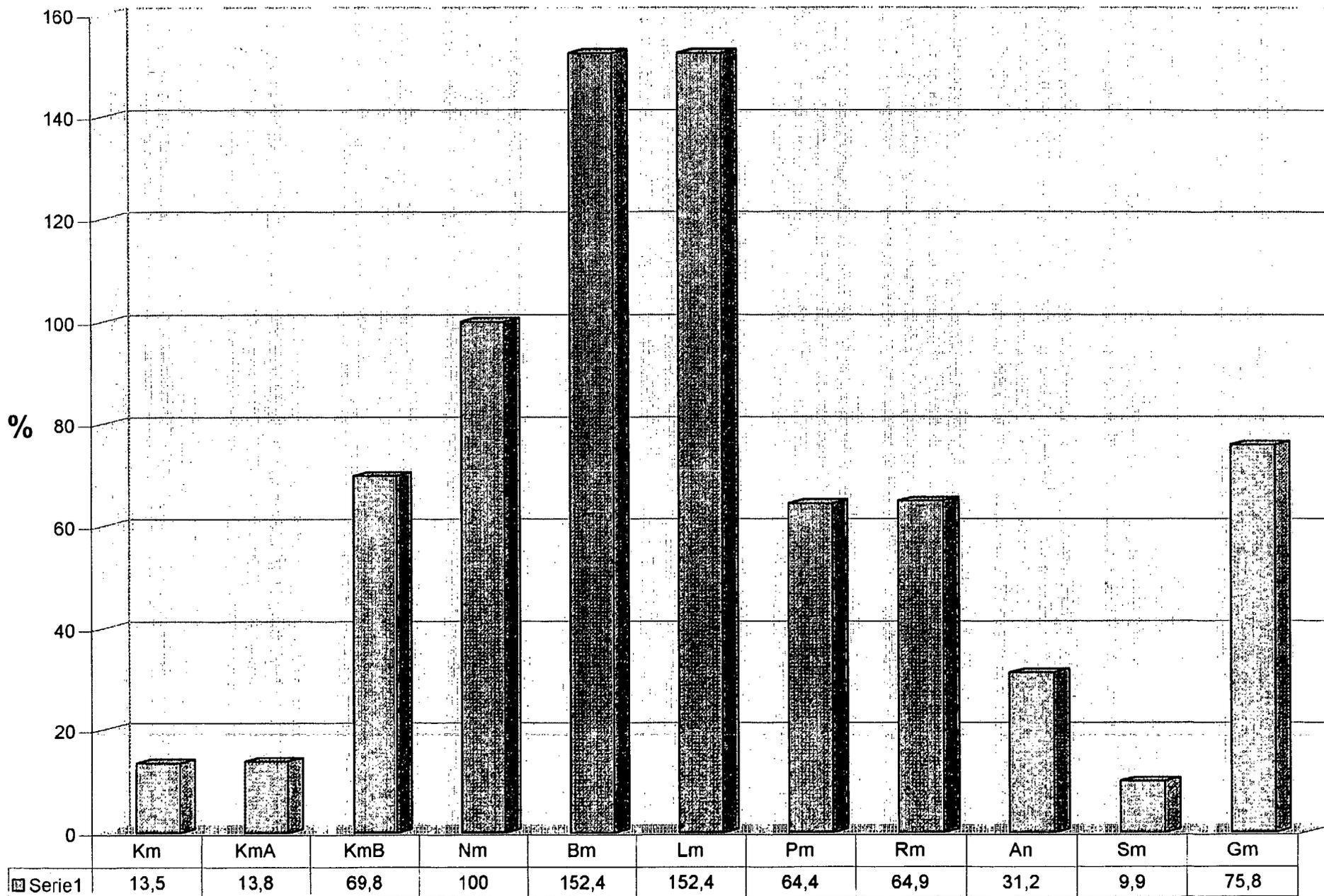
Gráfica 26 Perfil fosforilasas Cepa 85



Gráfica 27 Perfil fosforilasas Cepa 95

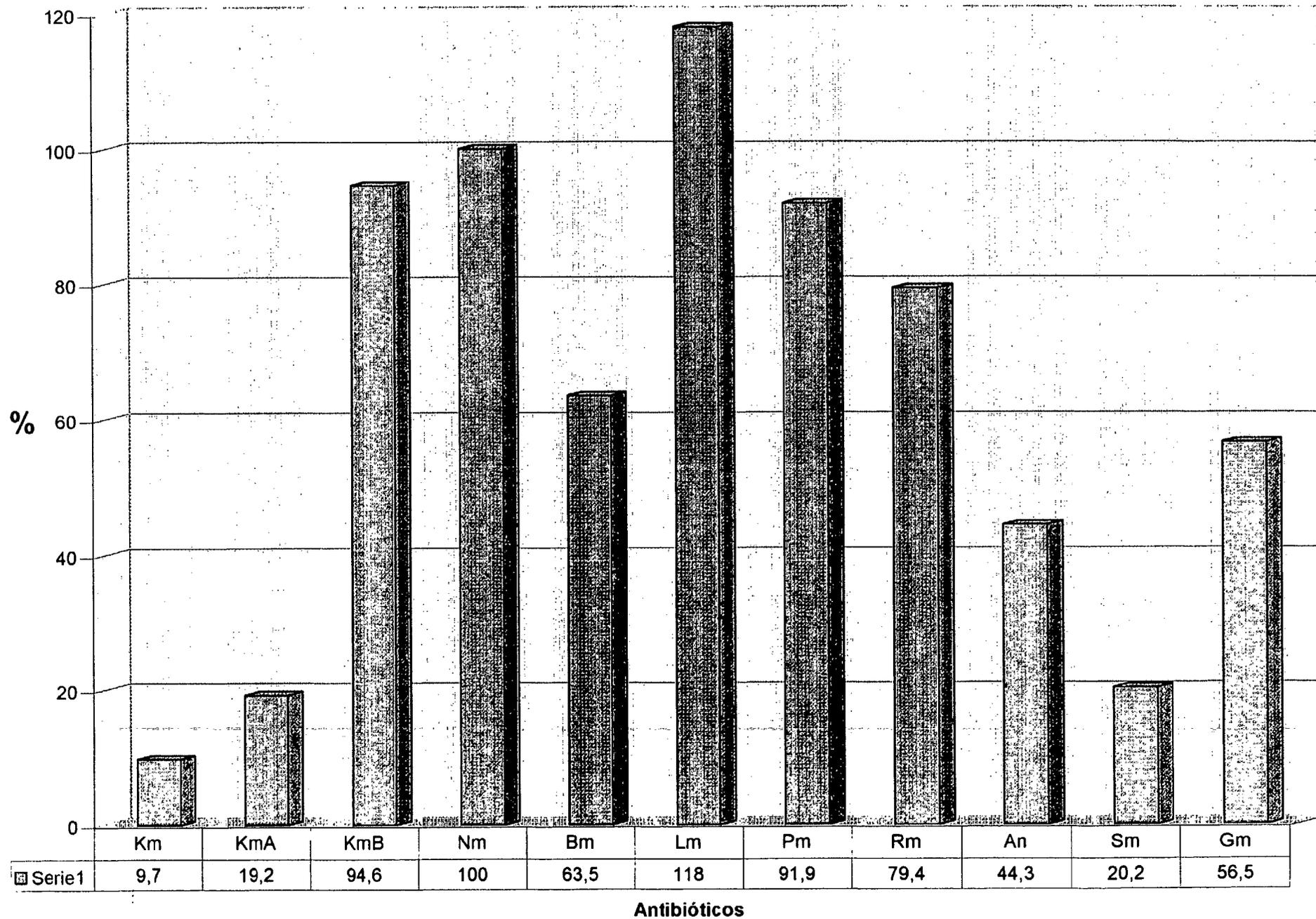


Gráfica 28 Perfil fosforilasas Cepa 110



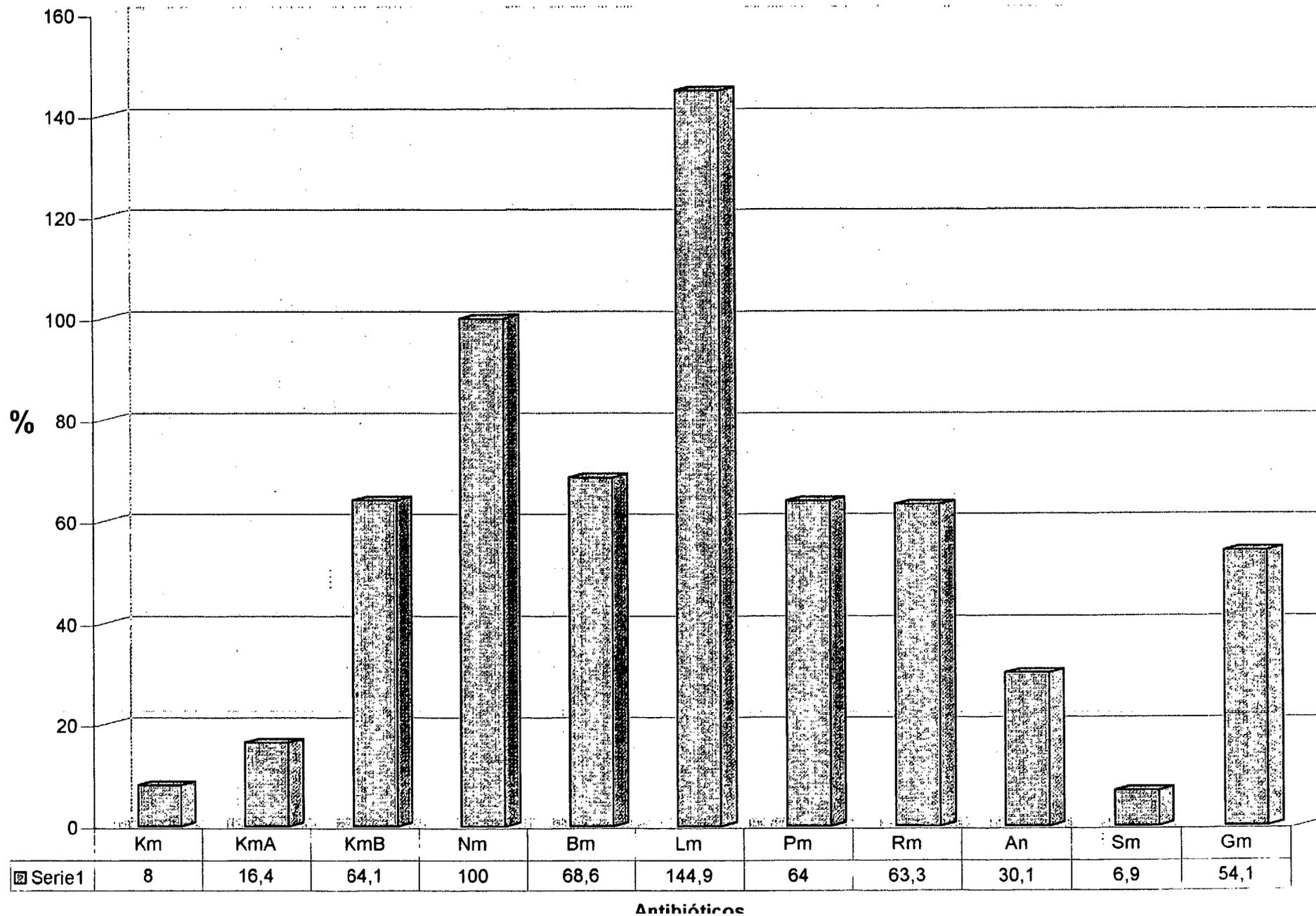
Gráfica 29

Perfil fosforilasas Cepa 119



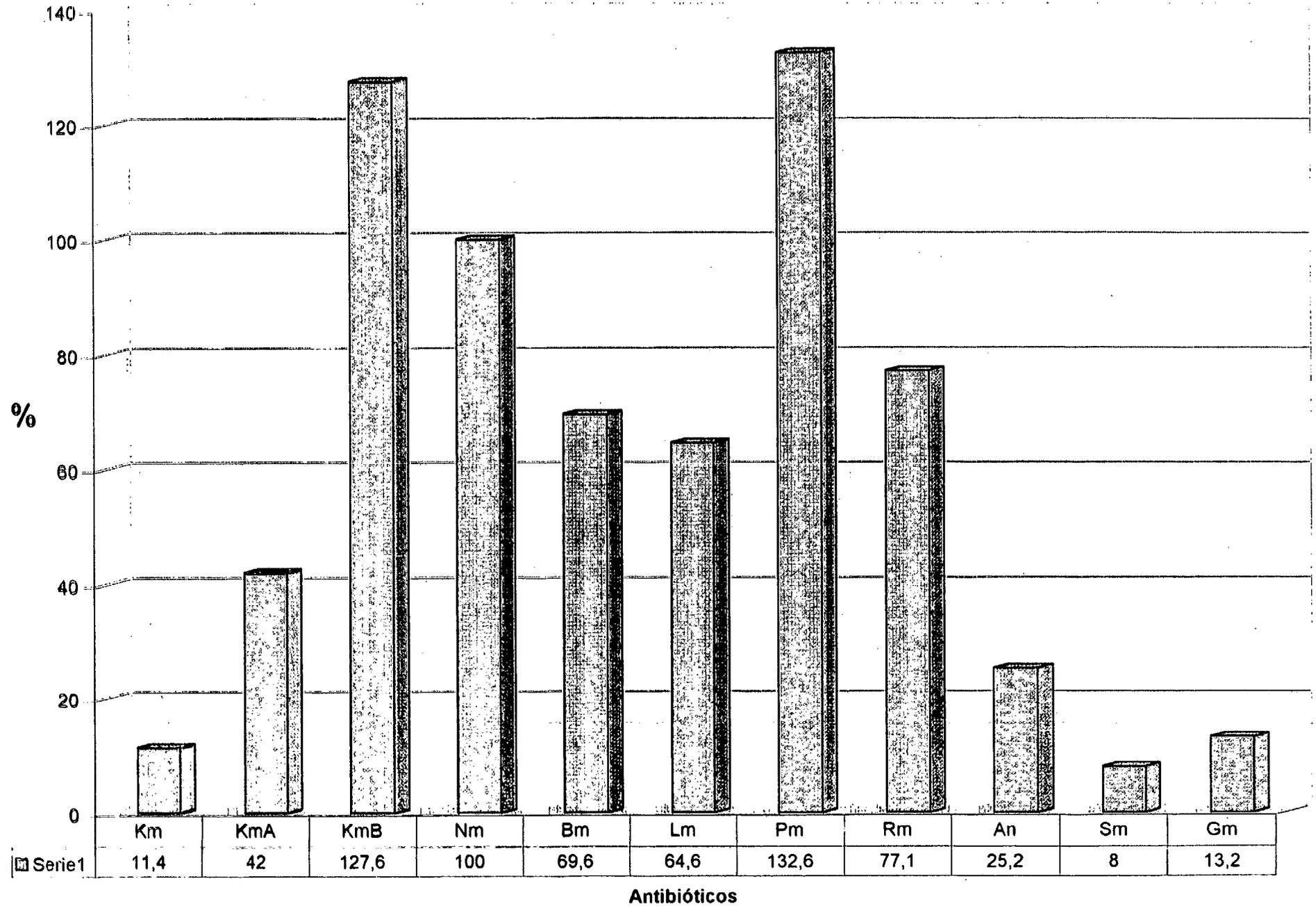
Gráfica 30

Perfil fosforilasas Cepa 124

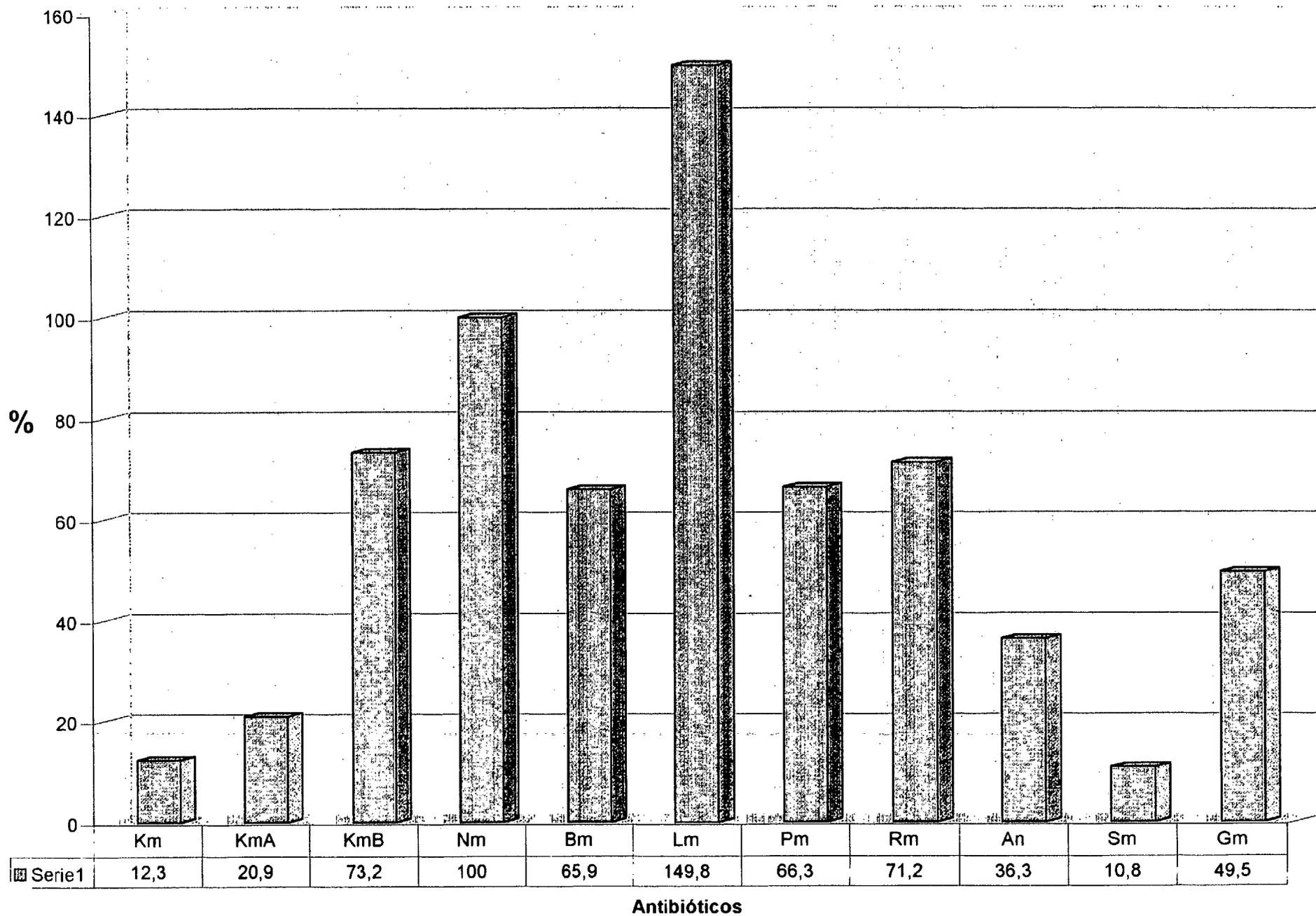


Gráfica 31

Perfil fosforilasas Cepa 133

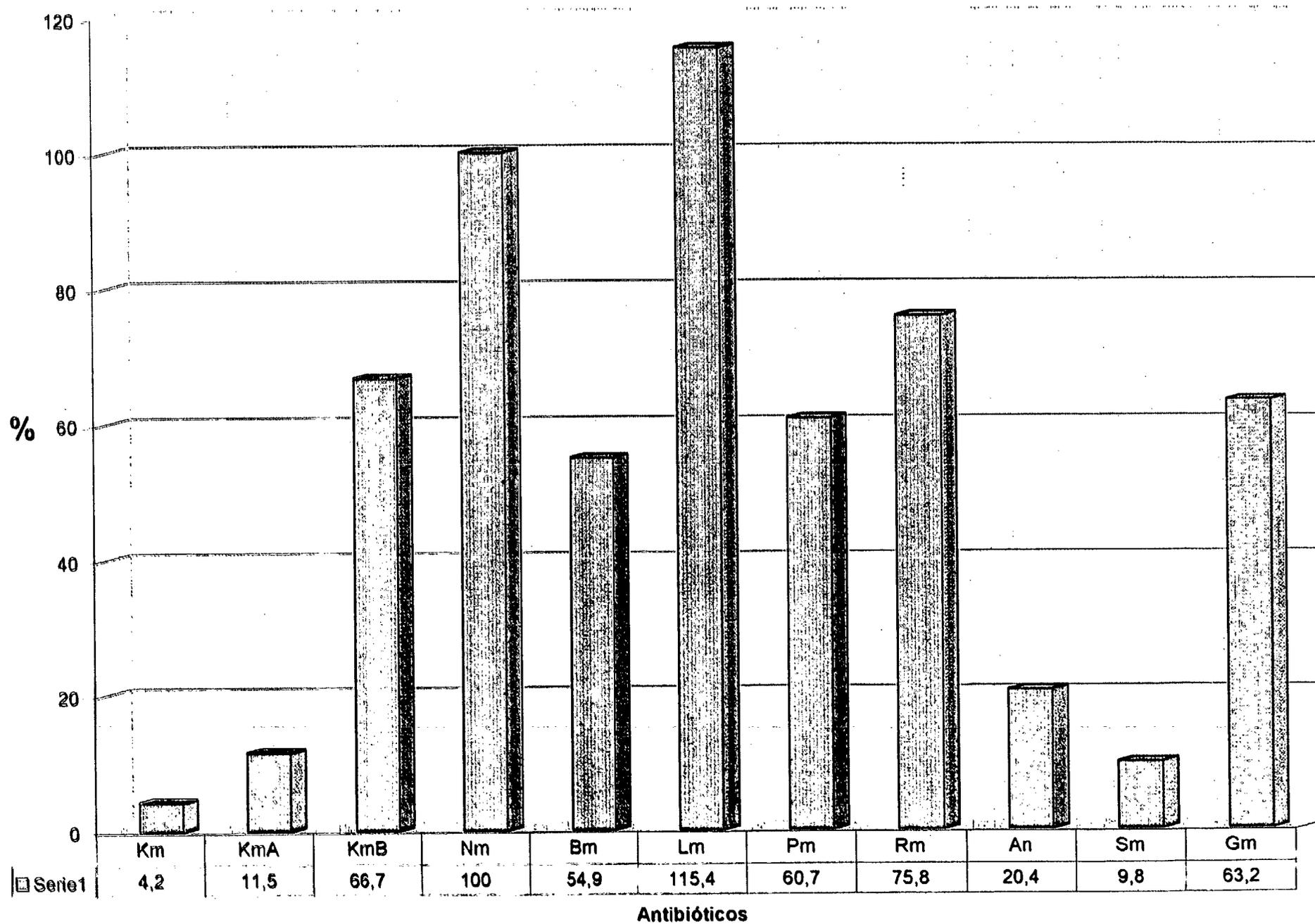


Gráfica 32 Perfil fosforilasas Cepa 140

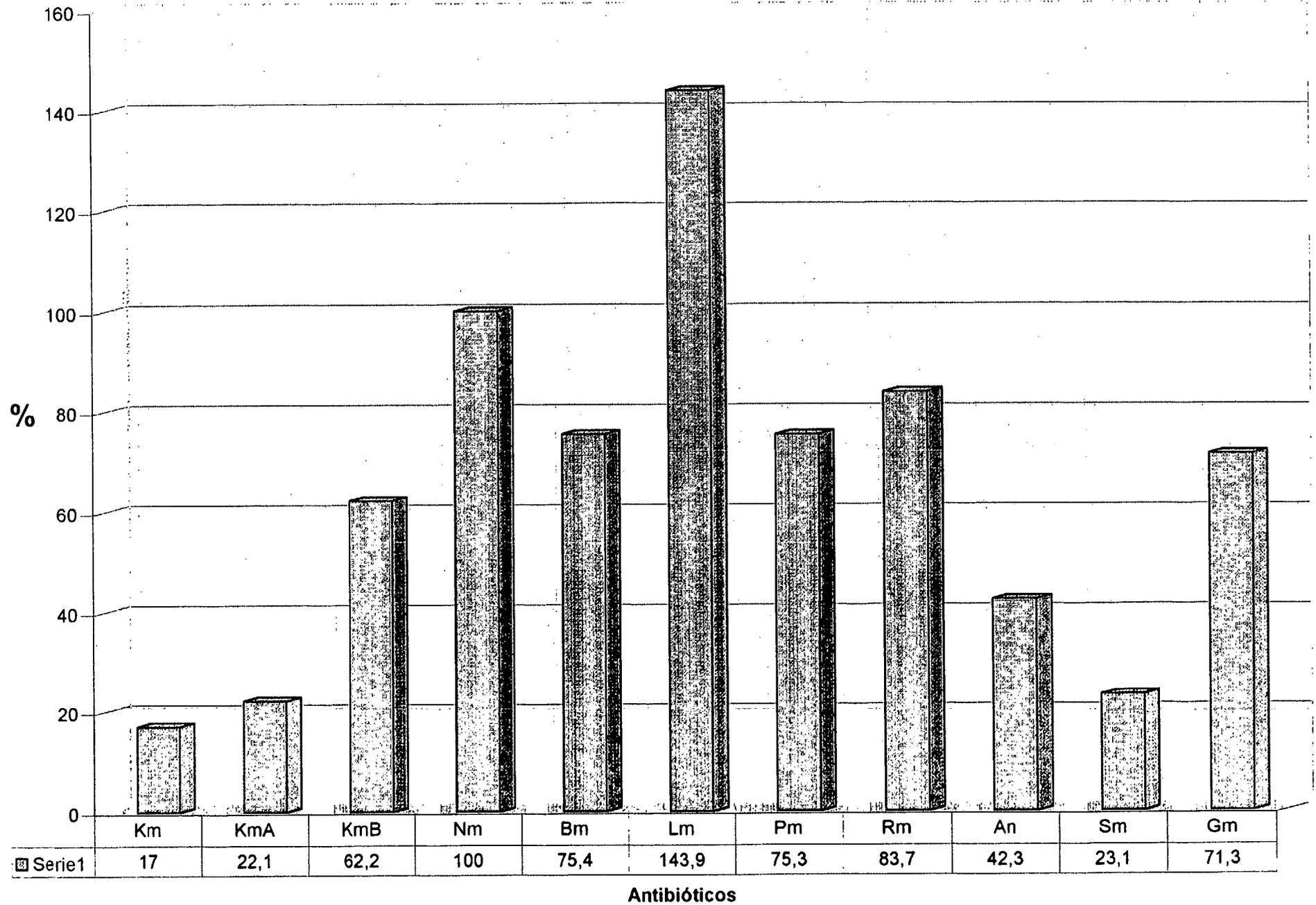


Gráfica 33

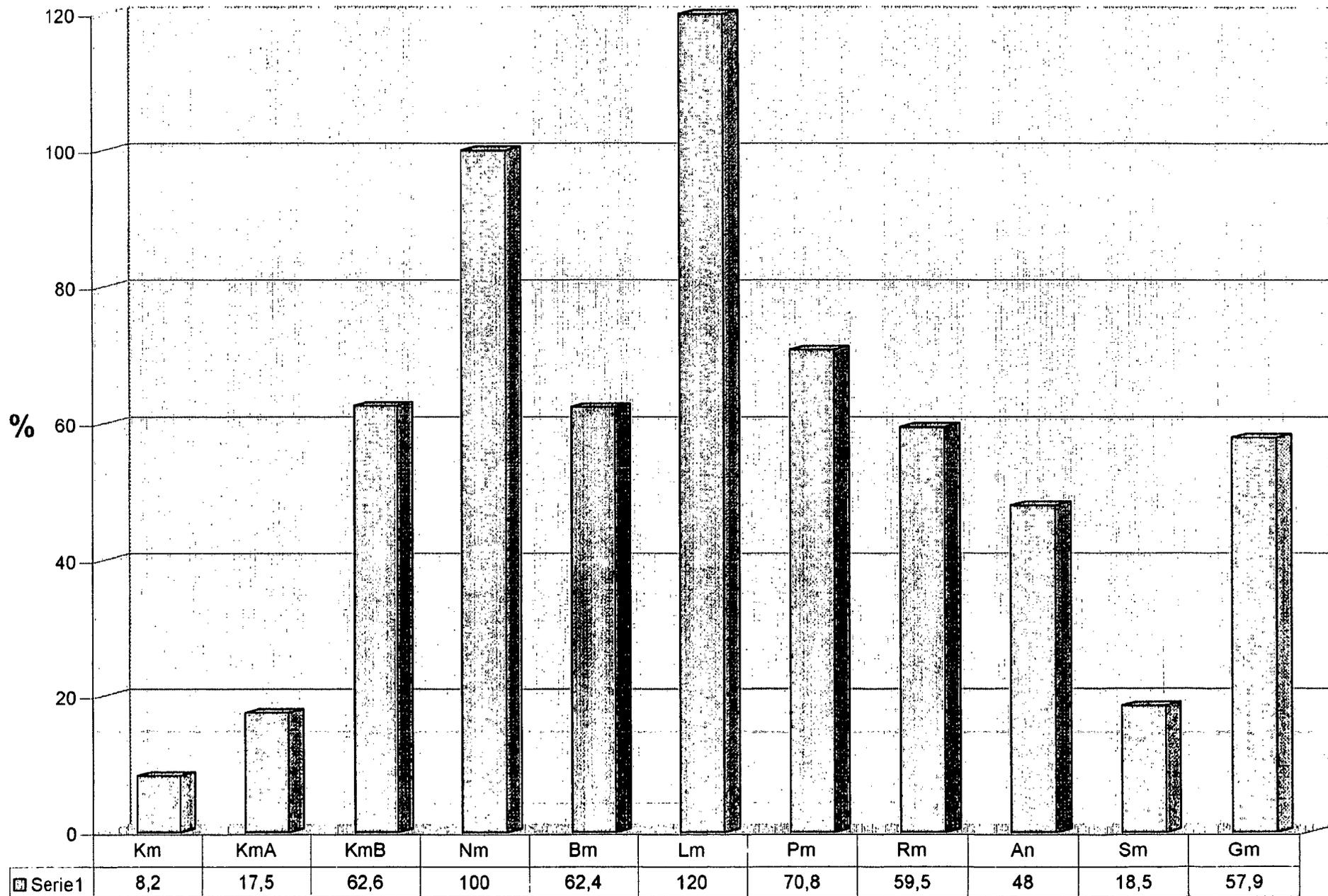
Perfil fosforilasas Cepa 153



Gráfica 34 Perfil fosforilasas Cepa 154



Gráfica 35 Perfil fosforilasas Cepa 155



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.-

Hemos realizado un estudio sobre un conjunto de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes del Hospital Insular, escogiendo a aquellos aislados que presentasen resistencia a dos o mas antibióticos aminoglicósidos. En estos aislados determinamos los mecanismos de resistencia presentes, a través de distintos métodos, y caracterizamos la codificación genética de la resistencia, llegando a las siguientes conclusiones:

Sobre el total de los aislados.-

1.- El antibiótico mas eficaz in vitro fue la amikacina seguido de sisomicina, tobramicina, netilmicina y gentamicina.

2.- Basándonos en que del total de cepas recogidas, un alto porcentaje presentaba resistencia a la kanamicina y a la neomicina unido al hecho de que el 100% de las cepas resistentes presentaban actividad APH(3'), sugerimos una amplia distribución de los mecanismos de resistencia enzimáticos a estos antibióticos.

Sobre los aislados resistentes.-

3.- Los mecanismos de resistencia a los aminoglicósidos de uso clínico son AAC(6')-II, APH(3') y alteraciones de la permeabilidad.

4.- Todos los aislados, independientemente de otros mecanismos de resistencia, presentaban actividad APH(3')-I y/o APH(3')-II o APH(3')-III.

5.- Los mecanismos de resistencia mas frecuentes a aminoglicósidos fueron las alteraciones de la permeabilidad, seguido de la combinación AAC(6')-II mas alteraciones de la permeabilidad, acompañados en todos los casos por APH(3').

6.- La codificación genética de la resistencia enzimática parecía estar localizada en el cromosoma.

