

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
EDIF – E DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN**

PROGRAMA DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**GENOTIPIFICACION DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTE A
LOS AMINOGLICOSIDOS, UTILIZANDO LA TECNICA DE
AMPLIFICACION AL AZAR DEL ADN POLIMORFICO (RAPD)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

ERNESTO MARAVILLA FRANCO

TUTORES

DR. JOSE SIFUENTES OSORNIO
DR. GUILLERMO RUIZ-PALACIOS

México, D.F., 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria:

A los Sagrados Corazones de Jesús y de María: por la fe, esperanza y perseverancia que imprimieron en mi corazón para culminar hasta el final con este trabajo de investigación. Por sostenerme en los momentos difíciles, por darme sabiduría y, sobre todo, porque siempre estuvieron y han estado a mi lado. Gracias Jesús mío. Gracias Dulce Madre. Los amo con todo mi corazón.

A mis padres José Luis Maravilla Quintero y María del Socorro Franco Gutiérrez: porque con su esfuerzo, cariño y sufrimiento me dieron vida, educación y un amor incondicional.

A mis hermanos tan queridos Fernando, Silvia Guadalupe, José Luis, Francisco Eduardo, Octavio, Dolores Leticia y muy especialmente a mi hermana Mónica Alicia por ayudarme a pasar el camino que creí imposible pasar. Dios te bendiga Moni.

A mi novia tan amada Chivis: porque con su llegada ha iluminado mi vida, trayendo nuevas ilusiones y esperanzas a mi corazón.

A mis amigos Marcial Gómez y Justino Altamirano por su apoyo, escucha y consejos y, muy especialmente, a mi amigo y hermano Alexandro Carranza: mil gracias por tenderme la mano.

A todos mis amigos y amigas de la Pq. de San Agustín.

Agradecimientos:

A mis tutores:

Dr. José Sifuentes Osornio
Dr. Guillermo Ruiz-Palacios

A mis asesores:

Dr. Alexandro Carvalho †
Dra. Rebeca Ramírez Carrillo
Dra. Valeria Souza
Act. Jaime Romero
Dra. Miriam Judith Bobadilla del Valle
Ing. Ancelmo Ramos Hinojosa
Ing. Renato Sánchez Montero †
Ing. Juan Gabriel Rojas Hernández
Dra. Beatriz Ruiz-Palacios

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Clínica.

Al Honorable Jurado del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas:

Dra. Carmen Gómez Eichelmann
Dra. Gloria Soberón Chávez
Dr. Juan E. Morett Sánchez
Dr. Edmundo Calva Mercado

PORTADA

INDICE

INTRODUCCION

JUSTIFICACION

HIPOTESIS

OBJETIVO GENERAL

DISEÑO DEL ESTUDIO

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

ABREVIATURAS

BIBLIOGRAFIA

Palabras clave: Infecciones nosocomiales, *P.aeruginosa*, RAPD, retrospectivo, análisis molecular, susceptibilidad, polimorfismo, correlación, brotes, muestras clínicas, estaciones.

RESUMEN

Introducción. Actualmente las infecciones adquiridas en hospitales, o nosocomiales, representan un problema muy grave en cuanto a morbilidad, a mortalidad y al impacto económico que ocasionan. Cuando los aislados bacterianos de la misma especie relacionados genética y epidemiológicamente aumentan su incidencia con respecto a la línea basal en un lugar determinado y durante un período dado, causan un brote. Diversas técnicas moleculares son utilizadas para la genotipificación de patógenos bacterianos, lo que permite relacionarlos epidemiológicamente. **Antecedentes.** En el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) se han realizado estudios sobre aislados nosocomiales de bacterias grampositivas y gramnegativas. Así se reporta que la mortalidad asociada a bacteriemia primaria por *Serratia marcescens* fue de 66%. Otros estudios sobre la resistencia en bacilos gramnegativos mostraron alta resistencia a antibióticos de amplio espectro y a aminoglicósidos; no obstante, el uso exclusivo de amikacina controló la resistencia a los aminoglicósidos. Con el fin de controlar y disminuir las infecciones adquiridas en el Instituto, desde 1985 se ha establecido un programa de Control de Infecciones Nosocomiales. Los sitios susceptibles de infecciones más comunes fueron las vías urinarias, sangre, vías respiratorias inferiores y heridas. Dentro de los gérmenes más comúnmente aislados estuvo *Pseudomonas aeruginosa*, y el área hospitalaria con la tasa más alta de infecciones fue la Unidad de Terapia Intensiva (UTI). - *P.aeruginosa* es uno de los patógenos nosocomiales más importantes debido a su capacidad de desarrollar resistencia a antibióticos. Se ha investigado acerca de las bacteriemias causadas por *P.aeruginosa*; 81% de los episodios se adquirieron en el área hospitalaria del INCMNSZ. El origen más común de la bacteriemia fue la vía biliar. Los aislados de *P.aeruginosa* presentaron una resistencia promedio a los aminoglicósidos de 34.8%. Los estudios reportados por el Departamento de Infectología del INCMNSZ, indican que los brotes, incluyendo los causados por *P.aeruginosa*, son un problema relevante en el Instituto, por lo que es importante estudiar y caracterizar por medio de la tipificación molecular, a la población clínica de *P.aeruginosa* para comprender su epidemiología, conducta biológica y evolución a través del tiempo y así establecer estrategias que impidan la emergencia y selección de cepas de *P.aeruginosa* más agresivas e impedir a la vez su diseminación en otras unidades hospitalarias. -El presente trabajo se divide en dos partes, la primera es un estudio retrospectivo de la base de datos del Laboratorio de Microbiología Clínica (LMC) del Departamento de Infectología, para analizar la prevalencia de *P.aeruginosa* en muestras clínicas (vías respiratorias, vías urinarias, cultivos de sangre, abscesos y heridas, fluidos corporales entre otros), la distribución de los aislados a lo largo del tiempo, con el fin de detectar brotes y su prevalencia en ciertas épocas del año. La segunda parte consistió en un análisis molecular en el que se realizaron ensayos con el ADN de 202 aislados clínicos de *P.aeruginosa*, utilizando la técnica de RAPD, la cual se optimizó previo al ensayo general, para tratar de conocer si existían aislados semejantes o si todos eran distintos. Los resultados del estudio retrospectivo se correlacionaron con los resultados del estudio molecular, encontrándose una correlación satisfactoria. **Objetivo.** Definir, mediante el método de amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD), si los aislados nosocomiales de *P.aeruginosa* resistente a aminoglicósidos, obtenidos en el intervalo de 1991 a 1995 en el INCMNSZ, están relacionados a la misma cepa. **Materiales y Métodos.** Se capturaron y organizaron los datos contenidos en la base de datos del LMC de 1991-1995. Los datos organizados se sujetaron a un análisis de variancia para el cálculo de la prueba F, en un diseño en bloques, factorial y de "split-split plot" utilizando el programa "SPSS for Windows V10.1". A partir de las medias de los contrastes se elaboraron histogramas de frecuencia para los aislados sensibles y resistentes a uno o más aminoglicósidos por mes, por año, por tipo de muestra clínica y distribución estacional. -Se incluyeron 202 aislados de *P.aeruginosa* viables para probarse con el RAPD. Los aislados se identificaron y probaron previamente para una batería de 19 antibióticos. - El ADN genómico de *P.aeruginosa* se extrajo según Pitcher, Bruce & Jordan's. Se llevaron a cabo ensayos para la selección del iniciador 1283 a partir de un conjunto de seis iniciadores. Las condiciones óptimas de amplificación para el RAPD se determinaron manteniendo uno de los

parámetros a probar y haciendo variaciones de los demás. –Con las condiciones seleccionadas se amplificaron los 202 aislados. Se estimó el grado de relación entre dos cepas a partir de los patrones electroforéticos de las bandas, utilizando el método de agrupación de pares no relacionados con base en promedios aritméticos (UPGMA). –La variabilidad genética de la población se determinó utilizando el programa *Tools for Population Genetics Analyses* (TFPGA).

Resultados. La subpoblación de *P.aeruginosa* multirresistente a los aminoglicósidos (PaeM) causó ocho brotes a lo largo de los 5 años estudiados. Prevalció en muestras provenientes de vías respiratorias y orina; así mismo, predominó durante la estación de verano. –El dendrograma obtenido a partir del análisis de UPGMA mostró que PaeM se distribuyó en tres grandes subpoblaciones: a) no relacionada (PaeMNR), b) esporádica (PaeMES) y c) endémica (PaeMED); esta última incluyó una sub-subpoblación de variedades de PaeM denominadas PaeMM, agrupadas en cinco conglomerados estrechamente relacionados (coeficiente de similitud de 75%). Los 60 genomas de PaeMM analizados mostraron el más bajo polimorfismo, con 21 centenas de pb, además de presentar bandas dobles de aproximadamente 400 pb en 75% de los aislados, tales aislados mostraron un polimorfismo muy semejante, es probable que estas bandas sean un marcador de resistencia. –El 22.3% (21/94) de los aislados de PaeMED mostró un código de susceptibilidad a 19 antibióticos 1737773; 57.4% (54/94) tuvieron el código 173777'. Ninguna de las subpoblaciones restantes presentó códigos semejantes. Los códigos se obtuvieron a partir de los resultados de susceptibilidad de cada antibiótico, categorizados en: resistente (R), sensible (S) e intermedio (I), estos datos se convirtieron al sistema binario 1, 0: R e I=1 y S=0, éstos a su vez se tradujeron al sistema octal para obtener el código de resistencia final, sintetizado y fácil de analizar. –Los coeficientes de heterocigosis virtual para subpoblaciones fenotípicas, origen de aislamiento por muestra clínica y estacionalidad fue de 0.26, 0.30 y 0.21, respectivamente. La proporción de loci polimórfico fue de 100, 91.2 y 73.5%, respectivamente. El segundo análisis con UPGMA utilizando TFPGA comprobó la estacionalidad de los aislados menos polimórficos y la existencia de patógenos tipo con la misma posibilidad de colonizar distintos nichos.

Discusión. Los brotes causados por *P.aeruginosa* se comprobaron en forma estadística; en ningún estudio realizado previamente en el Instituto se reporta diferencia estadística en los brotes observados. Los diseños estadísticos dieron a conocer la presencia de dos subpoblaciones importantes: *P.aeruginosa* resistentes a gentamicina (PaeGn) y PaeM. –Es probable que PaeM se esté seleccionando en aquellos pacientes que cursan con neumonía. PaeMED mostró una diversidad polimórfica de 31 centenas de pb a pesar de haberse analizado 100 genomas; más aún, la diversidad polimórfica de su subpoblación PaeMM fue mucho menor con tan solo 21 centenas de pb. –PaeMM presentó una distribución estacional predominando durante los meses cálido-lluviosos y frío-húmedos. –En este estudio el RAPD concordó con las apreciaciones hechas por otros autores en cuanto a la capacidad de discriminar los aislados de *P.aeruginosa*, además de ser reproducible. Los resultados de las huellas digitales obtenidas para las 202 *Pseudomonas* del análisis general mostraron correlación entre los conglomerados más estrechamente relacionados, no sólo con el fenotipo de resistencia a tres aminoglicósidos, sino también con la sensibilidad global a 19 antibióticos. La reproducibilidad del RAPD también se comprobó con el análisis de TFPGA.- Es probable que la región de aproximadamente 400 pb contenga integrones y/o cajas de genes de resistencia multicopia.

Conclusiones. i) Los aislados de *P.aeruginosa* multirresistentes a los aminoglicósidos están relacionados a distintas líneas clonales estrechamente relacionadas, y no solo una, causantes de brotes. ii) La optimización del RAPD permitió resultados reproducibles y confiables para la discriminación y agrupación de *P.aeruginosa*. iii) Existió concordancia entre el análisis estadístico y el método molecular. iv) La población clínica de *P.aeruginosa* fue diversa genéticamente. v) Existe una sub-subpoblación de *P.aeruginosa* (PaeMM) multirresistente a diversos antibióticos, con un escaso número de bandas obtenido por RAPD. vi) PaeMM mostró una distribución estacional. vii) PaeMM presenta un marcador molecular de aproximadamente 400 pb.

1. INTRODUCCION

1.1 Infecciones Nosocomiales

Las infecciones adquiridas en hospitales, llamadas infecciones nosocomiales, tienen gran importancia en la medicina de hoy debido a que representan un problema muy grave en cuanto a morbilidad, a mortalidad y al impacto económico que ocasionan.⁹⁴ Se realizan esfuerzos considerables en diversas áreas hospitalarias para controlarlas, por medio de una vigilancia que ejercita la recopilación de datos de una manera rutinaria y ordenada con base en normas establecidas.⁷¹ Tales infecciones no se presentarían si el enfermo no requiriese hospitalización o la aplicación de procedimientos invasivos en el hospital.^{83, 140} Cuando aislados bacterianos de la misma especie relacionados genética y epidemiológicamente aumentan su incidencia en un lugar determinado y durante un período dado, se dice que causan un brote.¹³¹ Para investigar las causas por las cuales el brote apareció, todo un equipo especializado de trabajadores al cuidado de la salud (médicos especialistas en control de infecciones, epidemiólogos hospitalarios, directores médicos y de enfermería, microbiólogos y farmacéuticos) se dedicarán a confirmar la presencia del brote, a identificar la fuente y forma de transmisión del microorganismo y a implementar medidas para su control.^{71, 84, 96, 131, 139}

La ayuda del laboratorio de microbiología juega un papel importante en la investigación de patógenos específicos. Recientemente se han desarrollado diversas técnicas moleculares para la genotipificación de patógenos bacterianos y la información que proveen tales técnicas permite el análisis de aislados relacionados epidemiológicamente que derivan de la expansión clonal de un solo precursor. Existen metodologías para la tipificación de microorganismos que han coadyuvado en la investigación de la epidemiología y el manejo de los pacientes. Entre ellas se encuentran las técnicas fenotípicas: biotipificación, susceptibilidad, serotipificación, bacteriófagos y bacteriocinas, inmunoensayos, perfiles proteínicos, etc., y genotípicas: análisis del perfil de plásmidos, análisis de restricción del ADN cromosomal utilizando enzimas específicas, hibridación

1. Introducción □

“Southern-blot”, ribotipificación, electroforesis en gel utilizando campo pulsado, reacción en cadena de la polimerasa, amplificación al azar del ADN polimórfico y secuenciación nucleotídica, entre otras.^{4, 31, 35, 68, 91, 102}

1.1.1 Infecciones Nosocomiales por Bacilos Gramnegativos en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Desde 1986, en el Departamento de Infectología del INCMNSZ se han hecho estudios sobre diversas bacterias grampositivas y gramnegativas aisladas de infecciones nosocomiales.^{29, 107, 120} Se encontró que *Serratia marcescens* fue causante de brotes en la unidad de terapia intensiva (UTI). La mortalidad asociada a bacteremias primarias por *S.marcescens* fue de 66 %; el biotipo A8b responsable del brote mostró un patrón de resistencia especial debido a la presencia de un plásmido específico.^{120, 136} En estudios más recientes sobre el análisis epidemiológico y microbiológico de la resistencia de algunos bacilos gramnegativos se encontró una alta resistencia a antibióticos de amplio espectro y a aminoglicósidos. El mismo estudio reveló que aún después de 4 años había predominio de un biogrupo particular de *S.marcescens*. Otras enterobacterias, como *Klebsiella pneumoniae* mostraron un patrón de resistencia elevado y el conjunto de bacilos gramnegativos provenientes de pacientes hospitalizados presentaron, en general, una mayor resistencia.³³

La preocupante emergencia de gérmenes multirresistentes en este Instituto ha llevado a realizar diversas investigaciones acerca de este fenómeno. Así, se ha reportado el control de la resistencia de bacilos gramnegativos a aminoglicósidos utilizando de manera exclusiva la amikacina (An). El porcentaje de resistencia para An, gentamicina (Gn) y tobramicina (Tb) en 870 cepas fue de 3.2%, 17.4% y 11.2% respectivamente, previo al uso exclusivo de An. Durante los 3 años siguientes con el consumo exclusivo de An se observó una disminución de los niveles de resistencia a Gn y Tb, mientras que el nivel de resistencia a An no se modificó.^{29, 107} Así mismo, se ha valorado la eficacia de otros antibióticos tales como piperacilina, ciprofloxacino y piperacilina/tazobactam para el control de

1. Introducción □

infecciones graves,^{47, 108, 118, 119} y el uso de cefepime contra ceftazidima para controlar infecciones por bacilos gramnegativos, especialmente *P.aeruginosa*.⁶⁰

En otro estudio acerca de la resistencia de microorganismos causantes de bacteremias en el período de 1995 a 1998, se encontró que las bacterias de la familia Enterobacteriaceae, las más frecuentemente aisladas de cultivos sanguíneos, mostraron en general aumento de la resistencia a diversos antibióticos.⁸

1.1.2 Programa de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales en el INCMNSZ.

Con el fin de controlar y disminuir las infecciones adquiridas en el Instituto, desde 1985 se ha establecido un programa de control de infecciones nosocomiales, encontrándose en sus inicios una tasa de infecciones intrahospitalarias de 18.9%. Los sitios susceptibles de infección más comunes fueron las vías urinarias, sangre, vías respiratorias inferiores y heridas postquirúrgicas; la tasa de mortalidad para los tres primeros sitios fue de 13%, 32% y 40%, respectivamente. Dentro de los gérmenes gramnegativos más comunes aislados tanto de vías urinarias como de sangre estuvieron *Escherichia coli*, *K.pneumoniae*, *Citrobacter* spp, *Serratia* spp y *P.aeruginosa*.⁹⁴ En estudios posteriores para valorar la eficacia del programa de control de infecciones se encontró en 1986 una disminución promedio de la tasa de infecciones hospitalarias de 1.3 para infecciones de vías urinarias y bacteremias, aunque para neumonías no hubo diferencia.⁹⁶ Para 1999 se reportó una tasa de infecciones de 8.6/100 egresos.⁹⁵ El área hospitalaria con la tasa más alta de infecciones fue la UTI (26.9/100 egresos) seguida por los cuartos compartidos (9.47) y cuartos privados (7.5); las infecciones del tracto urinario fueron las más frecuentes (26.6%) seguidas de las infecciones en heridas quirúrgicas (24.4%), neumonías (12.1%) y bacteremia (9.5%). Desde entonces, las tasas de infección para vías urinarias y bacteremia han disminuido significativamente; no obstante, en el caso de las neumonías y heridas quirúrgicas se ha observado un aumento. Así mismo, se ha valorado en el Instituto el impacto del sistema de vigilancia de infecciones

1. Introducción □

nosocomiales en la tasa de morbilidad y mortalidad en un período corto de un mes. La incidencia de infecciones nosocomiales fue de 10.48 casos/100 egresos. La tasa de mortalidad para infectados fue de 11.11%; los bacilos gramnegativos más comúnmente aislados fueron *E.coli* (38%) y *P.aeruginosa* (8.6%).¹⁰³

1.2 Microbiología de *P.aeruginosa*.

P.aeruginosa es un bacilo gramnegativo de la fila de las gamma-proteobacterias de la familia Pseudomonadaceae, capaz de utilizar gran variedad de compuestos orgánicos para crecer, por lo que puede colonizar distintos nichos, aún los que tienen escasos nutrientes. *P.aeruginosa* es una bacteria ubicua que se encuentra no sólo en suelos y aguas, sino que se encuentra en bajas cantidades en los alimentos y en algunos artículos de limpieza. Se sabe que *P.aeruginosa* es capaz de degradar alcanos de cadena ramificada debido a la producción de biosurfactantes que son compuestos tenso activos con propiedades detergentes. La naturaleza química de los biosurfactantes es variada, por ejemplo, se tienen a los péptidos polisacáridos y glicolípidos. Los biosurfactantes tienen un gran potencial biotecnológico ya que son tan efectivos o más que los sintetizados químicamente, además de ser totalmente biodegradables y no tóxicos. *P.aeruginosa* produce dos formas de biosurfactantes ramnolípidos, una contiene una molécula de ramnosa y la otra dos. Se piensa que la función del ramnolípido es solubilizar sustratos hidrofóbicos como el hexadecano, la utilidad de los ramnolípidos es la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos o con metales pesados; también se ha encontrado que tienen aplicación en el control biológico de hongos.

P.aeruginosa es una de las bacterias más estudiadas a nivel molecular y su genoma ha sido totalmente secuenciado, así mismo, se sabe que los genes que intervienen en la virulencia no están codificados en las llamadas "islas de patogenicidad", sino que se encuentran dispersos en el cromosoma. El genoma de *P.aeruginosa* con 6.3 Mb es grande en comparación con otros genomas bacterianos, además presenta una homología y un arreglo transcripcional en operones semejante a los de *E.coli*. Se ha encontrado que el 32% de los genes

1. Introducción □

predichos a partir de la secuenciación del genoma de esta bacteria no tienen homología con las secuencias almacenadas en las bases de datos, sugiriendo que se trata de genes que codifican para actividades enzimáticas desconocidas. Con respecto a su variabilidad genética se reporta que no existen clonas de *P.aeruginosa* asociadas a una enfermedad y que aislados clínicos y ambientales pueden ser los mismos. La alta frecuencia de recombinación entre distintas clonas en comparación con la tasa de mutación espontánea, mantiene una información genética común a toda la especie, mostrando así, un genoma altamente conservado y con una proporción mínima que es distinta en cada clona. *P.aeruginosa* también tienen material genético extracromosomal como son los plásmidos que a su vez tienen genes que expresan enzimas capaces de catabolizar hidrocarburos aromáticos y alifáticos, de igual forma, los plásmidos portan genes de resistencia a múltiples antibióticos lo que representa un serio problema en el tratamiento de infecciones por estos microorganismos.

P.aeruginosa también cuenta con múltiples sistemas regulatorios que le permiten modificar la expresión de distintos genes en *respuesta* de cambios en el medio ambiente. Este sistema regulatorio llamado *sensor de quorum* le confiere la habilidad de comunicarse y coordinar la conducta vía señales moleculares, por ejemplo, cuando *P.aeruginosa* alcanza una masa crítica de células, el sistema *sensor de quorum* lo detecta causando que cada célula produzca un compuesto difusible llamado autoinductor o feromona que son derivados acilados: lactonas N-acil-homoserina.⁴⁶ *P.aeruginosa* contiene más de un sistema *sensor de quorum* y produce múltiples autoinductores tales como Las, Rh1 y QscR, este último en particular tienen un papel negativo en la regulación de la respuesta *sensora de quorum*. Por otra parte, se sabe que Las-Rh1 participan directamente en la expresión de los genes que tienen que ver con la virulencia de *P.aeruginosa*. Se reporta también, que la respuesta *sensora de quorum* regula la expresión, ya sea por activación o por represión de cientos de genes. Se calcula que aproximadamente el 6% del genoma de esta bacteria se regula por este sistema. En análisis de mutantes afectados en la virulencia en distintos modelos, mostró

1. Introducción □

que algunas cepas de *P.aeruginosa* tienen la capacidad de infectar plantas, animales, invertebrados y mamíferos.

1.2.1 Factores de Virulencia.

P.aeruginosa puede presentar cepas no mucoides y en ocasiones mucoides, especialmente cuando éstas habitan los pulmones de los enfermos con fibrosis quística. Esto se debe a que tales aislados producen en mayor cantidad el polisacárido alginato. Se ha encontrado que los fenotipos mucoides de *P.aeruginosa* que habitan pulmones de este tipo de pacientes presentan una mutación en el gene que codifica para la proteína MucA.

Otro factor de virulencia en *P.aeruginosa* es el lipopolisacárido de membrana externa que se compone de un polímero de D-ramnosa y una estructura variable (denominadas banda A y B respectivamente) que determina el serotipo de las cepas. Aunque el alginato no es el material más abundantes, también forma parte de la matriz extracelular que envuelve a un conjunto de microcolonias de *P.aeruginosa* adheridas a una superficie, fenómeno denominado biopelícula. La capacidad de *P.aeruginosa* de formar biopelículas le confiere disminución de la sensibilidad a antibióticos y otros agentes tóxicos, incluyendo algunos elementos de la respuesta inmune. El sistema *sensor de quorum* tiene un papel central en la formación de biopelículas.

Con respecto a la motilidad de *P.aeruginosa*, ésta puede desplazarse nadando con su único flagelo polar, por un mecanismo llamado "twitching" que depende de las fimbrias o pili tipo IV que, determina además, la adhesión e invasión de la bacteria a las células epiteliales del huésped, de igual forma, *P.aeruginosa* presenta motilidad tipo "swarming" que se realiza en medios semisólidos. Los genes *motR* y *fleN* presentes también en *P.putida* regulan el número de flagelos y la velocidad de nado, mutantes de *motR* presentan múltiples flagelos y se desplazan a mayor velocidad que la cepa silvestre. Por su parte, es

1. Introducción □

posible que *fleN* regule el número de flagelos involucrados en la diferenciación celular, que ocurre cuando las bacterias se mueven por el mecanismo de “swarming”, el cual además, puede estar regulado por la respuesta sensora *de quorum* debido a que se presenta en ciertas densidades celulares.

En cuanto a la secreción de proteínas se han descrito cuatro vías de secreción en bacilos gramnegativos y tres de éstas están presentes en *P.aeruginosa*. Las proteínas exteriorizadas por el mecanismo de secreción tipo I pasan directamente al medio extracelular sin pasar por el espacio periplásmico. En *P.aeruginosa* la proteasa alcalina codificada por el gene *aprA* se secreta por esta vía. En la vía de secreción tipo II también conocida como vía de secreción general, se secretan la mayoría de las proteínas extracelulares en bacterias gramnegativas, específicamente en *P.aeruginosa*, una vez que las proteínas pasan al espacio periplásmico, se translocan por un conjunto de 12 a 14 proteínas denominadas Xcp; las proteínas transportadas por este sistema en *P.aeruginosa* son : elastasa, lipasa, exotoxina A, fosfolipasas y fosfatasa alcalina. De igual forma, el sistema *sensor de quorum* regula a los genes *xcp*. Por último, el sistema de secreción tipo III transloca las proteínas directamente de la bacteria a la célula eucariote. Este sistema se presenta en bacterias patógenas de animales y plantas.

En *P.aeruginosa* se secretan las exotoxinas S, T e Y, las dos primeras bloquean la transducción de señales de la célula infectada por su actividad ADP-ribosil-transferasa y la última eleva el AMP cíclico por su actividad adenilato ciclasa.

Considerando algunos aspectos evolutivos de *P.aeruginosa*, se sabe que presenta una estructura clonal superficial que participa frecuentemente en eventos de recombinación, de los que pueden surgir clonas que compiten favorablemente con otras desplazándolas, por tal motivo, *P.aeruginosa* no muestra una población clonal típica, no obstante, otras especies de *Pseudomonas* como *P.fluorescens* parece presentar una estructura clonal típica. Se ha concluido que *P.aeruginosa*

1. Introducción □

es una bacteria que coloniza exitosamente gran variedad de nichos y que mantiene una población con una secuencia genómica común mediante la recombinación.¹²⁴

1.3 *Pseudomonas aeruginosa* como Causante de Infecciones Nosocomiales en el INCMNSZ.

P.aeruginosa es un bacilo gramnegativo que causa infecciones oportunistas. Es uno de los patógenos nosocomiales más importantes^{11, 37, 43, 65, 142} debido a su capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos.^{54, 113} Además, como ya se refirió en 1.2, *P.aeruginosa* presenta diversos factores de virulencia tales como la producción de la exotoxina A, una de las más tóxicas y más estudiadas,^{25, 36, 39, 61, 62, 87, 93, 133} la hemolisina termoestable fosfolipasa C,^{9, 97} la producción de alginato relacionado especialmente a pacientes con fibrosis quística,^{10, 23, 24, 110, 117} la formación de biopelículas (glicocálices polisacáridos) que permiten el desarrollo de poblaciones sésiles y que además confieren resistencia a varios antibióticos,^{2, 28, 30, 127, 128} así como la modificación de proteínas de membrana externa (porinas) que causa también resistencia a los antibióticos.^{59, 145}

Los requerimientos nutricionales mínimos de *P.aeruginosa* le confieren la habilidad para sobrevivir en condiciones hostiles, la tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas como la temperatura y la alcalinidad, ha contribuido a su éxito biológico y a su efectividad como patógeno oportunista. Los reservorios hospitalarios que se ha demostrado contribuyen como factores críticos para la colonización de *P.aeruginosa* son: equipos respiratorios, soluciones de limpieza, medicinas, desinfectantes, torundas, alimentos de origen animal y vegetal y prácticamente cualquier superficie.^{50, 92, 142}

Ya se ha referido de manera general en 1.1.1 la importancia de los bacilos gramnegativos, incluyéndose a *P.aeruginosa*, como causantes de infecciones nosocomiales en el INCMNSZ. Las investigaciones hechas particularmente sobre las bacteremias causadas por *P.aeruginosa* de 1981 a 1994 refieren que de 153 pacientes que presentaron bacteremia por este germen, 18.9% de los episodios se

1. Introducción □

adquirieron en la comunidad, el 81% en el hospital y de éstos el 11.3% en la UTI, con un tiempo de hospitalización previo a la bacteremia nosocomial de 19 días (intervalo de 2 a 67). El origen más común de la bacteremia fue la vía biliar, seguida del tracto respiratorio y la vía urinaria. Los aislados de *P.aeruginosa* presentaron una resistencia promedio a los aminoglicósidos (An, Gn y Tb) de 34.8%.³² Estudios actuales reportan que tres brotes de colangitis/bacteremia por *Pseudomonas* spp estuvieron asociados a la contaminación del endoscopio. Además, posiblemente algunos brotes de neumonía estuvieron relacionados al mismo microorganismo, ya que en algunos de estos se documentaron los procesos endoscópicos como factor de riesgo; así mismo, la neumonía correspondió a casi la mitad de los brotes. Cerca de 60% de los aislados fueron *P.aeruginosa*; además, se observó que 75% de los brotes se presentaron en el segundo semestre del año, tratándose de explicar que siendo la mayoría de los brotes neumonías, éstas tienden naturalmente a presentarse en el segundo semestre en relación con el clima y el aumento de infecciones virales de vías respiratorias, o bien, debido a la relajación en la supervisión y normas de procedimientos que ocurre en los médicos residentes durante el año académico. Con este trabajo se demostró que los brotes, incluyendo los causados por *P.aeruginosa*, son un problema relevante en el Instituto y que es importante reforzar las medidas generales de control de infecciones en la UTI, ya que la mayoría de los brotes ocurrieron en esta área.⁸³

1.4 Técnica Molecular de la Amplificación al Azar del ADN Polimórfico (RAPD).

La técnica molecular de RAPD representa el método de huellas digitales del ADN más utilizado en organismos eucariotes, aunque hay gran variedad de reportes en los que el RAPD ha sido utilizado para genotipificar bacterias. El RAPD optimizado adecuadamente es altamente efectivo para valorar relaciones con altos niveles de resolución, no obstante, en contraste con los métodos polimorfismo en la longitud de los fragmentos restringidos (RFLP) y electroforesis en gel con campo pulsado (PFGE), el RAPD muestra baja reproducibilidad intra-

1. Introducción □

laboratorios. Con respecto a las consideraciones que deben tomarse en cuenta para la realización de los ensayos de RAPD, Ellsworth y cols.,²⁶ Venugopal y cols.,¹³⁴ refieren que es importante optimizar las proporciones del iniciador y del ADNbc, tal proporción también dependerá de la temperatura de alineación. Estos autores también refieren que la concentración de magnesio (Mg^{+2}) conjuntamente con la temperatura de alineación influyen la intensidad relativa de las bandas.

El RAPD se basa en la técnica de la PCR, usa iniciadores diseñados al azar de aproximadamente 10 pb.¹²² Durante la amplificación el iniciador podrá encontrar al azar diversas secuencias homólogas del genoma total de una bacteria (ADNbc), el iniciador se alinea con una orientación particular 5' \wedge 3' y 3' \wedge 5' en la parte superior e inferior de la cadena abierta de ADN en sentidos encontrados, lo que originará un producto de ADN bicatenario terminado el ciclo de amplificación. En caso de que los iniciadores se encuentren a gran distancia o se encuentren en sentidos opuestos, no se completará el proceso de amplificación.^{44, 45} Así mismo, el polimorfismo aumenta cuando la distancia entre los sitios de hibridación del iniciador cambia, o bien, cuando los sitios del iniciador aparecen o desaparecen o, la localización cambia debido a eventos de inserción, delección o recombinación. De igual forma, si el iniciador hibrida con un alto número de sitios opuestos a las cadenas del ADN, identificando un número significativo de amplicones, se generará un patrón complejo.¹²²

Para la realización de un ensayo de RAPD, el oligonucleótido de secuencia arbitraria se mezcla con el ADN genómico procarionta o eucariota en la presencia de una ADN polimerasa termoestable y de un amortiguador,¹⁴³ de concentraciones específicas de cloruro de magnesio, de una mezcla de dinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). La mezcla de tales reactivos es sometida a ciclos de temperatura, un ciclo se compone de una temperatura de desnaturalización comúnmente de 94°C, otra temperatura de alineación que para el caso del RAPD generalmente es de 36°C y una temperatura de polimerización de 72°C, determinados por tiempos específicos que van de segundos a minutos. El número de ciclos es aproximadamente de 35 a 40,^{85, 134, 143} tal proceso se lleva a cabo en un termociclador. Por último, el RAPD provee en forma sencilla la

1. Introducción □

generación de marcadores de ADN en gran variedad de especies de seres vivos y se ha utilizado exitosamente en estudios de genética molecular por muchos autores.^{3, 6, 14, 27, 35, 37, 77, 123, 130}

1.4.1 Otros Métodos de Tipificación Molecular.

Los métodos de tipificación molecular están categorizados en tres grandes grupos en base al tipo de macromoléculas blanco: métodos basados en lipopolisacáridos y ácidos grasos, métodos basados en proteínas y métodos basados en ácidos nucleicos; dentro de éstos últimos se cuenta con el análisis de plásmidos y ADN genómico por medio de endonucleasas, huellas digitales utilizando sondas de ADN y huellas digitales basadas en la reacción en cadena de la polimerasa PCR.

