



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Cambio en el perfil de sensibilidad a antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii*, asociado a transferencia horizontal de genes provenientes de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

ITZEL SALAS HERNÁNDEZ

ASESORA:

M. en C. SOCORRO SANDRA MARTÍNEZ ROBLES

CO ASESOR:

Dr. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Cambio en el perfil de sensibilidad a antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii*, asociado a transferencia horizontal de genes provenientes de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Que presenta la pasante: Itzel Salas Hernández

Con número de cuenta: 308129126 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil	
SECRETARIO	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	
1er. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

Por su amor y paciencia, por todo el apoyo que siempre me han dado y sobre todo, por impulsarme a seguir adelante y nunca dejar que me diera por vencida, gracias.

A Héctor, porque eres el hermano que nunca tuve, gracias por tu cariño, por cuidarme y creer en mí.

A mis amigos.

Por su cariño y apoyo incondicional, por enseñarme a disfrutar un poco más de la vida, aunque no lo parezca. Soy afortunada por tenerlos en mi vida.

A mis asesores.

Por brindarme su apoyo, su ayuda y su conocimiento.

A la M. en C. Sandra Martínez Robles, por confiar en mí, por todas sus enseñanzas, pero sobre todo por contagiarme su amor a la microbiología.

Al Dr. Carlos Ignacio, por recibirme y brindarme su ayuda cuando lo necesité, muchas gracias por su tiempo.

Al Dr. Andrés Romero Rojas, por abrirme las puertas del L-8 de la Unidad de Posgrado para la realización de este proyecto.

Y por supuesto a la UNAM, por permitirme concluir con una etapa tan importante de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS.....	III
GLOSARIO	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Infecciones asociadas a la atención de la salud.....	2
2.2. Resistencia a los antimicrobianos.....	2
2.2.1. Mecanismos de resistencia bacteriana.....	3
2.2.2. Elementos genéticos de transferencia	4
2.2.3. Patrones de resistencia bacteriana	7
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	8
2.3.1. Mecanismos de resistencia	9
2.3.2. Importancia clínica.....	11
2.4. Género <i>Acinetobacter</i>	11
2.4.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	12
2.4.2. Epidemiología.....	13
2.4.3. Mecanismos de patogenicidad.....	14
2.4.4. Mecanismos de resistencia	14
2.5. Sulfonamidas.....	15
2.5.1. Sulfametoxazol - Trimetoprim.....	16
2.5.2. Resistencia bacteriana adquirida a las sulfonamidas.....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20

5.1.	Objetivo general.....	20
5.2.	Objetivos específicos	20
6.	MATERIAL Y METODOS	21
6.1.	Equipo 21	
6.2.	Cepas 21	
6.3.	Diagrama general del desarrollo experimental	22
6.3.1.	Cultivos bacterianos	23
6.3.2.	Prueba de difusión en agar (Kirby-Bauer).....	23
6.3.3.	Placa de inducción de resistencia a sulfonamidas.....	23
6.3.4.	Extracción de DNA genómico	24
6.3.5.	Condiciones de amplificación de la PCR.....	25
6.3.6.	Electroforesis horizontal	25
7.	RESULTADOS	26
7.1.	Perfil inicial de sensibilidad a antimicrobianos.....	26
7.2.	Perfil de sensibilidad a antimicrobianos posterior a la inducción de resistencia.....	27
7.3.	Transferencia horizontal de material genético	31
8.	DISCUSIÓN	33
9.	CONCLUSIONES	37
10.	REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del cromosoma y plásmido bacteriano.....	5
Figura 2. Estructura general de los integrones clase 1.....	6
Figura 3. Imagen generada por computadora de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en microscopía electrónica de barrido	8
Figura 4. Mecanismos intrínseco, adquirido y adaptativo que confieren resistencia a antimicrobianos a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Figura 5. Tinción de Gram de <i>Acinetobacter baumannii</i>	11
Figura 6. Imagen generada por computadora de <i>Acinetobacter baumannii</i> basada en microscopía electrónica de barrido	12
Figura 7. Estructura química de las sulfanilamidas, sulfametoxazol y el ácido p-aminobenzoico	16
Figura 8. Mecanismo de acción de Sulfametoxazol-trimetoprim	17
Figura 9. Prueba de difusión en agar para la cepa <i>Acinetobacter baumannii</i> A424 no inducida a resistencia	28
Figura 10. Prueba de difusión en agar para la cepa <i>Acinetobacter baumannii</i> A424 inducida a resistencia	28
Figura 11. Prueba de difusión en agar para la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Figura 12. Prueba de difusión en agar para la cepa <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	28
Figura 13. Placa MicroScan sembrada con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Figura 14. Placa MicroScan sembrada con <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606.....	29
Figura 15. Placa MicroScan sembrada con <i>Acinetobacter baumannii</i> A424.....	30
Figura 16. Placa MicroScan sembrada con <i>Acinetobacter baumannii</i> A424 inducida a resistencia.....	30
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa para los amplificadores correspondientes al gen <i>IntI</i> en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i>	42