7.- La resistencia del aislado 20 se debía a alteraciones de la permeabilidad, a pesar de ello, era transmisible mediante un plásmido conjugativo.

8.- Todos los aislados que resultaron positivos para la hibridación con las sondas aac(6')-Ib y aac(6')-IIa correlacionaban con actividad enzimática AAC(6')-II.

9.- No se detectó hibridación con ninguna de las sondas de genes de enzimas fosforilasas, pero si se detectó actividad fosforilasa APH(3'), mediante ensayo radioenzimático lo cual sugiere la existencia de otros genes APH(3').

10.- La utilización del kit desarrollado por Schering-Plough, resulta un método eficaz para la detección de resistencia enzimática (acetilasas y adenilasas) y para caracterizar a los aislados resistentes por alteraciones de la permeabilidad, pero no para la detección de enzimas fosforilasas.

11.- El fenotipo An^R Gm^R Tm^S Net^R se asocia siempre con resistencia por alteraciones de la permeabilidad de la membrana externa.

12.- El mecanismo de resistencia AAC(6')-II unido a las alteraciones de la permeabilidad, solamente puede ser detectado mediante el kit desarrollado por el grupo de Schering.

13.- Comparando los sistemas de identificación fenotípicos con el genotipo obtenido mediante hibridación, podemos concluir que el sistema de identificación desarrollado por Schering, resulta simple y eficaz y no requiere de aparataje complejo.

14.- El serotipo O:11 es el mas frecuente y se asocia en todos los casos con resistencia enzimática. Los serotipos O:6 y los aislados no tipables se asocian siempre con resistencia por alteraciones de la permeabilidad.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Sayed, A., González, M., and Eagon, R.G. The role of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* in the uptake of aminoglycoside antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 1982; 10: 173-183.
2. Ahmad, M.H., Rechenmacher, A., and Böck, A. Interaction between aminoglycoside uptake and ribosomal resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; 18(5): 798-806.
3. Álvarez, M. and Mendoza, M.C. Epidemiological survey of genes encoding aminoglycoside phosphotransferases APH(3')-I and APH(3')-II using DNA probes. *Journal of Chemotherapy* 1992; 4(4): 203-210.
4. Álvarez, M. and Mendoza, M.C. Molecular epidemiology of two genes encoding 3-N-aminoglycoside acetyltransferases AAC(3)-I and AAC(3)-II among gram-negative bacteria from a Spanish hospital. *Eur. J. Epidemiol.* 1993; 9(6): 650-657.