1.4.1.1 Análisis de Restricción del ADN Cromosomal. Este método compara el número y tamaño de fragmentos producidos por la digestión del ADN con una enzima de restricción, la cual corta el ADN en una posición constante de un sitio específico compuesto generalmente de 4 y 6 pb. Este método es altamente reproducible debido a la alta especificidad de las enzimas de restricción que digieren completamente al ADN dado. El tamaño de los fragmentos restringidos van de 20,000 a 1000 pb y pueden separarse por medio de electroforesis en gel de agarosa y visualizados con bromuro de etidio. Las variaciones en el arreglo de los fragmentos generados recibe el nombre de polimorfismo en la longitud de los fragmentos restringidos "RFLP" por sus siglas en inglés.¹²⁹

1.4.1.2 Análisis de Plásmidos. Es un método de gran poder para identificar brotes. Los plásmidos pueden codificar para factores de virulencia o portar genes de resistencia a los antimicrobianos. Existen técnicas rápidas y económicas para la extracción de ADN plasmídico y su separación, en base a su tamaño por medio de electroforesis en gel, lo que permite su uso ampliamente en investigaciones epidemiológicas. Los plásmidos de igual tamaño pueden diferenciarse utilizando enzimas de restricción, sólo así se podrá saber si la secuencia nucleotídica de los plásmidos es la misma o no. No obstante, la técnica de perfil de plásmidos

1. Introducción □

no es universalmente aplicable, muchas especies bacterianas no almacenan plásmidos o lo hacen muy poco, además, debido a que existe escasa heterogeneidad en sus secuencias nucleotídicas, es menos usada para técnicas de Subtipificación.¹²⁹

1.4.1.3 Técnicas de Hibridación. Esta técnica se ha desarrollado con el fin de simplificar el análisis del ADN por RFLP disminuyendo el número de fragmentos a comparar, en la técnica los fragmentos de restricción son comparados con una o más sondas de ADN marcado. Los fragmentos de restricción son transferidos a membranas de “nylon” o nitrocelulosa por Southern-blott e hibridados con la(s) sonda(s) marcada(s). Únicamente los fragmentos de restricción que hibridan con la sonda son visibles, lo que simplifica considerablemente el patrón de huellas digitales. Las sondas para subtipificar derivan de genes que codifican para factores de virulencia, secuencias de inserción, ADN bacteriófago, fragmentos de ADN genómico clonado al azar y ARNr 16S más 23S.¹²⁹

1.4.1.4 Análisis del ADN Ribosomal por RFLP (Ribotipificación). La ribotipificación involucra las huellas digitales de los fragmentos de restricción del ADN genómico que tiene todos o parte de los genes que codifican para el ARNr 16S y 23S. Debido a que los genes codifican para el ARNr son altamente conservados, una sola sonda puede utilizarse para subtipificar a todas las eubacterias, así mismo, la mayoría de las bacterias contienen múltiples operones ribosomales por lo que un número considerable de fragmentos es obtenido por análisis de discriminación inter- e intraespecies. Métodos estándares para el aislamiento del ADN, restricción, electroforesis y transferencia a membranas son utilizados para realizar la técnica de ribotipificación, al final el ADN transferido es hibridado con el ARNr marcado con ³²P o algún otro marcador no radiactivo para obtener el polimorfismo correspondiente a la especie bacteriana.¹²⁹

1.4.1.5 Electroforesis en Gel con Campo Pulsado (PFGE). En este método se generan patrones simplificados de los fragmentos de restricción sin tener que recurrir a métodos de hibridación. Las enzimas de restricción

1. Introducción □

utilizadas para cortar el ADN en forma infrecuente, originan grandes fragmentos del ADN cromosomal, el cual es separado posteriormente por un procedimiento de electroforesis especial. Fragmentos de ADN mayores a los 40 Kb, no son resueltos eficientemente por la electroforesis en gel de agarosa convencional. Así los fragmentos del ADN pueden resolverse alterando en forma cíclica la orientación del campo eléctrico durante la electroforesis.

Existen varias técnicas de campo pulsado, la técnica más simple es la electroforesis en gel con inversión de campo, un sistema en el cual se utiliza la inversión periódica de un campo eléctrico, uniforme en ambas direcciones, hacia adelante o reversa, siendo ligeramente mayor el pulso hacia adelante. La separación de grandes moléculas de ADN se ve afectada por la concentración de la agarosa, del amortiguador, de la temperatura, tiempo del pulso, voltaje y, el tiempo total de corrimiento de la electroforesis.¹²⁹

1.4.1.6 Subtipificación Basada en la PCR. Los métodos de tipificación basados en la PCR se clasifican en dos tipos: el primer tipo (PCR-RFLP) involucra la amplificación de una secuencia, la secuencia es cortada con enzimas de restricción y los fragmentos restringidos del ADN amplificado de distintas cepas, son comparados. El segundo tipo involucra segmentos amplificados al azar utilizando un solo iniciador que no tiene homología con la secuencia blanco, sino que son diseñadas al azar, tal es el caso del método de amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) ya mencionado.^{89, 129}

1.4.1.6.1 Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP). Este método es una modificación del RAPD, en el cual los fragmentos amplificados se seleccionan para su posterior amplificación. El ADN se digiere con la enzima de restricción y los fragmentos cortados al azar son elegidos utilizando una secuencia de bases específica 3' terminal de los iniciadores. Las condiciones de la PCR son

1. Introducción □

más severas que las del RAPD lo que aumenta la confiabilidad del método. El patrón de huellas digitales obtenido es complejo.^{89, 122}

1.4.1.6.2 Número Variable de Elementos Repetidos en Serie (VNTRs) o Microsatélites. Son elementos muy cortos repetidos en serie que se encuentran en los genomas de procariotas y eucariotas. El método de huellas digitales VNTR se basa en la PCR. La amplificación de los VNTRs específicos, se realiza utilizando iniciadores dirigidos a las regiones externas que flanquean los elementos.^{89, 122}

1.4.1.6.3 Secuenciación del ADN. La secuenciación provee los datos más exactos para valorar la divergencia y las relaciones entre las especies, su mayor impacto se ha dado en la producción de árboles filogenéticos a nivel interespecies. Cambios en una sola secuencia proveen suficiente profundidad para interpretar la filogenia y la historia evolutiva de las especies. Para obtener tal información, loci múltiples se deben secuenciados y los datos almacenados. Actualmente la secuenciación es una técnica más rápida y menos cara.^{89, 122}

2. Justificación, Objetivo General e Hipótesis □

2. JUSTIFICACION

Debido a la persistencia de brotes causados por *P.aeruginosa* principalmente durante los años de 1991 a 1995 en la UTI y otras áreas hospitalarias del INCMNSZ, a la presencia de cepas altamente resistentes, en particular a los aminoglicósidos, y a la posibilidad de que algunas variedades puedan presentar un comportamiento biológico especial y sean prevalentes en cierto tipo de muestras clínicas, es importante estudiar y caracterizar por medio de la tipificación molecular a la población clínica de *P.aeruginosa* para comprender su epidemiología, conducta biológica y evolución a través del tiempo y así establecer estrategias que impidan la emergencia y selección de cepas de *P.aeruginosa* más agresivas e impedir, a la vez, su diseminación en otras unidades hospitalarias.

2. Justificación, Objetivo General e Hipótesis □

3. HIPOTESIS

Ya que *P.aeruginosa* ocupa un lugar relevante como germen nosocomial y causa continuos brotes, especialmente en la UTI, es muy probable que algunas cepas aisladas de distintas muestras clínicas estén relacionadas entre sí y tengan un genotipo y un fenotipo de resistencia semejante, si no es que único.

4. OBJETIVO GENERAL

Definir mediante el método de la amplificación al azar del ADN polimórfico, si los aislados nosocomiales de *P.aeruginosa* resistentes a aminoglicósidos (An, Gn y Tb) aislados en el intervalo de 1991 a 1995 en el INCMNSZ, están relacionados a la misma cepa.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

4.1.1 Detectar los brotes de *P.aeruginosa*, su distribución y prevalencia en muestras clínicas a lo largo de los cinco años estudiados, analizando la base de datos del Laboratorio de Microbiología Clínica del Departamento de Infectología.

4.1.2 Optimizar la técnica molecular de la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) para ensayarse sobre una muestra de los aislados clínicos de *P.aeruginosa*.

4.1.3 Correlacionar el patrón molecular obtenido de los aislados de *P.aeruginosa* con su perfil de resistencia a los aminoglicósidos, la distribución de los brotes a través del tiempo y la prevalencia en muestras clínicas.

5. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio retrospectivo, transversal, aleatorio, experimental y ciego para investigar y conocer la epidemiología y conducta biológica de *P.aeruginosa* aisladas de diferentes muestras clínicas de 1991 a 1995, período con mayor incidencia de brotes bacterianos reconocidos en el INCMNSZ, ⁸⁴ y conservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del Departamento de Infectología.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Análisis Retrospectivo.

6.1.1 Bases de Datos. Los datos de las muestras clínicas (fecha de la toma, perfil de resistencia a 19 antibióticos y tipo de muestra clínica) de las cuales se les aisló *P.aeruginosa*, provenientes del mismo o diferente paciente, contenidos en la base de datos del Laboratorio de Microbiología Clínica del Departamento de Infectología de 1991-1995 se capturaron en nuevas bases, categorizando el número de aislados según el patrón de resistencia a aminoglicósidos (A), el origen de la muestra clínica (T) y el mes (M) y año (Ñ) en el que ese aislado se recuperó. Los aislados de un mismo paciente colectados en un lapso de 3 meses se excluyeron del estudio retrospectivo. No obstante, en el caso de los aislados conservados en el cepario del Departamento de Infectología no se aplicó el mismo criterio ya que se seleccionaron totalmente al azar sin tomar en cuenta si la cepa de *P.aeruginosa* se había aislado en forma única o repetida, en períodos cortos o largos de tiempo, y si pertenecía al mismo o a diferente paciente (ver 6.2.1).

6.1.2 Diseño Experimental. Para analizar estadísticamente los datos organizados, se realizaron distintos diseños experimentales del análisis de variancia a partir del cual se calculó la prueba F (George W. Snedecor). Las variables mencionadas se analizaron por un ANOVA* simple para probar la igualdad de medias. Debido a que se encontró desigualdad se aplicó un diseño en bloques para maximizar las diferencias, un diseño factorial con el fin de determinar dependencia o interacción entre las muestras clínicas según el fenotipo de resistencia a aminoglicósidos (Figs. 1 y 2) y, por último, un diseño trifactorial de "Split-split plot"^{20, 56} para aumentar la precisión en la detección de brotes y la predominancia de fenotipos de resistencia conforme a las estaciones del año (Figs. 3 y 4). Para aquellos resultados en los cuales la F calculada (Fc), al compararla con la F de tablas (Ft), fue significativa, se aplicó el método de comparación múltiple de medias de Duncan para establecer las jerarquías entre las categorías analizadas. Cada diseño fue comparado uno con otro calculando el error relativo cuyo coeficiente permite elegir el mejor diseño; así mismo, se determinó la homogeneidad de la variancia para proceder a los cálculos de las F. Los datos fueron procesados en el programa SPSS for Windows V 10.01 Copyright © SPSS Inc. 1989-1999.

* ANOVA: acrónimo de "Analysis of Variance".

6. Materiales y Métodos □

Figura 1. Características del Diseño Factorial de Tercer Orden para Muestras Clínicas con Relevancia en Muestras Provenientes de Vías Urinarias, Vías Respiratorias y Cultivos de Sangre.

A		T		Ñ
FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS		TIPOS DE MUESTRAS CLINICAS		AÑOS DE ESTUDIO
$(A_1, \dots, A_8)^a$	VS	$(T_1, \dots, T_4)^b$	VS	$(\tilde{N}_1, \dots, \tilde{N}_5)^c$

^a Aislados de *P.aeruginosa* resistentes a un solo aminoglicósido: A₁, **PaeAn**; A₂, **PaeGn**; A₃, **PaeTb**. Resistentes a dos aminoglicósidos: A₄, **PaeAnGn**; A₅, **PaeAnTb**; A₆, **PaeGnTb**. Resistentes a los 3 aminoglicósidos A₇, **PaeM** y sensibles A₈, **PaeS**.

^b T₁, urocultivos (**URO**); T₂, vías respiratorias (**VR**); T₃, hemocultivos (**H**) y T₄, otras muestras clínicas (**O**).

^c Ñ₁, 1991; Ñ₂, 1992; Ñ₃, 1993; Ñ₄, 1994 y Ñ₅, 1995.

Figura 2. Características del Diseño Factorial de Tercer Orden Disertando Otras Muestras Clínicas (O).

A		T		Ñ
FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS		TIPOS DE MUESTRAS CLINICAS		AÑOS DE ESTUDIO
(A_1, \dots, A_8)	VS	$(T_1, \dots, T_{18})^a$	VS	$(\tilde{N}_1, \dots, \tilde{N}_5)$

^a T₁, absceso (**ABS**); T₂, biopsia (**Bx**); T₃, catéter (**CTR**); T₄, exudado uretral (**ExU**); T₅, exudado vaginal (**ExV**); T₆, secreción de herida (**Sx**); T₇, líquido de ascitis (**LA**); T₈, líquido cefalorraquídeo (**LCR**); T₉, líquido de diálisis (**LD**); T₁₀, líquido sinovial (**LS**); T₁₁, líquido pleural (**LP**); T₁₂, líquido biliar (**LB**); T₁₃, líquido duodenal (**LU**); T₁₄, secreción ótica (**OTT**); T₁₅, otras muestras (**O**); T₁₆, urocultivos (**URO**); T₁₇, vías respiratorias (**VR**); T₁₈, hemocultivos (**H**).

6. Materiales y Métodos

Figura 3. Características de un Diseño “Split-split plot” para la Detección de Brotes.

<p style="text-align: center;">T1 GRUPOS DE MUESTRAS CLINICAS (T_1, \dots, T_4)</p>	<p style="text-align: center;">T2 FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS (A_1, \dots, A_8)</p>
<p style="text-align: center;">T3 FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS VS AÑOS DE ESTUDIO (A_1, \dots, A_8)($\tilde{N}_1, \dots, \tilde{N}_5$)</p>	<p style="text-align: center;">T4 FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS VS AÑOS DE ESTUDIO VS MESES DEL AÑO (A_1, \dots, A_8)($\tilde{N}_1, \dots, \tilde{N}_5$)($M_1, \dots, M_{12}$)^a</p>

La parcela principal son los datos de los fenotipos de resistencia a aminoglicósidos (A_1, \dots, A_8) encontrados al azar en los cuatro grupos (bloques) de muestras clínicas (T_1, \dots, T_4). Las subparcelas incluyen el intervalo de años estudiados ($\tilde{N}_1, \dots, \tilde{N}_5$). Las sub-subparcelas son los datos de incidencia de A por meses del año (M_1, \dots, M_{12}).

^a M_1 , ENE; M_2 , FEB; M_3 , MAR; M_4 , ABR; M_5 , MAY; M_6 , JUN; M_7 , JUL; M_8 , AGO; M_9 , SEP; M_{10} , OCT; M_{11} , NOV; M_{12} , DIC.

6. Materiales y Métodos □

Figura 4. Características de un Diseño “Split-split plot” para Determinar la Conducta Estacional de los Fenotipos de Resistencia a Aminoglicósidos.

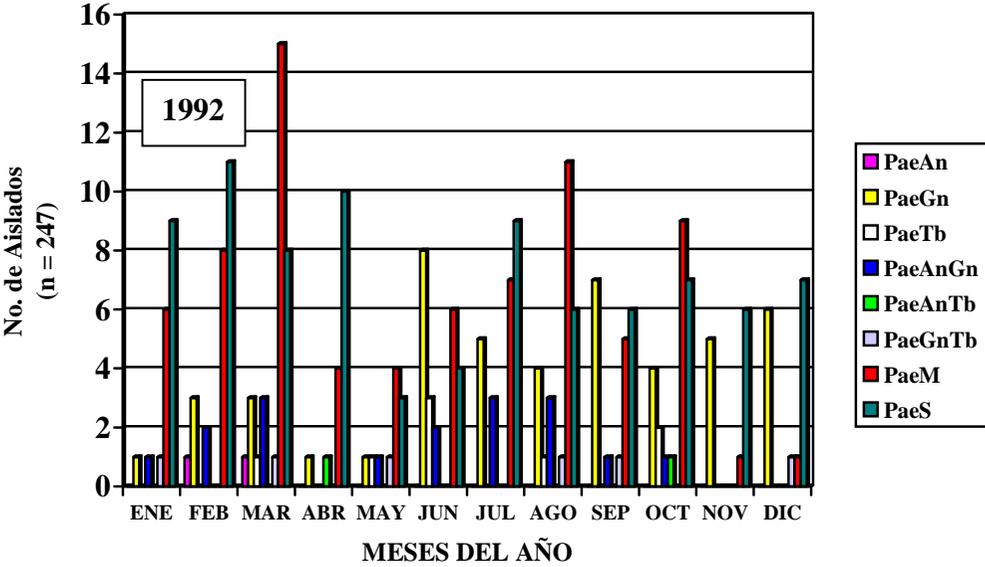
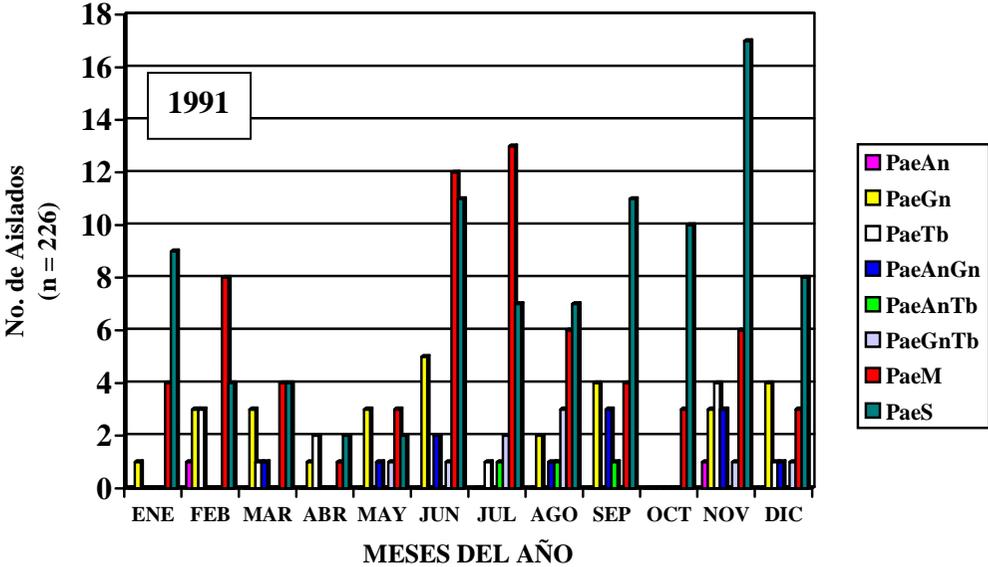
<p style="text-align: center;">T1 GRUPOS DE MUESTRAS CLINICAS (T_1, \dots, T_4)</p>	<p style="text-align: center;">T2 FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS (A_1, \dots, A_8)</p>
<p style="text-align: center;">T3 FENOTIOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS VS AÑOS DE ESTUDIO (A_1, \dots, A_8)($\tilde{N}_1, \dots, \tilde{N}_5$)</p>	<p style="text-align: center;">T4 FENOTIPOS DE RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS VS AÑOS DE ESTUDIO VS ESTACIONES DEL AÑO (A_1, \dots, A_8)($\tilde{N}_1, \dots, \tilde{N}_5$)($E_1, \dots, E_4$)^a</p>

La parcela principal son los datos de los fenotipos de resistencia a aminoglicósidos (A_1, \dots, A_8) encontrados al azar en los cuatro grupos (bloques) de muestras clínicas (T_1, \dots, T_4). Las subparcelas incluyen el intervalo de años estudiados ($\tilde{N}_1, \dots, \tilde{N}_5$). Las sub-subparcelas incluyen la distribución de los fenotipos de resistencia por estaciones del año (E_1, \dots, E_4).

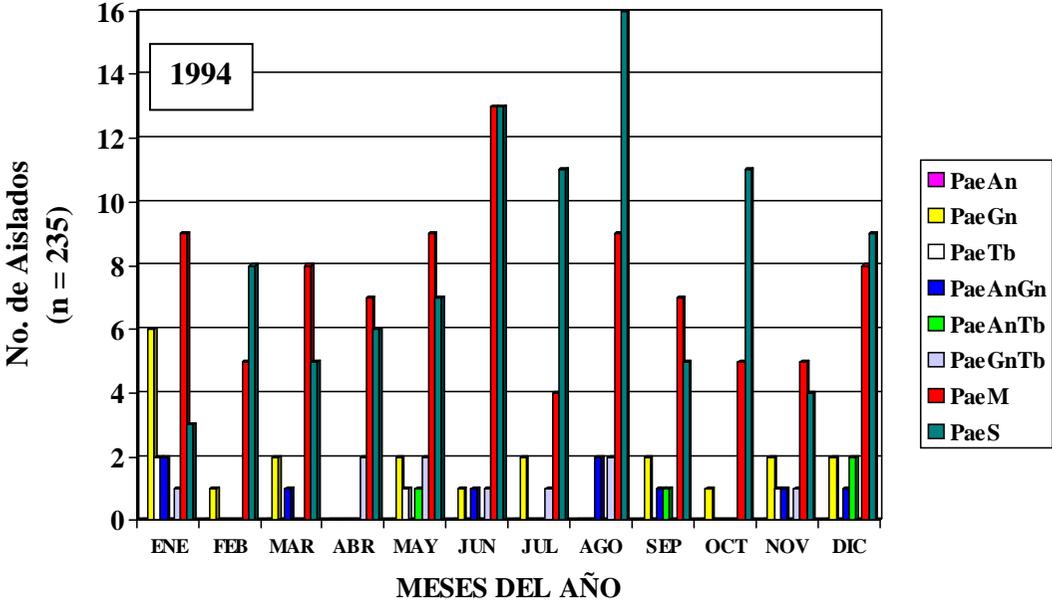
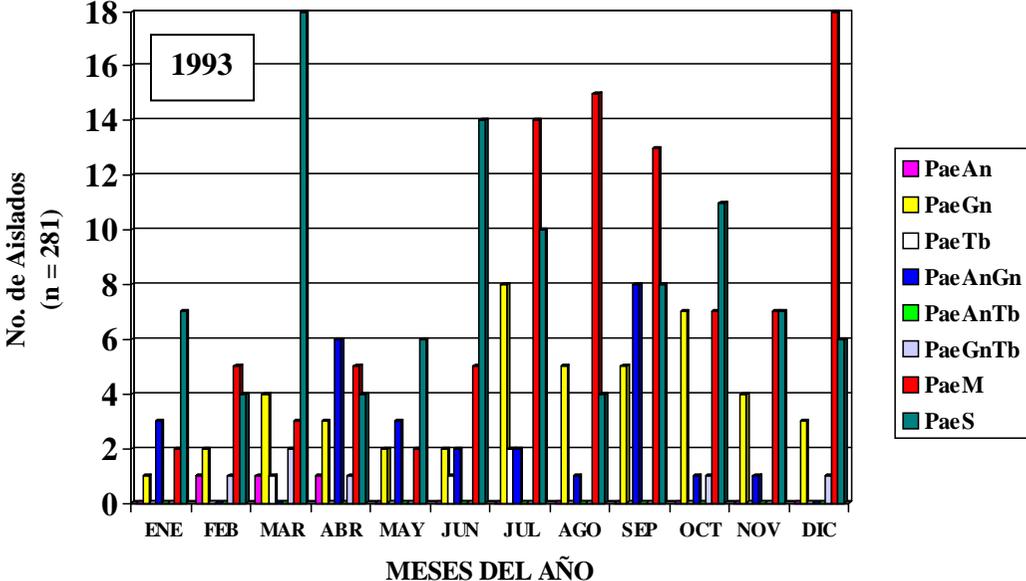
^a E_1 , INVIERNO; E_2 , PRIMAVERA; E_3 , VERANO; E_4 , OTOÑO.

6. Materiales y Métodos □

6.1.3 Histogramas de Frecuencia. A partir de las medias de los contrastes se elaboraron los histogramas de frecuencia para los aislados de *P.aeruginosa* sensibles y resistentes a uno o más aminoglicósidos por mes según el año (Figs. 5-9) y global (Fig. 10); prevalencia de los fenotipos de resistencia por tipo de muestra clínica (Figs. 11-13) y las gráficas de distribución estacional para los aislados de PaeM y PaeS (Figs. 14 y 15).



Figs. 5 y 6. Frecuencia de Fenotipos de Resistencia a Aminoglicósidos de *P.aeruginosa* durante los años de 1991 y 1992.



Figs. 7 y 8. Frecuencia de Fenotipos de Resistencia a Aminoglicósidos de *P.aeruginosa* durante los años de 1993 y 1994.

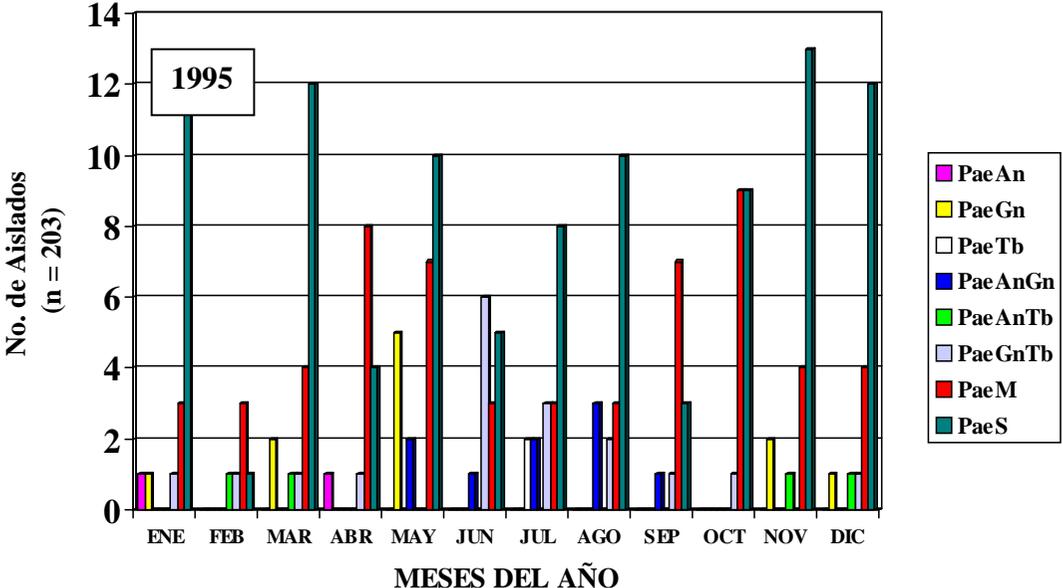
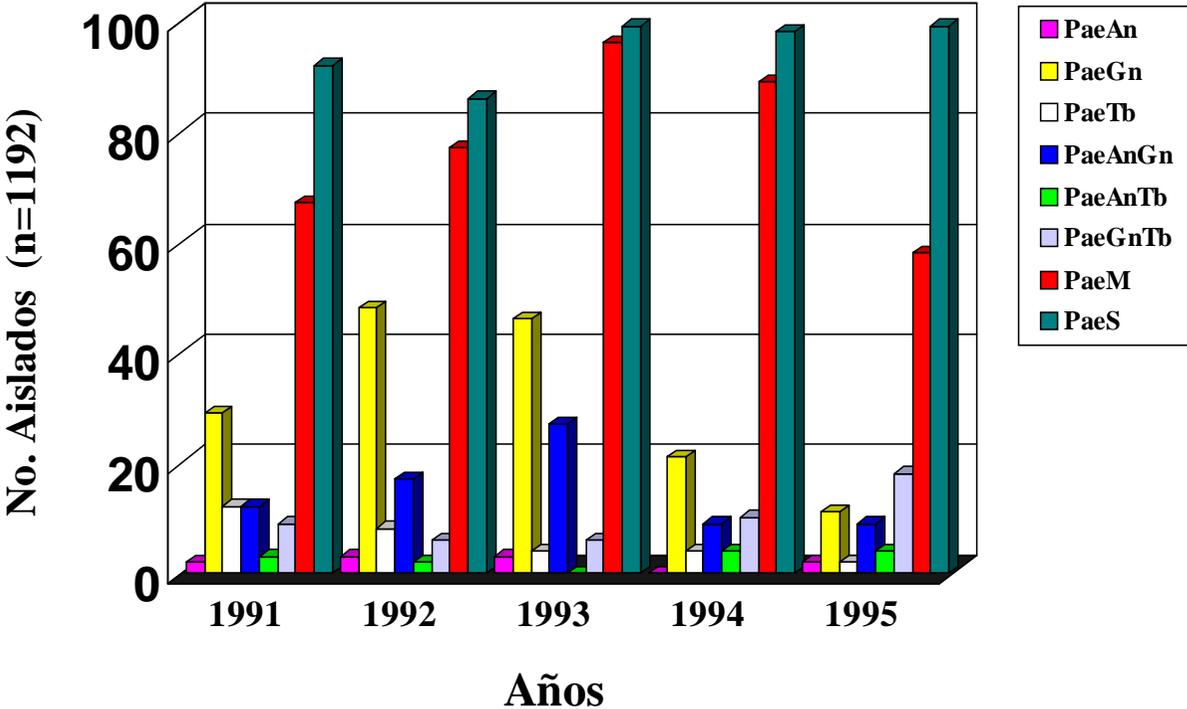
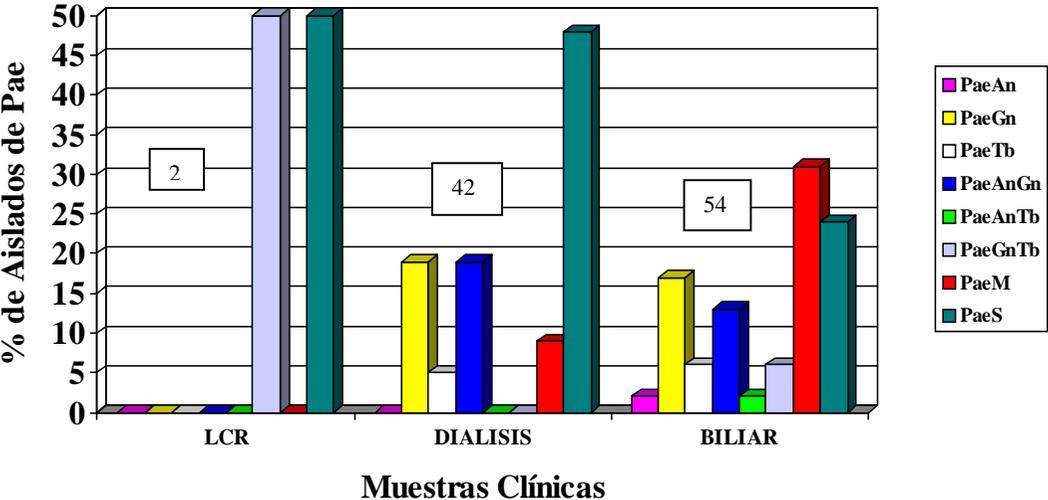
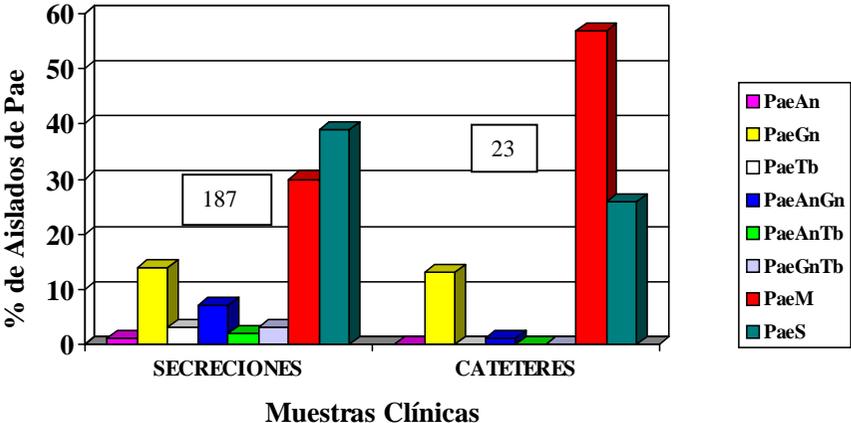
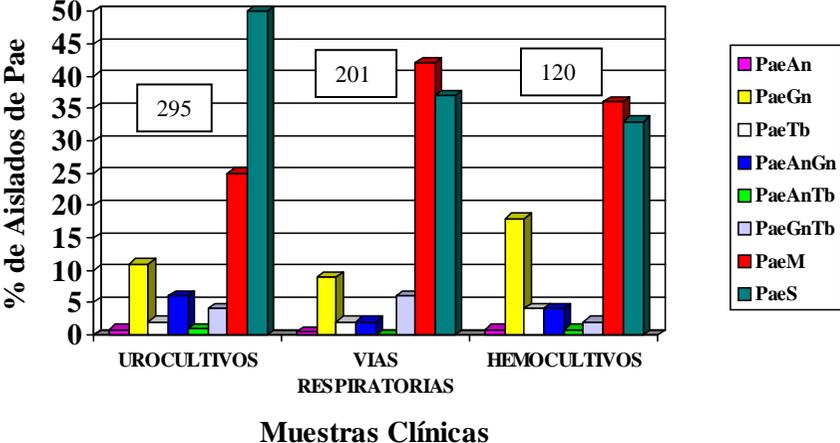


Fig. 9. Frecuencia de Fenotipos de Resistencia a Aminoglicósidos de *P.aeruginosa* durante el año de 1995.

Fig. 10. Frecuencia Global de Fenotipos de Resistencia a Aminoglicósidos de *P.aeruginosa* de 1991 a 1995.



6. Materiales y Métodos □



Figs. 11, 12 y 13. Prevalencia de Fenotipos de Resistencia a Aminoglicósidos de *P.aeruginosa* en Muestras Clínicas Incluyendo Líquidos Corporales de 1991 a 1995.

□ , número de *P.aeruginosa* aisladas en ese tipo de muestra.

Fig. 14. Distribución Estacional de Aislados de *Pseudomonas aeruginosa* Sensibles a los Aminoglicósidos (PaeS) DE ENERO DE 1991 A DICIEMBRE DE 1995.

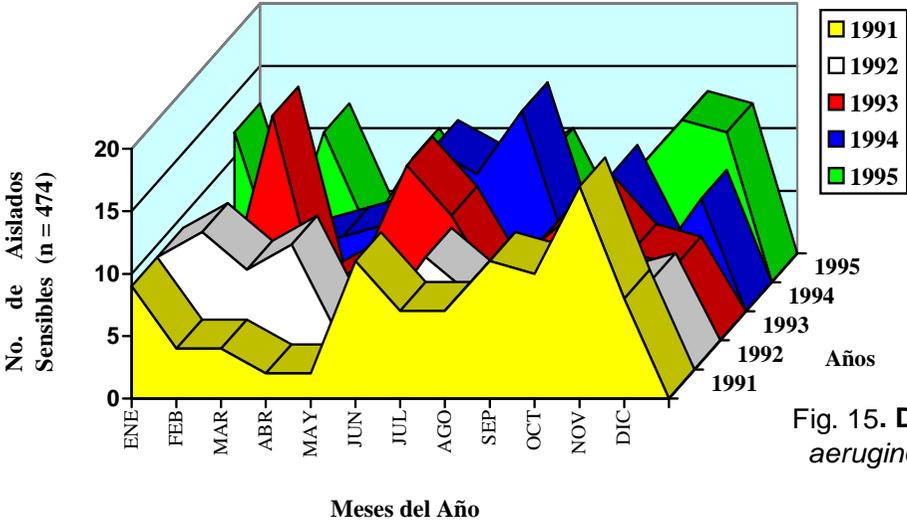
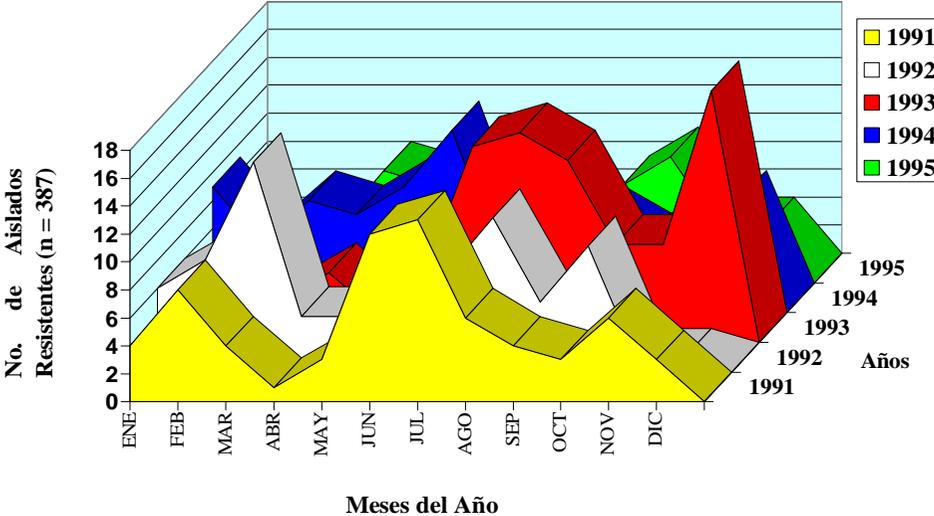


Fig. 15. Distribución Estacional de Aislados de *Pseudomonas aeruginosa* Multirresistentes a los Aminoglicósidos (PaeM) DE ENERO DE 1991 A DICIEMBRE DE 1995.