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Características del par de cebadores utilizados para amplificar el gen Intl 1 del Integron clase 1 según Koeleman y col (2001).	25
Cuadro 2.- Perfil de sensibilidad para Acinetobacter baumannii A424, Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter baumannii ATCC 19606	26
Cuadro 3.-Perfil de antibiograma para la cepa inducida a resistencia Acinetobacter baumannii A424	27

ABREVIATURAS

µg. - Microgramos

µL. - Microlitros

AST. - Agar Soya Trypticaseina

ATCC. - American Type Culture Collection

CLSI. - Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

DHPS. - Dihidropteroato sintasa

DNA. - Ácido desoxirribonucleico

ESKAPE. - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.*

IAAS. - Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud

Int I. - Integrasa tipo I

IS. - Secuencias de Inserción

LPS. - Lipopolisacaridos

MDR. - Multirresistente

mL. - Mililitros

NaCl. - Cloruro de sodio

NCBI. - National Center for Biotechnology Information por sus siglas en inglés o Centro Nacional para la Información Biotecnológica

OMS. - Organización Mundial de la Salud

PABA. - Ácido *p*-aminobenzoico

Pb. - Pares de bases

PCR. - Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés, traducida como reacción en cadena de la polimerasa

PDR. - Panresistente

RFC. - Fuerza Centrifuga Relativa o Relative Force Centrifugal por sus siglas en inglés

SXT. - Sulfametoxazol-trimetoprim

UCI. - Unidad de Cuidados Intensivos

XDR. - Extensamente resistente

GLOSARIO

Aerobio.- Organismo que crece en presencia de oxígeno molecular.

Agar.- Polisacárido extraído de ciertas algas marinas, utilizado como medio de soporte para técnicas de inmunodifusión y electroforesis, así como medio de crecimiento para distintos microorganismos.

Amplicón.- Producto de una reacción de amplificación de ADN.

Anaerobio.- Organismo que no requiere O_2 libre para su crecimiento y multiplicación y que es inhibido por las concentraciones atmosféricas de O_2 .

Antibiótico.- Sustancia química producida a partir de un microorganismo (bacterias, hongos, actinomicetos)

Antimicrobiano.- Sustancia química que impide el desarrollo o favorece la muerte de un microorganismo, de origen natural o sintético.

Bactericida.- Propiedad por la cual un biocida (agente físico o químico) es capaz de producir la muerte de una bacteria, con o sin lisis de éstas. Actúa en la fase de crecimiento logarítmico bacteriano.

Bacteriostático.- Propiedad por la cual un biocida es capaz de inhibir la multiplicación bacteriana. Actúa en la fase estacionaria de crecimiento bacteriano.

Cepa.- Conjunto de células de una sola especie, descendientes de una única célula y que presenta un fenotipo característico.