5. Angelatou, F., Litsas, S.B., and Kontomichalou, P. Purification and properties of two Gentamicin-modifying enzymes, coded by a single plasmid pPK237 originating from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antibiotics* 1981; 35(2): 235-244.
6. Angus, B.L., Carey, A.M., Caron, D.A., Kropinski, A.M.B., and Hancock R.E.W. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 21(2): 299-309.
7. Angus, B.L., Fyfe, J.A.M., and Hancock, R.E.W. Mapping and characterization of two mutations to antibiotic supersusceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology* 1987; 133: 2905-2934.
8. Aranoff, S.C. and Klinger, J.D. In vitro activities of aztreonam, piperacillin, and ticarcillin combined with amikacin against amikacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolates from children with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984; 25(2): 279-280.
9. Baltch, A.L. and Smith, R.P. Combinations of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *The American Journal of Medicine* 1985; 79(1A): 8-16.
10. Barclay, M.L., Begg, E.J., and Chambers, S.T. Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic in vitro model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36(9): 1951-1957.
11. Barg, N.L. Construction of a probe for the aminoglycoside 3-V-acetyltransferase gene and detection of the gene among edemic clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 31(12): 1834-1838.
12. Barry, A.L., Thornsberry, C., and Jones, R.N. Gentamicin and amikacin disk susceptibility test with *Pseudomonas aeruginosa*: Definition of Minimal Concentration correlates for susceptible and resistant categories. *Journal of Clinical Microbiology* 1981; 13(5): 1000-1003.
13. Barry, A.L., Miller, G.H., Thornsberry, C., Hare, R.C., Jones, R.N., Lorber, R.R., Ferraresi, R., and Cramer C. Influence of cation supplements on activity of Netilmicin against

- Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987; 31(10): 1514-1518.
14. Barry, A.L., Reller, L.B., Miller, G.H., Washington, J.A., Schoenknecht, F.D., Peterson, L.R., Hare, R.S., and Knapp, C. Revision of standards for adjusting the cation content of Mueller-Hinton Broth for testing susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30: 585-589.