6.2 Estudio Microbiológico.

6.2.1 Método de Selección. Se incluyeron 202 aislados de *P.aeruginosa* viables del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica de 1992 a 1995 para ser analizados por RAPD. Los aislados se seleccionaron al azar utilizando una tabla de números aleatorios. El método de selección en ciego eligió uno o varios aislados de un mismo paciente.

6.2.2 Identificación y Susceptibilidad Microbiana. Previamente los microorganismos del cepario se identificaron y se les realizaron pruebas de susceptibilidad utilizando los métodos comerciales API 20E (bioMérieux VITEK, Inc., Missouri 63042, USA) y MicroScan (Baxter Diagnostics Inc., CA 95691, USA). Los resultados categóricos (R=resistente, I=intermedio y S=sensible) para un total de 19 antibióticos: trimetoprim/sulfametoxazol, nitrofurantoina, norfloxacino, ciprofloxacino, ampicilina, ticarcilina, cefalotina, cefazolina, ceftazidima, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, amikacina, gentamicina, tobramicina, piperacilina, cloranfenicol, tetraciclina e imipenem, se transcribieron a un código de 7 dígitos con base en el sistema numérico octal ⁶⁶ para correlacionarlo posteriormente con los patrones polimórficos de RAPD de los 202 aislados (Fig. 16).

6.2.3 Descongelamiento y Reanimación de los Aislados. Una alícuota tomada de los viales descongelados se incluyó en 2 mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) y se incubó a 37°C por 24 hr. De estos cultivos se inocularon placas de agar-sangre de carnero haciendo resiembras periódicas durante 3 días consecutivos e incubadas en las mismas condiciones. Se corroboró que la cepa fuera *P.aeruginosa* aplicando las pruebas presuntivas de oxidasa, desarrollo a 42°C y producción de pigmento.

Fig. 16. Obtención de los Códigos de Susceptibilidad a 19 Antibióticos.

SXT	F/M	NOR	CIP	AM	TIC	PIP	CF	CZ	FOX	CXM	CTX	CAZ	AN	GM	TB	C	TE	IPM ^a
R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S ^b
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0 ^c
1	1 2 4			1 2 4			1 2 4			1 2 4			1 2 4			1 2 4 ^d		
1	7			3			7			7			7			1 ^e		

^a Posición y siglas de los antibióticos: SXT, Trimetoprim-sulfametoxazol; F/M, Nitrofurantoina; NOR, Norfloxacin; CIP, Ciprofloxacino; AM, Ampicilina; TIC, Ticarcilina; CF, Cefalotina; CZ, Cefazolina; FOX, Cefoxitina; CXM, Cefuroxima; CTX, Cefotaxima, CAZ, Ceftazidima; AN, Amikacina; GM, Gentamicina; TB, Tobramicina; C, Cloranfenicol; Te, Tetraciclina e IPM, Imipenem.

^b S, sensible; I, intermedio; R, resistente.

^c Código binario (1,0)

^d Código octal (valor asignado dependiendo del valor del código binario “presencia/ausencia”, “resistente/sensible”, etc).

^e Código de siete dígitos (cada dígito es la suma de los valores del código octal que dependen a su vez del valor del código binario).

6. Materiales y Métodos □

6.3 Ensayos Moleculares.

6.3.1 Extracción del ADN Genómico de *P.aeruginosa*. El desarrollo bacteriano contenido en un cuarto de la placa de agar sangre de carnero se suspendió en tubos Falcon con 300 μ L de agua ultrapura 18.2 m Ω , se agregaron 600 μ L de tiocianato de guanidina 5M/Tris-EDTA 10 mM más sarcosil 0.5% v/v. Después de 30 min, la solución de lisis fue dispensada en dos tubos Eppendorf de 1.5 mL, a los cuales se agregaron 300 μ L de acetato de amonio 7.5 M y se incubaron en hielo por 10 min. Los restos celulares se eliminaron con cuatro lavados de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y tres más con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) para depurar el fenol. El ADN se precipitó añadiendo dos volúmenes y medio de etanol absoluto frío con base en el volumen de la muestra. Después de dos lavados con etanol al 70% el botón de ADN se resuspendió en agua ultrapura y se almacenó a 4°C. La concentración de ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, comparando con concentraciones conocidas de ADN del fago λ (0.5 μ g/1.5 μ L) (Pitcher, Bruce & Jordan's). En los cinco carriles iniciales se distribuyeron las siguientes concentraciones del marcador: 5, 10, 25, 50 y 125 ng/ μ L ó 10, 25, 50, 125 y 250 ng/ μ L (Fig.17). Los ADN genómicos se diluyeron en agua ultrapura para obtener la concentración final deseada: 12.5 ng/ μ L para los ensayos de optimización y de 1.5 ng/ μ L para los ensayos con los 202 aislados.

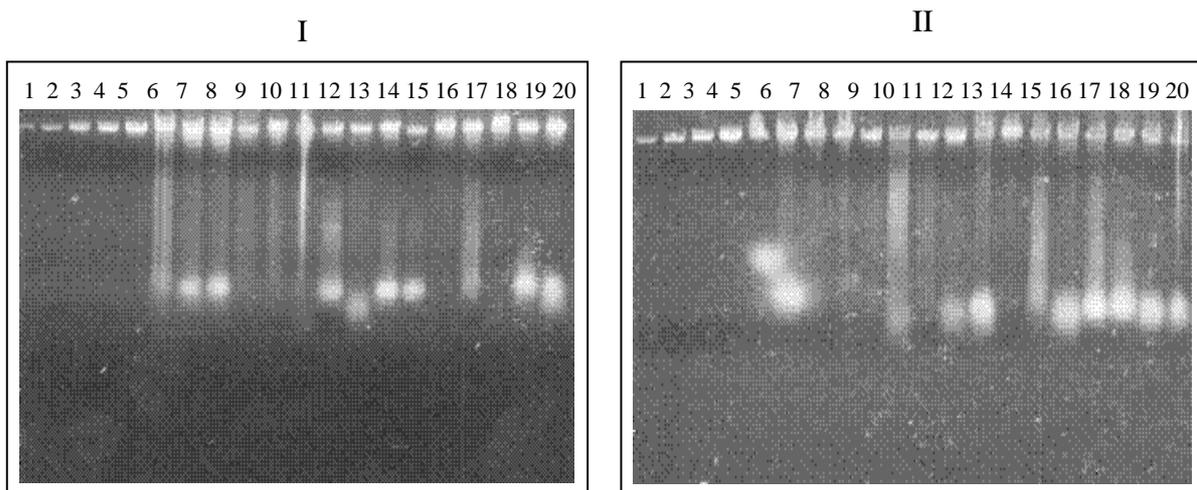


Fig. 17. Ejemplo de dos gels que muestran la electroforesis en agarosa al 1% con TBE 0.5X del ADN total de distintos aislados clínicos de *P.aeruginosa*. I. Carriles 1 a 5, ADN $\phi\lambda$ 5, 10, 25, 50, 125 ng/ μ L respectivamente; carriles 6 a 20 aislados, 16C, 37C, 41C, 45Ci, 45Cr, 46C, 2D, 21D, 34D, 41D, 32D, 48D, 1F, 15F y 16F. II. Carriles 1 a 5, ADN $\phi\lambda$ 10, 25, 50, 125 y 250 ng/ μ L respectivamente; carriles 6 a 20 aislados, 1E, 3E, 4E, 5E, 73, 8E, 9E, 10E, 11E, 12E, 17E, 18E, 19E, 20E y 21E.

6. Materiales y Métodos □

6.3.2 Selección del Iniciador. Seis oligonucleótidos de secuencia corta (de 10 nucleótidos cada uno) y arbitraria fueron probados: HLWL74, 5'-ACGTATCTGC-3' y HLWL85, 5'-ACAACTGCTC-3'⁷⁰; R2, 5'-AGTACAGGTC-3'^{27, 34}; 1283, 5'-GCGATCCCCA-3'; 1247, 5'-AAGAGCCCGT-3'^{1, 137} y WIL2, 5'-TCACGATGCA-3'¹⁴³. Los iniciadores HLWL74 y WIL2 se ensayaron con 5 aislados clínicos de *P.aeruginosa* seleccionados al azar (Fig. 18). De este ensayo se seleccionó la cepa 257, con mayor número de bandas, la cual se ensayó con el resto de los iniciadores HLWL85, R2, 1283 y 1247 (Fig. 19), en un volumen de reacción (V_{RC}) de 10 μ L, amortiguador con Mg 1X, 100 μ M de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 0.5 mM de $MgCl_2$, 15 pM del oligonucleótido, 1U de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (ADNpol-*Taq*) y 2 ng del ADN blanco (ADNbc). La reacción fue sellada con 20 μ L de aceite mineral y amplificada a 92°C/10", 36 °C/30" y 72 °C/1' (Yu & Pauls) en un termociclador GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, Foster City, CA). Los productos se corrieron en gel de agarosa al 1.5% en TAE1X a 60 V/2 hr. El ADN del fago λ cortado con *Pst*I se utilizó como marcador del peso molecular.

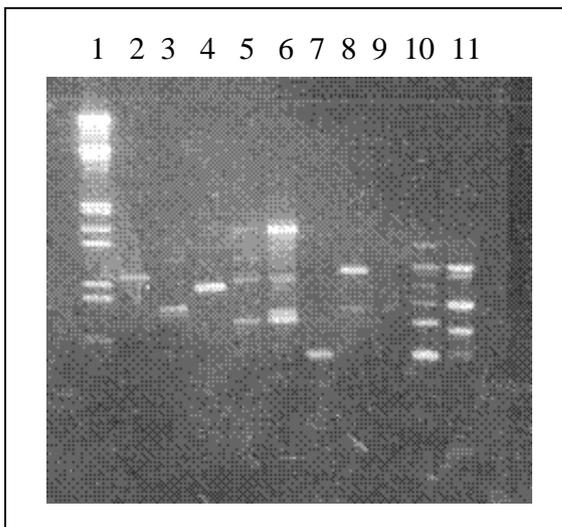


Fig. 18. Amplificación del ADN de *P.aeruginosa* con dos iniciadores. Carriles 2 a 6, cepas 251, 312, 263, 257 y 297 con HLWL74, 5'-ACGTATCTGC. Carriles 7 a 11 mismo orden de cepas con WIL2, 5'-TCACGATGCA. Carril 1: marcador del peso molecular, ADN $\phi\lambda Pst$ I. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Fotografía utilizando transiluminador de luz UV.

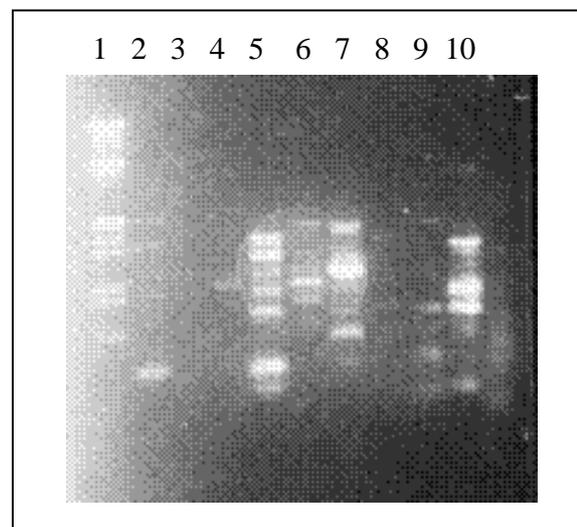


Fig. 19. Amplificación del ADN de *P.aeruginosa* con cinco iniciadores: a) 1247, 5'-AAGAGCCCGT; b) R2, 5'-AGTACAGGTC; c) HLWL85, 5'-ACCACTGCTC y d) 1283, 5'-GCGATCCCCA. Carril 1: marcador del peso molecular, ADN $\phi\lambda Pst$ I. Sigüientes carriles (no. de cepa e iniciador): 2, 257a; 3, 257b; 4, 257c; 5, 257d; 6, 231a; 7, 231d; 8, 231b; 9, 263d y 10, 297d. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Fotografía utilizando transiluminador de luz ultravioleta.

6. Materiales y Métodos □

6.3.3 Optimización del RAPD. Las condiciones óptimas de amplificación para el RAPD se determinaron manteniendo uno de los parámetros a probar y haciendo variaciones de los demás parámetros: V_{RC} : 10, 25 y 50 μL ; DNTPs, 100 y 200 μM ; MgCl_2 : 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 y 5.0 mM; iniciador 1283: 10, 15 y 20 pM; ADNpol-*Taq*: 0.50, 0.75 y 1.00 U; y ADNbco: 1, 5, 10 y 25 ng. Las condiciones de amplificación probadas fueron: *i*) 94 °C/1'; 36 °C/1'; 72 °C/2' ¹⁴³, *ii*) 92°C/10"; 36 °C/30"; 72 °C/1' ¹⁴⁶, *iii*) 94 °C/15"; 40 °C/30"; 72 °C/1' ⁸⁵. Los tres primeros programas fueron sujetos a 35 ciclos, y *iv*) 94 °C/5'/1ciclo; 94 °C/30"; 36 °C/30"; 72 °C/1' por 35 ciclos y 72 °C/10'/1ciclo (estas condiciones se optimizaron con base en los tres primeros). El aislado clínico No. 231, la cepa control de *P.aeruginosa* ATCC 27853 y un control negativo (tubo con agua ultrapura) se probaron para cada ensayo. Los productos se resolvieron en gel de poliacrilamida al 5% (9 cm de largo x 7 cm de ancho), 2 mL de acrilamida al 30% mas bis-acrilamida al 0.8%, 1.2 mL de amortiguador TBE 1X y 8.8 mL de agua. Como catalizadores de la reacción se agregaron 60 μL de persulfato de amonio al 10% y 12 μL de TEMED; el gelificado se agregó en el compartimento formado entre dos placas de cristal con un espesor de 3 mm. El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo en amortiguador TBE 0.5X a 50 V por 3 hr. Posteriormente, los geles se fijaron con ácido acético al 10% por 20 min, se enjuagaron con agua 2 min tres veces, se impregnaron con nitrato de plata (1g/L) más formaldehído al 37% (1.5 mL/L) durante 30 min, se enjuagaron de nuevo por 20 seg y finalmente se revelaron con carbonato de sodio (30 g/L), formaldehído 37% y tiosulfato de sodio pentahidratado (2 mg/L) de 2 a 5 min. La reacción se paró con ácido acético al 10% por 5 min ^{7, 16, 17} (Figs. 20-24).

6. Materiales y Métodos □

ENSAYOS CON 3 PROGRAMAS DE AMPLIFICACION

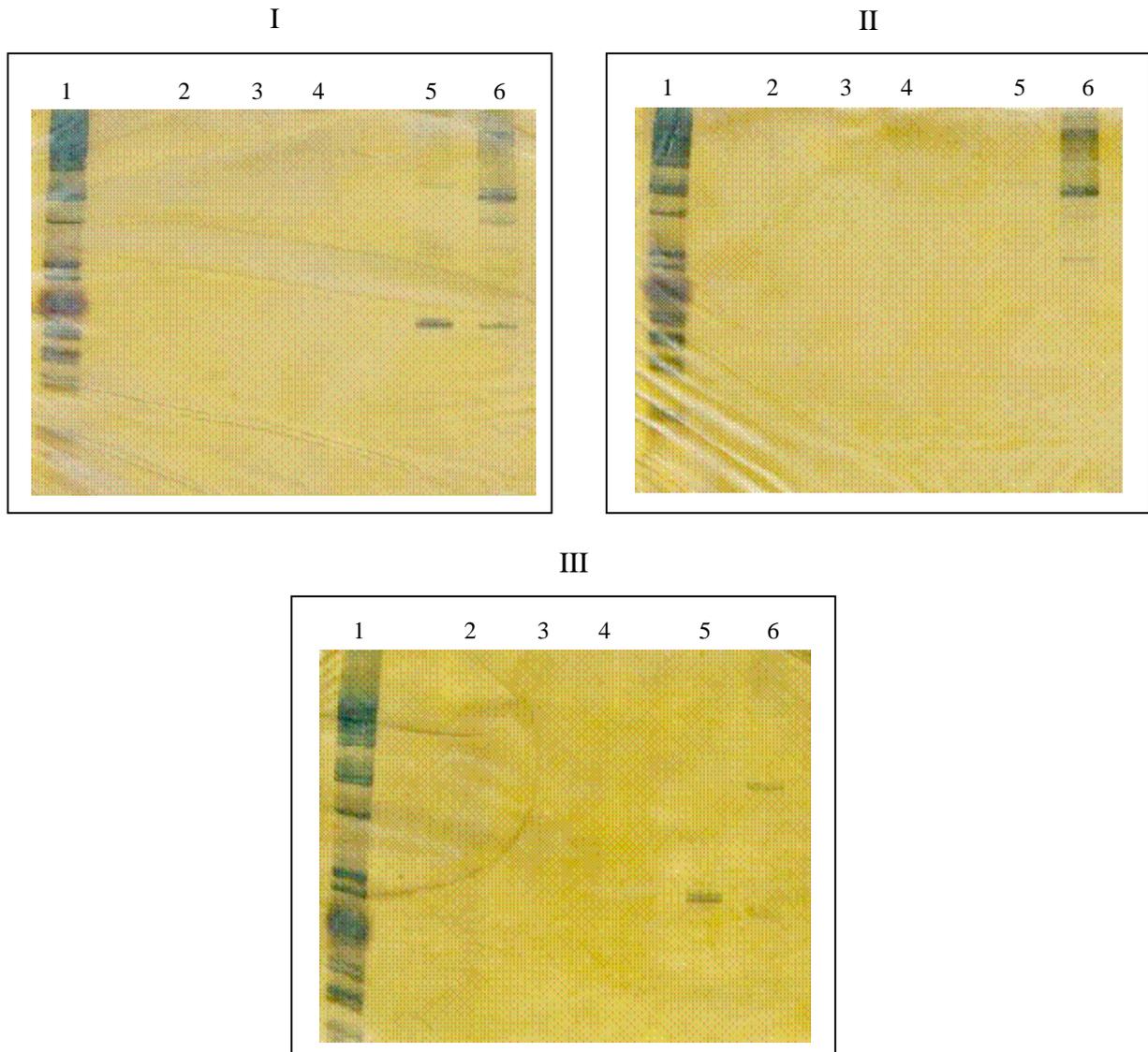


Fig. 20. I, programa Williams, *et al* (94°C/1', 36°C/1', 72°C/2'). II, programa Park, *et al* (94°C/15'', 40°C/30'', 72°C/1'). III, programa Yu & Pouls (92°C/10'', 36°C/30'', 72°C/1'). Carril 5, *P.aeruginosa* ATCC 27853; 6, *P.aeruginosa* 231; 2 a 4, blancos; 1, marcador del peso molecular ADN $\Phi\lambda PstI$.

6. Materiales y Métodos □

OPTIMIZACION DEL VOLUMEN DE REACCION (V_{RC}) Y LA CONCENTRACION DE LA ADNpol-*Taq*.

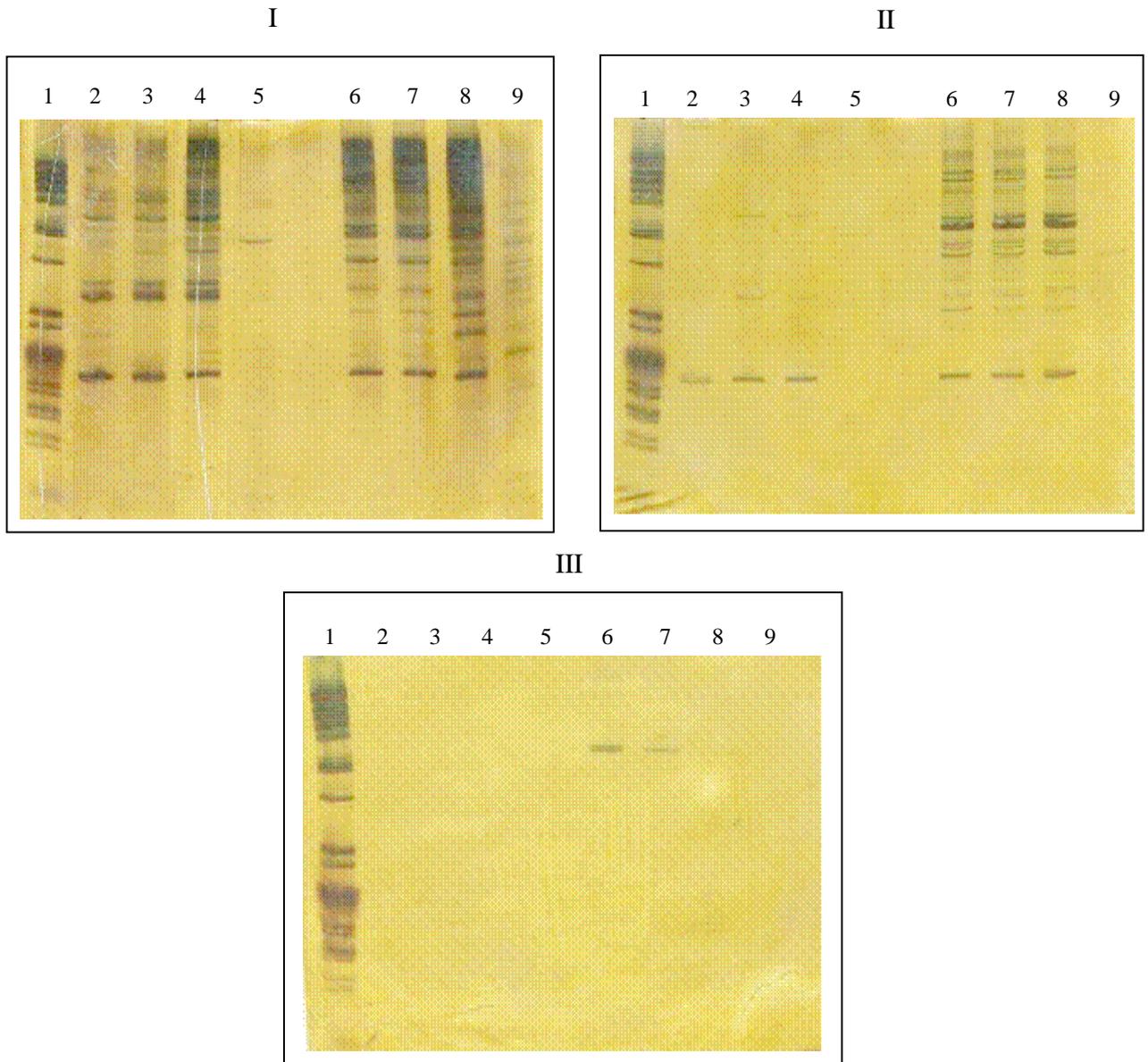


Fig. 21. Patrón de bandas del RAPD. I, $V_{RC}=10\mu\text{L}$; II, $V_{RC}=25\mu\text{L}$; III, $V_{RC}=50\mu\text{L}$. Carriles 2 a 4, *P.aeruginosa* ATCC 27853 con 0.50, 0.75 y 1.00 U de ADNpol-*Taq*. Carriles 6 a 8, *P.aeruginosa* 231 con 0.50, 0.75 y 1.00 U de ADNpol-*Taq* respectivamente. Carriles 5 y 9 blancos (representa un control con los componentes de la reacción típica sin el ADN blanco). Carril 1, marcador del peso molecular ADN $\Phi\lambda\text{PstI}$. Todas las reacciones se amplificaron con 2.5 mM de MgCl_2 , 15 pM del iniciador 1283 y 25 ng del ADN blanco. El termociclador se programó según Williams, *et al.*

6. Materiales y Métodos □

OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DE $MgCl_2$ Y V_{RC}

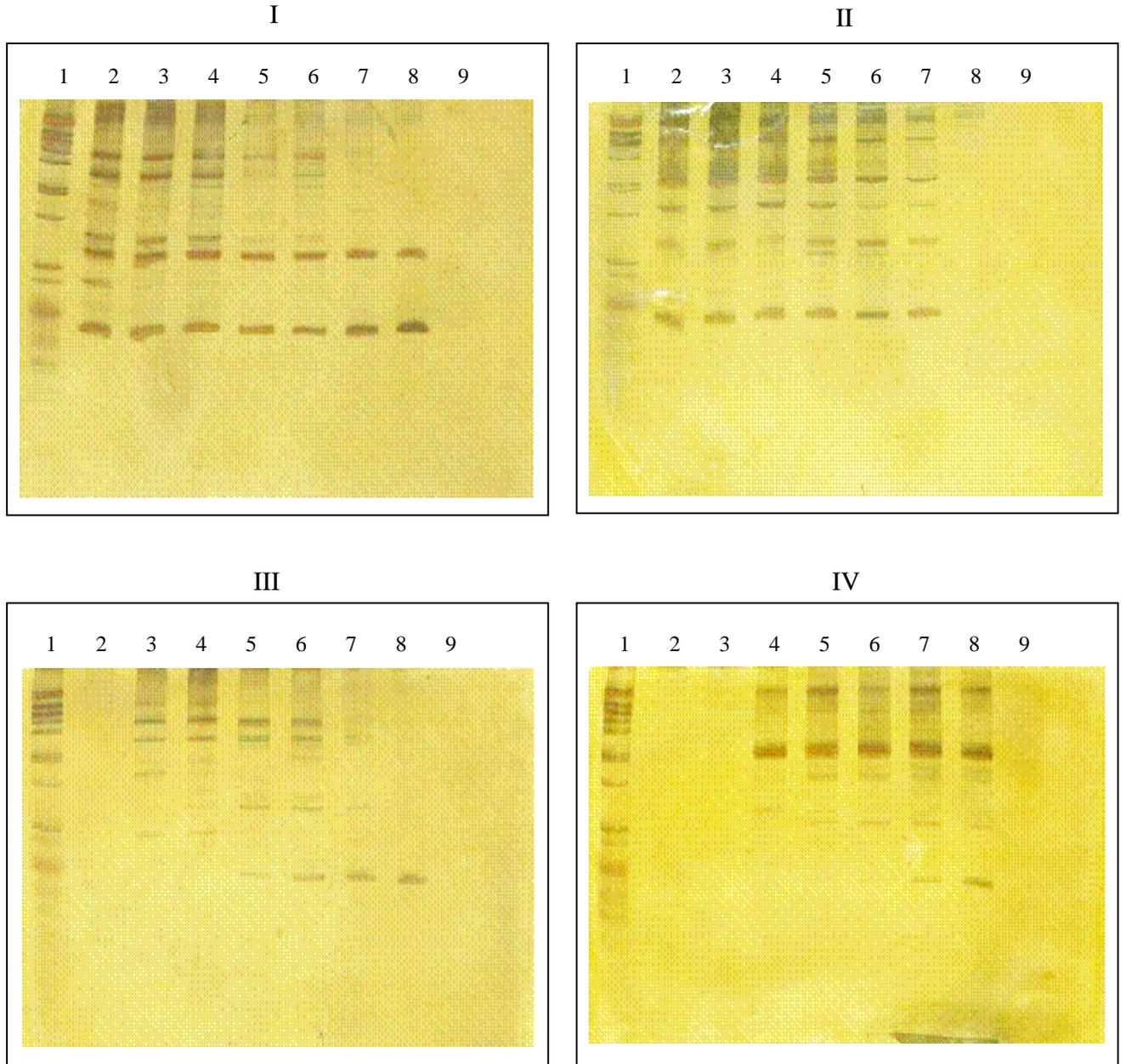


Fig. 22. Patrón de bandas del RAPD. Geles I, $V_{RC}=10 \mu L$ y III, $V_{RC}=25 \mu L$. Carriles 2 a 8 *P.aeruginosa* ATCC 27853 con 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 mM de $MgCl_2$. Geles II, $V_{RC}=10 \mu L$ y IV, $V_{RC}=25 \mu L$. Carriles 2 a 8 *P.aeruginosa* 231 con 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 mM de $MgCl_2$ respectivamente. Carril 9, blancos. Carril 1, marcador del peso molecular ADN $\Phi\lambda PstI$. Todas las reacciones se amplificaron con 2.0 mM de $MgCl_2$, 0.5 U de ADNpol-*Taq*, 15 pM del iniciador 1283, 25 ng ADNbco. El termociclador se programó según Williams, *et al.*

6. Materiales y Métodos □

OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DEL INICIADOR

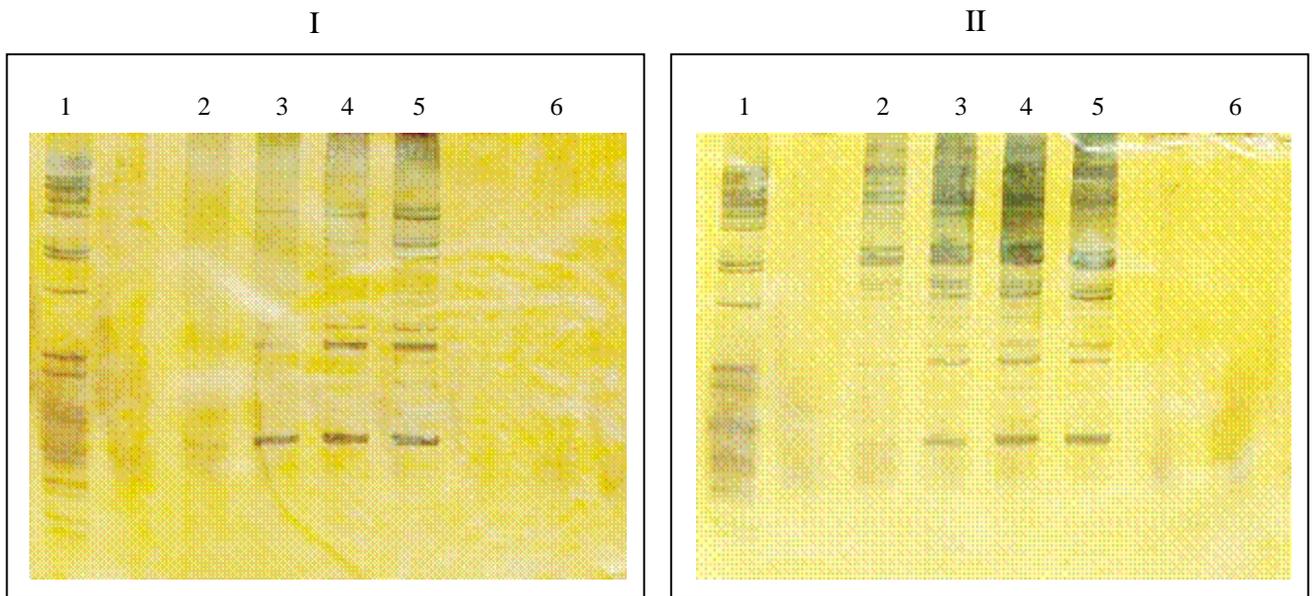


Fig. 23. Patrón de bandas del RAPD. I, carriles 2 a 5, *P.aeruginosa* ATCC 27853 con 5, 10, 15 y 20 pM del iniciador. II, carriles 2 a 5, *P.aeruginosa* 231 con 5, 10, 15 y 20 pM del iniciador. Carril 6, blancos. Carril 1, marcador del peso molecular ADN $\Phi\lambda PstI$. Todas las reacciones se amplificaron con 2.0 mM de $MgCl_2$, 0.5 U de ADNpol-*Taq*, 25 ng ADNbco en un $V_{RC}=10 \mu L$. El termociclador se programó según Williams, *et al.*

OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DEL ADN BLANCO

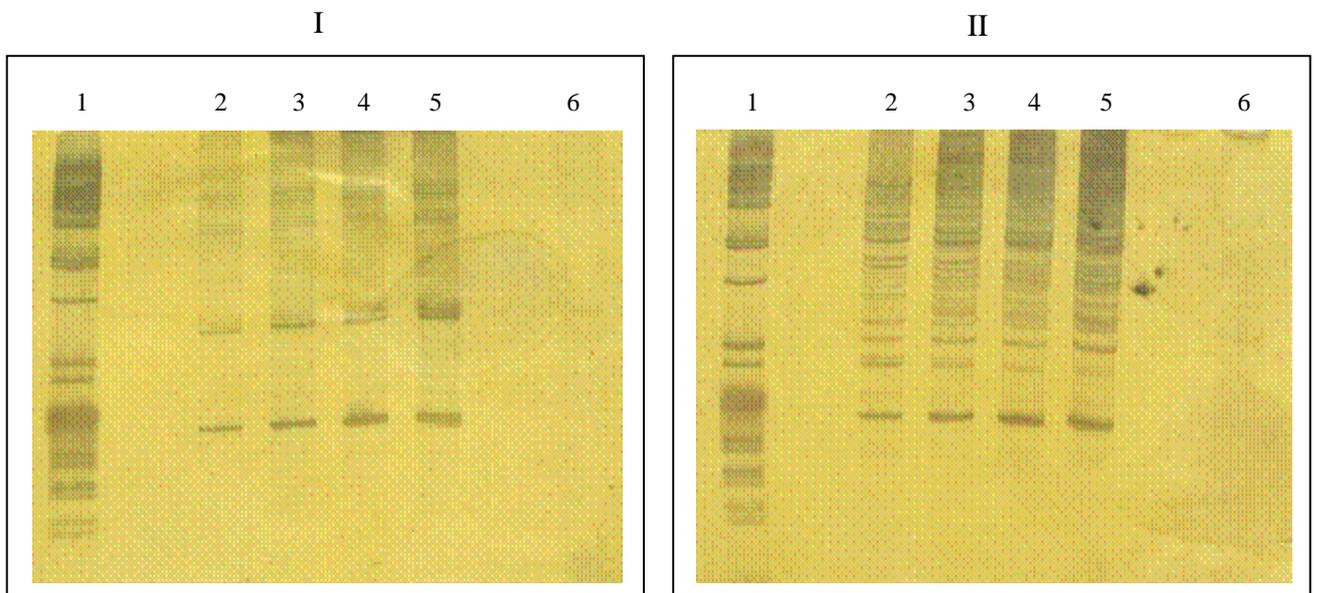


Fig. 24. Patrón del RAPD. I, carriles 2 a 5 con 1, 5, 10 y 25 ng de ADNbco de *P.aeruginosa* ATCC 27853. II, carriles 2 a 5 con 1, 5, 10 y 25 ng de ADNbco de *P.aeruginosa* 231. Carril 6, blancos. Carril 1, marcador del peso molecular ADN $\Phi\lambda PstI$. Todas las reacciones se amplificaron con 2.0 mM de $MgCl_2$, 0.5U de ADNpol-*Taq*, 15 pM del iniciador en un $V_{RC}=10 \mu L$. El termociclador se programó según Williams, *et al.*

6. Materiales y Métodos □

6.3.4 *Ensayo de Reproducibilidad en Gel de Poliacrilamida.* Para determinar la reproducibilidad del RAPD con las condiciones de amplificación seleccionadas, se utilizó el ADN de 10 aislados clínicos de *P.aeruginosa* seleccionados al azar y un control negativo. El ensayo de amplificación se repitió durante 4 días consecutivos bajo las mismas condiciones: $V_{RC}=10 \mu\text{L}$; amortiguador 1X; DNTPs, $100 \mu\text{M}$; MgCl_2 , 2.5 mM ; iniciador 1283, 20 pM ; ADNpol-*Taq.* 0.5 U y ADNbco 3.0 ng , sujetas a las condiciones de amplificación del inciso *i* en 6.3.3. Los productos se resolvieron en geles de poliacrilamida según las fórmulas referidas en 6.3.3, mostrando en este caso dimensiones mayores: 15 cm de largo x 10 cm de ancho (Fig. 25).