Patógeno.- Elemento capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en el cuerpo de un organismo vivo.

Tinción de Gram.- Técnica de tinción diferencial que divide a las bacterias en dos grupos, gram positivos o gram negativos, de acuerdo al tipo de pared bacteriana que posean.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un tema que ha cobrado gran importancia en la actualidad, debido a que existen cada vez más reportes de bacterias con una elevada resistencia a distintos antimicrobianos, lo que a su vez se ha visto reflejado en tratamientos más limitados y la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Este problema tiene su mayor impacto dentro del ambiente hospitalario, ya que las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) provocan diariamente que las estancias hospitalarias se alarguen, que se presente resistencia a los antimicrobianos por parte de distintos microorganismos y que los costos se eleven para los sistemas de salud en todo el mundo. Entre las bacterias de mayor importancia clínica se encuentran *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales pertenecen al denominado grupo "ESKAPE", conocidas por ser patógenos intrahospitalarios multirresistentes y de difícil erradicación.

En el caso particular de *Acinetobacter baumannii*, es una bacteria que ha tenido gran presencia dentro de los hospitales en los últimos años, esto, por el incremento en el número de cepas con perfiles de multirresistencia, así como por el hecho de que es una bacteria capaz de mantenerse viva en objetos inanimados por mucho tiempo, de fácil diseminación y que por lo tanto cause infecciones, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. También está el hecho de que dentro de este ambiente hospitalario existen otros microorganismos que, al convivir, llevan a cabo transferencias de genes asociados a la resistencia a diversos antimicrobianos, lo que conlleva al aumento de cepas multirresistentes e inclusive panresistentes.

Por todo lo anterior es de suma importancia conocer los mecanismos de patogenicidad, virulencia y resistencia antimicrobiana presentes en *Acinetobacter baumannii*, por lo cual en el presente trabajo se evaluó, en primer lugar, el perfil de sensibilidad a distintos antimicrobianos en una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* y en una cepa de referencia de *Acinetobacter baumannii*, para después inducir una resistencia a sulfonamidas transmitida por transferencia horizontal de genes, lo cual se corroboró mediante la obtención de amplificadores del integron clase 1, el cual está asociado a los genes responsables de otorgar resistencia a sulfonamidas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Infecciones asociadas a la atención de la salud

Las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) son descritas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como, "Infecciones contraídas por un paciente durante su tratamiento en un hospital o centro sanitario y que dicho paciente no tenía ni estaba incubando en el momento de su ingreso". Estas infecciones provocan diariamente la prolongación de las estancias hospitalarias, una mayor resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos, costos elevados para los sistemas de salud y los pacientes, entre otras consecuencias (OMS, 2018).

En el 2017 la OMS publicó una lista denominada "Patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos", en esta lista se incluían a las 12 familias de bacterias que más afectan la salud del ser humano. Entre las bacterias incluidas, están las pertenecientes al denominado grupo "**ESKAPE**", denominación que dio Rice y col. en el 2008 para referirse a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*, como los patógenos que con más frecuencia causaban infecciones y "escapaban" a los efectos de los antimicrobianos en los hospitales alrededor del mundo.

Entre estos patógenos, tanto *Acinetobacter baumannii* como *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran clasificados en la actualidad como miembros del grupo de prioridad crítica intrahospitalaria ya que se caracterizan por ser multirresistentes y estar presentes en el ambiente hospitalario.

En el caso particular de *Acinetobacter baumannii*, su presencia en el ambiente hospitalario ha aumentado rápidamente, y el convivir con otras bacterias de metabolismo no exigente le ha permitido establecerse de manera silenciosa en el ambiente y es capaz de producir infecciones en pacientes inmunocomprometidos.