 15. Bayer, A.S., Norman, D.C., and Kwang, S.K. Characterization of impermeability variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated during unsuccessful therapy of experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987; 31(1): 70-75.
 16. Bell, A. and Hancock, R.E.W. Outer membrane protein H1 of *Pseudomonas aeruginosa*: purification of the protein and cloning and nucleotide sequence of the gene. *Journal of Bacteriology* 1989; 171(6): 3211-3217.
 17. Bell, A., Manjeet, B., and Hancock, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH: Expression from the cloned gene and function in EDTA and Gentamicin resistance. *Journal of Bacteriology* 1991; 173(21): 6657-6664.
 18. Biddlecome, S., Haas, M., Davies, J., Miller, G.H., Rane, D.F., and Daniels, P.J.L. Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 3-N-acetylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976; 9(6): 951-955.
 19. Bito, A. and Susani, M. Revised analysis of aadA2 gene of plasmid pSa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38(5): 1172-1175.
 20. Blahová, J., Hupková, M., Babalová, M., Krčméry, V., and Schäfer, V. Transduction of resistance to Imipenem, Aztreonam and Cefazidime in nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* by wild-type phages. *Acta Virol.* 1993; 37: 429-436.
 21. Blahová, J., Hupková, M., Králiková, K., and Krčméry, V. Transduction of Imipenem resistance by the phage F-116 from a nosocomial strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Slovakia. *Acta Virol.* 1994; 38: 247-249.
 22. Blaser, J. and Lüthy, R. Comparative study on antagonistic effects of low pH and cation supplementation on in-vitro activity of quinolones and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1988; 22: 15-22.
 23. Bongaerts, G.P.A. and Vliegenthart, J.S. Effect of aminoglycoside concentration on reaction rates of aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32(5): 740-746.
 24. Bryan, L.E., Haraphongse, R., and Van Den Elzen, H.M. Gentamicin resistance in clinical-isolates of *Pseudomonas aeruginosa* associated with diminished Gentamicin accumulation and no detectable enzymatic modification. *The Journal of Antibiotics* 1976; 29(7): 743-753.
 25. Bryan, L.E. and Van Den Elzen, H.M. Effects of membrane-energy mutations and cations on Streptomycin and Gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and Gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977; 12(2): 163-177.