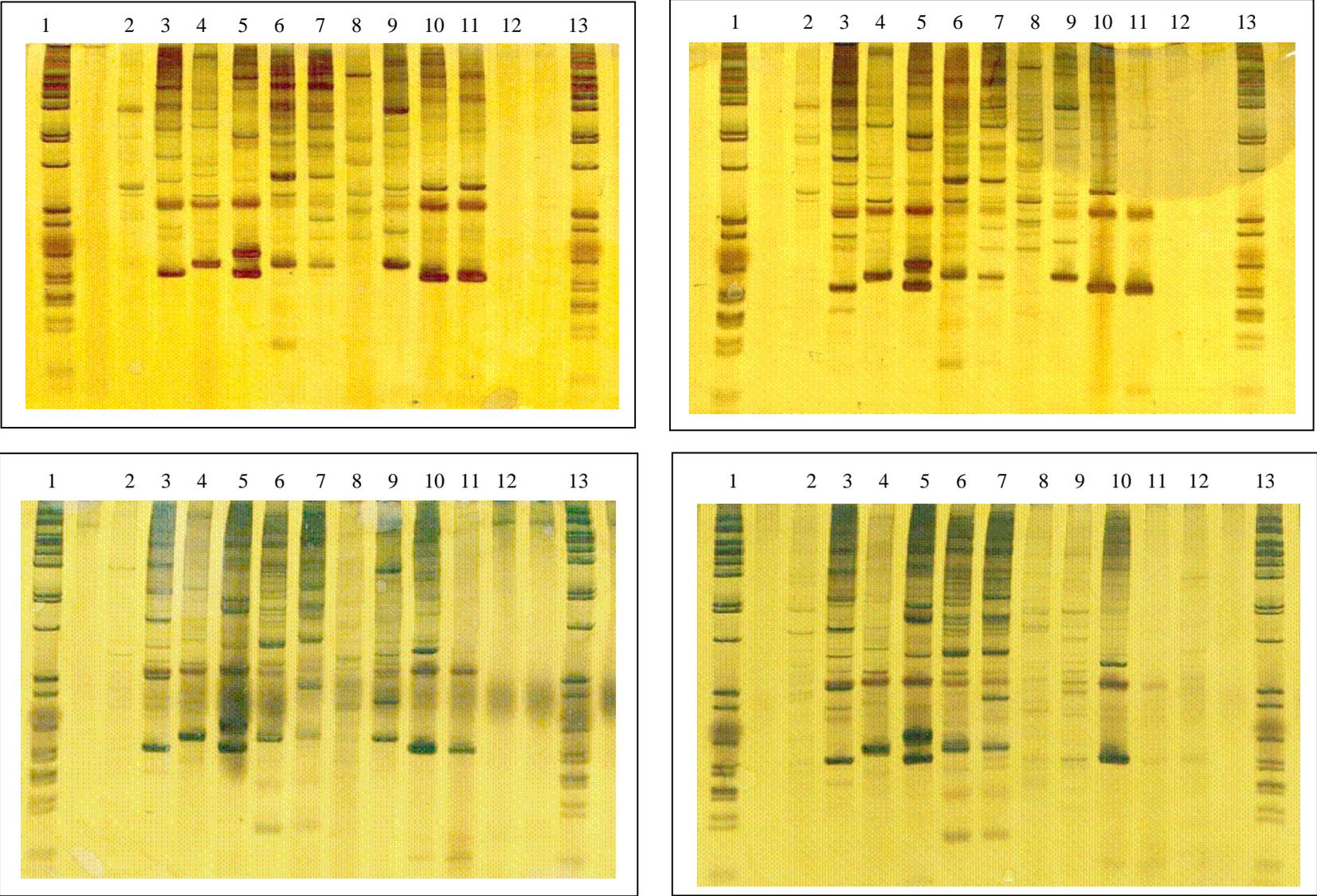


Fig. 25. Patrón del RAPD. En los 4 geles: carriles 2 a 11, aislados clínicos de *P.aeruginosa* 15, 66, 111, 251, 297, 312, 383, 474, 504 y 523; carril 12, blanco; carril 1 y 13, marcador del peso molecular ADN $\Phi\lambda PstI$. Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.

6. Materiales y Métodos □

6.4 Ensayo Experimental con 202 Aislados Clínicos de *P.aeruginosa*.

6.4.1 Ensayo del RAPD con 202 Aislados de *P.aeruginosa*. Con las condiciones seleccionadas: V_{RC} , 10 μ L; amortiguador 1X; DNTPs 100 μ M; $MgCl_2$, 2.5 mM; iniciador, 20 pM; ADNpol-*Taq*, 0.5 U; ADNbco, 3.0 ng y con el termociclador programado a 94 °C/5'/1ciclo; 94 °C/30"; 36 °C/30' ; 72 °C/1' por 35 ciclos y 72 °C/10'/1ciclo, se amplificaron 202 aislados de *P.aeruginosa* (Figs. 27-42) y un aislado de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 como un control externo de la reproducibilidad del método (Fig. 26). Los productos obtenidos se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con 0.5 μ L de bromuro de etidio en amortiguador TBE 0.5X, pH 8.0 a 60 V durante 2 hr. 30 min; 8.5 μ L del producto amplificado se añadió a cada pozo mezclándolo con 1.5 μ L de la mezcla azul de prusia-verde brillante como indicador del corrimiento del ADN durante la electroforesis. Los dos carriles de los extremos izquierdo y derecho se llenaron con 1 μ L de los marcadores IV (mezcla del ADN $\Phi\lambda$ PstI y pSPTBM20 [1.0 μ g/ μ L] cortado con *StyI* y *SauI*) y el marcador IX (ADN Φ X174 [0.5 μ g/ μ L] cortado con *HaeIII*) (Lakeside, Boehringer Mannheim, México, D.F.). Los geles se colocaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta y se expusieron a una película Polaroid blanco y negro, 150 3000/36°, 8.5 x 10.8 cm, polapan 667, con una apertura del diafragma de la cámara de 11 y a una distancia focal de 67.5 cm durante 1 min. Los ensayos en los que no se observó amplificación fueron repetidos.

6.5 Análisis Molecular

6.5.1 Análisis de Agrupación con UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). Las 16 fotografías de los geles se capturaron y los patrones electroforéticos de las bandas se procesaron en un analizador de imágenes (*Adobe Photoshop®*, *Adobe Systems Inc. USA*). El grado de relación entre dos cepas se estimó por un coeficiente de similitud (*cs*) de manera automática con el método de agrupación de pares no relacionados con base en promedios aritméticos (Unweighted Pair Group Method, using Arithmetic Averages <UPGMA>) ^{64, 121} utilizando el programa *Advanced Quantifier 1-D Matcha*, *Bioimage*, *Ann Arbor, MI*. El

6. Materiales y Métodos □

porcentaje de tolerancia para el tamaño y el espacio entre bandas fue de 5%, y el porcentaje límite entre líneas apareadas, de 80%.

6.5.2 *Histogramas de Diversidad Genética de las Subpoblaciones de P.aeruginosa.* El tamaño de las bandas de cada uno de los aislados clínicos de *P.aeruginosa* calculado automáticamente por el programa *Advanced Quantifier 1-D Matcha* se categorizó por centenas, por ejemplo, 5 aislados de *P.aeruginosa* en los que se amplificaron bandas con un peso molecular de 0.312 Kb, 0.334 Kb, 0.358 Kb, 0.310 Kb y 0.385 Kb se consideraron dentro de la centena de 300 pb (en el intervalo de 300 a 399 pb), el número total de bandas según su peso molecular categorizado en centenas se graficó, obteniéndose el porcentaje de los aislados que presentaban tal o tales bandas. ¹⁸ El análisis se obtuvo para el total de aislados que conformaban cada una de las subpoblaciones fenotípicas (PaeS, PaeGn,..., PaeMNR,... y PaeMM) (Figs. 50-55).

6.5.3 *Cuantificación de la Variabilidad Genética de la Población Clínica de P.aeruginosa.* Utilizando el programa *Tools for Population Genetics Analyses <TFPGA>*, V 6.0, Miller, P.M. 1997), se obtuvo la proporción de heterocigosis virtual y la proporción de loci polimórfico. Con el mismo programa se realizó un segundo análisis por UPGMA correlacionando el polimorfismo obtenido a partir del RAPD con la estacionalidad, la prevalencia en muestras clínicas (nichos ambientales) y con las subpoblaciones fenotípicas, con el fin de corroborar genéticamente la conducta estacional, la forma de colonización de los nichos y los mecanismos de resistencia.

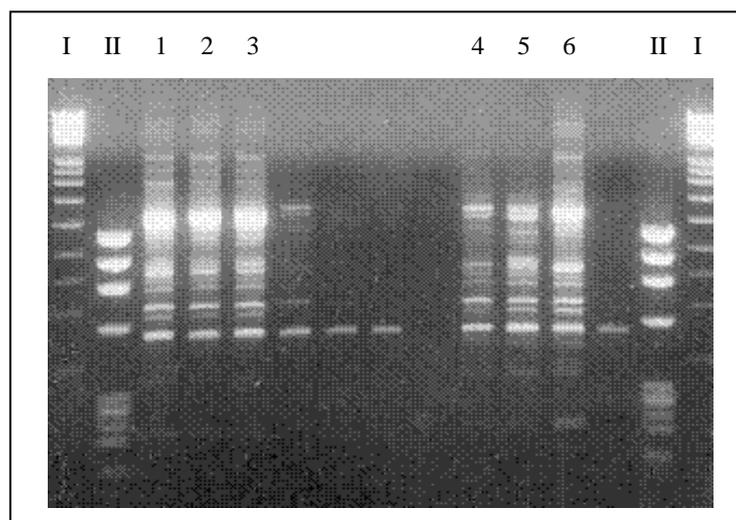


Fig. 26. Patrón del RAPD. Cepa control de *K.pneumoniae* ATCC 13883. Carril 1, ensayo A; 2, ensayo B; 3, ensayo C; 4, ensayo F; 5, ensayo D y 6, ensayo E. Carriles I y II, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

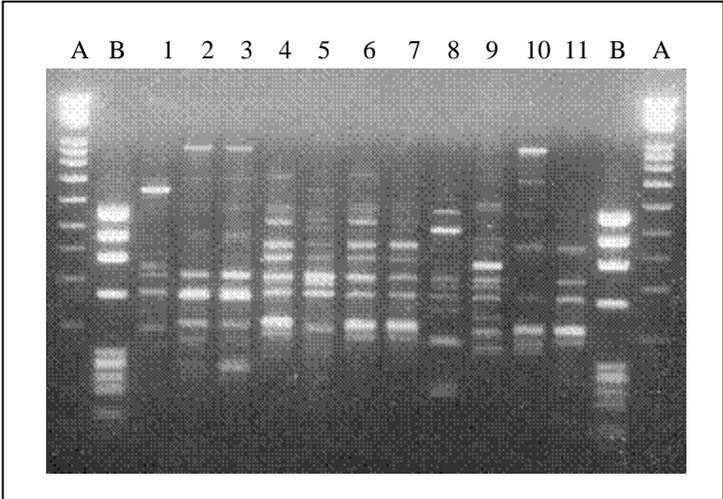


Fig. 27. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 1 a 11: 2D, 5D, 7D, 8D, 9D, 10D, 11D, 13D, 14D, 15D y 16D. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

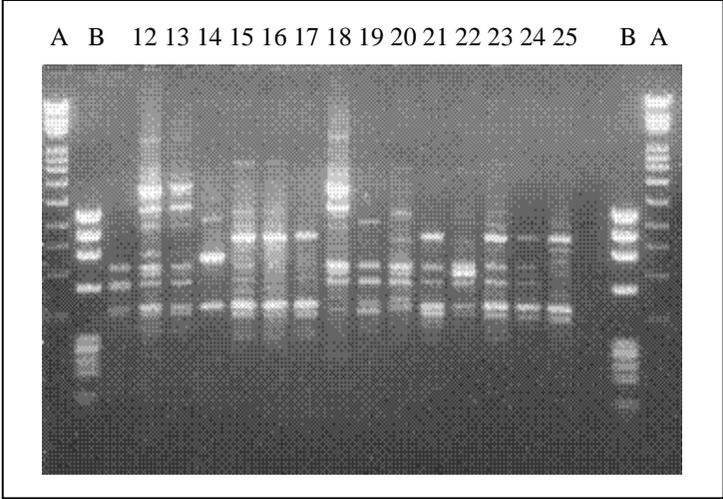


Fig. 28. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 12 a 25: 31D, 32D, 33D, 34D, 35D, 36D, 37D, 38D, 39D, 40D, 41D, 42D, 43D y 44D. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

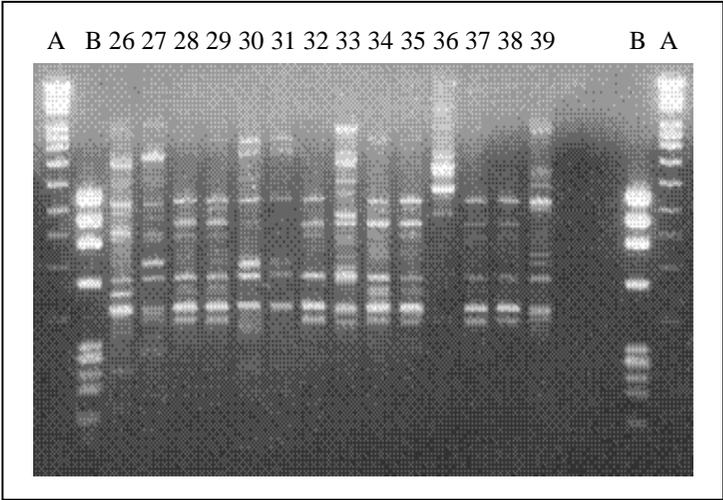


Fig.29. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 26 a 39: 26E, 27E, 28E, 29E, 30E, 31E, 32E, 33E, 34E, 35E, 36E, 37E, 38E y 39E. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

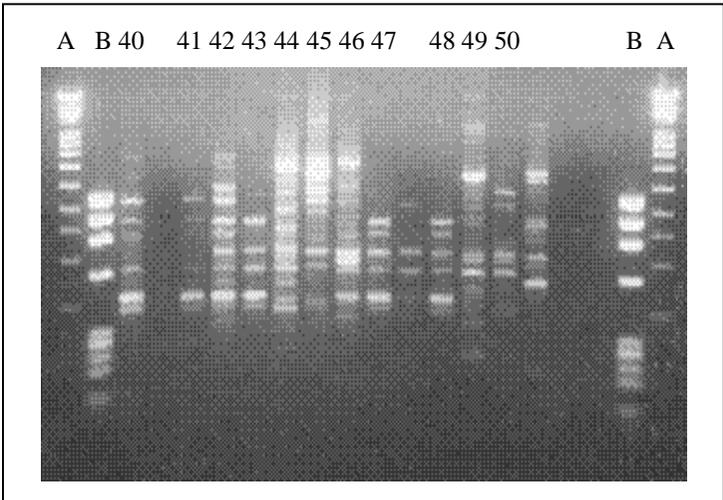


Fig. 30. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 40 a 50: 41E, 43E, 44E, 45E, 47E, 48E, 49E, 50E, 52E, 53E y 54E. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

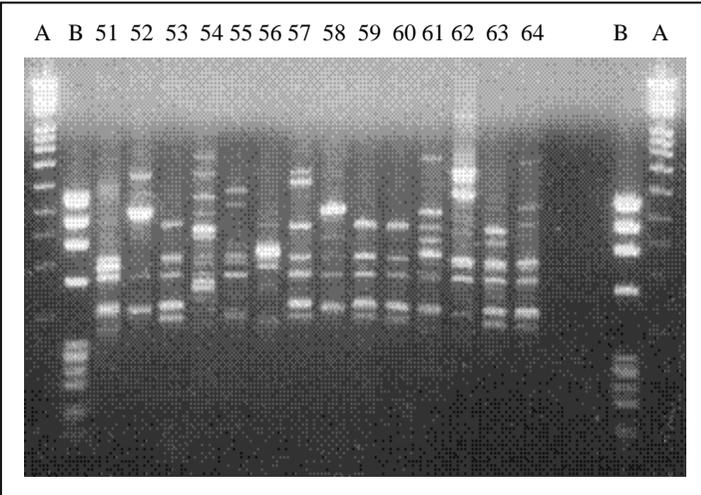


Fig. 31. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 51 a 64: 55E, 56E, 57E, 58E, 59E, 60E, 61E, 62E, 63E, 64E, 1F, 2F, 3F y 4F. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

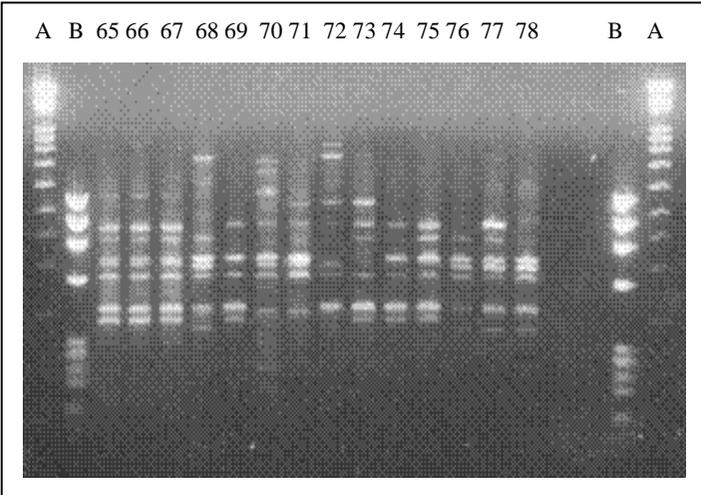


Fig. 32. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 65 a 78: 5F, 6F, 8F, 9F, 10F, 12F, 14F, 15F, 16F, 17F, 18F, 19F, 20F y 21F. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

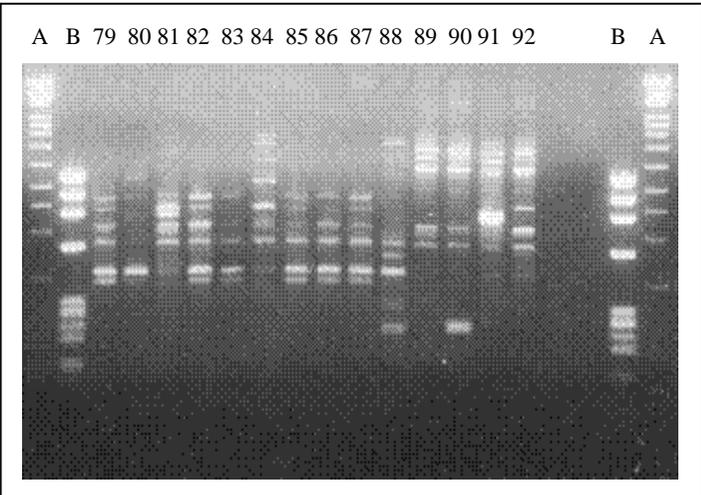


Fig. 33. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 79 a 92: 53F, 54F, 55F, 56F, 60F, 61F, 62F, 63F, 64F, 1Fox, 1C, 2C, 3C y 4C. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

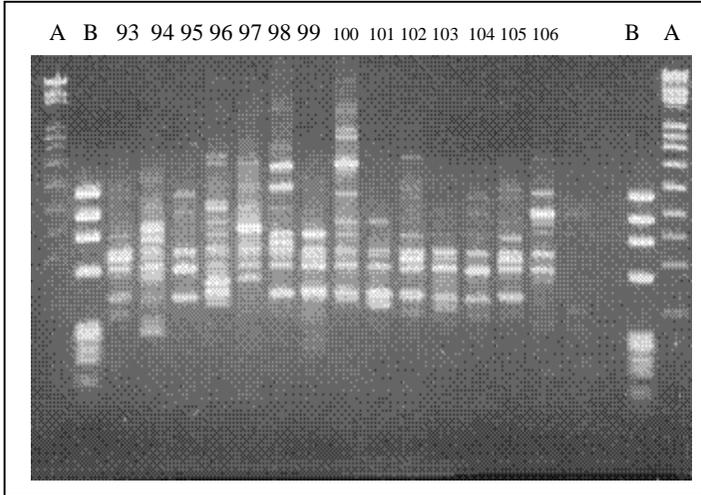


Fig. 34. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 93 a 106: 5C, 6C, 7C, 8C, 9C, 10C, 11C, 12C, 14C, 15C, 16C, 18C, 20C y 21C. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

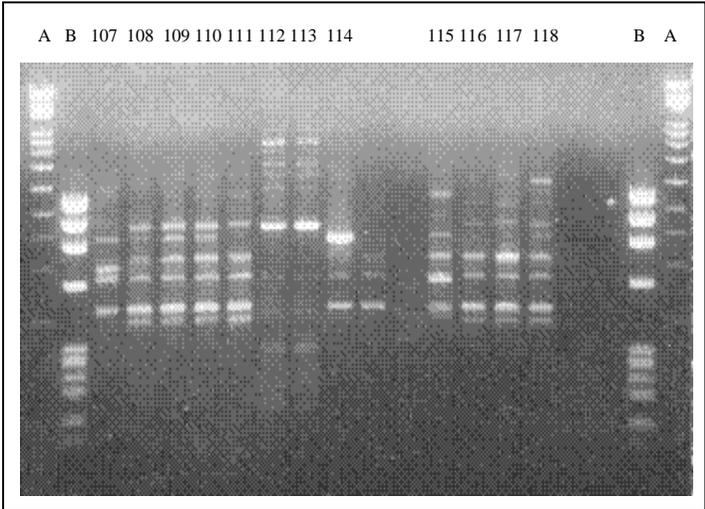


Fig. 35. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 107 a 118: 22F, 23F, 24F, 26F, 27F, 28F, 29F, 30F, 33F, 34F, 35F y 36F. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

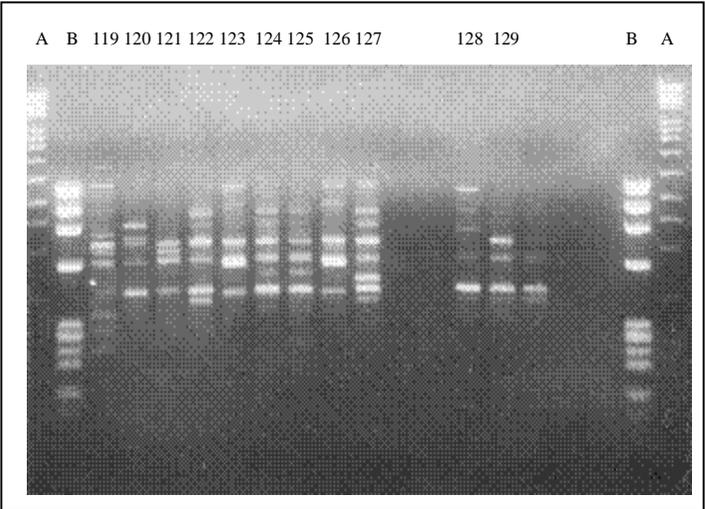


Fig. 36. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 119 a 129: 37F, 38F, 39F, 40F, 41F, 42F, 44F, 46F, 47F, 50F y 51F. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

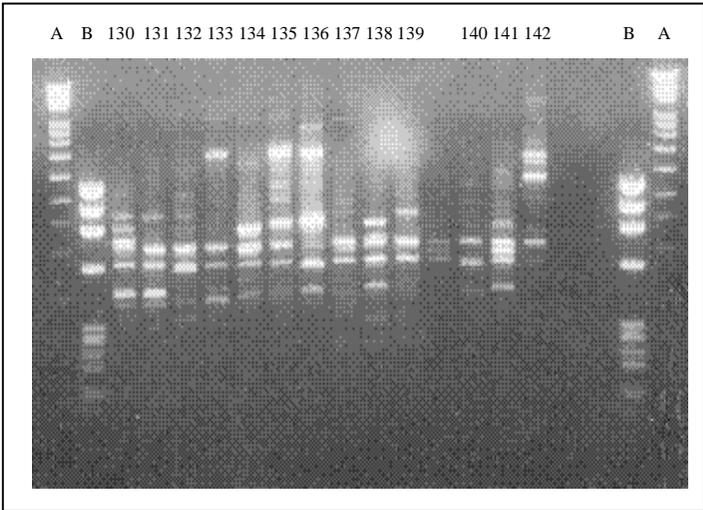


Fig. 37. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 130 a 142: 22C, 23C, 24C, 26C, 27C, 28C, 29C, 30C, 31C, 32C, 35C, 36C y 37C. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

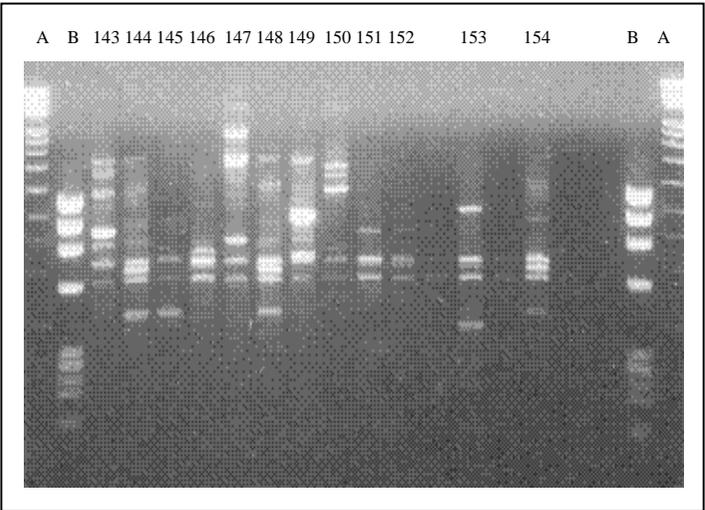


Fig. 38. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 143 a 154: 38C, 39C, 40C, 41C, 42C, 43C, 44C, 45Cr, 1D, 3D, 12D y 18D. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

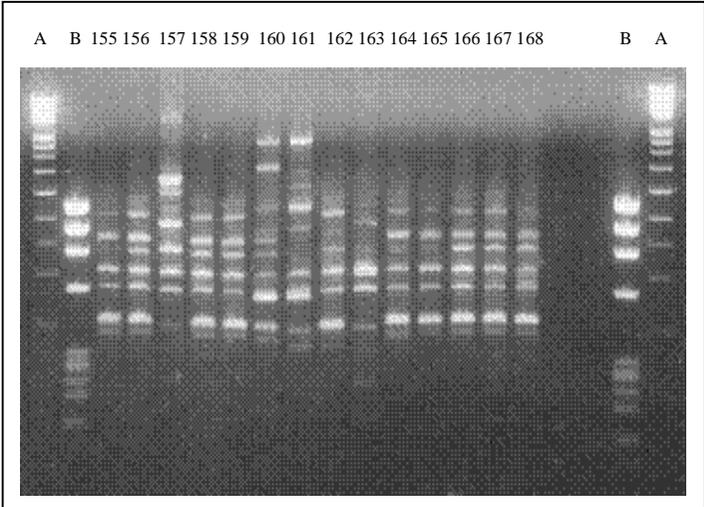


Fig. 39. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 155 a 168: 20D, 21D, 22D, 24D, 25D, 26D, 48D, 27D, 28D, 29D, 46D, 47D, 49D y 50D. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

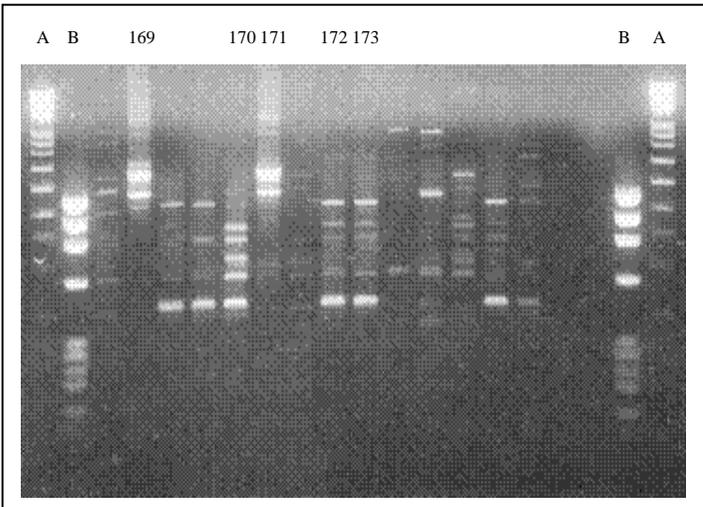


Fig. 40. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 169 a 173: 3E, 6E, 7E, 9E y 10E. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

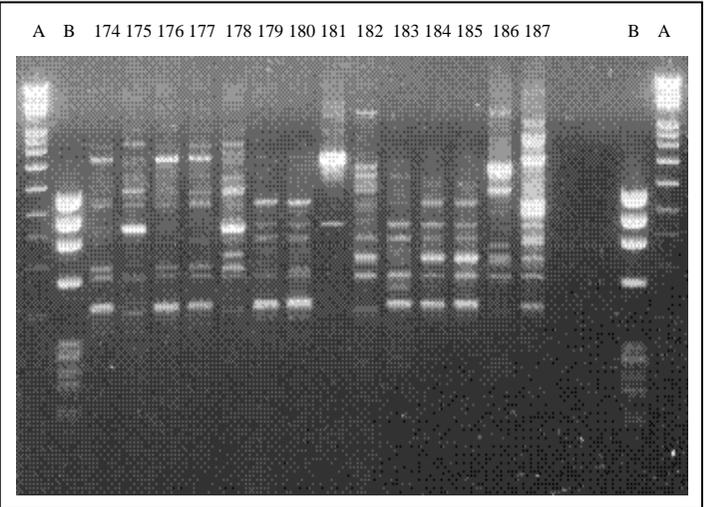


Fig. 41. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 174 a 187: 17E, 18E, 19E, 20E, 21E, 24E, 25E, 42E, 51E, 32F, 48F, 49F, 45Ci y 46C. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

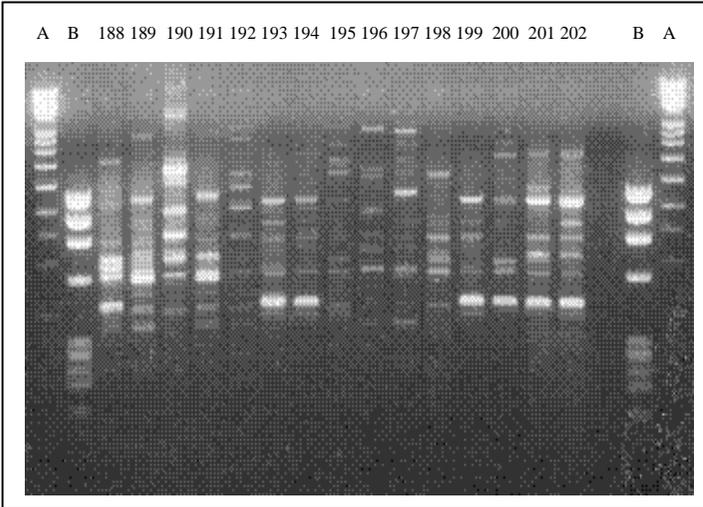


Fig. 42. Patrón del RAPD. Cepas clínicas de *P.aeruginosa*. Carriles 188 a 202: 34C, 4D, 17D, 30D, 1E, 4E, 5E, 8E, 11E, 12E, 13E, 15E, 16E, 31F y 52F. Carriles A y B, marcadores del peso molecular IV y IX (ver 6.4.1).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis Retrospectivo.

Al hacer el análisis estadístico utilizando un diseño factorial de tercer orden para el total de aislados clínicos de *P.aeruginosa* (1192) sin tomar en cuenta las probables interacciones, se observó diferencia significativa en las variables meses de año (M), fenotipos de resistencia a aminoglicósidos (A), muestras clínicas (T) y años de estudio (\tilde{N}) en forma independiente. La comparación de medias de los parámetros a evaluar de las distintas variables mostraron los siguientes resultados: para los meses del año, los meses con las medias más altas (significativos) fueron junio y julio lo cual ya se observaba en las gráficas por mes (Figs. 5 a 9); para los fenotipos de resistencia a aminoglicósidos hubo diferencia significativa en PaeS, PaeM y PaeGn con el resto de los fenotipos de resistencia, y además, entre ellas mismas; las medias de los tipos de muestras clínicas mostraron diferencia significativa entre los cuatro grupos: otras muestras clínicas, cultivos de orina, vías respiratorias y sangre. Por último el análisis mostró que el año con mayor número de aislados fue 1993 el cual mantuvo diferencia significativa con 1995 (Fig. 10). Las medias de las variables mencionadas se compararon a un nivel de significancia de .01.

El mismo modelo factorial reveló diferencia significativa entre las interacciones triples de las variables, por lo que, con base en este modelo se procedió a realizar el ajuste estadístico para un diseño de Split-split plot, colocando en la sub-subparcela los meses del año, con el fin de mejorar la precisión en la comparación del número de aislados promedio asignados por mes y así confirmar los brotes causados por los distintos fenotipos de *P.aeruginosa* a lo largo de los 5 años (interacción triple M x A x \tilde{N})(Fig. 3); así mismo, se compararon las medias de los contrastes de la interacción triple A x T x \tilde{N} del mismo diseño factorial para determinar la prevalencia de los fenotipos de resistencia a los aminoglicósidos de *P.aeruginosa* en las muestras clínicas encontradas durante los 5 años investigados (Fig. 1). Por último, los datos de la base de datos se agruparon por estaciones del año para corroborar en forma estadística la distribución estacional de los aislados de *P.aeruginosa*; los datos se procesaron de nuevo bajo un diseño factorial de tercer orden, obteniéndose diferencia significativa para la interacción triple E x \tilde{N} x A ($F_c=1.40^*$). De la misma manera, con base en este último diseño factorial, se realizó un diseño de Split-split

7. Resultados □

plot colocando las estaciones del año en la sub-subparcela con el fin de mejorar la precisión en la comparación del número de aislados promedio asignados por estación del año y así confirmar la distribución estacional de *P.aeruginosa* en el intervalo de los 5 años ($F_c=1.50^{**}$)(Fig. 4). Los resultados detallados para brotes, prevalencia en muestras clínicas y distribución estacional se presentan a continuación:

7.1.1 Brotes en el Período de Estudio (1991-1995). De los 1192 aislados de *P.aeruginosa* con distinta sensibilidad a los aminoglicósidos, se encontró que el fenotipo multirresistente (PaeM) tuvo una prevalencia promedio de 6 aislados/mes y 77 aislados/año, semejante a la de *P.aeruginosa* sensible (PaeS), con 8 aislados/mes y 95 aislados/año. La subpoblación de PaeM causó 8 brotes: en 1991, un brote que abarcó junio y julio (Fig. 5); en 1992, un brote en marzo, otro en agosto y uno más en octubre (Fig. 6); en 1993, un brote abarcando julio, agosto, septiembre y uno más en diciembre que continuó en enero de 1994 (Fig. 7); en 1994, un brote que comprendió mayo, junio y agosto (Fig. 8) y, en 1995, un brote en octubre (Fig. 9). La subpoblación de PaeS tuvo un número prominente de aislados en por lo menos 4 meses del año, abundando en los meses de enero y octubre. El resto de las subpoblaciones fenotípicas no mostraron brotes estadísticamente significativos ($F_c=1.42$; $F_{t_{1320};0.01}=1.15$) (Fig. 43; Tabla 1).