2.2. Resistencia a los antimicrobianos

En las primeras décadas del siglo XX se dio un periodo en el cual, tanto antibióticos como quimioterapéuticos tuvieron un gran impacto en la salud pública a nivel mundial, gracias a los descubrimientos e investigaciones realizados por múltiples científicos para conocer sus efectos y mecanismos de acción. El efecto de lo

anterior, fue que diversas infecciones de origen bacteriano fueran tratadas y por lo tanto millones de vidas fueran salvadas, sin embargo, su uso indiscriminado junto con los mecanismos de transferencia propios de las bacterias, conllevó a lo que conocemos como resistencia bacteriana.

La resistencia bacteriana la podemos definir como la capacidad que tiene la bacteria de sobrevivir en presencia de un antimicrobiano, representando una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación, ya sea en hospitales o en el medio ambiente (Garza Ramos, Silva Sánchez y Martínez Romero, 2009).

Existen dos tipos de resistencia bacteriana: la primera es la resistencia intrínseca, la cual es propia de cada familia, género o especie bacteriana, mientras que la segunda, es la resistencia adquirida, la cual es variable y es obtenida por una cepa de una especie bacteriana como mecanismo de adaptación (Vignoli y Seija, 2008). Una vez que el microorganismo adquiere un grado de resistencia a los antibióticos, entonces éste puede transferir el gen o genes de resistencia a otros microorganismos por medio de elementos genéticos de transferencia.

2.2.1. Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética, ya sea mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de diferentes especies o relacionadas (Vignoli y Seija, 2008). Estos mecanismos de resistencia se pueden agrupar principalmente en tres grupos:

a) Modificación o inactivación del antibiótico

Es el mecanismo más común de resistencia adquirida, en el cual se expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura química del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Estos cambios se deben, ya sea a la hidrólisis, como sucede con las betalactamasas y los betalactámicos, o mediante modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones como en los aminoglucósidos.

b) Cambios en la permeabilidad de la membrana externa

En estos casos el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo, ya sea generando cambios de la bicapa lipídica, principalmente en las porinas, lo que altera la permeabilidad de la membrana; aumentando la salida de los antibióticos (bombas de eflujo) o alterando la entrada de antibióticos, mediante un cambio en su conformación, lo que no permite el paso de los antibióticos al espacio periplásmico.

c) Modificaciones en el sitio de acción

En éstas, se producen modificaciones en la estructura o paso metabólico sobre los que ejercen su acción un antimicrobiano, bien por incremento de la concentración de una sustancia competitiva o por modificación de las diferentes estructuras bacterianas. Estas modificaciones son mayoritariamente dadas por genes que codifican el propio blanco del antibiótico o que codifican para sustitutos de los blancos originales.

2.2.2. Elementos genéticos de transferencia

La transferencia de genes de resistencia, de una bacteria a otra normalmente ocurre por medio de una transferencia horizontal, es decir el evento en el cual un microorganismo le dona a otro material genético por diversos mecanismos (Schoroeder y Brooks, 2017). Este tipo de transferencia incluye a los elementos genéticos móviles o de transferencia, como son los plásmidos, transposones e integrones.

a) Plásmidos

Los plásmidos son elementos de DNA extracromosomales, de doble cadena, circulares o lineales, que se replican independientemente del cromosoma bacteriano. Éstos, no contienen información esencial para la bacteria, pero sí le confieren ventajas en condiciones determinadas, por ejemplo, frente a la presencia de antibióticos o codifican mecanismos de virulencia (Loera Valenzuela et al., 2016).

Algunos plásmidos tienen la capacidad de insertarse en el cromosoma bacteriano, razón por lo cual pueden transferirse en forma vertical, de célula madre a célula hija cuando ocurre reproducción mediante fisión binaria. Además, también pueden movilizarse de una bacteria a otra por conjugación.