26. Bryan, L.E., Nicas, T., Holloway, B.W., and Crowther, C. Aminoglycoside-resistant mutation of *Pseudomonas aeruginosa* defective in Cytochrome c_{552} and Nitrate Reductase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; 17(1): 71-79.
27. Bryan, L.E. and Kwan, S. Aminoglycoside-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in Cytochrome d, Nitrate reductase, and aerobic transport. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1981; 19(6): 958-964.
28. Bryan, L.E. and Kwan, S. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of Streptomycin and Gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983; 23(6): 835-845.
29. Bryan, L.E. Aminoglycoside Resistance. En: *Antimicrobial Drug Resistance*. Academic Press., Inc., Orlando, USA. 1984.
30. Bryan, L.E., O'hara, K., and Wong, S. Lipopolisaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984; 26(2): 250-255.
31. Bunny, K.L., Hall, R.M., and Stokes, H.W. New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene *aacA7*, and a Chloramphenicol resistance gene, *catB3* in an integron in pBWH301. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(3): 686-693.
32. Carratalá, J., Peña, C. y Cabellos, C. Infección nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Conceptos actuales en enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Infección nosocomial*. Ediciones Doyma, 1993.
33. Chakrabarty, A.M. Plasmids in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Genet.* 1976; 10: 7-30.
34. Clark, R.B., Sanders, C.C., Pakiz, C.B., and Marcia, K.H. Aminoglycoside resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates with an unusual disk diffusion antibiogram. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32(5): 689-692.
35. Collis, C.M. and Hall, R.M. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *Journal of Bacteriology* 1992; 174(5): 1574-1585.
36. Collis, C.M. and Hall, R.M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated Cassettes of Integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(1): 155-162.
37. Courvalin, P. and Carlier, C. Resistance towards aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics in bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1981; 8(Suppl. A): 57-69.
38. Courvalin, P. Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(6): 1019-1023.
39. Crosa, J., and Falkow, S. Plasmids. En: *Manual of Methods for General Bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.D., Krieg, N.R., Phillips, G.B. (ed.). AMS, Washington, D.C., 1981.
40. Crosa, J., Tolmasky, M.E., Actis, L.A. and Falkow, S. Plasmids. En: *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R.G.E. Wood, W.A., Krieg, N.R. (ed.). Washington, D.C. AMS, 1994.

41. Daikos, G.L., Jackson, G.G., Lolans, V.T. and Livermore, D.M. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics from first-exposure down-regulation. *The Journal of Infectious Diseases* 1990; 162: 414-420.
42. Daikos, G.L., Lolans, V.T., and Jackson, G.G. First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(1): 117-123.
43. Dámaso, D. Aminoglicósidos. En: *Antibióticos y Quimioterápicos Antibacterianos. Uso Clínico.* Dámaso, Moreno-López y Doza (ed.). Grutesa. Madrid. España, 1990.
44. Damper, P.D. and Epstein W. Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1981; 20(6): 803-808.
45. Davies, J and Smith, D.I. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.* 1978; 32: 469-518.
46. Davies, J. Mechanisms of antibiotic resistance En: *Current Concepts of the Upjohn Company*, 1980.
47. Dean, H.F., Royle, P., and Morgan, R.F. Detection of FP plasmids in hospital isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 1979; 138(1): 249-250.
48. Dennis, J.J. and Sokol, P.A. Electrotransformation of *Pseudomonas*. En: *Methods in Molecular Biology. Electroporations Protocols for Microorganisms.* Nickoloff, J.A. (ed.). Humana Press Inc., Totowa, N.J.
49. Divo, A. Género *Pseudomonas* y otros bacilos no fermentadores de glucosa. En: *Microbiología Médica.* Divo, A., McGraw-Hill, Nueva Editorial Interamericana, S.A., 1990.
50. Doggett, R.G. Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Pseudomonas aeruginosa. Clinical Manifestation of Infections and Current Therapy.* Doggett (ed.). Academic Press, Inc., New York, San Francisco, London, 1972.
51. Eckhard, T. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588.
52. Fernández Robles, R. y Soriano, F. Aminoglucósidos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 1997; 15: 342-343.
53. Foster, T.J. Plasmid.determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Reviews* 1983; 47(3): 361-409.
54. Fujita, J., Negayama, K., Takigawa, K., Yamagishi, Y., Kuba, A., Yamaji, Y., and Takahara, Y. Activity of antibiotic against resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1992; 29: 539-546.
55. García Rodríguez, J.A. Antimicrobianos. En: *Microbiología y Parasitología Médica.* Pumarola, A., Rodríguez Torres, A y García Rodríguez, J.A. (ed.). Masson-Salvat. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. Barcelona (España), 1991

56. Galimand, M., Lambert, T., Gerbaud, G., and Courvalin, P. Characterization of the *aac(6')*-Ib gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase in *Pseudomonas aeruginosa* BM2656. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(7): 1456-1462.
57. Gaynes, R., Groisman, E., Nelson, E., Casadaban, M. and Lerner, S.A. Isolation, characterization, and cloning of a plasmid-borne gene encoding a phosphotransferase that confers high-level amikacin resistance in enteric bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32(9): 1379-1384.
58. Gilbert, D.N. Once-daily aminoglycoside therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(3): 399-405.
59. Gilleland, L.B., Gilleland, H.E., Gibson, J.A., and Champlin, F.R. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 1989; 29: 41-50.
60. Gilligan, P.H. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P.R. (ed.). ASM, Washington, D.C. 1995.
61. Godfrey, A.J., Morgan, A.F., and Holloway, B.W. Structural instability of Inc P-1 plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* PAT involves interaction with plasmid pVS1. *Journal of Bacteriology* 1980; 144(2): 622-629.
62. Gómez, J., Herrero, F., Ruiz-Gómez, J., Gassent, P., Hernández-Cardona, J.L. y Valdés, M. Bases y significación clínica de los aminoglicósidos en los 1990. *Rev. Esp. Quimioterap.* 1993; 6(2): 140-147.
63. Gómez-Lus, R. Enzimas modificantes de aminoglicósidos. *Rev. Esp. Quimioterap.* 1989; 2(2): 107-114.
64. Gómez-Lus, R. Detección por antibiograma de los mecanismos de resistencia a aminoglicósidos. *Rev. Esp. Quimioterap.* 1989; 2(Supl.1): 23-25.
65. Gómez-Lus, R., Gómez-Lus, M.P., Gil, J., Otal, I., Gómez-Lus, S., and Rubio, M.C. In vitro activity of Isepamicin against 203 aminoglycoside-modifying enzyme producers clinical isolates. *Rev. Esp. Quimioterap.* 1990; 3(3): 255-258.
66. Gómez-Lus Centelles, P. Evolución de la resistencia a aminoglicósidos en *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Esp. Quimioterap.* 1995; 8(2): 151-156.
67. González Martín, M.R. Enzimas modificadores de aminoglicósidos en Enterobacterias de origen hospitalario. Tesis Doctoral, 1990.
68. Gootz, T.D., Tenover, F.C., Young, S.A., Gordon, K.P. and Plorde, J.J. Comparison of three DNA hybridization methods for detection of the aminoglycoside 2"-O-adenyltransferase gene in clinical bacterial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 28(1): 69-73.
69. Grinsted, J. and Bennett, P.M. Preparation and electrophoresis of plasmid DNA. En: *Plasmid Technology*, vol. 21, *Methods in Microbiology*. Grinsted, J. Bennett, P.M. (ed.). Academic Press, 1998.