7.1.2 Prevalencia en Muestras Clínicas. La prueba F calculada de la interacción triple del primer diseño factorial mencionado en 7.1, reveló que PaeM prevaleció en forma altamente significativa en muestras provenientes de vías respiratorias inferiores y de orina con respecto a hemocultivos. Las PaeM provenientes de las vías respiratorias fueron más abundantes con respecto a las demás subpoblaciones en los años de 1991, 1992 y 1995 que aquellas de vías urinarias, más abundantes en 1993 y 1994 (Tabla 2). PaeS prevaleció con muy alta frecuencia en muestras de orina en 4 de los 5 años, de 1992 a 1995 ($F_c=2.00$; $F_{t_{1332};0.01}=1.41$) (Figs. 11 y 44; Tabla 2).

En este diseño se observó también que con respecto a otras muestras clínicas, hubo diferencia altamente significativa, tanto para PaeM como para PaeS, por lo que se aplicó un segundo diseño factorial para pormenorizar la prevalencia de

7. Resultados □

P.aeruginosa en un total de 18 tipos de muestras clínicas (Fig. 2), mostrando que PaeM prevaleció en sangre, heridas quirúrgicas y abscesos conjuntamente con PaeS (Fig. 11 y 12), la que a su vez tuvo alta prevalencia en líquidos de diálisis (Fig. 13). Por último, este análisis mostró que la subpoblación de PaeGn prevaleció también en forma significativa en muestras de orina y sangre ($F_c=11.67$; $F_{t_{504;0.01}}=1.42$) (Figs. 11 y 45; Tabla 3).

7.1.3 Distribución Estacional. El fenotipo PaeM predominó en forma altamente significativa con respecto a las demás subpoblaciones durante la estación de verano en 4 de los 5 años estudiados (Fig. 15), mientras que PaeS se distribuyó homogéneamente durante las distintas estaciones (Fig. 14). Las demás subpoblaciones no presentaron una distribución estacional ($F_c=1.50$; $F_{t_{360;0.01}}=1.47$) (Fig. 46; Tabla 4).

7.2 Análisis Molecular del RAPD.

(Primer Análisis Utilizando el Método de Agrupación de Pares no Relacionados con Base en Promedios Aritméticos <UPGMA>)(ver 6.5.1).

7.2.1 Optimización y Reproducibilidad. El iniciador 1283 amplificó bandas en el intervalo de peso molecular de 0.2 a 7.6 Kb, con un mínimo de 4, un máximo de 18 y una media de 9 bandas. El iniciador discriminó entre los aislados estudiados. Las condiciones óptimas para los ensayos del RAPD fueron las referidas en 6.4.1. El patrón del RAPD para la cepa control de *K.pneumoniae* ATCC 13883 tuvo en 3 ensayos un coeficiente de similitud de 100%, en 2 del 97.5%, y uno se relacionó con un 87.5%; los ensayos en los que no hubo reproducibilidad se repitieron (Figs. 26 y 47).

7.2.2 Análisis de Agrupación para 202 Aislados Clínicos de *P.aeruginosa*. De los 202 aislados de *P.aeruginosa*, 193 tuvieron un patrón de susceptibilidad determinado; 125 de estos (64.8%) tuvieron un fenotipo PaeM. El dendrograma obtenido con base en el análisis de UPGMA mostró que PaeM se distribuyó en tres grandes subpoblaciones que suponemos: a) no relacionada (PaeMNR), b) esporádica (PaeMES) y c) endémica (PaeMED), la cual incluyó, a su vez, una sub-subpoblación de variedades de PaeM (PaeMM) agrupadas en 5 conglomerados

7. Resultados □

estrechamente relacionados (cs=75%). El 35.2% restante tuvieron los fenotipos PaeS, PaeGn, PaeTb, PaeAnGn y PaeGnTb (Fig. 48).

7.2.3 Polimorfismo Genético de la Subpoblaciones de *P.aeruginosa*. Todas las subpoblaciones fenotípicas de *P.aeruginosa* mostraron distinto polimorfismo en el intervalo de 215 a 7620 pb. PaeGn (n=27) y PaeMES (n=24) mostraron el mayor polimorfismo, con 48 y 45 centenas de pb (ver 6.5.2), respectivamente. De manera inesperada, los polimorfismos de los 100 genomas de PaeMED analizados presentaron únicamente 31 centenas de pb, cantidad significativamente menor a la de PaeGn ($p=0.05$) y PaeMES ($p=0.20$) e inclusive menor a PaeS (n=11) y PaeAnGn (n=14), con 36 y 37 centenas de pb, respectivamente (no significativas). Más aún, la sub-subpoblación PaeMM, con 60 genomas, presentó el más bajo polimorfismo, con 21 centenas de pb, en comparación con 7 de las 9 subpoblaciones estudiadas (Figs. 50-55; Tabla 5).

7.2.3.1 Frecuencia de Bandas Dobles. PaeMED y PaeMM presentaron altos porcentajes de bandas dobles en la centena de 400 pb en 62% y 75%, respectivamente, mientras que el resto de las subpoblaciones mostraron bandas dobles, principalmente en las centenas de 700 pb de 36.4% a 59.2% (Tabla 5).

7.3 Correlación del Patrón del RAPD con la Prevalencia en Muestras Clínicas y el Patrón de Susceptibilidad a 19 Antibióticos.

7.3.1 Prevalencia en Muestras Clínicas. Se mencionó en el análisis retrospectivo en 7.1.2, que PaeM prevaleció en diversos tipos de muestras clínicas, especialmente en vías respiratorias y orina, lo cual se comprobó al correlacionar tal prevalencia con el análisis molecular. Todas las subpoblaciones de *P.aeruginosa* derivadas de los 202 aislados prevalecieron con distintas proporciones en todas las muestras clínicas, exceptuando a aquellas de vías respiratorias, en las cuales prevalecieron casi exclusivamente PaeM y PaeGn (Tabla 6).

7. Resultados □

7.3.2 Susceptibilidad a 19 Antibióticos. En base a lo descrito en 6.2.2, se obtuvieron 87 códigos de susceptibilidad distintos a partir de los 202 aislados (Fig. 48 y 49); 22.3% (21/94) de los aislados de PaeMED mostró un código de susceptibilidad idéntico, representado por los 7 dígitos: 1737773, sensibles únicamente a Piperacilina (PIP) e Imipenem (IPM); 57.4% (54/94) tuvieron el mismo código para 6 dígitos: 173777', donde (') puede adquirir valores de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 dependiendo de la susceptibilidad de la última tripleta de antibióticos: cloranfenicol, tetraciclina e IPM (Fig. 16). El 18.1% (17/94) presentaron un código idéntico 177777' resistente a PIP. Las subpoblaciones PaeMES y PaeMNR mostraron proporciones semejantes de los mismos códigos. Por último, PaeGn y PaeAnGn tuvieron los códigos de susceptibilidad 1117323 y 1177733, respectivamente. Ninguna de las dos subpoblaciones anteriores ni las restantes presentaron códigos semejantes a los de las subpoblaciones de PaeM (Fig. 49; Tabla 7).

7.4 Determinación de la Diversidad Genética.

(Segundo Análisis Utilizando el Método de Agrupación de Pares no Relacionados con Base en Promedios Aritméticos <UPGMA>)(ver 6.5.3).

7.4.1 Heterocigosis Virtual y Loci Polimórfico. La proporción de heterocigosis virtual fue de 0.26 para las subpoblaciones fenotípicas, de 0.30 para origen del aislamiento por muestra clínica y de 0.21 para estacionalidad. Los resultados denotan que la población clínica de *P.aeruginosa* es genéticamente diversa. Así mismo, la proporción de loci polimórfico (P) con los valores de 100, 91.2 y 73.5% respectivamente, reveló que la población, en general, es también altamente polimórfica.

7.4.2 Correlación con la Estacionalidad, Prevalencia en Muestras Clínicas y las Subpoblaciones Fenotípicas. El segundo análisis con UPGMA reveló que efectivamente existe una distribución estacional en los aislados de *P.aeruginosa* menos polimórficos, los cuales se agrupan durante los meses cálido-lluviosos y frío-húmedos, siendo muy similares entre sí. Los aislados distribuidos durante los meses secos de primavera e invierno terminal, fueron más polimórficos con respecto a los anteriores (Fig. 56). En el caso de los nichos relacionados a muestras clínicas, se

7. Resultados □

encontró que existen “patógenos tipo” con la misma posibilidad de colonizar líquidos corporales, tejido sanguíneo, vías respiratorias y urinarias, así como heridas. Los aislados recuperados a partir de biopsias, postmortem, catéteres y exudados respiratorios fueron más polimórficos, mostrando un genotipo distinto (Fig. 57).

Fig. 43. AJUSTE SPLIT-SPLIT PLOT PARA BROTES EPIDEMICOS

*** ANALISIS DE VARIANCIA ***
HIERARCHICAL sums of squares

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	Fc	Ft .05	Ft .01
SSP	3355.967	1919				
SP	2218.800	159				
PP	1522.499	31				
T	246.638	3	82.213			
A	957.950	7	136.850	9.04 **	2.49	3.65
ξ_a AxT	317.912	21	15.139			
\tilde{N}	8.612	4	2.153	1.26 NS	2.46	3.51
$\tilde{N} \times A$	43.904	28	1.568	.92 NS	1.57	1.89
ξ_b Tx \tilde{N} + ($\tilde{N} \times A$)	163.785	96	1.706			
M						
MxA	20.617	11	1.874	2.23 *	1.79	2.24
Mx \tilde{N}	65.100	77	.845	1.00 NS	1.28	1.41
Mx $\tilde{N} \times A$	56.925	44	1.294	1.54 *	1.40	1.59
	367.358	308	1.193	1.42 **	1.11	1.15
ξ_c TxM + T (AxM) + T ($\tilde{N} \times M$) + T (Mx $\tilde{N} \times A$)	1107.358	1320	.839			

1920 cases were processed.
0 cases (.0 pct) were missing.

PP, parcela principal; SP, subparcela; SSP, sub-subparcela; M, meses del año; A, fenotipos de resistencia a aminoglicósidos; \tilde{N} , años de estudio; T, tipo de muestra clínica.

ξ , error experimental tipo a (parcela principal), b (subparcela) y c (sub-subparcela) para las interacciones dadas.

7. Resultados

Tabla 1. Comparación entre medias^a del número de *P.aeruginosa* aisladas en distintos meses del año.

	PaeAn	PaeGn	PaeTb	PaeAnGn	PaeAnTb	PaeGnTb	PaeM	PaeS
1991								
ENE	.00	.25 k	.00	.00	.00	.00	1.00 hijk	2.25 cdefghij
FEB	.25 ^b k	.75 ijk	.75 ijk	.00	.00	.00	2.00 defghijk	1.00 hijk
MAR	.00	.75 ijk	.25 k	.25 k	.00	.00	1.00 hijk	1.00 hijk
ABR	.00	.25	.50 jk	.00	.00	.00	.25 k	.50 jk
MAY	.00	.75 ijk	.00	.25 k	.00	.25 k	.75 ijk	.50 jk
JUN	.00	1.25 ghijk	.00	.50 jk	.00	.25 k	3.00^c abcdefg	2.75 abcdefgh
JUL	.00	.00	.25 k	.00	.25 k	.50 jk	3.25 abcdef	1.75 efghijk
AGO	.00	.50 jk	.00	.25 k	.25 k	.75 ijk	1.50 fghijk	1.75 efghijk
SEP	.00	1.00	.00	.75 ijk	.25 k	.00	1.00 hijk	2.75 abcdefgh
OCT	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.75 ijk	2.50 bcdefghi
NOV	.25 k	.75 ijk	1.00 hijk	.75 ijk	.00	.25 k	1.50 fghijk	4.25 ab
DIC	.00	1.00 hijk	.25 k	.25 k	.00	.25 k	.75 ijk	2.00 defghijk
1992								
ENE	.00	.25 k	.00	.25 k	.00	.25 k	1.50 fghijk	2.25 cdefghij
FEB	.25 k	.75 ijk	.00	.50 jk	.00	.00	2.00 defghijk	2.75 abcdefgh
MAR	.25 k	.75 ijk	.25 k	.75 ijk	.00	.25 k	3.75 abcd	2.00 defghijk
ABR	.00	.25 k	.00	.00	.25 k	.00	1.00 hijk	2.50 bcdefghi
MAY	.00	.25 k	.25 k	.25 k	.00	.25 k	1.00 hijk	.75 ijk
JUN	.00	2.00 defghijk	.75 ijk	.50 jk	.00	.00	1.50 fghijk	1.00 hijk
JUL	.00	1.25 ghijk	.00	.75 ijk	.00	.00	1.75 efghijk	2.25 cdefghij
AGO	.00	1.00 hijk	.25 k	.75 ijk	.00	.25 k	2.75 abcdefgh	1.50 fghijk
SEP	.00	1.75 efghijk	.00	.25 k	.00	.25 k	1.25 ghijk	1.50 fghijk
OCT	.25 k	1.00 hijk	.50 jk	.25 k	.25 k	.00	2.25 cdefghij	1.75 efghijk
NOV	.00	1.25 ghijk	.00	.00	.00	.00	.25 k	1.50 fghijk
DIC	.00	1.50 fghijk	.00	.00	.00	.25 k	.25 k	1.75 efghijk

7. Resultados

Tabla 1. Comparación entre medias^a del número de *P.aeruginosa* aisladas en distintos meses del año. (Continuación)

	PaeAn	PaeGn	PaeTb	PaeAnGn	PaeAnTb	PaeGnTb	PaeM	PaeS
1993								
ENE	.00	.25 k	.00	.75 ijk	.00	.00	.50 jk	1.75 efghijk
FEB	.25 k	.50 jk	.00	.00	.00	.25 k	1.25 ghijk	1.00 hijk
MAR	.25 k	1.00 hijk	.25 k	.00	.00	.50 jk	.75 ijk	4.50 a
ABR	.25 k	.75 ijk	.00	1.50 fghijk	.00	.25 k	1.25 ghijk	1.00 hijk
MAY	.00	.50 jk	.00	.75 ijk	.00	.00	.50 jk	1.50 fghijk
JUN	.00	.50 jk	.25 k	.50 jk	.00	.00	1.25 ghijk	3.50 abcde
JUL	.00	2.00 defghijk	.50 jk	.50 jk	.00	.00	3.50 abcde	2.50 bcdefghi
AGO	.00	1.25 ghijk	.00	.25 k	.00	.00	3.75 abcd	1.00 hijk
SEP	.00	1.25 ghijk	.00	2.00 defghijk	.00	.00	3.25 abcdef	2.00 defghijk
OCT	.00	1.75 efghijk	.00	.25 k	.00	.25 k	1.75 efghijk	2.75 abcdefgh
NOV	.00	1.00 hijk	.00	.25 k	.00	.00	1.75 efghijk	1.75 efghijk
DIC	.00	.75 ijk	.00	.00	.00	.25 k	4.50 a	1.50 fghijk
1994								
ENE	.00	1.50 fghijk	.50 jk	.50 jk	.00	.25 k	2.25 cdefghij	.75 ijk
FEB	.00	.25 k	.00	.00	.00	.00	1.25 ghijk	2.00 defghijk
MAR	.00	.50 jk	.00	.25 k	.00	.00	2.00 defghijk	1.25 ghijk
ABR	.00	.00	.00	.00	.00	.50 jk	1.75 efghijk	1.50 fghijk
MAY	.00	.50 jk	.25 k	.00	.25 k	.50 jk	2.25 cdefghij	1.75 efghijk
JUN	.00	.25 k	.00	.25 k	.00	.25 k	3.25 abcdef	3.25 abcdef
JUL	.00	.50 jk	.00	.00	.00	.25 k	1.00 hijk	2.75 abcdefgh
AGO	.00	.00	.00	.50 jk	.00	.50 jk	2.25 cdefghij	4.00 abc
SEP	.00	.50 jk	.00	.25 k	.25 k	.00	1.75 efghijk	1.25 ghijk
OCT	.00	.25 k	.00	.00	.00	.00	1.25 ghijk	2.75 abcdefgh
NOV	.00	.50 jk	.25 k	.25 k	.00	.25 k	1.25 ghijk	1.00 hijk
DIC	.00	.50 jk	.00	.25 k	.50 jk	.00	2.00 defghijk	2.25 cdefghij

7. Resultados

Tabla 1. Comparación entre medias^a del número de *P.aeruginosa* aisladas en distintos meses del año. (Continuación)

	PaeAn	PaeGn	PaeTb	PaeAnGn	PaeAnTb	PaeGnTb	PaeM	PaeS
1995								
ENE	.25 k	.25 k	.00	.00	.00	.25 k	.75 ijk	3.00 abcdefg
FEB	.00	.00	.00	.00	.25 k	.25 k	.75 ijk	.25 k
MAR	.00	.50 jk	.00	.00	.25 k	.25 k	1.00 hijk	3.00 abcdefg
ABR	.25 k	.00	.00	.00	.00	.25 k	2.00 defghijk	1.00 hijk
MAY	.00	1.25 ghijk	.00	.50 jk	.00	.00	1.75 efghijk	2.50 bcdefghi
JUN	.00	.00	.00	.25 k	.00	1.50 fghijk	.75 ijk	1.25 ghijk
JUL	.00	.00	.50 jk	.50 jk	.00	.75 ijk	.75 ijk	2.00 defghijk
AGO	.00	.00	.00	.75 ijk	.00	.50 jk	.75 ijk	2.50 bcdefghi
SEP	.00	.00	.00	.25 k	.00	.25 k	1.75 efghijk	.75 ijk
OCT	.00	.00	.00	.00	.00	.25 k	2.25 cdefghij	2.25 cdefghij
NOV	.00	.50 jk	.00	.00	.25 k	.00	1.00 hijk	3.25 abcdef
DIC	.00	.25 k	.00	.00	.25 k	.25 k	1.00 hijk	3.00 abcdefg

^aPrueba de comparación múltiple de medias de Duncan ($F_c=1.42^{**}$; $F_{t_{1320;0.01}}=1.15$).

^bLa media de los contrastes es un promedio de 4 repeticiones. Medias de los contrastes con las mismas letras no presentan diferencia significativa.

^cEn negritas, medias con mayor número de aislados.

** Diferencia altamente significativa.

Fig. 44. AJUSTE FACTORIAL PARA 4 TIPOS DE MUESTRAS CLINICAS

*** ANALISIS DE VARIANCIA ***
HIERARCHICAL sums of squares

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	Fc	Ft .05	Ft .01
Main Effects	1233.817	25	49.353			
M	20.617	11	1.874	2.21 *	1.79	2.24
A	957.950	7	136.850	161.56 **	2.01	2.64
T	246.638	3	82.213	97.06 **	2.60	3.78
Ñ	8.612	4	2.153	2.54 *	2.37	3.32
2-Way Interactions	483.841	215	2.521			
M A	65.100	77	.845	.997 NS	1.28	1.41
M Ñ	56.925	44	1.294	1.53 *	1.40	1.59
A T	317.912	21	15.139	17.87 **	1.57	1.87
A Ñ	43.904	28	1.568	1.85 **	1.46	1.69
3-Way Interactions	510.071	755	1.093			
M A Ñ	367.358	308	1.193	1.41 **	1.11	1.15
A T Ñ	142.713	84	1.699	2.00 **	1.28	1.41
Explained	2227.729	587	2.614			
Residual	1128.238	1332	.847			
Total	3355.967	1919				

1920 cases were processed.
0 cases (.0 pct) were missing.

M, meses del año; A, fenotipos de resistencia a aminoglicósidos; T, tipo de muestra clínica; Ñ, años de estudio.

7. Resultados

Tabla 2. Comparación entre medias^a del número de *P.aeruginosa* aisladas a partir de 3 tipos de muestras clínicas.

	URO	VR	H	O
1991				
PaeAn	.00	.00	.08	.08
PaeGn	.83 ^b mnopqr	.17	.42	1.00
PaeTb	.33 qr	.17	.25	.25
PaeAnGn	.33 qr	.00	.08	.58
PaeAnTb	.17 r	.00	.00	.08
PaeGnTb	.08 r	.25	.00	.42
PaeM	.92 mnopqr	1.42^c hijklmnopq	.92	2.33 fghi
PaeS	2.17 ghijk	2.25 fghij	1.08 lmnopqr	2.17 ghijk
1992				
PaeAn	.08 r	.00	.08	.08
PaeGn	.50 pqr	.75 mnopqr	.67 nopqr	2.08 ghijkl
PaeTb	.00	.25 qr	.00	.42 qr
PaeAnGn	.17 r	.17	.08	1.00
PaeAnTb	.00	.00	.00	lmnopqr .17
PaeGnTb	.08 r	.17	.17	.08
PaeM	.83 mnopqr	1.58 hijklmnop	.42	3.58 cd
PaeS	2.42 efgh	.83 mnopqr	.50 pqr	3.42 cde
1993				
PaeAn	.08 r	.08	.00	.08
PaeGn	.67 nopqr	.50 pqr	.42	2.25 fghij
PaeTb	.00	.00	.17	.17
PaeAnGn	.92 mnopqr	.25	.25	.83
PaeAnTb	.00	.00	.00	mnopqr .00
PaeGnTb	.33 qr	.00	.08	.08
PaeM	1.92 ghijklm	1.67 hijklmno	1.17	3.25 cdef
PaeS	2.92 cdefg	.92 mnopqr	.58 opqr	3.83 bc

7. Resultados

Tabla 2. Comparación entre medias del número de *P.aeruginosa* aisladas a partir de 3 tipos de muestras clínicas. (Continuación)

	URO	VR	H	O
1994				
PaeAn	.00	.00	.00	.00
PaeGn	.33 qr	.08 r	.17 r	1.17 jklmnopqr
PaeTb	.17 r	.00	.00	.17 r
PaeAnGn	.08 r	.00	.08 r	.58 opqr
PaeAnTb	.00	.00	.08 r	.25 qr
PaeGnTb	.17 r	.25 qr	.08 r	.33 qr
PaeM	1.42 hijklmnopq	.92 mnopqr	.50 pqr	4.58 ab
PaeS	2.42 efgh	1.58 hijklmnop	.75 mnopqr	3.42 cde
1995				
PaeAn	.00	.00	.00	.17 r
PaeGn	.42 qr	.08	.00	.42 qr
PaeTb	.08 r	.00	.00	.08 r
PaeAnGn	.08 r	.00	.00	.67 nopqr
PaeAnTb	.08 r	.00	.00	.25 qr
PaeGnTb	.25 qr	.42 qr	.00	.83 mnopqr
PaeM	1.08 lmnopqr	1.42 hijklmnopq	.58 opqr	1.75 hijlmn
PaeS	2.25 fghij	.58 opqr	.33 qr	5.08 a

^a Prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ($F_c=2.00^{**}$; $F_{t_{1332},0.01}=1.41$).

^b La media de los contrastes es un promedio de 12 repeticiones. Medias de los contrastes con las mismas letras no presentan diferencia significativa.

^c En negritas, medias con mayor número de aislados.

URO, urocultivo; VR, vías respiratorias; H, hemocultivos y O, otras muestras clínicas.

Fig. 45. AJUSTE FACTORIAL PARA 18 TIPOS DE MUESTRAS CLINICAS

*** ANALISIS DE VARIANCIA ***
HIERARCHICAL sums of squares

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	Fc		Ft .05	Ft .01
Main Effects	5851.072	28	208.967				
Ñ	22.967	4	5.742	1.53	NS	2.39	3.36
A	2546.178	7	363.740	97.44	**	2.03	2.69
T	3281.928	17	193.055	51.72	**	1.67	2.04
2-Way Interactions	5666.205	187	30.300				
Ñ T	482.933	68	7.102	1.90	**	1.32	1.47
A T	5183.272	119	43.557	11.67	**	1.28	1.42
Explained	11517.277	215					
Residual	1881.301	504	3.732				
Total	13398.578	719					

720 cases were processed.
0 cases (.0 pct) were missing.

M, meses del año; A, fenotipos de resistencia a aminoglicósidos; T, tipo de muestra clínica; Ñ, años de estudio.
La interacción triple no fue significativa.

Tabla 3. Comparación de medias^a del número de *P.aeruginosa* aisladas a partir de 18 tipos de muestras clínicas.

	ABS	Bx	CTR	ExU	ExV	Sx	LA	LCR	LD	LS	LP	LB	LU	OTI	OTR	URO	VR	H
PaeAn	.20 ^b n	.00	.00	.00	.00	.20 n	.40 mn	.00	.00	.00	.00	.20 n	.00	.00	.40 mn	.40 mn	.20 n	.20 n
PaeGn	3.20 ghijk lmn	.20 n	.60 mn	.00	.00	1.60 klmn	.80 lmn	.00	1.60 klmn	.00	.40 mn	1.80 klmn	.00	.00	6.00^c defghi	6.60 defg	3.80 ghijk lmn	4.40 fghij kl
PaeTb	.60 mn	.00	.00	.00	.00	.20 n	.00	.00	.40 mn	.00	.20 n	.60 mn	.00	.00	.60 mn	1.40 klmn	1.00 lmn	1.00 lmn
PaeAnGn	1.40 klmn	.20 n	.20 n	.00	.00	1.20 lmn	.20 n	.00	1.60 klmn	.00	.20 n	1.40 klmn	.00	.00	2.60 hijk lmn	3.80 ghijk lmn	1.00 lmn	1.00 lmn
PaeAnTb	.80 lmn	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.20 n	.00	.00	.80 lmn	.60 mn	.00	.20 n
PaeGnTb	1.00 lmn	.40 mn	.00	.00	.00	.20 n	.00	.20 n	.00	.00	.00	.60 mn	.00	.20 n	1.80 klmn	2.20 klmn	2.60 hijk lmn	.60 mn
PaeM	5.00 efgh ijk	2.80 hijk lmn	2.60 hijk lmn	.20 n	.20 n	5.80 dfghij	2.20 klmn	.00	.80 lmn	.00	.60 mn	3.20 ghijk lmn	.20 n	.00	13.40 bc	14.80 bc	16.80 b	8.60 d
PaeS	7.60 def	1.80 klmn	1.20 lmn	.00	.00	6.20 defgh	1.00 lmn	.20 n	4.00 ghij klm	.80 lmn	.00	2.60 hijk lmn	.00	.00	17.40 b	29.20 a	14.80 bc	8.00 de

^aPrueba de comparación múltiple de medias de Duncan ($F_c=11.67^{**}$; $F_{t_{504;0.01}}=1.42$).

^bLa media de los contrastes es un promedio de 5 repeticiones. Medias de los contrastes con las mismas letras no presentan diferencia significativa.

ABS, absceso; Bx, biopsia; CTR, catéter; ExU, exudado uretral; ExV, exudado vaginal; Sx, secreción de herida; LA, líquido de ascitis; LCR, líquido cefalorraquídeo; LD, líquido de diálisis; LS, líquido sinovial; LP, líquido pleural; LB, líquido biliar; LU, líquido duodenal; OTI, secreción ótica; OTR, otras muestras clínicas; URO, urocultivo; VR, vías respiratorias y H, hemocultivos.

^cEn negritas, medias con mayor número de aislados.

Fig. 46. AJUSTE "SPLIT-SPLIT PLOT" PARA ESTACIONES DEL AÑO

*** ANALISIS DE VARIANCIA ***
HIERARCHICAL sums of squares

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	Fc	.05	Ft	.01
SSP	6769.900	639					
SP	5280.400	159					
PP	4567.500	31					
T	739.913	3	246.638				
A	2873.850	7	410.550	9.04 **	2.49	3.65	
ξ_a AxT	953.738	21	45.416				
\tilde{N}	25.838	4	6.459	1.57 NS	2.46	3.51	
$\tilde{N} \times A$	131.712	28	4.704	1.14 NS	1.57	1.89	
ξ_b Tx \tilde{N} + ($\tilde{N} \times A$)	395.350	96	4.118				
E							
ExA	39.788	3	13.263	4.31 **	2.62	3.83	
Ex \tilde{N}	68.563	21	3.265	1.06 NS	1.60	1.92	
Ex $\tilde{N} \times A$	45.025	12	3.752	1.21 NS	1.78	2.23	
	387.625	84	4.615	1.50 **	1.32	1.47	
ξ_c TXE + T (AxE) + T ($\tilde{N} \times E$) + T (Ex $\tilde{N} \times A$)	1108.499	360	3.079				

640 cases were processed.
0 cases (.0 pct) were missing.

PP, parcela principal; SP, subparcela; SSP, sub-subparcela; E, estaciones del año; A, fenotipos de resistencia a aminoglicósidos; \tilde{N} , años de estudio; T, tipo de muestra clínica.

ξ , error experimental tipo a (parcela principal), b (subparcela) y c (sub-subparcela) para las interacciones dadas.

Tabla 4. Comparación entre medias^a del número de *P.aeruginosa* aisladas en distintas estaciones del año.

	1991	1992	1993	1994	1995
PaeAn					
INVIERNO	.25 ^b q	.25 q	.25 q	.00	.25 q
PRIMAVERA	.00	.25 q	.50 pq	.00	.25 q
VERANO	.00	.25 q	.00	.00	.00
OTOÑO	.25 q	.00	.00	.00	.00
PaeGn					
INVIERNO	2.00 jklmnopq	2.50 hijklmnopq	1.50 lmnopq	2.25 ijklmnopq	.50 pq
PRIMAVERA	1.75 klmnopq	1.25 mnopq	2.25 ijklmnopq	1.00 nopq	1.75 klmnopq
VERANO	1.75 klmnopq	4.25^c defghijk lmnop	3.75 efghijklmnopq	.75 opq	.00
OTOÑO	1.75 klmnopq	4.00 defghijk lmnopq	4.00 defghijk lmnopq	1.25 mnopq	.50 pq
PaeTb					
INVIERNO	1.00 nopq	.00	.00	.50 pq	.00
PRIMAVERA	.75 opq	.50 pq	.25 q	.25 q	.00
VERANO	.25 q	1.00 nopq	.75 opq	.00	.50 pq
OTOÑO	1.00 nopq	.50 pq	.00	.25 q	.00
PaeAnGn					
INVIERNO	.25 q	.75 opq	.75 opq	.75 opq	.00
PRIMAVERA	.50 pq	1.00 nopq	2.25 ijklmnopq	.25 q	.50 pq
VERANO	.75 opq	2.00 jklmnopq	1.25 mnopq	.50 pq	1.50 lmnopq
OTOÑO	1.50 lmnopq	.50 pq	2.50 hijklmnopq	.75 opq	.25 q
PaeAnTb					
INVIERNO	.00	.00	.00	.50 pq	.50 pq
PRIMAVERA	.00	.25 q	.00	.25 q	.25 q
VERANO	.50 pq	.00	.00	.00	.00
OTOÑO	.25 q	.25 q	.00	.25 q	.25 q

Tabla 4. Comparación entre medias^a del número de *P.aeruginosa* aisladas en distintas estaciones del año. (Continuación)

	1991	1992	1993	1994	1995
PaeGnTb					
INVIERNO	.25 q	.50 pq	.50 pq	.25 q	.75 opq
PRIMAVERA	.25 q	.50 pq	.75 opq	1.00 nopq	.50 pq
VERANO	1.50 lmnopq	.25 q	.00	1.00 nopq	2.75 fghijklmnopq
OTOÑO	.25 q	.25 q	.25 q	.25 q	.50 pq
PaeM					
INVIERNO	3.75 efghijklmnopq	3.75 efghijklmnopq	6.25 bcdefgh	5.50 cdefghijk	2.50 hijklmnopq
PRIMAVERA	2.00 jklmnopq	5.75 cdefghij	2.50 hijklmnopq	6.00 bcdefghi	4.75 defghijklmn
VERANO	7.75 abcd	6.00 bcdefghi	8.50 abc	6.50 abcdefg	2.25 ijklmnopq
OTOÑO	3.25 efghijklmnopq	3.75 efghijklmnopq	6.75 abcdefg	4.25 defghijk lmnop	5.00 defghijklm
PaeS					
INVIERNO	5.25 cdefghijkl	6.75 abcdef	4.25 defghijk lmnop	5.00 defghijklm	6.25 bcdefgh
PRIMAVERA	2.00 jklmnopq	5.25 cdefghijkl	7.00 abcde	4.50 defghijklmno	6.50 abcdefg
VERANO	6.25 bcdefgh	4.75 defghijklmn	7.00 abcde	10.00 a	5.75 cdefghij
OTOÑO	9.50 ab	4.75 defghijklmn	6.50 abcdefg	5.00 defghijklm	6.25 bcdefgh

^aPrueba de comparación múltiple de medias de Duncan ($F_c=1.50^{**}$; $F_{t_{360;0.01}}=1.47$).^bLa media de los contrastes es un promedio de 4 repeticiones. Medias de los contrastes con las mismas letras no presentan diferencia significativa.^cEn negritas, medias con mayor número de aislados.

7. Resultados

Tabla 5. Diversidad Genética de las Subpoblaciones de *P.aeruginosa*.

Subpoblación	ADNs Analizados	Intervalo de Amplicones (centenas de pb)	No. de Centenas	Media del No. de Bandas	Bandas Dobles (pb x 10 ²)
PaeS	11	200 a 5000	36	10.3	3, 4, 6, 7, 8, 10
PaeGn	27	300 a 7600	48	10.1	4, 5, 6, 7 ^a , 8, 9, 10, 14
PaeTb	3	200 a 1700	16	9.3	4, 6, 7, 8
PaeAnGn	14	200 a 7500	37	10.4	3, 4, 5, 6, 7 ^b , 8, 10, 14
PaeAnTb	2	400 a 1400	11	7.5	4, 6, 7
PaeGnTb	11	300 a 3000	25	8.4	4, 6, 7 ^c , 8
PaeMNR	10	300 a 7600	28	7.6	4, 7, 13
PaeMES	24	200 a 6500	45	12.1	4, 6, 7 ^d , 8, 10, 14
PaeMED	100	200 a 2600	31	7.8	4 ^e , 6, 7, 8, 10, 14
PaeMM	60	300 a 2100	21	7.0	4 ^f , 6, 7, 8, 10
Total	202	200 a 7600	65	9.0	

Bandas dobles en 700 pb: a, 59.2%; b, 57.1%; c, 36.4%; d, 41.7%.
Bandas dobles en 400 pb: e, 62% y f, 75%.

Tabla 6. Prevalencia de las Subpoblaciones de *P.aeruginosa* en Muestras Clínicas.

Subpoblación	Tipo de Muestra / n(%)					
	n	VR	URO	H	L	O
PaeS	11	0	3(30)	0	2(20)	6(54.5)
PaeGn	27	6(22.2)	10(37)	2(7.4)	1(3.7)	8(29.6)
PaeTb	3	0	2(66.6)	0	1(33.3)	0
PaeAnGn	14	0	3(21.4)	2(14.3)	5(35.7)	4(28.6)
PaeAnTb	3	0	2(100)	0	0	0
PaeGnTb	11	1(9)	5(45.5)	1(10)	0	4(36.4)
PaeMNR	10	1(10)	3(30)	0	1(10)	4(40)
PaeMES	24	5(21)	5(21)	1(4)	2(8)	10(41.6)
PaeMED	98	24(24.5)	20(20.4)	11(11.2)	11(11.2)	32(32.6)
PaeMM	56	15(25)	10(17.8)	4(7.1)	9(16)	21(37.5)
Total	200	37(18.5)	54(27)	18(9)	23(11.5)	67(33.5)

VR, vías respiratorias; URO, vías urinarias; H, hemocultivos; L, líquidos; O, otras muestras clínicas.