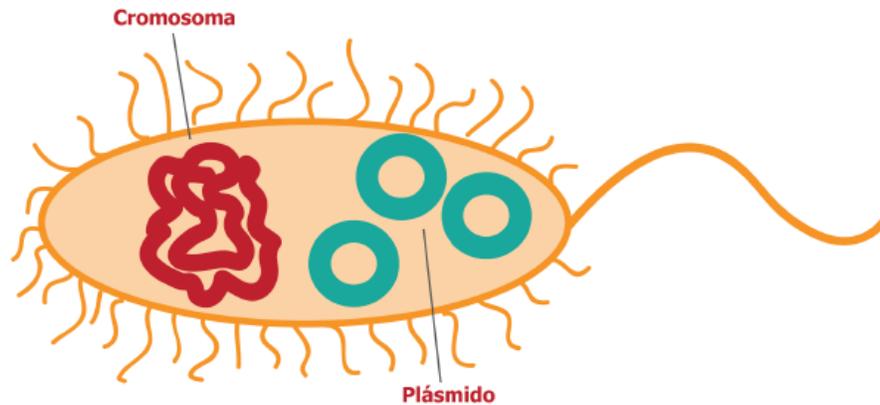


Figura 1. Representación esquemática del cromosoma y plásmido bacteriano.

Obtenida de <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/283-numero-33/510-plasmidos-bacterianos.html>

b) Transposones

Son secuencias de DNA que pueden moverse de una ubicación a otra en el genoma, por lo cual se les ha denominado también con el nombre de “genes saltarines”. Fueron identificados por primera vez hacia finales de la década de 1940 por Barbara McClintock (Watson, J. D., 2006) y hoy en día se han identificado estos elementos en todos los organismos, procariontes y eucariotes. La movilización de los transposones se denomina transposición o retrotransposición, dependiendo de la naturaleza del intermediario utilizado para la movilización (Muñoz López y García Pérez, 2010).

Uno de los elementos transponibles más sencillos, pequeños y que se relacionan a la resistencia bacteriana, son las secuencias de inserción (IS), las cuales son unidades autónomas que sólo portan el gen que codifica para la transposasa, lo cual permite su movilización, ya que es la responsable tanto de reconocer el sitio blanco como los extremos del transposón y mediar su movilización. A veces la transposición es replicativa, en la cual una copia del elemento de inserción se inserta en un nuevo sitio blanco y la otra se mantiene en el lugar original (Chalmers y Blot, 1999).

c) Integrones

Los integrones son una familia de elementos genéticos móviles, capaces de integrar y expresar genes sin promotor, de tal modo que se convierten en genes funcionales. Los integrones se dividen en clases en función de la secuencia que

tiene la integrasa que codifican, y aunque se han descrito al menos seis clases de integrones, los de clase 1 son los más estudiados puesto que son los que más se han identificado en aislamientos clínicos (Turton et al., 2005).

El integrón clase 1, está conformado estructuralmente por dos regiones constantes, el extremo 5' (5'-CS) y el extremo 3' (3'-CS), que se ubican en extremos opuestos; el extremo 5' (5'-CS) está conformado por el *gen intl* que codifica una proteína con actividad de recombinasa específica de sitio, la integrasa (*intl*), adyacente a ésta se encuentra el sitio de recombinación específica (*attI*), uno de los sitios de reconocimiento de la integrasa; entre *intl* y *attI* se encuentra una región con dos promotores divergentes (P1 y P2) que controlan respectivamente, la transcripción del gen de la integrasa y la de los genes estructurales, situados río abajo en forma de casetes, puesto que la mayoría de éstos no tiene promotor.

El lugar donde se encuentran ubicados los casetes es conocido como la región variable del integrón, estos genes constitutivos están separados unos de otros por secuencias *attC*. La enzima *intl* permite la interacción entre *attI* y el sitio *attC* de los casetes genéticos, uniendo ambos sitios y facilitando la integración o escisión del casete de resistencia en la zona variable del integrón.