70. Hächler, H., Santanam, P., and Kayser, F. H. Sequence and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside phosphotransferase gene, aph(3')-IIb, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 46(5): 1254-1256.
71. Hancock, R.E.W. and Nikaido, H. Outer membranes of gram-negative bacteria XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *Journal of bacteriology* 1978; 136: 381-390.
72. Hancock, R.E.W. and Carey, A.M. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: Heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *Journal of bacteriology* 1979; 140: 902-910.
73. Hancock, R.E.W., Decad, G.M., and Nikaido, H. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1979; 554: 323-331.
74. Hancock, R.E.W., Raffle, V.J., and Nicas, T. Involvement of the outer membrane in Gentamicin and Streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1981; 19(5): 777-785.
75. Hancock, R.E.W., Poole, K., and Benz, R. Outer membrane protein P of *Pseudomonas aeruginosa*: Regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. *Journal of bacteriology* 1982; 150(2): 730-738.
76. Hancock, R.E.W., Mutharia, L.M., Chan, L., Darveau, R.P., Speert, D.P. and Pier, G.B. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in Lipopolysaccharide O side chains. *Infection and Immunity* 1983; 42(1): 170-177.
77. Hancock, R.E.W. Alteration in outer membrane permeability. *Ann. Rev. Microbiol.* 1984; 38: 237-264.
78. Hancock, R.E.W. and Wong, P.G.W. Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984; 26(1): 48-52.
79. Hancock, R.E.W. Role of porins in outer membrane permeability. *Journal of bacteriology* 1987; 169(3): 929-933.
80. Hancock, R.E.W., Siehnel, R., and Martin, N. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology* 1990; 4(7): 1069-1075.
81. Hancock, R.E.W., Farmer, S.W., Li, Z. and Poole, K. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified Lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(7): 1309-1314.
82. Hansen, J.B. and Olsen, R.H. Isolation of large plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *Journal of bacteriology* 1978; 135(1): 227-238.
83. Holloway, B.W., Krishnapillai, V., and Morgan, A.F. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews* 1979; 43(1): 73-102.

84. Holloway, B.W. and Morgan, A.F. Genome organization in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Microbiol.* 1986; 40: 79-105.
85. Holloway, B.W., Dharmsthiti, S., Krishnapillai, V., Morgan, A., Obeyesekere, V., Ratnaningsih, E., Sinclair, M., Strom, D., and Zhang, C. Patterns of gene linkages in *Pseudomonas* species. En: *The bacterial Chromosome*. Drlica, K. and Riley, M. AMS. Washington, D.C., 1990.
86. Holloway, B.W., Römmling, U., and Burkhard, T. Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology* 1994; 140: 2907-2929.
87. Hupková, M., Blahová, J., and Krčméry, V. Transfer, by conjugation and transduction, of resistance to ceftazidime and cefotaxime from the same clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zbl. Bakt.* 1994; 281: 196-200.
88. Iyobe, S., Sagai, H., Hasuda, K. and Mitsunashi, S. Drug-resistance plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Proceeding of the 3th International Symposium on Antibiotic Resistance*. Czechoslovakia 1976.
89. Iyobe, S., Sagai, H. and Mitsunashi, S. Tn2001, a transposon encoding Chloramphenicol resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 1981; 146(1): 141-148.
90. Iyobe, S. Transferable drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Proceeding of the 14th International Congress of chemotherapy*. Kyoto 1985.
91. Iyobe, S., Tsunoda, M., and Mitsunashi, S. Cloning and expression in Enterobacteriaceae of the extended-spectrum β -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *FEMS Microbiology Letters* 1994; 121: 175-180.
92. Jackson, G.G., Lolans, V.T., and Daikos, G.L. The inductive role of ionic binding in the bactericidal and postexposure effects of aminoglycoside antibiotics with implications for dosing. *The Journal of Infectious Diseases* 1990; 162: 408-413.
93. Jacoby, G.A. Properties of an R plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* producing amikacin (BB-K8), Butirosin, kanamycin, Tobramycin, and Sisomicin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1974; 6(6): 807-810.
94. Jacoby, G.A., Weiss, R., Korfliagen, T.R., Krishnapillai, V., Jacob, A.E., and Hedges, R.W. An explanation for the apparent host specificity of *Pseudomonas* plasmid R91 expression. *Journal of Bacteriology* 1978; 136(3): 159-1164.
95. Jacoby, G.A. Plasmids of *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical manifestations of infection and current therapy. Edited by Dogget, R.G. Academic Press, Inc. 1979.
96. Jacoby, G.A., Blaser, M.J., Santanam, P., Hächler, H., Kayser, F.H., Hare, R.S. and Miller, G.H. Appearance of Amikacin and Tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase (ANT(4')-II) in gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34(12): 2381-2386.
97. Johson, D.E., Thompson, B., and Calia, F.M. Comparative activities of piperacillin, ceftazidime, and amikacin alone and in all possible combinations, against experimental

- Pseudomonas aeruginosa* infections in neutropenic rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27(12): 735-739.
98. Kadurugamuwa, J.L., Lam, J.S., and Beveridge, T.J. Interaction of gentamicin with the A band and B band Lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and its possible lethal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(4): 715-721.
99. Karlowsky, J.A., Zhanel, G.G., Davidson, R.J., and Hoban, D.J. Once-daily aminoglycoside dosing assessed by MIC reversion time with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38(5): 1165-1168.
100. Karlowsky, J.A., Saunders, M.H., Harding, G.A.J., Hoban, D.J. and Zhanel, G.G. In vitro characterization of aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40(6): 1387-1393.
101. Kato, T., Sato, Y., Iyobe, S. and Mitsuhashi, S. Plasmid-mediated Gentamicin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and its lack of expression in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 358-363.
102. Katsorchis, T., Legakis, N.J., Shearer, B., Genmmata, and Pataryas, H. Outer surface changes of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to resistance to Gentamicin and Carbenicillin. *J. Med. Microbiol.* 1985; 19: 375-381.
103. Kawabe, H., Naito, T. and Mitsuhashi, S. Acetylation of Amikacin, a new semisynthetic antibiotic, by *Pseudomonas aeruginosa* carrying an R factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1975; 7(1): 50-54.
104. Kawabe, H., Kondo, S., Umezawa, H. and Mitsuhashi, S. R factor-mediated aminoglycoside antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a new aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1975; 7(5): 494-499.
105. Kenneth, J.R. *Pseudomonas* and other opportunistic Gram-negative bacilli. En: *Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases*. Sherris (ed.). Prentice-Hall International Inc., 1990.
106. Kesters, K. Ludwig, W., Vancannest, M., De vos, P., Gillis, M., and Schleifer, K-M. Recent changes in the classification of the Pseudomonads: an overview. *System. Appl. Microbiol.* 1996; 19: 465-477.
107. Kettner, M., Milosovic, P., Hletková, J., Kallová, J. Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates. *Infection* 1995; 23(6): 380-383.
108. Knothe, H., Lebek, G., Krčméry, V., Seginková, Z., Cêrvenka, J., Antal, M. and Mitsuhashi, S. Transduction of Amikacin, Gentamicin and Tobramycin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* with phage F116 and AP19, a new wild type phage. *Zbl. Bakt.* 1981; 250: 506-510.
109. Kocabiyc, S., Akalin, E., and Alaeddinogh, G. Resistance to antimicrobial agents. En: *Abstracts of the 15th International Congress of Chemotherapy*. Turkey.

110. Kontomichalou, P. Multiresistant plasmid from *Pseudomonas aeruginosa* highly resistant to either or both Gentamicin and Carbenicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976; 9(6): 866-873.
111. Kropinski, A.M., Kuzio, J., Angus, B.L., and Hancock, R.E.W. Chemical and chromatographic analysis of lipopolysaccharide from an antibiotic-supersusceptible mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 21(2): 310-319.
112. Lam, M.Y.C., McGroarty, E.J., Kropinski, A.M., MacDonald, L.A., Pedersen, S.S., Høiby, N. and Lam, J.S. Occurrence of a common Lipopolysaccharide antigen in standar and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27(5): 962-967.
113. Lambert, T., Gerbaud, G., Bouvet, P., Vieu, J.F., and Courvalin, P. Dissemination of Amikacin resistance gene aphA6 in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34(6): 1244-1248.
114. Lambert, T., Gerbaud, G., Galimand, M. and Courvalin, P. Characterization of *Acinetobacter haemolyticus* aac(6')-I_g gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase which modifies Amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(10): 2093-2100.
115. Lambert, T., Gerbaud, G., and Courvalin, P. Characterization of the chromosomal aac(6')-I_j gene of *Acinetobacter* sp.13 and the aac(6')-I_h plasmid gene of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38(9): 1883-1889.
116. Lambert, T., Ploy, M.C. and Curvalin, P. A spontaneous point mutation in the aac(6')-I_b' gene results in altered substrate specificity of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *FEMS Microbiology Letters* 1994; 115: 297-304.
117. Lerner, S.A., Gaynes, R.P. and Lisbeth, N. Aminoglycosides. En: *Infectious Diseases*. Gorbach, S.L., Bartlett, J.G., Blacklow, N.R. W.B. (ed.). Saunders Company, HBJ, Inc. 1992.
118. Lietman, P.S. Aminoglycosides and Spectinomycin: Aminocyclitols. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, Douglas and Bennett (ed.). Churchill Livingstone Inc. 1990.
119. Lightfoot, J. and Lam, J.S. Molecular cloning of genes involved with expression of A-Band lipopolysaccharide, an antigenically conserved form, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 1991; 173(18): 5624-5630.
120. Loh, B., Grant, C. and Hancock, R.E.W. Use of the fluorescent probe 1-N-phenyl-naphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotic with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984; 26(4): 546-551.
121. López-Yeste, M^a. L., Chaves, J., Garau, J., Martín, A., Tirado, M., Reig, R. y Roy, C. Pérdida de sensibilidad a los antibióticos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el curso del tratamiento. *Med. Clin.* 1994; 103: 81-84.
122. Maloney, J., Rimland, D., Stephens, D.S., Terry, P., and Whitney, A.M. Analysis of Amikacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* developing in patients receiving Amikacin. *Arch. Intern. Med.* 1989; 149: 630-634.