7. Resultados

Tabla 7. Resistencia Global de las Subpoblaciones de *P.aeruginosa* a 19 Antibióticos. Evaluado sobre el análisis de 87 códigos distintos. (Ver también la Fig. 49)

Subpoblación	n	CODIGO		DE	RESISTENCIA / n(%)		Todos los Códigos Distintos	Uno a dos códigos repetidos ^c
		173777 ^a	177777 ^a	1737773 ^b	1177733 ^b	1117323 ^b		
PaeS	11	0	0	0	0	0	X	-
PaeGn	27	0	0	0	0	8(29.6)	-	X
PaeTb	3	0	0	0	0	0	X	-
PaeAnGn	14	0	0	0	4(28.6)	0	-	X
PaeAnTb	2	0	0	0	0	0	X	-
PaeGnTb	11	0	0	0	0	0	-	X
PaeMNR	10	2(20)	0	1(10)	0	0	-	-
PaeMES	21	6(28.6)	6(28.6)	0	0	0	-	-
PaeMED	94	54(57.4)	17(18.1)	21(22.3)	0	0	-	X
PaeMM	55	35(63.6)	10(18.2)	17(31)	0	0	-	X
Total	193	62(32.1)	23(11.8)	22(11.4)	4(2.1)	8(4.1)		

^a Código para 16 Antibióticos

^b Código para 19 Antibióticos

^c Repetición de otros códigos distintos a los predominantes.

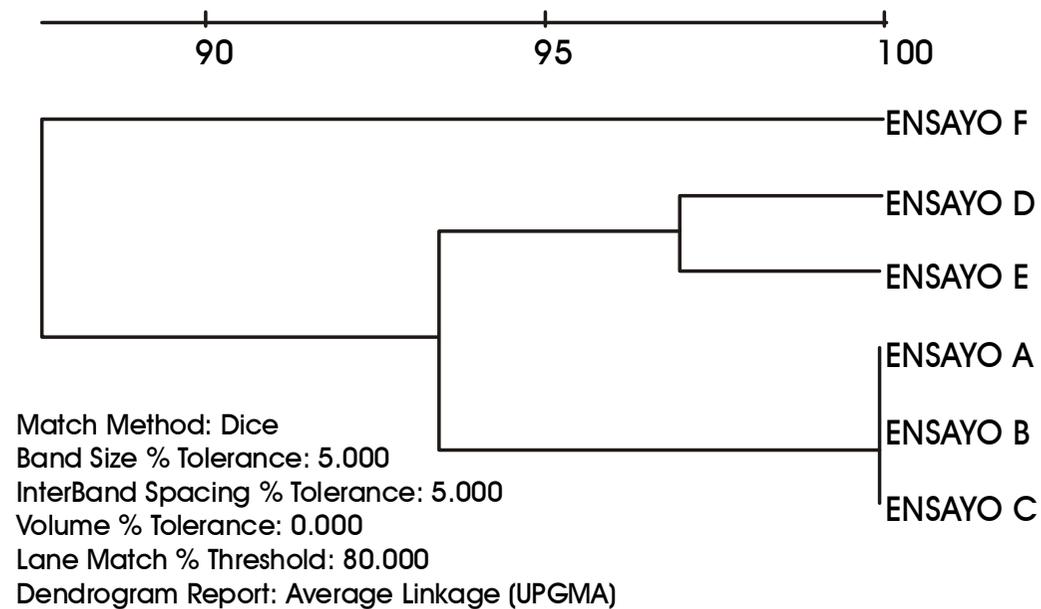


Fig. 47. Dendrograma de reproducibilidad que muestra la agrupación de los patrones polimórficos del RAPD dados por la cepa tipo *K.pneumoniae* ATCC 13833. Los ensayos A, B y C muestran un coeficiente de similitud de 100%; D y E de 97.5% y F de 87.5% con respecto a los demás. (Ver Fig. 26)

DENDROGRAMA GENERAL Población Clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

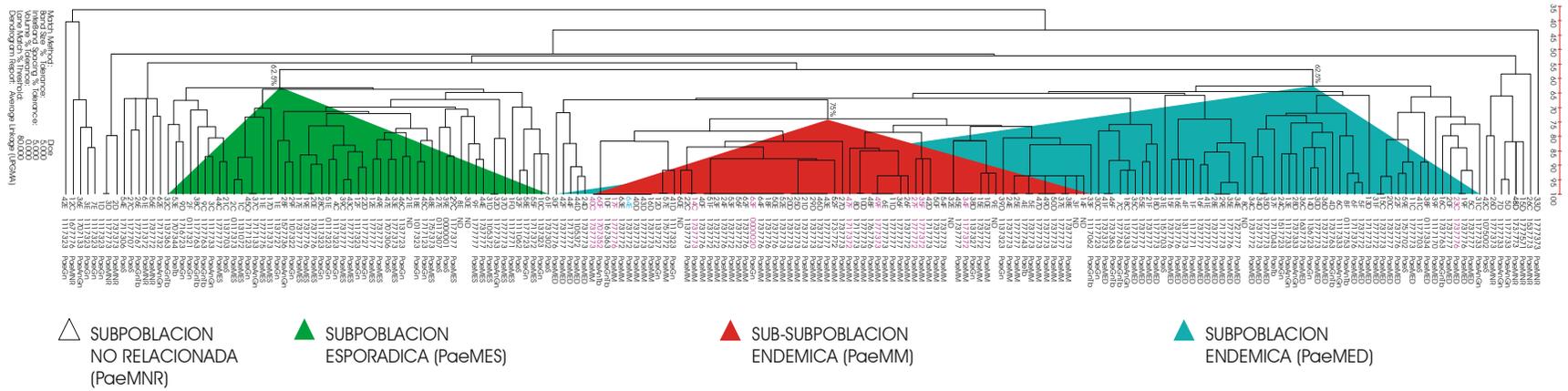


Fig. 48. Asociación por UPGMA de los patrones polimórficos del RAPD en 202 aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Los triángulos en color indican las subpoblaciones bacterianas. En el vértice superior de cada triángulo se indica el coeficiente de similitud entre los aislados de esa subpoblación. En la primera columna el número de aislado y el año indicado por las letras C, 1992; D, 1993; E, 1994 y F, 1995. En la segunda columna el código numérico para 19 antibióticos y en la tercera columna el fenotipo de resistencia a aminoglicósidos según el tipo de subpoblación de *Pseudomonas*.

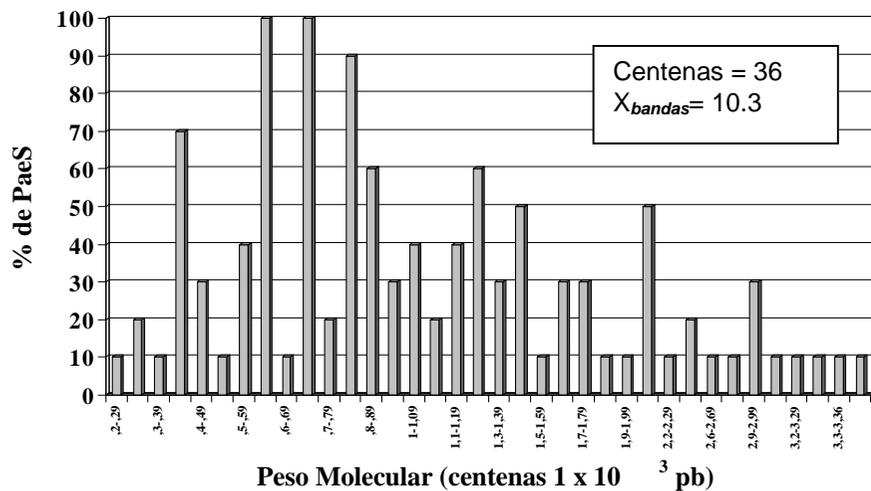
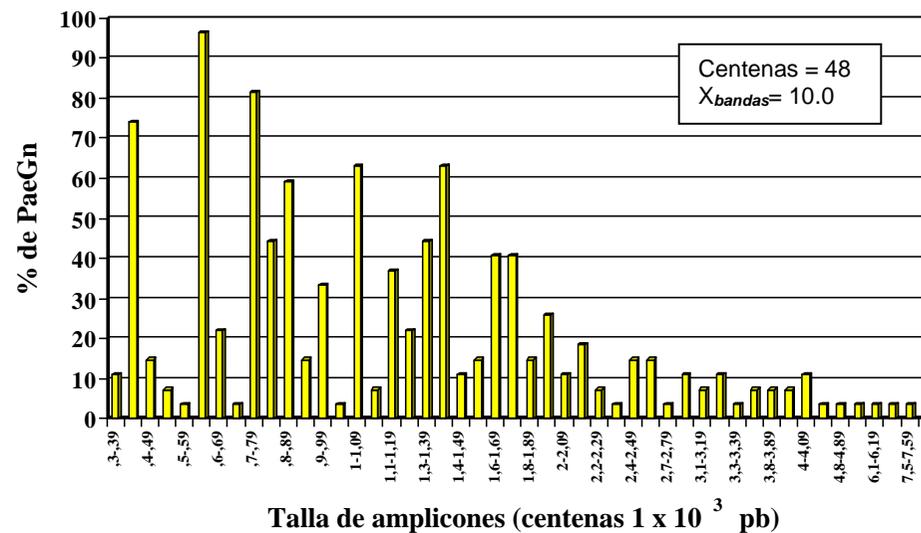


Fig. 50. Distribución de la Diversidad Polimórfica en la Subpoblación PaeS (11 ADNs analizados).

Fig. 51. Distribución de la Diversidad Polimórfica en la Subpoblación PaeGn (27 ADNs analizados).



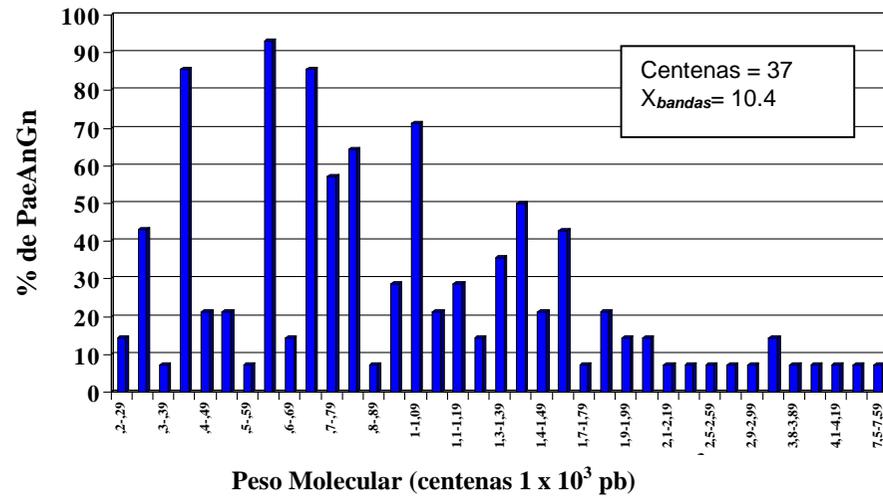


Fig. 52. Distribución de la Diversidad Polimórfica en la Subpoblación PaeAnGn (14 ADN's analizados).

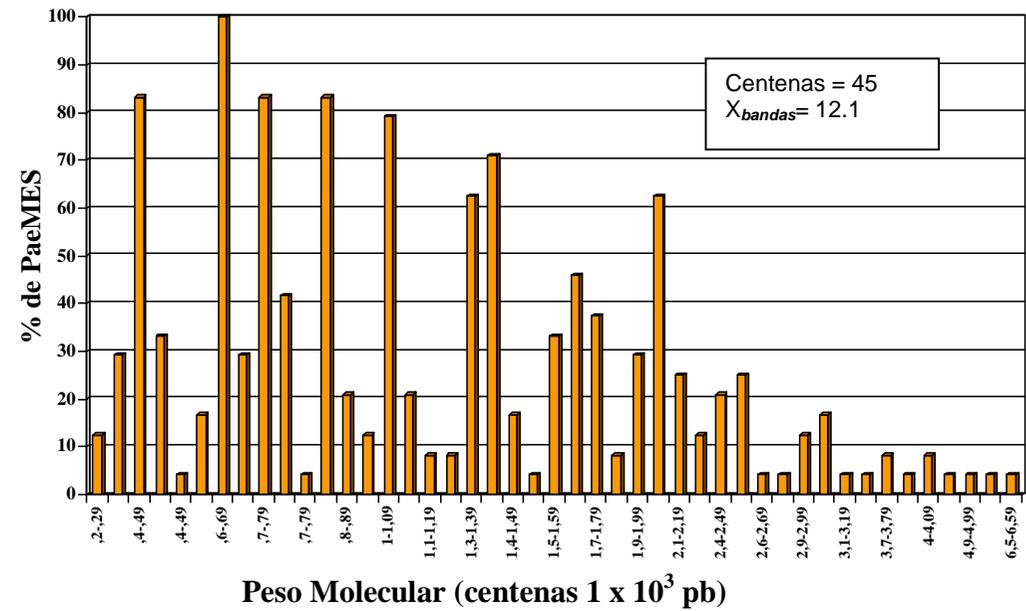


Fig. 53. Distribución de la Diversidad Polimórfica en la Subpoblación PaeMES (24 ADN's analizados).

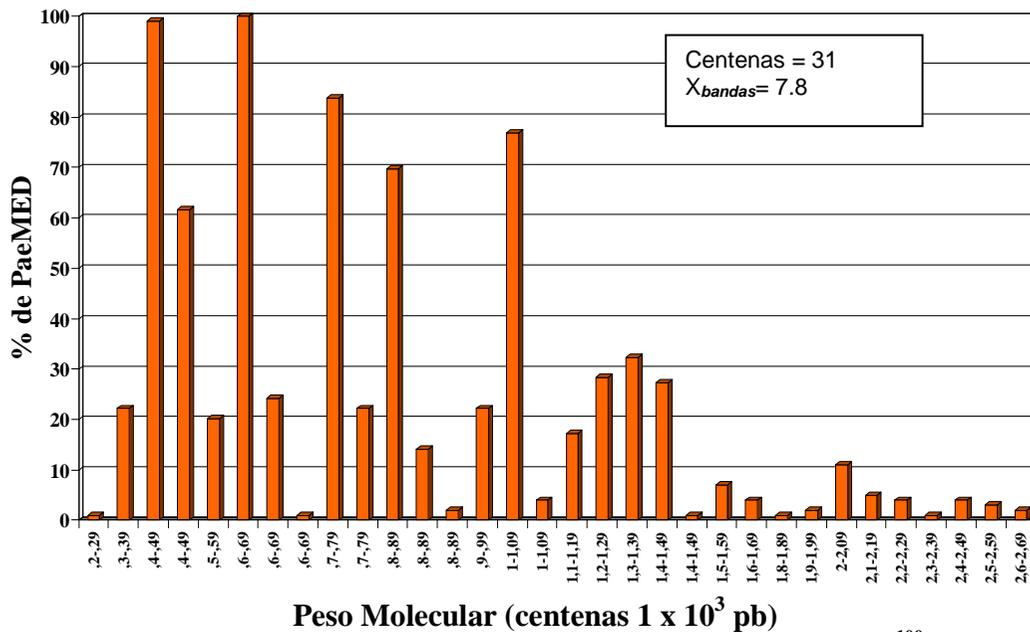


Fig. 54. Distribución de la Diversidad Polimórfica en la Subpoblación Paemed (100 ADNs analizados).

Peso Molecular (centenas 1 x 10³ pb)

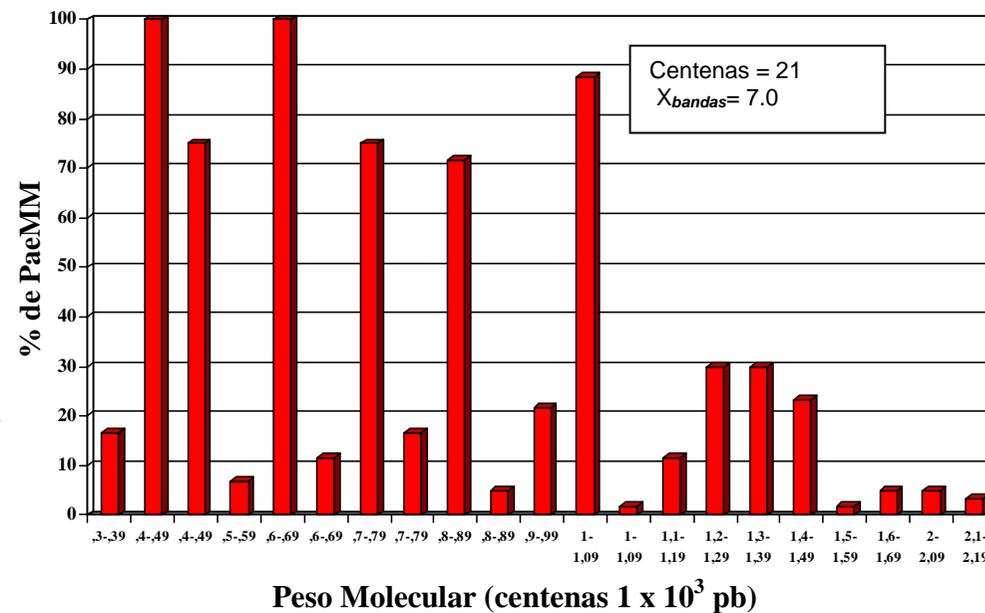


Fig. 55. Distribución de la Diversidad Polimórfica en la Subpoblación Paemm (60 ADNs analizados).

Peso Molecular (centenas 1 x 10³ pb)

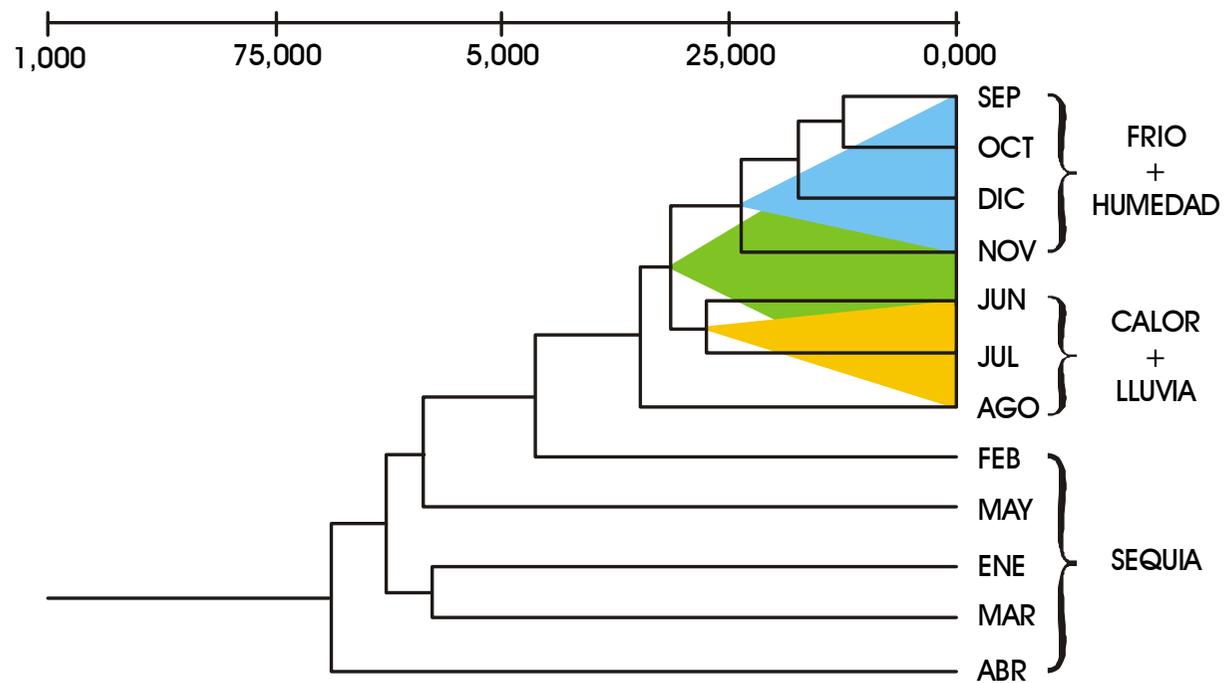


Fig. 56. Asociación por UPGMA de los patrones polimórficos del RAPD en 202 aislados de *P.aeruginosa* para meses del año. Triángulo ▲ agrupa a las pseudomonas menos diversas durante las estaciones de verano ▲ y otoño ▲.

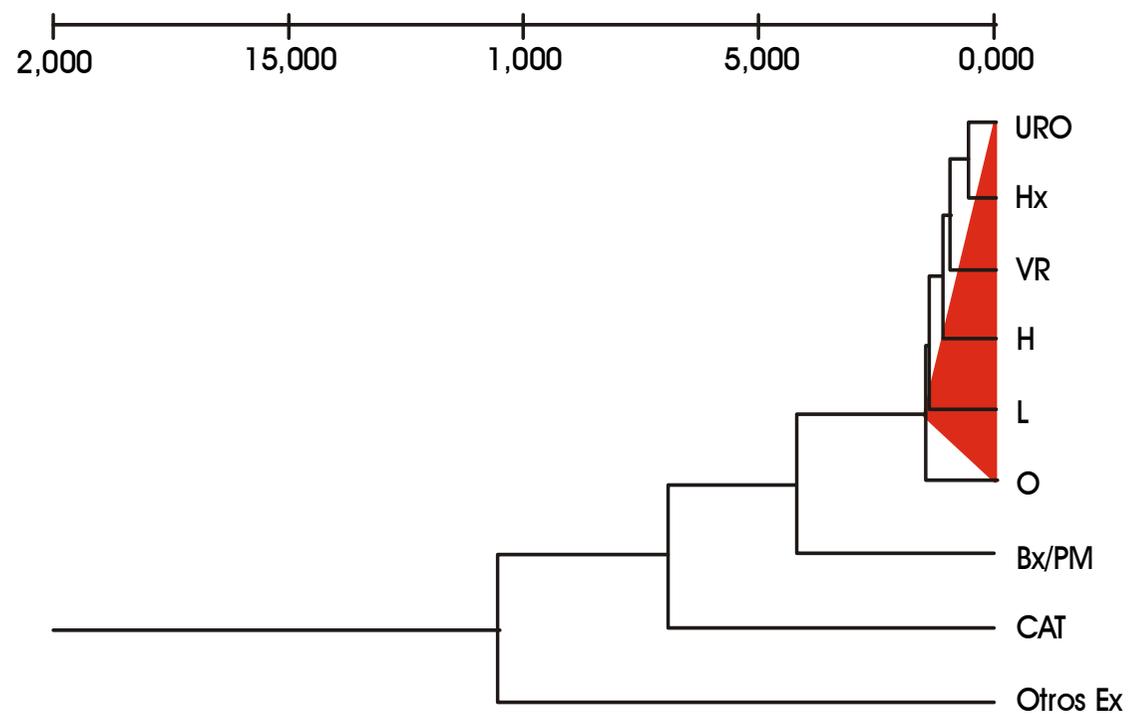


Fig. 57. Asociación por UPGMA de los patrones polimórficos del RAPD en 202 aislados de *P.aeruginosa* para muestras clínicas. Triángulo ▲ agrupa las muestras clínicas con las pseudomonas más agresivas. Las líneas libres representan aquellas muestras con pseudomonas silvestres. URO, urocultivos; Hx, heridas y abscesos; VR, vías respiratorias; H, hemocultivos; L, líquidos; O, otras muestras clínicas; Bx/PM, biopsias y post-mortem; CAT, catéteres; Otros Ex, otro tipo de exudados (p. ej. exudado uretral).

8. DISCUSION

8.1 Estudio Retrospectivo.

8.1.1 Brotes y Subpoblaciones Fenotípicas. En este estudio no sólo se detectaron los brotes por *P.aeruginosa*, al manifestar una prevalencia alta durante ciertos meses del año, sino que se comprobaron con el modelo matemático a un nivel de significancia estadística del 0.01. En ninguno de los estudios previos hechos en el Instituto se reporta diferencia estadística en los brotes observados.^{8, 32, 33, 60, 84} Así mismo, los diseños estadísticos permitieron conocer el predominio de los fenotipos de resistencia a aminoglicósidos dentro de esos mismos brotes, revelando tres subpoblaciones importantes: PaeGn, PaeS y PaeM; las dos últimas subpoblaciones tuvieron una muy alta prevalencia, con 8 y 6 aislados/mes respectivamente, lo cual refleja las oportunidades que tales subpoblaciones tuvieron durante ese lapso para colonizar distintos nichos clínicos y causar infección posterior. Dentro de los fenotipos de resistencia a aminoglicósidos mencionados, PaeM será el objeto de mayor interés durante esta discusión, debido a que son *Pseudomonas* con cualidades biológicas especiales. PaeM fue causante de 8 brotes considerables de 1991 a 1995 (7.1.1); sin embargo, si se observan las figuras 5 a 9, da la impresión de que PaeM se mantiene en forma constante durante los 12 meses de los 5 años estudiados, es decir, que en realidad nunca deja de aislarse en por lo menos una muestra clínica. También se podría decir que PaeM prevaleció en forma semejante a la de PaeS, de la cual se esperaría que muchos de sus miembros no sean endémicos.

8.1.2 Prevalencia en Muestras Clínicas. Con respecto a la prevalencia en muestras clínicas, PaeM predominó en aquellas provenientes de vías respiratorias (Fig. 11; Tabla 6), lo que sugiere que esta subpoblación multirresistente se haya seleccionado en pacientes que cursan con neumonía. Por su parte, PaeS predominó en vías urinarias al igual que PaeGn. El análisis detallado sobre 18 tipos de muestras clínicas muestra que igualmente PaeM y PaeS abundaron también en sangre, heridas quirúrgicas y abscesos (Figs. 11 y 12; Tabla 3), lo que pone de manifiesto la capacidad de dispersión de *P.aeruginosa* para colonizar e infectar nuevos sitios del

3. Discusión □

cuerpo humano. Este hallazgo está fundamentado con el análisis del polimorfismo genético utilizando el programa Herramientas para el Análisis Genético de Poblaciones (TFPGA). El estudio del dendrograma obtenido para observar este fenómeno denota que las *Pseudomonas* menos polimórficas (PaeM) tienen la misma oportunidad de invadir uno u otro nicho clínico (Fig. 57). Kiewitz *et al*⁵² reporta en un análisis molecular con 19 aislados clínicos y ambientales de *P.aeruginosa*, que las variantes clonales mostraron secuencias idénticas en el acervo de genes conservados y que las clonas predominantes se distribuyeron tanto en lugares clínicos como ambientales indistintamente; miembros de la misma clona fueron recuperados del suelo así como del pulmón de pacientes con fibrosis quística, siendo indistinguibles en su genotipo y características quimiotaxonómicas y, que además, son equivalentes en cuanto a sus características de virulencia y ambientales. Wolfgang *et al*¹⁴⁴ realizó estudios con el genoma de *P.aeruginosa* con el fin de establecer si las variaciones encontradas en los aislados pueden estar asociadas con un tipo particular de infección. Para esto micro arreglos del ADN genómico total de 18 cepas obtenidas de pacientes infectados y del ambiente fueron analizados. Wolfgang demostró que los genomas de *P.aeruginosa* tanto clínicos como ambientales son altamente conservados. Sus resultados sustentan el modelo básico de conservación de un genoma grande, lo que permite que *P.aeruginosa* pueda habitar un amplio intervalo de ambientes a la vez de conferirle la habilidad de causar infección en humanos; así mismo, menciona que la marcada conservación de los genes que codifican proteínas asociadas con la virulencia indica que la mayoría de las cepas, sin importar su origen, poseen los mecanismos de patogenicidad básicos para causar una amplia variedad de infecciones humanas. La Tabla 3 corrobora lo mencionado por Kiewitz en donde se observó que tanto las cepas sensibles como las multirresistentes a los aminoglicósidos se aislaron de la mayoría de las muestras clínicas, aunque en forma más abundante en vías respiratorias y de orina, sin embargo, existe una diferencia notoria en cuanto a la prevalencia en las distintas muestras clínicas entre éstas dos subpoblaciones y las demás subpoblaciones (mono o birresistentes a los aminoglicósidos). Es de esperar que las PaeS con un genotipo RAPD altamente polimórfico predominen con respecto a las demás subpoblaciones más resistentes a los aminoglicósidos, pues aunque, según los autores mencionados refieran que las *P.aeruginosa* guardan un alto porcentaje

8. Discusión □

de secuencias conservadas en su genoma, no todas tendrán la misma oportunidad de adquirir secuencias de resistencia que les permitan tolerar con mayor eficacia ambientes hostiles, pues en forma natural no todos los ambientes colonizables por *P.aeruginosa* contendrán antibióticos en gran número y diversidad, como los pueden presentar los ambientes clínicos mencionados. Ahora bien, para el caso de las PaeM con un polimorfismo RAPD reducido se esperaría que mostraran una prevalencia semejante a la de las demás subpoblaciones de *P.aeruginosa* resistentes. No obstante, no solo sobrepasan en mucho a éstas últimas sino que, además, se equiparan en número con las PaeS. Se puede suponer por tanto que aunque todas las *P.aeruginosa* tengan una alta capacidad de colonizar cualquier ambiente según refiere Wolfgang, aquellas que habiten ambientes clínicos hostiles y que contengan genes de resistencia serán capaces de tolerar eficazmente tales condiciones, pudiendo colonizar nuevos huéspedes, causándoles infección y, manteniendo así, brotes continuos en áreas hospitalarias específicas.

Ya se mencionó anteriormente que PaeM predominó en muestras de vías respiratorias. En la Tabla 2 se muestra que en 3 de los 5 años estudiados PaeM prevaleció en este tipo de muestras en comparación con PaeS quien abundó en muestras de orina en 4 de 5 años. Es probable que la severidad de las condiciones en este nicho clínico de su huésped, debida a la presencia de antibióticos suministrados en forma especial (por ej. administración de An utilizando nebulizador) puedan propiciar eventos de adquisición de genes de resistencia con mayor frecuencia que en otro lugar anatómico de su huésped por lo que muy probablemente PaeM se esté seleccionando en este ambiente clínico.

8.1.3 Distribución Estacional. Otro fenómeno interesante es la distribución estacional observada en PaeM y en especial en PaeMM. Los datos estadísticos muestran que esta sub-subpoblación abunda especialmente durante los meses cálido-lluviosos y frío-húmedos. La gráfica tridimensional (Fig. 15) define una clara elevación con el mayor número de aislados, que abarca los meses de junio a octubre durante los 5 años, indicando, además, brotes considerables en algunos meses fríos, mientras que PaeS muestra una distribución homogénea con picos prominentes en cualquiera de los meses del año (Fig. 14). En distintos reportes se refieren cambios o tendencias estacionales sobre ciertas especies bacterianas procedentes de distintos

3. Discusión □

nichos: acuáticos marinos y de agua dulce, suelo, simbioses y patógenos, entre otros.^{22, 105} Krog y Hoiby⁵⁵ reportan en uno de sus estudios clínicos acerca de la infección y colonización estacional por *P.aeruginosa* en pacientes daneses con fibrosis quística, que tales eventos inician en la mayoría de los pacientes durante la estación de invierno; así mismo, el virus sincicial respiratorio también muestra una distribución estacional causando infecciones en invierno. Ellos concluyen que, al parecer, las infecciones provocadas por el virus sincicial respiratorio están estrechamente asociadas con las exacerbaciones de los síntomas pulmonares en este tipo de pacientes, haciendo más favorable el medio para la colonización y posterior infección por *P.aeruginosa*. Con respecto a la estacionalidad manifestada por PaeMM, hay que señalar que tal conducta es exclusiva de esta sub-subpoblación y recordar que PaeMM forma parte de la población clínica de *P.aeruginosa* del Instituto, la cual se compone de otras subpoblaciones de *P.aeruginosa* y, que en el caso de haber evaluado la tendencia estacional de la población en general, no se hubiese encontrado tal distribución, debido a la gran heterogeneidad de los aislados en cuanto a su procedencia geográfica y epidemiológica. La caracterización de las subpoblaciones en base a su fenotipo de resistencia a los aminoglicósidos permitió detectar con fineza este fenómeno estacional.

Por otra parte, Krog y Hoiby han investigado *Pseudomonas* bien caracterizadas con relación al tipo de pacientes estudiados, aisladas de muestras procedentes del tracto respiratorio y que en forma particular están asociadas a los eventos infecciosos del virus para causar brotes durante los meses fríos. En nuestro caso, PaeMM fue aislada de una gran diversidad de muestras clínicas (Tabla 3), prevaleciendo igualmente en vías respiratorias, y fueron recuperadas de pacientes con patologías diversas, pero en su mayoría, pacientes inmunocomprometidos y tratados con múltiples antimicrobianos ¿Cuáles son entonces los factores que causan que PaeMM prolifere durante las estaciones del año mencionadas? Con base en las referencias citadas se propone la siguiente hipótesis: la variación de las condiciones ambientales como la humedad, luz y temperatura son factores que pueden afectar la proliferación bacteriana aumentando o disminuyendo su número.^{22, 48} Así mismo, es probable que PaeMM estando en condiciones desfavorables habitando superficies inertes (tubos plásticos, metales, concreto, etc.), soluciones antisépticas caducas, jabones y detergentes, o estando en condiciones menos

3. Discusión □

desfavorables como pueden ser en las manos del personal de salud, proliferen durante las condiciones de humedad y temperatura más convenientes,⁴⁹ aumentando así la probabilidad de colonizar a un huésped (usualmente un paciente inmunocomprometido) y causar infección. La abundancia de la progenie permitirá de alguna forma mayor poder de dispersión para alcanzar nuevos nichos clínicos (otros pacientes dentro de las mismas áreas hospitalarias). Por último, con respecto a lo que concluyen Kroig y Hoiby, no es probable que la estacionalidad de PaeMM esté asociada a algún patógeno, virus o bacteria, ya que los pacientes de nuestro Instituto presentan diversas patologías y, si bien PaeMM prevaleció en muestras del tracto respiratorio, las neumonías causadas por estas *Pseudomonas* no se asocian a algún tipo de enfermedad respiratoria previa sino, específicamente, al estado inmune y tratamientos previos, como ya se mencionó.

Por otro lado, existe la posibilidad de que esta conducta estacional en realidad pueda estar asociada al ingreso de los nuevos estudiantes de medicina que eventualmente cada seis meses (inscripciones en los meses de enero y julio) llegan al Instituto para realizar sus prácticas clínicas en distintas unidades hospitalarias. La falta de experiencia en el manejo del paciente y las posibles fallas en seguir de manera estricta las normas establecidas por el Comité de Control de Infecciones, pudo haber causado la dispersión de PaeMM en distintos nichos clínicos, colonizando e infectando a nuevos huéspedes. No obstante, se han mencionado dos períodos de inicio de cursos, un mes que corresponde a la estación de invierno y otro a la de verano, por tanto, se esperaría que PaeMM abundara no sólo en los meses de la estación cálida sino también en los meses fríos. Sin embargo, solamente en los meses de diciembre de 1993 y enero de 1994 se encuentra un brote con un número de *P.aeruginosa* significativo (Tabla 1). Así mismo, si se observan los resultados del “Split-split plot” para estaciones del año y se comparan las medias de los contrastes de la estación de invierno también significativas únicamente en 1993 y 1994, con las de la estación de verano de esos mismos años, se observa que el número de aislados es mayor en esta última estación (Tabla 4).