Finalmente, en el extremo 3' (3'-CS), el cual es una región altamente conservada, se encuentran dos genes, uno de ellos es el *qacEΔ1*, que codifica para la resistencia a compuestos cuaternarios de amonio, el otro es el *gen sul1*, el cual otorga resistencia a sulfonamidas. Sin embargo, se ha observado que los integrones de clase 1 no siempre contienen la región 3' completa (González et al., 2004; Japoni Nejad et al., 2013).

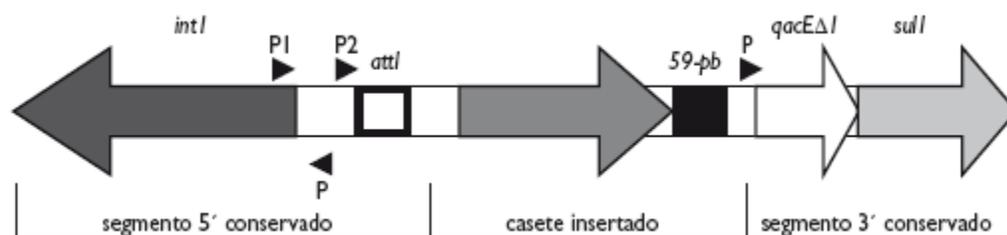


Figura 2. Estructura general de los integrones clase 1. En la región 5' se localiza el gen de la integrasa (*intl*), los promotores, indicados en flechas menores como P1 y P2, y la región de recombinación *attI*. La siguiente región, región variable, corresponde a la zona donde se integran los casetes. La región 3' está conformada por los genes *qacEΔ1*, de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio, y el *sul1*, que da resistencia a sulfonamidas. Modificado de Garza-Ramos, Silva-Sánchez y Martínez-Romero, 2009.

La integrasa, es también la encargada de incorporar genes que se encuentran en el citoplasma bacteriano bajo la forma de genes en casete, éstos no son parte necesaria de los integrones, pero forman parte de ellos una vez que han sido integrados. Por lo que la adquisición de casetes por parte del integrón no se limita a los que confieren resistencia, existiendo algunos que determinan virulencia, nuevas funciones metabólicas, etc., lo cual brinda a la bacteria hospedadora una amplia versatilidad para adaptarse a nuevas condiciones de supervivencia (Di Conza y Gutkind, 2010; Garza Ramos et al., 2009).

Los integrones identificados en las últimas décadas han sido asociados a una parte de la resistencia bacteriana, junto con otros elementos móviles, debido principalmente a la facilidad y rapidez con la que se dispersan a distintas bacterias, esto, se ha observado en diversos estudios, donde los genes integrados son de diversos microorganismos. Hui, L. y col., propusieron en el 2001 que la baja diversidad y la estabilidad estructural en aislados clínicos resistentes a antimicrobianos en las últimas décadas, apoyaría la hipótesis de que existen episodios de selección de un pequeño número de unidades de captura génica ocurrida en el medio hospitalario como consecuencia del uso de antimicrobianos.

2.2.3. Patrones de resistencia bacteriana

En el ámbito hospitalario es muy común reportar en algunos aislados clínicos a las llamadas "bacterias multirresistentes", sin embargo, no existía un parámetro preciso de qué bacterias debían ser consideradas como tales, hasta que Magiorakos y col. se dieron a la tarea en el 2012 de realizar este trabajo, definiendo los distintos patrones de resistencia a los antimicrobianos que se pueden presentar en las bacterias.

De esta forma una bacteria multirresistente a los fármacos o MDR por sus siglas en inglés (Multidrug-Resistant), es aquella que es resistente a por lo menos un agente, en tres o más categorías de antimicrobianos; una bacteria extremadamente resistente a los fármacos o XDR por sus siglas en inglés (Extensively Drug-Resistant), es aquella que es resistente a por lo menos un agente en todas las categorías de antimicrobianos, pero aún es susceptible a los antimicrobianos de dos categorías; finalmente una bacteria panrrresistente o PDR por sus siglas en inglés (Pandrug-Resistant), es aquella que es resistente a todas las clases de antimicrobianos (Magiorakos et al. 2012). Es importante señalar que las categorías de antimicrobianos, así como los antimicrobianos en sí, varían según la especie o

género bacteriano del que se esté hablando; las cuales son establecidas por guías de organismos internacionales.