123. Martin, N.L. and Beveridge, T.J. Getamicin interaction with *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986; 29(6): 1079-1087.
124. Martín, C., Gomez-Lus, R., Ortiz, J.M., and García-Lobo, J.M. Structure and mobilization of an Ampicillin and Gentamicin resistance determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987; 31(8): 1266-1270.
125. Martínez, J.L., Blázquez, J., and Baquero, F. Non-canonical mechanisms of antibiotic resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1994; 13(12): 1015-1022.
126. Masuda, N, Sakagawa, E., and Ohya, S. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(3): 645-649.
127. Matsen, J. and Barry, A.L. Pruebas de sensibilidad: técnicas por difusión. En: *Manual de Microbiología Clínica*. Lennette, E.H., Spaulding, E.H., Truant, J.P. Salvat Editores, S.A. 1981.
128. Matsushashi, Y., Yagisawa, M., Kondo, S., Takeuchi, T. And Umezawa, H. Aminoglycoside 3'-phosphotransferase I and II in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antibiotics* 1975; 28(6): 442-447.
129. Mayer, K.H., Opal, S.M. and Medeiros, A.A. Mecanismos de Resistencia a los antibióticos. En: *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*. Mandell, Douglas y Bennett (ed.). Editorial Panamericana, 1997.
130. McCombie, W.R., Hansen, J.B., Gerber, J., Zylstra, B.M. and Olsen, R.H. *Pseudomonas* Streptomycin resistance transposon associated with R-plasmid mobilization. *Journal of Bacteriology* 1993; 155(1): 40-48.
131. McGrath, B.J., Bailey, E.M., Lamp, K.C. and Rybak, M.J. Pharmacodynamics of once-daily Amikacin in various combinations with Cefepime, Aztreonam, and Ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36(12): 2741-2746.
132. Mercer, A.A. and Loutit, J.S. Transformation and transfection of *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of metal ions. *Journal of Bacteriology.* 1979; 140(1): 37-42.
133. Meyer, J.F., Nies, B.A., and Wiedemann Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn 2424. *Journal of Bacteriology* 1983; 155(2): 755-760.
134. Michéa-Hamzhepour, M., Sanchez, J-C., Epp, S.F., Paquet, N., Hughes, G.J., Hochstrasser, D., and Pechère, J.C. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis isolation and microsequencing of *Pseudomonas aeruginosa* proteins. *Enzyme Protein* 1993; 47: 1-8.
135. Michéa-Hamzhepour, M., Kahr, A., and Pechère, J-C. In vitro stepwise Selection of Resistance to Quinolones, β -lactams and Amikacin in nosocomial gram-negative Bacilli. *Infection* 1994; 22(Suppl.2): S-105-110.

136. Michel-Briand, Y., Dupont, M.J., Chardon-Loriaox, I. and Jouvenot, M. Isolation of an antibiotic multiresistance plasmid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1981; 7: 371-378.
137. Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Hare, R.S. and Waitz, J.A. Survey of aminoglycoside resistance patterns. *Developments in Industrial Microbiology* 1980; 21: 91-104.
138. Miller, G.H. and the Aminoglycoside Resistance Study Groups. Resistance to aminoglycosides in *Pseudomonas*. *Trends in Microbiology* 1994; 2(10): 347-351.
139. Miller, G.H. and the Aminoglycoside Resistance Study Groups. Increasing complexity of aminoglycoside resistance mechanisms in gram-negative bacteria. *APUA Newsletter* 1994; 12(2): 5-9.
140. Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Naples, L., Hare, R.S., Shaw, K.J. and the Aminoglycoside Resistance Study Groups. The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms-combined results of surveys in eight regions of the world. *Journal of Chemotherapy* 1995; 7(2): 17-30.
141. Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Naples, L., Hare, R.S. and Shaw, K.J. and the Aminoglycoside Resistance Study Group. The changing nature of Aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin- a new broad-spectrum aminoglycoside. *Journal of Chemotherapy*
142. Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Mann, P., Woloj, M., Naples, L., Hare, R.S., and Shaw, K.J. The utilization of aminoglycoside resistance phenotypes for the determination of aminoglycoside resistance mechanisms. Schering-Plough Research Institute "Aminoglycoside Resistance Surveys Team".
143. Miller, M.H., Feinstein, S.A. and Chow, R.T. Early effects of β -lactams on aminoglycoside uptake, bactericidal rates, and turbidimetrically measured growth inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987; 31(1): 108-110.
144. Millesimo, M., De Intinis, G., Chirillo, M.G., Musso, T., and Savoia, D. *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: serotypes, resistance phenotypes and plasmid profiles. *Eur. J. Epidemiol.* 1996; 12: 123-129.
145. Mills, B. and Holloway, B. W. Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa*. 3th International Symposium on Antibiotic Resistance 1976.
146. Mollet, B., Clerget, M., Meyer, J., and Iida, S. Organization of the Tn6-related Kanamycin resistance transposon Tn2680 carrying two copies of IS26 and IS903 variant, IS903.B. *Journal of Bacteriology* 1985; 163(1): 55-60.
147. Moore, R.A., Bates, N.C. and Hancock, R.E.W. Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using Dansyl-Polymyxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986; 29(3): 496-500.
148. Moore, R.A. and Hancock, R.E.W. Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in Aminoglycoside and Polymyxin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986; 30(6): 923-926.

149. Moore, E.R.B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E.C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Van der Perr, Y., De Wachter, R., and Timmis, K.N. The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intragenic relationships. *System. Appl. Microbiol.* 1996; 19: 478-492.
150. Morgan, A.F. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* R' plasmids constructed by interspecific mating. *Journal of Bacteriology* 1982; 149(2): 654-661.
151. Morris, D and Broda, P. R plasmid R91 and R91a from *Pseudomonas aeruginosa* share only the gene for Carbenicillin resistance. *Journal of Bacteriology* 1979; 138(3): 1036-1037.
152. Mucha, D.K. and Farrand, S. Diversity of determinants encoding Carbenicillin, Gentamicin, and Tobramycin resistance in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986; 30(2): 281-289.
153. Nakae, R. and Nakae, T. Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 22(4): 554-559.
154. Nicas, T.I. and Hancock, R.E.W. Outer membrane protein H1 of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in adaptive and mutational resistance to ethylendiaminetetraacetate, Polymyxin B, and gentamicine. *Journal of Bacteriology* 1980; 143: 872-878.
155. Nicas, T.I. and Hancock, R.E.W. Alteration of susceptibility to EDTA, polymyxin B and Gentamicin in *Pseudomonas aeruginosa* by divalent cation regulation of outer membrane protein H1. *Journal of General Microbiology* 1983; 129:509-517.
156. Nicolau, D.P., Freeman, C.D., Belliveau, P.P., Nightingale, C.H., Ross, J.W., and Quintiliani, R. Experience with a once-daily aminoglycoside program administered to 2184 adult patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(3): 650-655.
157. Nikaido, H. and Vaara, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews* 1985; 49(1): 1-32.
158. Nikaido, H., Nikaido, K. and Harayama, S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266(2): 770-779.
159. Nikaido, H. Microreview. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Molecular Microbiology* 1992; 6(4): 435-442.
160. Nikaido, H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 1994; 264: 382-388.
161. Okii, M., Iyobe, S. and Mitsuhashi, S. Mapping of the gene specifying aminoglycoside 3'-phosphotransferase II on the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Journal of Bacteriology.* 1983; 155: 643-649.
162. Olexy, V.M., Bird, T.J., Griebel, H.G. and Farrand, S.K. Hospital isolates of *Serratia marcescens* transferring Ampicillin, Carbenicillin, and Gentamicin resistance to other gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979; 15(1): 93-100.

163. Olsen, R.H. and Hansen, J. Evolution and utility of a *Pseudomonas aeruginosa* drug resistance factor. *Journal of Bacteriology*. 1976; 125(3): 837-884.
164. Olson, B., Weinstein, R.A., Chamberlin, W., and Kabins, S.A. Occult aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and implications for therapy and control. *The Journal of Infectious Diseases*. 1985; 152(4): 769-774.
165. Palleroni, N.J. *Pseudomonas*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg (ed. Vol. 1), Holt (ed., c). Williams and Wilkins, Baltimore, London, 1984.
166. Park, M.K., Myers, R.A.M., and Marzella, L. Hyperoxia and prolongation of aminoglycoside-induced postantibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*: role of reactive oxygen species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(1): 120-122.
167. Perlin, M. and Lerner, S.A. Localization of an Amikacin 3'-phosphotransferase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1981; 147(2): 320-325.
168. Peterson, A.A., Hancock, R.E.W., and McGroarty, E.J. Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 1985; 164(3): 1256-1261.
169. Phillips, I. and Shannon, K. Aminoglycoside resistance. *British Medical Bulletin*. 1984; 40(1): 28-35.
170. Piédrola-Angulo, G. *Pseudomonas* y bacilos gramnegativos no fermentadores. En: *Microbiología y Parasitología Médica*. Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García Rodríguez, J.D., Piédrola-Angulo, G. (ed.). Masson-Salvat Medicina S.A., Barcelona. España, 1987.
171. Pitt, T.L. *Pseudomonas*. En: *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, Eighth Edition. Vol. 2. Parker, Dueerden, Brian (ed.). Edward Arnold, 1990.
172. Poh, C.L. Tay, Y.L., and Bergan, T. Plasmid profiles compared with serotyping for epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 25: 109-114.
173. Pollack, M. *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, Douglas, and Bennett (ed.). Churchill Livingstone, Inc. New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo, 1990.
174. Prince, A.S. and Jacoby, G.A. Cloning the Gentamicin resistance gene from a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid in *Escherichia coli* enhances detection of aminoglycoside modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 22(3): 525-526.
175. Rather, P.N., Munayyer, H., Mann, P.A., Hare, R.S., Miller, G.H., and Shaw, K.J. Genetic analysis of bacterial Acetyltransferases: identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase Ib and IIa proteins. *Journal of Bacteriology*. 1992; 174(10): 3196-3203.
176. Rather, P.N., Mierzwa, R., Hare, R.S., Miller, G.H., and Shaw, K.J. Cloning and DNA sequence analysis of an aac(3)-Vb gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36: 2222-2227.