8.2 Análisis Molecular.

8.2.1 Análisis Molecular con UPGMA. Por otra parte, el análisis genético global de los 202 aislados de *P.aeruginosa* utilizando UPGMA muestra una distribución poblacional muy particular, en donde se observa que la subpoblación de PaeM se subdivide en tres grandes subpoblaciones: la primera, se ha referido como PaeMNR, ya que en esta se han agruparon todos aquellos aislados en general más sensibles a otros antibióticos y con un patrón polimórfico escasamente relacionado con la subpoblación endémica (cs<55%) y que ocasionalmente son recuperados en el Instituto, posiblemente estos aislados proceden de distintos hospitales del D.F., así como de otros estados de la República Mexicana. La segunda subpoblación denominada esporádica (PaeMES), probablemente se compone por organismos que se aíslan eventualmente en el Instituto y que podrían aportar nuevos genes ⁵ a la subpoblación endémica (PaeMED). Se trata de *Pseudomonas* que comienzan a formar parte de la subpoblación más resistente y que, según las condiciones ambientales presentadas por sus nichos ecológicos, podrían adquirir genes de resistencia incluidos en plásmidos o segmentos genómicos vía transferencia horizontal, ^{5, 81} de hecho, Wolfgang también refiere que existen segmentos variables en el genoma de *P.aeruginosa* que podrían funcionar como sitios de integración de material genético por transferencia horizontal. Los resultados en la Figura 53 muestran la gran diversidad polimórfica de esta subpoblación (45 centenas de pb), lo que la hace muy diferente a PaeMED, aún a pesar de presentar multirresistencia a los aminoglicósidos. La tercera subpoblación es la referida como PaeMED, constituida por el mayor número de microorganismos. Suponemos que PaeMED incluye a las *Pseudomonas* que habitan ordinariamente áreas hospitalarias específicas. Las PaeMED no sólo son resistentes a los aminoglicósidos, sino también a otros antibióticos como cefalosporinas de tercera y cuarta generación, quinolonas, carbapenémicos y sulfas. ⁵³ Es muy probable que los miembros de PaeMED hayan desarrollado y mantenido diversos mecanismos de resistencia como son la modificación de proteínas de membrana externa, ^{69, 126, 145, 147} adquisición de material extracromosomal como plásmidos y transposones, ^{67, 99} el desarrollo de bombas de eflujo, ^{53, 141} la expresión de diversas enzimas modificadoras de antibióticos como las β -lactamasas y transferasas muy probablemente contenidas en plásmidos, ^{59, 114, 115,}

8. Discusión □

^{116, 132} así como, la modificación de las proteínas de unión a penicilina ^{53, 112} y la formación de biopelículas que son una barrera eficaz para contrarrestar la acción del antibiótico. ^{2, 28, 30, 127, 128}

8.2.2 Polimorfismo Obtenido por RAPD. El número de bandas arrojado por el RAPD de los aislados de PaeMED fue mucho menor a pesar de que se analizaron 100 genomas respecto a los sólo 24 de PaeMES (Figs. 53 y 54; Tabla 5). Así mismo, el análisis genético por UPGMA reveló que la gran subpoblación endémica contenía una sub-subpoblación con un $cs=75\%$, de variedades clonales ⁹⁸ de *Pseudomonas* (PaeMM), muchas de ellas idénticas (Fig. 48), más resistentes que su subpoblación progenitora. Si bien la diversidad polimórfica de PaeMED (Fig. 54), con 31 centenas de pb (100 genomas analizados), es ya bastante reducida, PaeMM tuvo sólo 21 centenas de pb a partir del análisis de 60 genomas (Fig. 55). El análisis de resultados muestra que esta sub-subpoblación tuvo el más bajo número de bandas comparado aún con aquellas subpoblaciones como PaeTb y PaeAnTb, de las cuales se analizaron 3 y 2 genomas respectivamente, pero con una media del número de bandas de 9.3 y 7.5 mayor a la de PaeMM con tan sólo 7.0. (Tabla 5). Con estas características genotípicas de PaeMM, una primera propuesta para tratar de explicar tales observaciones podría estar relacionada a que el iniciador 1283 encontró múltiples secuencias homólogas en el ADN total de aquellas subpoblaciones más polimórficas como lo fueron PaeS (Fig. 50), PaeGn (Fig. 51), PaeGnAn (Fig. 52) e inclusive en aquellas que fueron resistentes a los aminoglicósidos como PaeMES (Fig. 53) y PaeMNR (Tabla 5). Mientras que en el caso de PaeMM las posibles secuencias homólogas a 1283 fueron escasas amplificándose un número menor de bandas.

Clarck y Lanigan ¹⁹ refieren que el hecho de que muchos iniciadores de 10 nucleótidos produzcan 5 o más bandas en forma individual a partir del ADN genómico bacteriano, sugiere un acoplamiento imperfecto frecuente, debido a que tales bandas son generadas cuando hay amplificación de algún sitio del ADN en donde el iniciador no se acopló perfectamente, o bien, otra posibilidad de obtener tal número de bandas se debe a que el genoma bacteriano está altamente estructurado. Clarck y Lanigan refieren en un estudio de polimorfismo del ADN eucariótico en 8 macacos utilizando RAPD con 22 iniciadores de 10 nucleótidos c/u, una media de 11

3. Discusión □

bandas/individuo. Aunque son varios los iniciadores ensayados y además se trabaja con ADN eucariótico, la media del número de bandas obtenido por estos autores es muy cercano a la media del número de bandas que en los 202 aislados de *P.aeruginosa* se obtuvo utilizando un sólo iniciador ($\mu=9$) y más cercano aún, a la media del número de bandas de aquellas subpoblaciones más polimórficas como PaeS con $\mu=10.3$; PaeGn, $\mu=10.1$; PaeAnGn, $\mu=10.4$ y PaeMES, $\mu=12.1$.

Williams *et al*¹⁴³ refieren que en genomas pequeños como el del bacteriófago λ de 48.5 Kb la amplificación por RAPD no es tan confiable debido a que existe una homología escasa por parte del iniciador, mientras que en el caso de genomas como el de *Haemophilus influenzae* de 1.5 Mb la amplificación por RAPD muestra ser más reproducible. La alta complejidad de estos genomas bacterianos ofrecerá mayor número de sitios blanco con mejor complementariedad al iniciador, permitiendo la amplificación de un número mayor de bandas, en comparación con aquellos genomas de baja complementariedad. PaeMM mostró un número escaso de bandas en comparación al resto de las subpoblaciones fenotípicas; según Sepencer y cols.¹²⁵ refieren que *P.aeruginosa* presenta un genoma de 6 Mb, un genoma aún más complejo en comparación con el de *H.influenzae*, por lo tanto, esperaríamos que a partir del ADN total de PaeMM se encontrase un número mayor de secuencias complementarias a 1283, en principio, muy semejante al resto de las subpoblaciones. Por otra parte, como ya se mencionó, la mayoría de los aislados de PaeMM mostraron un fenotipo de resistencia a diversos antibióticos y existe una alta concordancia entre un número de bandas escaso (mínimo de 4 y un máximo de 7) y la resistencia a un gran número de antibióticos (Fig. 48). Sepencer también menciona que entre las secuencias genéticas de aislados estudiados de *P.aeruginosa* (2 aislados de pacientes con fibrosis quística y un aislado ambiental) y las secuencias de la cepa control PAO1, existen fragmentos anónimos (aproximadamente 10%) y, que el contenido de G+C de tales secuencias es significativamente menor al contenido de G+C de PAO1 yendo de 50% a 54% para las cepas estudiadas contra el 67% en PAO1. El autor menciona que al parecer existen "islas cepa-específicas" como el modo primario de variación entre cepas de *P.aeruginosa* y que tal material genético se adquiere vía transferencia horizontal de otras especies bacterianas. En realidad desconocemos por qué se amplifican pocas bandas a partir del ADN total de

8. Discusión □

las PaeMM, no obstante, con base en lo mencionado por Williams, Clarck y Lanigan es probable que el ADN extracromosomal adquirido por PaeMM se componga, efectivamente, de un porcentaje menor del contenido de G+C ofreciendo de alguna manera un número menor de sitios blanco al iniciador 1283. Como hemos mencionado anteriormente, son necesarios nuevos estudios dirigidos a conocer las propiedades del material extracromosomal como plásmidos que pudiesen contener tales aislados, así como, realizar estudios más detallados sobre el genoma de PaeMM.

8.3 Probables Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos en PaeMM.

Ahora bien, con respecto a las características genóticas y fenotípicas en cuanto a la resistencia, tan especiales de PaeMM se puede suponer que tales variedades clonales hayan adquirido un fenotipo multirresistente debido a la adquisición de ADN extranjero con varios genes de resistencia.^{79, 80} Ya se mencionó que varios grupos de investigadores refieren que la transferencia horizontal es uno de los mecanismos más comunes en la adquisición de genes de resistencia,^{81, 100} no obstante, existen otros mecanismos como el aumento de la tasa de mutación sobre subpoblaciones especiales. Las cepas de *P.aeruginosa* sensibles a los aminoglicósidos pueden adquirir la resistencia en alta frecuencia. Se sabe que *P.aeruginosa* PAK muestra una alta frecuencia de resistencia *in vitro* a neomicina de 200 µg/mL tan alta como 10^{-6} en comparación con la tasa de mutación espontánea de 10^{-8} células de *Escherichia coli*/generación. La alta frecuencia de conversión de resistencia a aminoglicósidos será el resultado de la razón de hipermutabilidad de *P.aeruginosa*.^{5, 82, 138} Estudios posteriores podrían dar a conocer si existe este fenómeno en nuestros aislados.

Con respecto a la transferencia de secuencias genéticas, es probable que las subpoblaciones de *P.aeruginosa* que habitaron ambientes con una fuerte presión selectiva provocada por el uso de múltiples antibióticos, como tal vez sucedió en PaeMED, mantuvieron una relación biológica muy estrecha entre miembros de su misma especie y con bacterias relacionadas evolutivamente como lo son aquellas de la familia Enterobacteriaceae,⁸¹ que de igual manera forman parte de la gran comunidad intrahospitalaria de poblaciones bacterianas infecciosas.^{94, 107, 119}

8. Discusión □

8.3.1 Enzimas Modificadoras de Aminoglicósidos. Shaw y cols.^{113, 114, 115} han realizado estudios detallados de genética molecular en los genes de resistencia a los aminoglicósidos y refieren que las cepas resistentes a estos antibióticos han aparecido a causa de la adquisición de genes contenidos en plásmidos que codifican para las enzimas modificadoras de aminoglicósidos, así mismo, refiere que estos genes están asociados a transposones, los cuales permiten la rápida diseminación de la resistencia entre especies cercanas como pudo haber sucedido entre *P.aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos de nuestro Instituto. En otra referencia del mismo autor que comprende múltiples publicaciones¹¹⁶ se describen una gran variedad de genes que codifican para proteínas modificadoras de aminoglicósidos, cada una de estas enzimas hace que *P.aeruginosa* muestre un patrón particular de resistencia a estos antibióticos. PaeMM mostró un fenotipo de resistencia a los tres aminoglicósidos An, Gn y Tb; según los reportes de Shaw, tal fenotipo no es común en *P.aeruginosa*, sin embargo, podría presentarse por la aparición de enzimas mixtas modificadoras de aminoglicósidos. Los genes más comunes son los de la familia *aac* que expresan acetil-transferasas y dentro de ellos una clase especial que presentan un mecanismo bifuncional son los genes *aac(6')-aph(2'')* que codifican para la enzima AAC(6')-APH(2'') (acetil-transferasa-fosfotransferasa) que confiere resistencia a Gn, Tb, An, dibekacina, netilmicina, 2'-N-etilnetilmicina, isepamicina, 5-episisomicina y fortimicina. Shaw y cols. refieren que este gene se encuentra principalmente en cocos grampositivos como estafilococos y enterococos portados en el plásmido pIP800 y en el transposon Tn4001, no obstante, Kettner *et al*⁵¹ han reportado la existencia de este tipo de enzimas en bacterias gramnegativas. Por otro lado, cabe la posibilidad de que las PaeMM expresen enzimas ANT(4')-II (adeniltransferasas) que confieren resistencia a Tb, An, isepamicina y otros aminoglicósidos con grupos 4'-hidroxil. Se reporta que este tipo de enzimas contenidas en el plásmido pMG77 fue primeramente observado en *P.aeruginosa*, posteriormente se encontró en *E.coli*, *Citrobacter* spp, *Klebsiella* spp y *Serratia* spp¹¹⁵, así mismo, Shaw y cols. refieren que en las secuencias corriente abajo del gene *ant(4')-IIa* se encontraron secuencias nucleotídicas homólogas al gene *aac(3)-IIIa*, sugiriendo que *ant(4')-IIa* puede estar insertado en la parte terminal del gene *aac(3)-IIIa* o que ambos genes están

8. Discusión □

recombinados con el mismo elemento genético. El perfil de resistencia de *aac(3)-IIIa* incluye la resistencia a Gn y Tb además de otros aminoglicósidos, pero no a An.

8.3.2 Resistencia a los Aminoglicósidos por Impermeabilidad de la Membrana.

Por su parte Westbrook y cols.¹⁴¹ refiere que la resistencia a los aminoglicósidos en *P.aeruginosa* es generalmente mediada por enzimas modificadoras del antibiótico o bien por un mecanismo de resistencia por impermeabilidad de la membrana. Este tipo de resistencia por impermeabilidad se describió originalmente en aislados de *P.aeruginosa* que no exhibieron una actividad de acetilación o adenilación; tales cepas son ahora caracterizadas como panaminoglicósidos resistentes en la ausencia de las enzimas modificadoras, no obstante, refiere el autor, que la resistencia por impermeabilidad en aislados clínicos de *P.aeruginosa* es menos frecuente que la causada por las enzimas modificadoras. En contraste, la resistencia por impermeabilidad es predominante (>90%) en aislados de pacientes con fibrosis quística. Westbrook reporta que los experimentos realizados en su estudio identificaron un gran número de genes que están potencialmente involucrados en la resistencia a los aminoglicósidos y sugiere que el fenotipo de resistencia asociado a impermeabilidad es multifactorial. En estudios más recientes Wang *et al*,¹³⁸ refieren que la impermeabilidad de la membrana es el mayor factor que contribuye a la resistencia multidroga en aislados clínicos de *P.aeruginosa* y que muchos aislados de esta especie son menos sensibles a los aminoglicósidos debido principalmente a la impermeabilidad de su membrana externa, llegando a manifestar en muchas ocasiones altos niveles de resistencia a estos antibióticos. La resistencia a los aminoglicósidos también se atribuye a la bomba de eflujo MexXY específica para aminoglicósidos. En la actualidad un fenómeno llamado “resistencia adaptativa a los aminoglicósidos” se ha descrito en *P.aeruginosa* tanto *in vitro* como *in vivo*. Wang menciona que cualquiera que sea el nivel de resistencia a los aminoglicósidos, aumenta gradualmente después del tratamiento directo con los mismos u otros agentes. Los mecanismos moleculares de tal insensibilización son totalmente desconocidos. Por último, Wang refiere que por arriba del 90% de los aislados de *P.aeruginosa* tienen un tipo de resistencia por impermeabilidad demostrada por una combinación de mutaciones o cambios en la estructura de porinas, lipopolisacáridos

8. Discusión □

y mecanismos de resistencia secundarios tales como el eflujo multidroga dependiente de energía y la acción de las enzimas modificadoras de antibióticos.

8.3.3 Bombas de Eflujo en *P.aeruginosa*. Ya se mencionó que la baja permeabilidad de las porinas de la membrana externa en *P.aeruginosa* juega un papel importante en el alto nivel de resistencia a los antibióticos. *P.aeruginosa* presenta transportadores que bombean estos compuestos al exterior de la célula. El principal mecanismo de transporte de antibióticos al exterior conocido en *P.aeruginosa* es el sistema de eflujo multidroga llamado “resistencia por nodulación-división”⁷³ RND (por sus siglas en inglés). El sistema RND contribuye significativamente a la resistencia intrínseca o adquirida a los antimicrobianos y, es un sistema único de transportadores encontrados en bacterias gramnegativas.^{75, 78} Los transportadores RND bombean una amplia variedad de sustratos, incluyendo todos los antibióticos lipofílicos y anfifílicos, agentes quimioterapéuticos, inhibidores metabólicos tales como la cerulenina, colorantes, detergentes (SDS, Tritón X-100 y sales biliares), así como solventes. Tales compuestos pueden tener carga electroquímica positiva, negativa o ser neutros. En contraste, se sabe que los aminoglicósidos los cuales son hidrofílicos alrededor de toda su molécula, son una clase rara de antibióticos que no son excretados. Se propone que los transportadores RND capturan a aquellos sustratos que se han insertado parcialmente en la bicapa lipídica, lo que explica que las bombas RND catalizan el eflujo de los agentes que no cruzan la membrana plasmática para entrar al citoplasma, como es el caso de carbenicilina.⁷⁸

Generalmente los transportadores RND están asociados con proteínas de enlace y con canales de la membrana externa. Los sistemas RND se componen de tres proteínas intrínsecas en la bicapa fosfolipídica, una proteína embebida en la membrana interna, cuya función es reconocer a la droga y transportarla hacia el exterior, a través de un canal formado entre dos proteínas embebidas a su vez en la membrana externa, conectadas a la primera por medio de proteínas de fusión membranal y que rodean tal conexión, todo esto en el espacio periplásmico^{75, 78}.

Existen varios sistemas de eflujo multidroga que *P.aeruginosa* puede expresar, por ejemplo MexAB-OprM se expresa constitutivamente en cepas silvestres y contribuye en forma natural a la resistencia de β -lactámicos, inhibidores de β -lactamasas, quinolonas, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol,

8. Discusión □

novobiocina y eritromicina. De igual manera, MexAB-OprM podría conferir altos niveles de resistencia a cepas clínicas.^{56, 101} Por su parte, el sistema MexCD-OprJ y MexEF-OprN son homólogos a MexAB-OprM pero no se producen en forma constitutiva. Se sabe que confieren resistencia a cefalosporinas de cuarta generación, cloranfenicol y fluoroquinolonas principalmente.⁷⁸

Más recientemente se ha reconocido en *P.aeruginosa* el sistema de eflujo multidroga MexXY-OprM el cual es portado en un plásmido, este sistema de eflujo confiere resistencia a fluoroquinolonas.⁷³ MexXY-OprM es codificado por el operon regulador-represor MexZ que es inducido por antibióticos como cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y kanamicina los cuales actúan sobre el ribosoma. No obstante, MexXY no tienen que ver con la resistencia a aminoglicósidos y cloranfenicol como sucede con otras especies bacterianas *E.coli* y *Synechocystis* sp.^{73, 75}

8.3.4 Mecanismos de Resistencia a Otros Antibióticos. La sub-subpoblación de PaeMM no solo fue resistente a los aminoglicósidos mencionados, sino que en general, mostraron resistencia a muchos más antibióticos en comparación con su subpoblación progenitora PaeMED y más aún, con el resto de las subpoblaciones estudiadas. PaeMM mostró los códigos de resistencia 173777' en 63.6% y 177777' en 18.2% (Tabla 7), con estos perfiles 29.1% fueron resistentes a imipenem; 60% a cloramfenicol; 92.7% a cefalosporinas incluyendo ceftazidima; 96.4% a norfloxacin y ciprofloxacino y, 100% a trimetoprim-sulfametoxazol, nitrofurantoina y tetraciclina. Por último, 67.3% (37/55) fueron sensibles a piperacilina.

Con respecto a la resistencia a imipenem Livermore⁵⁹ reporta que imipenem induce fuertemente una β -lactamasa cromosomal clase C de *P.aeruginosa* y que tal enzima hidroliza al imipenem lentamente, así mismo, refiere que la resistencia de imipenem en *P.aeruginosa* puede elevarse debido a la pérdida vía mutación de la porina D2 que forma poros de la membrana externa y es permeable a carbapenémicos pero no a penicilinas ni a cefalosporinas. Livermore concluye que la resistencia a imipenem en *P.aeruginosa* requiere de la β -lactamasa cromosomal, así como la pérdida de la porina D2, sin embargo, al parecer la pérdida de D2 no causa resistencia sobre meropenem un carbapenémico más estable. En estudios más recientes Bonfiglio *et al*¹³ menciona que *P.aeruginosa* es resistente intrínsecamente

3. Discusión □

a muchos antibióticos y que además puede desarrollar resistencia durante el tratamiento. Investigando los mecanismos de resistencia a los β -lactámicos, Bonfiglio refiere que probablemente existió en varios aislados la producción de β -lactamasa cromosomal clase C. Dentro de estos aislados hubo una gran parte resistente a carbenicilina con una susceptibilidad reducida a ceftazidima, penicilinas, ciprofloxacino y amikacina lo cual es netamente considerado como un patrón típico de “resistencia intrínseca” probablemente causada por la reducción en la permeabilidad y/o al eflujo multidroga en la membrana externa. Otro grupo de *Pseudomonas* mostraron fuerte hidrólisis a nitrocefín y se inhibieron por clavulanato y no por cloxacilina. El perfil de inhibición y alta resistencia a carboxipenicilinas y a ureidopenicilinas sugiere la presencia de β -lactamasas secundarias expresadas por genes contenidos en plásmidos. Cepas de *P.aeruginosa* con las enzimas PSE-1, PSE-4 y PSE-2 fueron más resistentes a carbenicilina, piperacilina y ticarcilina-clavulanato. Por su parte Marchandin y cols.⁶⁷ refieren recientemente que se han encontrado β -lactamasas de espectro extendido en *P.aeruginosa* confirmando resistencia a cefalosporinas de espectro extendido, ellos reportan el hallazgo de una β -lactamasa de espectro extendido del tipo TEM-24 en un aislado de *P.aeruginosa*. En este estudio se confirma la expansión de una sola cepa de *Enterobacter aerogenes* produciendo TEM-24. El gene portado en un plásmido que codificaba para tal proteína fue transferido de *E.aerogenes* a otros bacilos gramnegativos incluyendo *Proteus mirabilis* y *P.aeruginosa*. También se encontró que el gene *bla*_{TEM-24} se portaba en un plásmido de 180 Kb el cual contenía, además, genes adicionales que le permitían una alta capacidad de transferencia. Marchandin concluye que el estudio demuestra el intercambio de genes que codifican para β -lactamasas de espectro extendido de Enterobacteriaceae a *P.aeruginosa* para originar cepas de *P.aeruginosa* multirresistentes. Partridge y cols.⁸⁶ refieren que muchos de los integrones clase 1, uno de los más predominantes en cepas clínicas y ambientales multirresistentes, están presentes en plásmidos multidrogas resistentes y que tiempo atrás estos integrones se han distribuido en un gran número de especies bacterianas, previo a la introducción de terapéuticos humanos y, posteriormente, pasaron a patógenos humanos. Partridge reporta un integrón clase 1, In28 incluido en el transposón Tn1403 recuperado de una cepa de *P.aeruginosa*, el transposón se localizó en un plásmido IncP2 RPL11 el cual confiere resistencia a

8. Discusión □

gentamicina, carbenicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloramfenicol y mercurio. Un mapeo reciente del Tn1403 indica la presencia del gene *blaP1* (PSE-1) entre otros genes de resistencia a antibióticos, aunque no se encontró resistencia a sulfonamidas. Partridge menciona que el integrón In28 es semejante a los integrones clase 1 del grupo In4 que pueden ser encontrados en una variedad de plásmidos, transposones, así como, cromosoma bacteriano, además de tener la cualidad de cambiar su localización relativamente fácil.

Como se puede apreciar, son múltiples los factores que pueden conferir resistencia a diversos antibióticos en PaeMM, independientemente de los aminoglicósidos, incluyendo la desrepresión mutacional de β -lactamasas secundarias mediada por plásmidos o transposones, la pérdida de la porina D2, la presencia de bombas de eflujo al igual que la impermeabilidad de la membrana externa, siendo estos dos últimos factores los que confieren la llamada “resistencia intrínseca” en *P.aeruginosa*.¹³ Como un buen principio para estudiar los factores de resistencia en PaeMM sería conveniente investigar sobre el perfil de plásmidos y los genes de resistencia que contienen y, así mismo, comparar con los posibles plásmidos contenidos en otras poblaciones de bacterias gramnegativas nosocomiales frecuentes en nuestro Instituto como podrían ser: *Acinetobacter* spp, *E.coli*, *K.pneumoniae*, entre otras, con el fin de esclarecer algunos aspectos de la adquisición y transferencia de genes de resistencia y así, mejorar o corregir las estrategias en la aplicación de antibióticos, además de realizar vigilancia temprana previa o durante los brotes.

8.4 Clonalidad de *P.aeruginosa*.

Otro aspecto interesante está relacionado a la estructura poblacional mostrada por los aislados clínicos de *P.aeruginosa*. Con base en el análisis hecho a partir del dendrograma general se puede señalar que probablemente existen múltiples clonas endémicas dentro de la sub-subpoblación de PaeMM (triángulo rojo, Fig. 48), y no sólo una, capaz de colonizar e infectar a un gran número de paciente, causando así múltiples brotes. Pirnay *et al*⁹⁰ refieren que la observación de clonas en muchas poblaciones bacterianas permite asumir que las bacterias se reproducen clonalmente. Se sabe que *Neisseria meningitidis* despliega una estructura epidémica. En el reporte de Pirnay y colaboradores se utilizaron cuatro métodos de tipificación

3. Discusión □

aplicados en 73 aislados de *P.aeruginosa*; no hubo concordancia entre los métodos de tipificación explicando que la causa se debió a la presencia de eventos de recombinación múltiples. Pirnay refiere que las diferencias entre los dendrogramas obtenidos a partir de la amplificación de los fragmentos restringidos (AFLP) se debe a que la diversidad de secuencias es causada por el polimorfismo nucleotídico, así mismo, las diferencias en el patrón de los fragmentos restringidos es el resultado principalmente de inserciones y/o deleciones; no obstante, el dendrograma obtenido a partir de la combinación de los resultados de los cuatro métodos, agrupó 7 complejos clonales con un $cs=80\%$, los aislados incluidos en tales complejos provenían de regiones geográficas y ecológicas diferentes, sugiriendo que existen altas tasas de migración y una versatilidad nutricional remarcada adquirida a través de la recombinación o algún otro mecanismo evolutivo.

Como se ha mencionado con anterioridad las 202 *P.aeruginosa* estudiadas en nuestro Instituto se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del Depto. de Infectología, la mayoría de ellas fueron aislados provenientes de distintas muestras clínicas obtenidas de un mismo o diferente paciente (ver 6.2.1) y sólo un aislado se obtuvo de un endoscopio. En este trabajo no se incluyeron aislados ambientales de *P.aeruginosa* de agua, suelo, soluciones antisépticas caducas o de algún otro sitio hospitalario. No obstante, el aislado del endoscopio mostró un polimorfismo genético y un fenotipo de resistencia idéntico a otros 8 aislados provenientes de un mismo o diferente paciente (número y letra denotados en azul, Fig. 48). Así mismo, se puede observar en la Fig. 48 que la mayoría de grupos de aislados idénticos de *P.aeruginosa* están agrupados a un $cs=75\%$ e igualmente se puede apreciar que el triángulo rojo conteniendo a las PaeMM está insertado en el triángulo azul que incluye a todas aquellas *P.aeruginosa* que se han designado como endémicas. A diferencia de Pirnay *et al* un solo método de genotipificación utilizando RAPD conjuntamente con el patrón fenotípico de resistencia a 19 antibióticos mostró que dentro de la población clínica de *P.aeruginosa* existen clonas estrechamente relacionadas. Muy posiblemente el estudio hecho únicamente con cepas clínicas permitió detectar con mayor facilidad la presencia de múltiples clonas y fenotipos de resistencia idénticos. Pirnay *et al* también refieren que la habilidad de identificar agrupaciones de aislados con un conjunto de datos idénticos, provenientes de distintos países y hábitats en un período

8. Discusión □

de tiempo, es evidencia de una estructura clonal de *P.aeruginosa*. En nuestro caso se obtuvieron múltiples agrupaciones de aislados idénticos en el lapso de los 5 años estudiados (triángulo rojo, Fig. 48) por lo que deducimos que el dendrograma obtenido a partir de las huellas digitales del RAPD muestra una estructura clonal de la población clínica de *P.aeruginosa* que ordinariamente habitan áreas específicas del INCMNSZ.

8.5 Reproducibilidad del RAPD y Correlación con Otros Análisis.

Se ha referido la utilidad del RAPD para la genotipificación y la determinación de la estructura poblacional de *P.aeruginosa*. En este estudio el RAPD fue útil para estudiar la población clínica de *P.aeruginosa* existiendo correlación entre los análisis de UPGMA, TFPGA y el análisis estadístico retrospectivo. Estudios previos reportan la eficacia del RAPD para genotipificar diversas especies bacterianas,^{6, 35, 37, 130} estreptomicetos³ y hongos;^{14, 27, 123} la caracterización de genes con cualidades relevantes, como genes que confieren resistencia a enfermedades en plantas¹³⁴ e identificación y diferenciación de parásitos.⁷⁷ Así mismo, con el RAPD se han realizado diversos estudios epidemiológicos para genotipificar *P.aeruginosa*.^{40, 41, 43, 50, 58, 65, 72, 74, 76, 135, 142} Los autores concuerdan en que el RAPD es capaz de discriminar entre aislados relacionados de una misma especie,^{6, 15} así como proporcionar huellas digitales idénticas para aquellos aislados clonales.^{38, 41} En la mayoría de los estudios comparativos el RAPD muestra alta concordancia con tecnologías moleculares como la electroforesis en gel con campo pulsado,^{35, 104} FLRP e hibridación tipo Southern-blot,⁶³ ribotipificación, HPLC,¹³⁰ punto isoeléctrico de pioverdina²¹ e inclusive mostró mayor poder de discriminación que la electroforesis multilocus.^{14, 137} En este estudio, el RAPD confirma, al igual que los estudios referidos, su capacidad de discriminar entre los aislados de *P.aeruginosa*, agrupando a aquellos con un polimorfismo idéntico (Fig. 48).

Los ensayos previos variando las concentraciones del volumen de reacción y amortiguador,¹² MgCl₂,⁸⁵ ADNpol-*Taq*,¹¹¹ iniciador¹⁴³ y ADNbco⁴² (Figs. 21-24) teniendo en cuenta las consideraciones de Ellsworth *et al*,²⁶ y Venugopal *et al*,¹³⁴ con respecto a la reproducibilidad de la técnica, así como las condiciones de amplificación programadas en el termociclador^{88, 109} (Fig. 20), permitieron ajustar las

8. Discusión □

condiciones óptimas de la reacción para obtener resultados reproducibles con bandas definidas y un buen poder de resolución (Figs. 26-42), ofreciendo resultados confiables durante el análisis genético computarizado.

8.5.1 Huellas Digitales del RAPD y Resistencia a 19 Antibióticos. Los resultados de las huellas digitales obtenidos para las 202 cepas de *P.aeruginosa* en el análisis general mostraron correlación entre los conglomerados más estrechamente relacionados, no sólo con el fenotipo de resistencia a los tres aminoglicósidos, sino también con la sensibilidad global a 19 antibióticos. El 32.1% de los miembros de PaeM (divididos en las tres subpoblaciones PaeMNR, PaeMES y PaeMED) mostró un código 173777' idéntico para 16 antibióticos (Tabla 7). Al considerar en forma particular a estos subgrupos se observó que 22.3% de los aislados de PaeMED tuvieron un código de susceptibilidad 1737773 idéntico a 19 antibióticos y dentro de ésta, sus variantes más resistentes (PaeMM) mostraron la mayoría de códigos idénticos en 31% (Fig. 49; Tabla 7). Ya se mencionó que los miembros de esta subpoblación guardan una gran similitud entre sí (cs=75%) (Fig. 48) y que, si bien sería difícil agrupar distintos aislados clínicos a partir del polimorfismo genético obtenido por alguna técnica molecular y obtener correlación con 1, 2 o 3 características fenotípicas dadas, más lo sería en el momento de incluir 16 características más. De esta manera, el análisis de correlación reveló la existencia de una sub-subpoblación policlonal altamente resistente (Tabla 7) muy poco polimórfica (Fig. 55), perfectamente delimitada dentro de la subpoblación endémica (Fig. 48).

8.5.2 Huellas Digitales del RAPD y Distribución Estacional. La reproducibilidad del RAPD también se comprobó durante el análisis estacional con TFPGA utilizando los mismos patrones polimórficos. El dendrograma obtenido reveló que los aislados menos diversos, en su mayoría PaeM, predominan durante los meses cálido-lluviosos y frío-húmedos, siendo muy similares entre sí (Fig. 56) lo cual, además, correlacionó con el análisis estadístico retrospectivo (7.1.3) (Tabla 4). Por último, el polimorfismo del control externo de *K.pneumoniae* ATCC 13883 fue idéntico en la mayoría de los ensayos (7.2.1) (Figs. 26 y 47), con un coeficiente de similitud mínimo de 87%.

8.6 Probable Marcador Genético.

Dentro de los resultados obtenidos durante el análisis molecular cabe mencionar otra característica sobresaliente de las subpoblaciones de *P.aeruginosa*, y es la presencia de un posible marcador genético amplificado en bandas dobles con un peso molecular contenido en el intervalo de 400 pb predominante para PaeMED en 62 % y hasta 75% para su sub-subpoblación PaeMM. Al comparar el resto de sus subpoblaciones hermanas, se encontró que en estas últimas hay predominio de bandas dobles en la centena de 700 pb de 36.4% a 59.2% (Tabla 5). La presencia de este marcador ubicado en la centena de 400 pb en PaeMM y su progenitora, muestra otra clara diferencia con sus subpoblaciones hermanas. Sería de gran interés realizar estudios sobre este posible marcador para conocer sus características genéticas, tal vez se trate de una región que puede estar compuesta de integrones y cajas de genes de resistencia.¹⁰⁶

En este trabajo se presentan los primeros resultados y su análisis, acerca de la investigación realizada con la población clínica de *P.aeruginosa*, quedando por estudiar todavía los hallazgos con respecto a la epidemiología de las subpoblaciones y en especial de PaeMED y su subpoblación PaeMM; la relación con las áreas hospitalarias en las cuales ordinariamente se encuentran, sus mecanismos de colonización y dispersión en distintos pacientes, así como, las características fenotípicas y genotípicas de aquellas *Pseudomonas* aisladas de un mismo y distinto paciente. Con respecto a la capacidad de dispersión de *P.aeruginosa*, faltaría investigar si algunas(s) clona(s) de PaeMM se encuentra(n) distribuida(s) en otras unidades hospitalarias cercanas al Instituto.

Por otra parte, sería conveniente realizar estudios utilizando otras técnicas moleculares que permitan dilucidar si en verdad existe un menor polimorfismo en las *Pseudomonas* más resistentes o si el número escaso de bandas se debe a otros factores, tanto bioquímicos como biológicos, que desconocemos.

9. CONCLUSIONES

9.1 Los aislados de *P.aeruginosa* resistentes a los aminoglicósidos, recuperados en el intervalo de 1991 a 1995 en el INCMNSZ, están relacionados a distintas líneas clonales estrechamente relacionadas, y no sólo una, causantes de brotes.

9.2 Existe una sub-subpoblación de *P.aeruginosa* (PaeMM) multirresistente a diversos antibióticos con un número de bandas escaso obtenido por el RAPD.

9.3 PaeMM manifiesta una distribución estacional predominando en los meses cálido-lluviosos y frío húmedos.

9.4 PaeMM presenta un posible marcador molecular en el par de bandas con un intervalo de peso molecular de 400 pb.

9.5 PaeMM prevaleció en vías respiratorias y causó neumonía no asociada a otras bacterias patógenas o virus.

9.6 Existió concordancia entre el análisis estadístico y el análisis del método molecular.

9.7 Se confirmó la aparición de brotes causados por *P.aeruginosa* en forma estadística.

INDICE DE ABREVIATURAS

A	Fenotipo de Resistencia a Aminoglicósidos
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADN $\phi\lambda$	ADN del fago <i>lambda</i>
ADN _{bco}	ADN blanco
ADN _{pol-Taq}	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
An	Amikacina
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
E	Estaciones del Año
Gn	Gentamicina
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
M	Meses del Año
Ñ	Años de Estudio
O	Otras muestras
PaeAn	<i>P.aeruginosa</i> resistente a amikacina
PaeAnGn	<i>P.aeruginosa</i> resistente a amikacina y gentamicina
PaeAnTb	<i>P.aeruginosa</i> resistente a amikacina y tobramicina
PaeGn	<i>P.aeruginosa</i> resistente a gentamicina
PaeGnTb	<i>P.aeruginosa</i> resistente a gentamicina y tobramicina
PaeM	<i>P.aeruginosa</i> multirresistente a amikacina, gentamicina y tobramicina
PaeMED	Subpoblación Endémica de <i>P.aeruginosa</i> Multirresistente a los aminoglicósidos
PaeMES	Subpoblación Esporádica de <i>P.aeruginosa</i> Multirresistente a los aminoglicósidos
PaeMM	Sub-subpoblación Endémica de <i>P.aeruginosa</i> Multirresistente a los aminoglicósidos
PaeMNR	Subpoblación No Relacionada de <i>P.aeruginosa</i> Multirresistente a los aminoglicósidos

PaeS	<i>P.aeruginosa</i> sensible a amikacina, gentamicina y tobramicina
PaeTb	<i>P.aeruginosa</i> resistente a tobramicina
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Amplificación al Azar del ADN polimórfico)
T	Tipo de Muestra Clínica
Tb	Tobramicina
TFFGA	Tools for Population Genetics Analyses (Herramientas para el Análisis Genético de Poblaciones)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages (Método de Agrupación de Pares No Relacionados con Base en Promedios Aritméticos)
UTI	Unidad de Terapia Intensiva
V _{RC}	Volumen de Reacción

10. BIBLIOGRAFIA

A

1. **Akopyanz.** 1992. Nucleic Acids Res. 20:5137-5142.
2. **Anawar, H., Strap, L.J., and J.W. Costerton.** 1992. Establishment of Aging Biofilms: Possible Mechanism of Bacterial Resistance to Antimicrobial Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1347-1351.
3. **Anzai, Y., Okuda, T., and J. Watanabe.** 1994. Application of the Random Amplified Polymorphic DNA Using the Polymerase Chain Reaction for Efficient Elimination of Duplicate Strains in Microbial Screening. II Actinomycetes. *J. Antibiot.* 47:194-200.
4. **Arbeit, D.R.** 1999. Laboratory Procedures for the Epidemiologic Analysis of Microorganisms, p. 116-137. In R.P. Murray, E. Baron Jo, A. M. Tenover, C.F. Tenover, and H.R. Tenover (ed.), *MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

B

5. **Baquero, F., Blázquez, J., and Martínez, J.L.** 2002. Mutación y Resistencia a los Antibióticos. *Investigación y Ciencia.* 315:72-78.
6. **Barbut, F., Mario, N., Delmée, M., Gozian, J., and J.C. Petit.** 1993. Genomic Fingerprinting of *Clostridium difficile* Isolates by Using a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay. *FEMS Microbiol. Letters.* 114:161-166.
7. **Bassam, J.B., Caetano-Anollés, G., and M.P. Gresshoff.** 1991. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 196:80-82.
8. **Bautista-Alavez, A., Kato-Maeda, M., Rolon-Montes de Oca, A.L., Ramos-Hinojosa, A., Ponce de León, A., Bobadilla del Valle, M., Ruiz-Palacios, G.M., and J. Sifuentes-Osornio** 2003. Incremento en la Tendencia de la Resistencia Antimicrobiana en Organismos Causales de Bacteremias en un Hospital de Tercer Nivel. *Rev. Invest. Clín.* 55:600-605.
9. **Berka, M.R., L.M. Vasil.** 1982. Phospholipase C (Heat-Labile Hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and Preliminary Characterization. *J. Bacteriol.* 152:239-245.
10. **Berry, A., DeVault, D., and A.M. Chakrabarty.** 1989. High Osmolarity Is a Signal for Enhanced *algD* Transcription in Mucoic and Nonmucoic *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *J. Bacteriol.* 171:2312-2317.
11. **Bingen, E., Bonacorsi, S., Rohrlach, P., Duval, M., Lhopital, S., Brahimi, N., Vilmer, E., and V.R. Georing.** 1996. Molecular Epidemiology Provides Evidence of Genotypic Heterogeneity of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Serotype O:12 Outbreak Isolates from a Pediatric Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 34:3236-3229.
12. **Blanchard, M.M., Taillon-Miller, P., Nowotny, P., and V. Nowotny.** 1993. PCR Buffer Optimization with Uniform Temperature Regimen to Facilitate Automation. *PCR Methods Applications.* 2:234-240.
13. **Bonfiglio, G., Laksai, Y., Franchino, L., Amicosante, G., and G. Nicoletti.** 1998. Mechanisms of β -lactam Resistance Amongst *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in an Italian Survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:697-702.
14. **Brandt, E.M., Hutwagner, C.L., Kuykendall, J.R., Pinner, W.R., and The Cryptococcal Disease Active Surveillance Group.** 1995. Comparison of Multilocus Enzyme Electrophoresis and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis for Molecular Subtyping of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 33:1890-1895.
15. **Bukanov, N., Ravi, V.N., Miller, D., Srivastava, K., and D.E. Berg.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa* Corneal Ulcer Isolates Distinguished Using the Arbitrarily Primed PCR DNA Fingerprinting Method. *Curr Eye Res.* 13:783-790.

C

16. **Caetano-Anollés, G.** 1993. Amplifying DNA with Arbitrarily Oligonucleotide Primers. *PCR Methods Applic.* 3:85-94.

10. Bibliografía □

17. **Caetano-Anollés, G., Bassam, J.B., and M.P. Gresshoff.** 1992. Primer-Template Interactions During DNA Amplification Fingerprinting with Single Arbitrary Oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* 235:157-165.
18. **Ciencias por una Educación Popular.** 1984. EVOLUCION (Capítulos 2, 3, 4, 5 y 8), p. 21-164;235-255.
19. **Clark, G.A., and S.M.C. Lanigan.** 1993. Prospects for Estimating Nucleotide Divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* 10:1096-1111.
20. **Cochran, G.W., Cox, M.G.** 1987. DISEÑOS EXPERIMENTALES. Ed. Trillas. 10ª ed. México.

D

21. **De Vos, D., Lim, A Jr., Pirnay, J.P., Duinslaeger, L., Revets, H., Vanderkelen, A., Hamer, R., and P. Cornelis.** 1997. Analysis of Epidemic *Pseudomonas aeruginosa* Isolates by Isoelectric Focusing of Pyoverdine and RAPD-PCR: Modern Tools for an Integrated Antinococomial Infection Strategy in Burn Wound Centres. *Burns.* 23:379-386.
22. **Della, C.N., Danovaro, R., Fabiano, M., Albertelli, G., and A. Tselepidis.** Benthic Bacteria en Seasonal Changes of Organic Input in The Deep-sea Sediments of the Cretan Sea: Preliminary Results.
23. **Deretic, V., Dikshit, R., Konyecsni, W.M., Chakrabarty, A.M., and T.K. Misra.** 1989. The *algR* Gene, Which Regulates Mucoidity in *Pseudomonas aeruginosa*, Belongs to a Class of Environmentally Responsive Genes. *J. Bacteriol.* 171:1278-1283.
24. **Deretic, V., Gill, J.F., and A.M. Chakrabarty.** 1987. Gene *algD* Coding for GDP-mannose Dehydrogenase Is Transcriptionally Activated in Mucooid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 169:351-358.
25. **Douglas, M.C., Guidi-Rontani, C., and R.J. Collier.** 1987. Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*: Active, Cloned Toxin Is Secreted into the Periplasmic Space of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:4962-4966.

E

26. **Ellsworth, D.L., Rittenhouse, D.D., and R.L. Honeycutt.** 1993. Artifactual Variation in Random Amplified Polymorphic DNA Banding Patterns. *Biotech.* 14:214-217.

F

27. **Fujimori, F., and T. Okuda.** 1993. Application of the Random Amplified Polymorphic DNA Using the Polymerase Chain Reaction for Efficient Elimination of Duplicate Strains in Microbial Screening. *I. Fungi. J. Antibiotics.* 47:173-182.

G

28. **Gilbert, P., Collier, J.P., and R.W.M. Brown.** 1990. Influence of Growth Rate on Susceptibility to Antimicrobial Agents: Biofilms, Cell Cycle, Dormancy, and Stringent Response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1865-1868.
29. **Giraud, M., Calva, J.J., Huazano, F., Ponce de León, S., and Ruiz-Palacios, G.** 1986. Patrones de Susceptibilidad a 19 Antimicrobianos de Gérmenes Aislados de Hemocultivos en un Hospital de Referencia de la Ciudad de México. *Rev. Invest. Clín. (Méx.).* 38:7-14.
30. **Giwerzman, B., Jensen, T.E., Hoiby, N., Kharazmi, A., and J.W. Costerton.** 1991. Induction of β -Lactamase Production in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1008-1010.
31. **Goering, V.R. PhD., and Neil, L.B.** 1993. Molecular Epidemiology of Nosocomial Infection: Analysis of Chromosomal Restriction Fragment Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 14:595-600.
32. **Gonzalez-Hernandez, R., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de León, A., and M.L. Guerrero** 1998. Epidemiology and Prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in a Tertiary-Care Center in Mexico City. *Rev. Invest. Clín.* 50:383-388.
33. **Gonzalez-Sandoval, A.** 1993. Analisis Epidemiologico y Microbiologico de la Resistencia de Algunos Bacilos Gramnegativos a Aminoglicosidos y Beta-lactamicos de Amplio Espectro en un Hospital de Tercer Nivel en Mexico (Tesis de Licenciatura). Universidad Motolinia, A.C. México, D.F.

10. Bibliografía □

34. **Goodwin, P.H., and S.L. Annis.** 1991. Rapid Identification of Genetic Variation and Pathotype of *Leptosphaeria maculans* by Random Amplified Polymorphic DNA Assay. *Applied Environm. Microbiol.* 57:2482-2486.
35. **Gori, A., Espinasse, F., Deplano, A., Nonhoff, C., Nicolas, H.M., and J.M. Struelens.** 1996. Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified DNA Polymorphism Analysis for Typing Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 34:2448-2453.
36. **Grant, R.C.C., and L.M. Vasil.** 1986. Analysis of Transcription of the Exotoxin A Gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 168:1112-1119.
37. **Grattard, F., Gaudin, O.G., Pozzetto, B., Ros, A., and A.D. Mbida.** 1993. Genotypic Homogeneity of Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* O12 Strains Demonstrated by Analysis of Protein Profiles, DNA Fingerprints and rRNA gene Restriction Patterns. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12:57-61.
38. **Grundmann, H., Schneider, C., and F.D. Daschner.** 1995. DNA Fingerprinting based on Automated Laser Fluorescence Analysis of Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-ALFA) is a Rapid and Convenient Technique for Detecting Clonal Relatedness of Bacterial Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:1057-1062.

H

39. **Hanne, F.L., Howe, R.T., and H.B. Iglewski.** 1983. Locus of the *Pseudomonas aeruginosa* Toxin A Gene. *J. Bacteriol.* 154:383-386.
40. **Hernandez, J., Ferrus, M.A., Hernandez, M., and R.J. Owen.** 1997. Arbitrary Primed PCR Fingerprinting and Serotyping of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 17:37-47.
41. **Hoogkamp-Korstanje, A.A.J., Meis, F.G.M.J., Kissing, J., van der Laag, J., and Melchers, J.G.W.** 1995. Risk of Cross-Colonization and Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a Holiday Camp for Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol.* 33:572-575.
42. **Horton, H.J., Hagen, D.M., and S.H.M. Ko.** 1994. Optimized Conditions for Cycle Sequencing of PCR Products. *PCR Methods and Applications.* 3:359-360.
43. **Hsueh, P., Teng, L., Yang, P., Chen, Y., Ho, S., and K. Luh.** 1998. Persistence of a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone in an Intensive Care Burn Unit. *J. Clin. Microbiol.* 36:1347-1351.
44. <http://avery.rutgers.edu/wssp/StudentScholars/project/onions/rapd.html>.
45. <http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGWI/MG11127.html>
46. <http://quorum-sensing.area51.ipupdater.com/>
47. **Huazano-Ramos, F.** 1980. Bacteremias en Enfermos Inmunocomprometidos: Sensibilidad de Gérmenes Gram-negativos a la Amikacina Comparada con otros Aminoglicosidos y Penicilinas Semisintéticas por el Método de Microdilución en Placa (Tesis de Licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México, D.F.

I

48. **Iowa Department of Natural Resources, Geological Survey Bureau.** 2003. Bacteria in Iowa's Water Resources.

K

49. **Kasbohrer, A., Talaska, T., Bogel, K., Stohr, K., and W. Lehmacher.** 1993. Epidemiologic Pattern of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in Man-analysis of *Salmonella* cases in the Bandenburg Federal Territory. *Gesundheitswesen.* 55(8-9):418-426.
50. **Kerr, J.R., Moore, J.E., Curran, M.D., Graham, R., Webb, C.H., Lowry, K.G. Murphy, P.G., Wilson, T.S., and W.P. Ferguson.** 1995. Investigation of a Nosocomial Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in an Intensive Care Unit by Random Amplification of Polymorphic DNA Assay. *J. Hosp. Infect.* 30:125-131.
51. **Kettner, M., Macickova, T., and V.J. Kremery.** 1991. Susceptibility of Amikacin- and Gentamicin-resistant Clinical Isolates of Gram-negative Bacteria to Isepamicin, p.273-275. In V. Krcmery, Jr., D. Adam, O. Balint, and E. Rubinstein (ed.), *Antimicrobial Chemotherapy in Immunocompromised Host*, Rocnik. SL. International Congress of Chemotherapy, Berlin.

10. Bibliografía □

52. **Kiewitz, C., and B. Tümmler.** 2000. Sequence Diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: Impact on Population Structure and Genome Evolution.. J. Bacteriol. 182:3125-3135.
53. **Kiska, L.D., and Gilligan, H.P.** 2003. *Pseudomonas*. p 719-720. In Murray R.P., Baron Jo. E., Jorgensen, H.J., Pfaller, A.M., and H.R. Tenover (ed). MANUAL CLINICAL MICROBIOLOGY. 8th American Society for Microbiology, Washington, D.C.
54. **Korvick, A.J., and L.V. Yu.**1991. Antimicrobial Agent Therapy for *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 35:2167-2172.
55. **Krogh, J.H., and N. Hoiby.** 1992. Seasonal Onset of Initial Colonisation and Chronic Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Patients with Cystic Fibrosis in Denmark. Thorax. 47:109-111.

L

56. **Li, X., Nikaido, H., and K. Poole.** 1995. Role of MexA-MexB-OprM in Antibiotic Efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1948-1953.
57. **Little, M.T., and J. Hills.** 1978. Agricultural Experimentation. Design and Analysis (The Split-Split Plot), p.101-113. John Wiley and Sons (ed.), New York.
58. **Liu, Y., Davin-Regli, A., Bosi, C. Charrel, R.N., and C. Bollet.** 1996. Epidemiological Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* Nosocomial Bacteraemia Isolates by PCR-based DNA Fingerprinting Analysis. J. Med. Microbiol. 45:349-365.
59. **Livermore, M.D.** 1992. Interplay of Impermeability and Chromosomal β -Lactamase Activity in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob, Agents Chemother. 36: 2046-2048.
60. **Lopez, M.M.** 1998. Estudio Comparativo de Cefepima y Ceftazidima para el Tratamiento de Infecciones Bacterianas Graves (Tesis de Especialidad). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
61. **Lory, S.** 1986. Effect of Iron on Accumulation of Exotoxin A-Specific mRNA in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 168:1451-1456.
62. **Lory, S., and R.J. Collier.** 1980. Expression of Enzymic Activity by Exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 28:292-501.
63. **Loutit, S.J. and S.L. Tompkins.** 1991. Restriction Enzyme and Southern Hybridization Analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Patients with Cystic Fibrosis. J. Clin. Microbiol. 29:2897-2900.

M

64. **MacDonell, M.T., and R.R. Colwell.** 1985. The Contribution of Numerical Taxonomy to the Systematics of Gram-negative Bacteria, p. 107-136. In Godfellow, M., Jones, D., and F.G. Priest (ed.), COMPUTER-ASSISTED BACTERIAL SYSTEMATICS. 1ra. Ed. American Society for Microbiology by Academic Press. Orlando, Florida.
65. **Mahenthalingam, E., Campbell, E.M., Foster, J., Lam, S.J., and P.D. Speert.** 1996. Random Amplified Polymorphic DNA Typing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Patients with Cystic Fibrosis. J. Clin. Microbiol. 34:1129-1135.
66. **Maravilla, F.E., y O.J. Sifuentes.** 1991. Desarrollo de un Método Miniaturizado para la Identificación de Enterobacterias. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
67. **Marchandin, H., Jean-Pierre, H., De Champs, C., Sirot, D., Darbas, H., Perigault, F.P. and C. Carriere.** 2000. Production of a TEM-24 Plasmid-Mediated Extended-Spectrum β -Lactamase by a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:213-216.
68. **Maslow, N.J., Mulligan, E.M., and R.D. Arbeit.** 1993. Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. Clin. Infect. Dis. 57:153-164.
69. **Masuda, N., Sakagawa, E., and S. Ohya.** 1995. Outer Membrane Proteins responsible for Multiple Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 39:645-649.
70. **Mazurier, S., van de Giessen, A., Heuvelman, K., and K. Wnars.** 1992. RAPD Analysis of *Campylobacter* Isolates: DNA Fingerprinting without the Need to Purify DNA. Letters Applied Microbiol. 14:260-262.

10. Bibliografía □

71. **McGowan, Jr., E.J., and B. Metchock.** 1995. Infection Control Epidemiology and Clinical Microbiology. p.183-189. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 72. **Mereghetti, L., Marquet-van der Mee, N., Loulergue, J., Rolland, J.C., and A. Audurier.** 1998. *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Patients: Study Using Whole Cell RAPD and Antibiotic Susceptibility. *Pathol. Biol.* 46:319-324.
 73. **Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., and T. Tsuchiya.** 1999. Expression in *Escherichia coli* of a New Multidrug Efflux Pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:415-417.
 74. **Morais, P.V., Mesquita, C., Andrade, J., and M.S. da Costa.** 1997. Investigation of Persistent Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like Strains in a Spring Water Bottling Plant. *Infect. Control. Appl. Environ. Microbiol.* 63:851-861.
 75. **Morita, Y., Sobel, L.M., and K. Poole.** 2006. Antibiotic Inducibility of the MexXY Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the Antibiotic-Inducible PA5471 Gene Product. *J. Bacteriol.* 188:1847-1855.
 76. **Muyldermans, G., de Smet, F., Pierard, D. Steenssens, L., Stevens, D., Bougatef, A., and S. Lauwers.** 1998. Neonatal Infections with *Pseudomonas aeruginosa* Associated with a Water-bath Used to Thaw Fresh Frozen Plasma. *J. Hosp. Infect.* 89:309-314.
- N**
77. **Neto, D.E., De Souza, P.C., Rollinson, D., Katz, N., Pena, D.J.S., and J.G.A. Simpson.** 1993. The Random Amplification of Polymorphic DNA Allows the Identification of Strains and Species of Schistosome. *Mol. Biochem. Parasit.* 57:83-88.
 78. **Nikaido, H.** 1998. Multiple Antibiotic Resistance and Efflux. *Current Opinion Microbiol.* 1:516-523.
- O**
79. **Ochman, H.** 2001. Lateral and Oblique Gene Transfer. *Current Opinion in Genetics & Development.* 11:616-619.
 80. **Ochman, H., and A.N. Moran.** 2001. Genes Lost and Genes Found: Evolution of Bacterial Pathogenesis and Symbiosis. *Ecol. Evol. Infect.* 292:1096-1098.
 81. **Ochman, H., Lawrence, G.J., and A.E. Groisman.** 2000. Lateral Gene Transfer and the Nature of Bacterial Innovation. *Nature.* 405:299-304.
 82. **Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., and J. Blázquez.** 2000. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science.* 288:1251-1253.
 83. **Ostrosky, Z.L., Baez-Martinez, R., Rangel-Frausto, M.S., and S.R. Ponce de Leon.** 2000. Epidemiology of Nosocomial Outbreaks: 14-year Experience at a Tertiary-care Center. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 21:527-529.
 84. **Ostrosky, Z.L., Ponce de León, R.S., and D.L.F. Uscanga.** 1998. Epidemiología de los Brotes Nosocomiales: Experiencia de Catorce Años en un Centro Hospitalario de Tercer Nivel (Tesis de Especialidad). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- P**
85. **Park, Y.H., and R.J. Kohet.** 1994. Effect of Concentration of MgCl₂ on Random-Amplified DNA Polymorphism. *Biotech.* 16:652-656.
 86. **Partridge, R.S., Recchia, D.G., Stokes, H. W., and M. R. Hall.** 2001. Family of Class 1 Integrons Related to In4 from Tn 1696. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3014-3020.
 87. **Pavlovskis, R.O., Iglewski, H.B., and M. Pollack.** 1978. Mechanism of Action of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A in Experimental Mouse Infections: Adenosine Diphosphate Ribosylation of Elongation Factor 2. *Infect. Immun.* 19:29-33.
 88. **Penner, A.G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, J.S., and G. Fedak.** 1993. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis among Laboratories. *PCR Methods Applications.* 2:341-345.

10. Bibliografía □

89. **Persing, H.D.** In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques. 1993. p. 51-87. In H.D. Persing, F.T. Smith, C.F. Tenover, and J.T. White (ed). DIAGNOSTIC MOLECULAR MICROBIOLOGY. PRINCIPLES AND APPLICATIONS. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 90. **Pirnay, P.J., De Vos, D., Cochez, C., Bilocq, F., Vanderkelen, A., Zizi, M., Ghysels, B., and P. Cornelis.** 2002. *Pseudomonas saeruginosa* Displays an Epidemic Population Structure. Environment. Microbiol. 4:898-911.
 91. **Podzorski, P.R., and H.D. Persing.** 1995. Molecular Detection and Identification of Microorganisms, p. 130-157. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 92. **Pollack, M.** 1984. The Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. Suppl 3:S617-626.
 93. **Ponce de León, R.S., Molinar-Ramos, F., Dominguez-Cherit, G., Rangel-Frausto, M.S., and V.G. Vaquez-Ramos.** 2000. Prevalence of Infections in Intensive Care Units in Mexico: a Multicenter Study. Crit. Care Med. 28:1316-1321.
 94. **Ponce de León, R.S., Ponce de León, R.S., Ruiz-Palacios, G., and G. Rita.** 1986. Infecciones Nosocomiales: Características del Problema en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y en México. Salud Pública Mex. 28:29-36.
 95. **Ponce de León, R.S., Rangel-Frausto, M.S., Elias-Lopez, J.I., Romero-Oliveros, C., and M. Huertas-Jimenez.** 1999. Nosocomial Infections: Secular Trends of a Control Program in Mexico. Salud Publica Mex. 41 Suppl 1:S5-11.
 96. **Ponce de León, R.S., Romero, O.M., Sandoval, G.M., and G. Ruiz-Palacios.** 1986. Eficacia de un Programa de Control de Infecciones Nosocomiales: una Posibilidad Real para Mejorar la Calidad de la Atención Médica. Salud Pública Mex. 28:593-597.
 97. **Pritchard, E.A., and L.M. Vasil.** 1986. Nucleotide Sequence and Expression of a Phosphate-Regulated Gene Encoding a Secreted Hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 167:291-298.
- Q**
98. **Quale, J.** 2004. La Influencia de Cambios o Restricciones en Formulación en Infecciones Hospitalarias y Patrones de Resistencia Antimicrobiana: *Un Reporte de Caso sobre Resistencia Antibiótica en Brooklyn, Nueva York.*
 99. **Quintiliani, Jr., R., and P. Courvalin.** 1995. Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents, p.1308-1326. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- R**
100. **Ragan, A.M.** 2001. Detection of Lateral Gene Transfer Among Microbial Genomes. Current Opinion in Genetics & Development. 11:620-626.
 101. **Ramos, A. J., Köhler, T., Nikaido, H., and P. Plésiat.** 1999. Involvement of an Active Efflux System in the Natural Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2624-2628.
 102. **Rangel-Frausto, M.S.** 1999. The Epidemiology of Bacterial Sepsis. Infect. Dis. Clin. North Am. 13:299-312.
 103. **Rangel-Frausto, M.S., Morales-Garcia, D. Baez-Martinez, R., Ibarra-Blancas, J., and R.S. Ponce de León.** 1999. Evaluation of a Nosocomial Infection Surveillance Program. Salud Publica Mex. 41 Suppl 1:S59-63.
 104. **Renders, N. Römling, U., Verbrugh, H., and A. van Belkum.** 1996. Comparative Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments. J. Clin. Microbiol. 34:3190-3195.
 105. **Rooney-Varga, N.J., Devereux, R., Evans, S.R., and E.M. Hines.** 1997. Seasonal Changes in the Relative Abundance of Uncultivated Sulfate-Reducing Bacteria in a Salt Marsh Sediment and in the Rhizosphere of *Spartina alterniflora*. Applied Environ. Microbiol. 63:3895-3901.

10. Bibliografía □

106. **Roy, H.P.** 1998. Integrones: Nuevos Elementos Genéticos Móviles que Median la Resistencia a los Antibióticos en Enterobacterias y *Pseudomonas*. *Enf. Infec. Microbiol.* 18(3):141-145.
 107. **Ruiz-Palacios, G., Ponce de León, S.R., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de Leon, S.R., Calva, J., Huazano, F., Ontiveros, C., Ojeda, F., and M. Bobadilla.** 1986. Control de la Resistencia de Bacilos Gram Negativos a Aminoglucósidos: Resultados de un Estudio Prospectivo a 3 Años con el Uso Exclusivo de Amikacina. *Rev. Invest. Clín.* 38.1-6.
 108. **Ruiz-Palacios, G.M., Zamora, J., and F. Huazano.** 1981. Piperacilina, Estudio Clínico en Infecciones Graves. *Rev. Invest. Clín.* 33:253-257.
 109. **Rychlik, W., Spencer, W.J., and R.E. Rhoads.** 1990. Optimization of the Annealing Temperature for DNA Amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 18:6409-6412.
- S**
110. **Sá-Correia, I., Darzins, A., Wang, S., Berry, A., and A.M. Chakrabarty.** 1987. Alginate Biosynthetic Enzymes in Mucoid and Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*: Overproduction of Phosphomannose Isomerase, Phosphomannomutase, and GDP-Mannose Pyrophosphorylase by Overexpression of the Phosphomannose Isomerase (*pmi*) Gene. *J. Bacteriol.* 169:3224-3231.
 111. **Saiki, D. R., Gelfand, H.D., Stoffel, S., Scharf, J.S., Higuchi, R., Horn, T.G., Mullis, B.K., and A.H. Herlich.** 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science.* 239:487-491.
 112. **Salyers, A.A., and D.D. Whitt.** 1994. BACTERIAL PATHOGENESIS A MOLECULAR APPROACH. P. 97-110. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 113. **Shaw, K.J., Cramer, C.A., Rizzo, M., Mierzwa, R., Gewain, K., Miller, G.H., and R.S. Hare.** 1989. Isolation, Characterization, and DNA Sequence Analysis of an AAC(6')-II Gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:2052-2062.
 114. **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 M. Woloj.** 1991. Correlation between Aminoglycoside Resistance Profiles and DNA Hybridization of Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:2253-2261.
 115. **Shaw, K.J., Munayer, H., Rather, P.N., Hare, R.S., and G.H. Miller.** 1993. Nucleotide Sequence Analysis and DNA Hybridization Studies of the *ant(4')-IIa* Gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:708-714.
 116. **Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., and G.H. Miller.** 1993. Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:138-163.
 117. **Shen, B., Tai, C.P., Pritchard, E.A., and L.M. Vasil.** 1987. Nucleotide Sequences and Expression In *Escherichia coli* of the In-Phase Overlapping *Pseudomonas aeruginosa plcR* Genes. *J. Bacteriol.* 169:4602-4607.
 118. **Sifuentes-Osornio, J. Jakob, E.C., Durlach, R., Dain, A., Ruiz-Palacios, G.M., Barkan, L., Lamberghini, R., Jauregui, A., Villalobos, Y., Saenz-Aguirre, C., de la Cabada, F.J., Rodriguez-Toledo, A., Zavala-Trujillo, I., Gamboa, M.A., Fuentes del Toro, S., Froiler, C., Maglio, F., Quiroga, J.V., Rojas, J.J., and I. Conde-Carmona.** 1996. Piperacillin/Tazobactam in the Treatment of Hospitalized Patients with Urinary Tract Infections: an Open Non-comparative and Multicentered Trial. *J. Chemother.* 8:122-129.
 119. **Sifuentes-Osornio, J., Macias, A., Amieva, R.I., Ramos A., and G.M. Ruiz-Palacios.** 1989. Intravenous Ciprofloxacin and Ceftazidime in Serious Infections. A prospective, Controlled Clinical Trial with Third-party Blinding. *Am. J. Med.* 87:202-205.
 120. **Sifuentes-Osornio, Ruiz-Palacios, G.M., and D.H. Groschei.** 1986. Analysis of Epidemiologic Markers of Nosocomial *Serratia marcescens* Isolates with Special Reference to the Grimont Biotyping System. *J. Clin. Microbiol.* 23(2).230-234.
 121. **Sneath, A.H.P., and R.R. Sokall.** 1973. NUMERICAL TAXONOMY (The Principles and Practice of Numerical Clasification), p. 188-305. W.H. Fruman and Company. San Francisco.
 122. **Soll, R.D., Lockhart, R.S., and C. Pujol.** 2003. Laboratory Procedures for the Epidemiological Analysis of Microorganisms. p. 139-161. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A.

10. Bibliografía □

- Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
123. **Sorrell, C.T., Chen, C.A.S., Ruma, P., Meyer, W., Pfeiffer, J.T., Ellis, H.D., and G.A. Brownlee.** 1996. Concordance of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by Random Amplification of Polymorphic DNA Analysis and PCR Fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 34:1253-1260.
124. **Soveron, C.G.** *Pseudomonas aeruginosa*. 2005. Investigación Biomédica Básica. UACPyP, U.N.A.M.
125. **Spencer, H.D., Kas, A., Smith, E.E., Raymond, K.C., Sims, H. E., Hastings, M., Burns, L.J., Kaul, R., and V. O. Maynard.** 2003. Whole-Genome Sequence Variation among Multiple Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185:1316-1325.
126. **Stake, S., Yoshihara, E., and T. Nakae.** 1990. Diffusion of β -Lactam Antibiotics through Liposome Membranes Reconstituted from Purified Porins of the Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:685-690.
127. **Stewart, S.P.** 1994. Biofilm Accumulation Model That Predicts Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:1052-1058.
128. **Suci, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P., and G.G. Geesey.** 1994. Investigation of Ciprofloxacin Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2125-2133.
129. **Swaminathan, B., and M.G. Mathar.** Molecular Typing Methods. 1993. p. 26-49. *In* H.D. Persing, F.T. Smith, C.F. Tenover, and J.T. White (ed). *DIAGNOSTIC MOLECULAR MICROBIOLOGY. PRINCIPLES AND APPLICATIONS.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- T**
130. **Tanaka, H., Sawairi, S., and Okuda. T.** 1994. Application of the Random Amplified Polymorphic DNA Using the Polymerase Chain Reaction for Efficient Elimination of Duplicate Strains in Microbial Screening. III. Bacteria. *J. Antibiot.* 47:183-193.
131. **Tenover, C.F., Arbeit, D.R., Goering, V.R., Mickesen, A.P. Murray, E.B., Persing, H.D., and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
132. **Tenover, C.F., Phillips, L.K., Gilbert, T., Lockhart, P., O'Hara, J.P., and J.J. Plorde.** 1989. Development of a DNA Probe from the Deoxyribonucleotide Sequence of a 3-*N*-Aminoglycoside Acetyltransferase [AAC(3)-I] Resistance Gene. *J. Clin. Microbiol.* 33(4):551-559.
- V**
133. **Vasil, L.M. Chamberlain, C., and C.R.C. Grant.** 1986. Molecular Studies of *Pseudomonas* Exotoxin A Gene. *Infect. Immun.* 52:538-548.
134. **Venugopal, G., Mohapatra, S., Salo D., and S. Mohapatra.** 1993. Multiple Mismatch Annealing: Basis for Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197:1382-1387.
135. **Verweij, P.E. Bijl, D., Melchers, W.J., De Pauw, B.E., Meis, J.F., Hoogkamp-Korstanje, J.A. and A. Voss.** 1997. Pseudo-outbreak of Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Hematology Unit. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 18:128-31.
136. **Volkow-Fernandez, P., Ponce de Leon, R.S., Sifuentes-Osornio, J., Calva-Mercado, J.J., Ruiz-Palacios, G.M., and M.A. Cerbon.** 1993. An Epidemic of Primary Bacteremia due to an Endemic Strain of *Serratia marcescens* in an Intensive Care Unit. *Salud Publica Mex.* 35:440-447.
- W**
137. **Wang, G., Whittam, S.T., Berg, M.C., and E.D. Berg.** 1993. RAPD (arbitrary primer) PCR is More Sensitive than Multilocus Enzyme Electrophoresis for Distinguishing Related Bacterial Strains. *Nucleic Acids Res.* 21:5930-5933.
138. **Wang, Y., Ha, U., Zeng, L., and S. Jin.** 2003. Regulation of Membrane Permeability by a Two-Component Regulatory System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:95-101.

10. Bibliografía □

139. **Wenzel, P.R.** 1996. Aspectos Históricos y Perspectivas a Futuro, p. 1-5. In R.S., Ponce de León, and H.J.L. Soto. INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS. Universidad Nacional Autónoma de México, MacGraw-Hill Interamericana Ed. México, D.F.
140. **Wenzel, P.R.** 1997. PREVENTION AND CONTROL OF NOSOCOMIAL INFECTIONS. 3ra. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, U.S.A.
141. **Westbrock-Wadman, S., Sherman, R.D., Hickey, J.M., Coulter, N.S., Zhu, Q. Y., Warrener, P., Nguyen, Y.L., Shawar, M.R., Folger, R.K., and C.K. Stover.** 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Efflux Pump Contributing to Aminoglycoside Impermeability. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2975-2983.
142. **Widmer, A.F., Wnzel, R.P., Trjilla, A., Bale, M.J., Jones, R.N., and B.N. Doebbling.** 1993. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in a Surgical Intensive Care Unit: Probable Transmission via Hands of a Health Care Worker. Clin. Infect. Dis. 16:372-376.
143. **Williams, G.K.J., Hanafey, K.M., Rafalski, J.A., V.S. Tingey.** 1993. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Meth. Enzym. 218:704-741.
144. **Wolfgang, C.M., Kulasekara, R.B., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, G.C., and S. Lory.** 2003. Conservation of Genome Content and Virulence Determinants among Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. PNAS. 100:8484-8489.

Y

145. **Young, M., and E.W.R. Hancock.** 1992. Fluoroquinolone Supersusceptibility Mediated by Outer Membrane Protein OprH Overexpression in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for Involvement of a Nonporin Pathway. Antimicrob. Agents Chemother. 36:2365-2369.
146. **Yu, K., and Pauls.** 1992. Optimization of the PCR Program for RAPD Analysis. Nucleic Acids Res. 20(10):2606.

Z

147. **Zhanel, G.G., Karlowsky, A.J. Saunders, H.M. Davidson, J.R., Hoban, J.D., Hancock. E.W.R., McLean, I., and E.L. Nicolle.** 1995. Development of Multiple-Antibiotic-Resistant (Mar) Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after Serial Exposure to Fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 39:489-495.