177. Rather, P.N., Mann, P.A., Mierzwa, R., Hare, R.S., Miller, G.H., and Shaw, K. Analysis of the *aac(3)-VIa* gene encoding a novel 3-N-Acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(10): 2074-2079.
178. Richard, P., LeFloch, R., Chamoux, C., Pannier, M., Espaze, E., and Richet, H. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistance strains. *The Journal of Infectious Diseases.* 1994; 170: 377-383.
179. Rivera, M., Hancock, R.E.W., Sawyer, J.G., Haug, A, and McGroarty, E.J. Enhanced binding of polycationic antibiotics to lipopolysaccharide from an aminoglycoside-supersusceptible, *tolA* mutant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32(5): 649-655.
180. Rivera, M. and McGroarty, E.J. Binding of polycationic antibiotics to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface. Assembly and Function*, Actor, P, Higgins, M.L., salton, M.J.R., and Sharman, G.D. (ed.). Washington D.C., A.M.S. 1988.
181. Rivera, M. and McGroarty, E.J. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 1989; 171(4): 2244-2248.
182. Royle, P.L., and Holloway, B.W. Relationship between R and FP plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; 17(3): 293-297.
183. Royle, P.L., Matsumot, H. and Holloway, B.W. Genetic circularity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *Journal of Bacteriology.* 1981; 145(1): 145-155.
184. Sande, M.A., y Mandell, G.L. Agentes antimicrobianos. Los aminoglucósidos. En: *Las Bases Farmacológicas de la terapéutica.* Goodman y Gilman (ed.). Editorial Panamericana, S.A. 1986.
185. Santré, C., Georges, H., Jacquier, J.M., Leroy, O., Beuscart, C., Buguin, D., and Beaucaire, G. Amikacin levels in bronchial secretions of 10 pneumonia patients with respiratory support treated once daily versus twice daily. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(1): 264-267.
186. Shaw, K.J., Cramer, C.A., Rizzo, M., Mierzwa, R., Gewain, K., Miller, G.H., and Hare, R.S. Isolation, characterization, and DNA sequence analysis of an AAC(6')-II gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33(12): 2052-2062.
187. Shaw, K.J., Hare, R.S., Sabatelli, F.J., Rizzo, M., Cramer, C.A., Naples, L., Kocsi, S., Munayyer, H., Mann, P., Miller, G.H., Verbist, L., Van Landuyt, H., Glupczynski, Y., Catalano, M., and Woloj, M. Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(11): 2253-2261.
188. Shaw, K.J., Rather, P.N., Sabatelli, F.J., Mann, P., Munayyer, H., Mierzwa, R., Petrikos, G.L., Hare, R.S., Miller, G.H., Bennett, P., and Downey, P. Characterization of the chromosomal *aac(6')-Ic* gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36(7): 1447-1455.

189. Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*. 1993; 57(1): 138-163.
190. Shaw, K.J., Munayyer, H., Rather, P.N., Hare, R.S., and Miller, G.H. Nucleotide sequence analysis and DNA hybridization studies of the ant(4')-IIa gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(4): 708-714.
191. Shimizu, K., Kumada, T., Hsieh, W.C., Chung, H.Y., Chong, Y., Hare, R.S., Miller, G.H., Sabatelli, F.J., and Howard, J. Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 28(2): 282-288.
192. Schwocho, L.R., Schaffner, C.P., Miller, G.H., Hare, R.S., and Shaw, K.J. Cloning and characterization of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, aac(3)-Ib, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(8): 1790-1796.
193. Sinclair, M.I., and Holloway, B.W. A chromosomally located transposon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 1982; 152(2): 569-579.
194. Siregar, J.J., Lerner, S.A., and Mobashery, S. Purification and characterization of aminoglycoside 3'-phosphotransferase type IIa and kinetic comparison with a new mutant enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38(4): 641-647.
195. Speert, D.P., Farmer, S.W., Campbell, M.E., Musser, J.M., Selander, R.K., and Kuo, S. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to the phenotype characteristic of strains from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(2): 188-194.
196. Standford, J.P. *Pseudomonas* species (including Meloidosis and Glanders). En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, Douglas, and Bennett (ed.). Churchill Livingstone, Inc. New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo, 1990.
197. Stanier, R.Y. The aerobic Pseudomonads. En: *General Microbiology*. Stanier, Ingraham, Wheelis, Painter (ed.). MacMillan Education LTD, Houndmills, Basingstoke, Hampshire and London, 1986.
198. Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F., and Arrow, A.S. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiological Reviews* 1987; 51(4): 439-457.
199. Talarmin, A., Dubrous, P., Gérome, P., and Buisson, Y. Study of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 isolates with a common antibiotic susceptibility pattern. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 15: 459-464.
200. Takigawa, A., Fujita, J., Negayama, K., Xu, G., Yamagishi, Y., Miyawaki, H., Hojo, S., Yamaji, Y., and Takahara, J. Comparing antimicrobial activity against resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1995; 35: 425-427.
201. Tardif, G., and Grant, B.R. Transfer of plasmids from *Escherichia coli* to *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mutant with enhanced recipient ability for Enterobacterial plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983; 24(2): 201-208.

202. Tassios, P.T., Gennimata, V., Spaliara-K, L., Kairis, D., Koutsia, C., Vatapoulos, A.C., and Legakis, N.J. Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11 outbreak in an intensive care unit. *Clinical Microbiology and Infection* 1997; 3(6): 621-628.
203. Tenover, F.C., Gilbert, T., and O'Hara, P. Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, aphA-7 from *Campylobacter jejuni* and comparison to other kanamycin phosphotransferase genes. *Plasmid*. 1989; 22: 52-58.
204. Tenover, F.C., Phillips, K.L., Gilbert, T., Lockhart, P., O'Hare, P. J., and Plorde, J.J. Development of a DNA probe from the deoxyribonucleotide sequence of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase AAC(3)-I resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33(4): 551-559.
205. Terán, F.J., Suárez, J.E., and Mendoza, C. Cloning sequencing, and use as a molecular probe of a gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of broad substrate profile. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(4): 714-719.
206. Terán, F.J., Alvarez, M., Suárez, J.E., and Mendoza, C. Characterization of two aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase genes and assay as epidemiological probes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1991; 28: 333-346.
207. Torres García, M.M. Estudios sobre la resistencia enzimática a aminoglicósidos en aislados clínicos del género *Staphylococcus*. Tesis Doctoral, 1992.
208. Tran Van Nhieu, G. and Collatz, E. Primary structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-4, fused in vivo with the signal peptide of the Tn3-encoded β -lactamase. *Journal of Bacteriology* 1987; 169(12): 5708-5714.
209. Trieu-Cout, P., and Courvalin, P. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3',5''-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene.* 1983; 23: 331-341.
210. Umezawa, H. Biochemical mechanism of resistance to aminoglycosidic antibiotics. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1974; 30: 183-225.
211. Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews.* 1992; 56(3): 395-411.
212. Van de Klundert, J.A.M. and Vliegthart, J.S. PCR Detection of genes coding for aminoglycoside modifying enzymes. En: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J. Mayo Foundation, Rochester, 1993.
213. Vézina, G., and Levesque, R.C. Molecular characterization of the class II multiresistance transposable element Tn1403 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(2): 313-321.
214. Vliegthart, J.S., Ketelaar-van Gaalen, P.A.G., and Van de Klundert, J.A.M. Nucleotide sequence of the aacC2 gene, a gentamicin resistance determinant involved in a hospital epidemic of multiple resistant members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33(8): 1153-1159.

215. Vliegthart, J.S., Ketelaar-van Gaalen, P.A.G., and Van de Klundert, J.A.M. Nucleotide sequence of the *aacC3* gene, a gentamicin resistance determinant encoding aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase III expressed in *Pseudomonas aeruginosa* but not in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(5): 892-897.
216. Walker, S.G. and Beveridge, T.J. Amikacin disrupts the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. *Can. J. Microbiol.* 1987; 34:12-18.
217. Williams, D.J. Aminoglycoside antibiotics. En: *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. Parker, Duerden, Brian (ed.). Edward Arnold, 1990.
218. Woolfrey, B.F., Fox, J.M.K., Lally, R.T., and Quall, C.O. Broth microdilution testing of *Pseudomonas aeruginosa* and aminoglycosides: need for employing dilutions differing by small arithmetic increments. *Journal of Clinical Microbiology.* 1982; 16(4): 663-667.
219. Xion, Y-Q, Caillon, J., Drugeon, H., Postel, G., and Baron, D. Influence of pH on adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and their postantibiotic effects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40(1): 35-39.
220. Yoneyama, H., Sato, K., and Nakae, T. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to outer membrane stabilization. *Chemotherapy* 1991; 37: 239-245.
221. Yoshimura, F., and Nikaido, H. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *Journal of Bacteriology.* 1982; 152(2): 636-642.
222. Young, M.L., Bains, M., Bell, A., and Hancock, R.E.W. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36(11): 2566-2568.
223. Young, S.A., Tenover, F.C., Gootz, T.D., Gordon, K.P., and Plorde, J.J. Development of two DNA probes for differentiating the structural genes of subclasses I and II of the aminoglycoside-modifying enzyme 3'-aminoglycoside phosphotransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27(5): 739-744.