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

El microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria ubicua Gram-negativa, que además está considerada como un patógeno humano oportunista, al ser capaz de causar una amplia gama de infecciones agudas y crónicas potencialmente mortales, particularmente en pacientes inmunocomprometidos. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* poseen genomas grandes (~5-7 Mpb), su capacidad metabólica es extensa, ya que posee toda la maquinaria bioquímica para producir múltiples metabolitos y utilizar diversas fuentes de carbono y aceptores de electrones para realizar su ciclo de vida. La presencia ubicua de *Pseudomonas aeruginosa*, así como la prevalencia, persistencia y resistencia a los tratamientos farmacológicos en entornos clínicos, se atribuyen a su capacidad de supervivencia mediante el uso de diversos mecanismos de respuesta, así como del amplio repertorio de genes que posee (Moradali, Ghods y Rehm, 2017).



Figura 3. Imagen generada por computadora de *Pseudomonas aeruginosa* en microscopía electrónica de barrido. Fuente: Public Health Image Library, Center for Disease Control, James Archer, U.S. Centers for Disease Control and Prevention 2013.

2.3.1. Mecanismos de resistencia

Los distintos mecanismos de resistencia que posee *Pseudomonas aeruginosa* pueden ser clasificados en tres grupos (Figura 4):

- a) Resistencia intrínseca: Este tipo de resistencia se deriva de la existencia de genes dentro del genoma bacteriano que codifican las propiedades inherentes de las estructuras celulares de la bacteria, así como su composición, lo que proporciona protección contra moléculas tóxicas y antimicrobianos.
 - ✓ Porinas: *Pseudomonas aeruginosa* limita la entrada de antibióticos al reducir el número de porinas no específicas y reemplazarlas con canales específicos o más selectivos para absorber los nutrientes requeridos, lo que resulta en una menor permeabilidad a los productos químicos tóxicos o a los antimicrobianos.
 - ✓ Bombas de eflujo: son complejos multiprotéicos que abarcan la envoltura de las bacterias Gram-negativas, son responsables de expulsar diversos materiales tóxicos y una amplia gama de antimicrobianos gracias a que son específicas a diversos sustratos. Son cuatro las bombas de eflujo que *Pseudomonas aeruginosa* posee MexAB-OprM, MexXY / OprM (OprA), MexCD-OprJ y MexEF-OprN (Moradali, Ghods y Rehm, 2017; Ochoa et al., 2013).
- b) Resistencia adquirida: Este tipo de resistencia se da mediante la mutación de los genes intrínsecos o por la adquisición de material genético de manera horizontal, como lo son los plásmidos. Lo anterior provoca modificaciones a nivel estructural y genético provocando, por ejemplo, la sobreexpresión de los genes de resistencia o adquisición de resistencia a un amplio espectro de antibióticos, lo que tiene una mayor prevalencia entre las cepas clínicas y ambientales.

Los plásmidos son componentes importantes de la composición genética de *Pseudomonas*. Algunos de ellos (plásmidos R) pueden impartir resistencia a diversos agentes, tanto físicos, químicos o antimicrobianos y otros confieren la capacidad de utilizar compuestos orgánicos simples que normalmente no son capaces de degradar (Moradali, 2017; Palleroni, 2015).

c) Resistencia adaptativa: es una forma de resistencia inestable y transitoria, que se induce en presencia de antibióticos específicos y otras tensiones ambientales, es decir, se induce una alteración en la producción y expresión de proteínas o genes cuyo blanco son los antimicrobianos. Este tipo de resistencia es reversible una vez que desaparezca el estímulo externo y se ha visto en β -lactámicos, aminoglucósidos, polimixinas y fluoroquinolonas (Moradali, 2017).

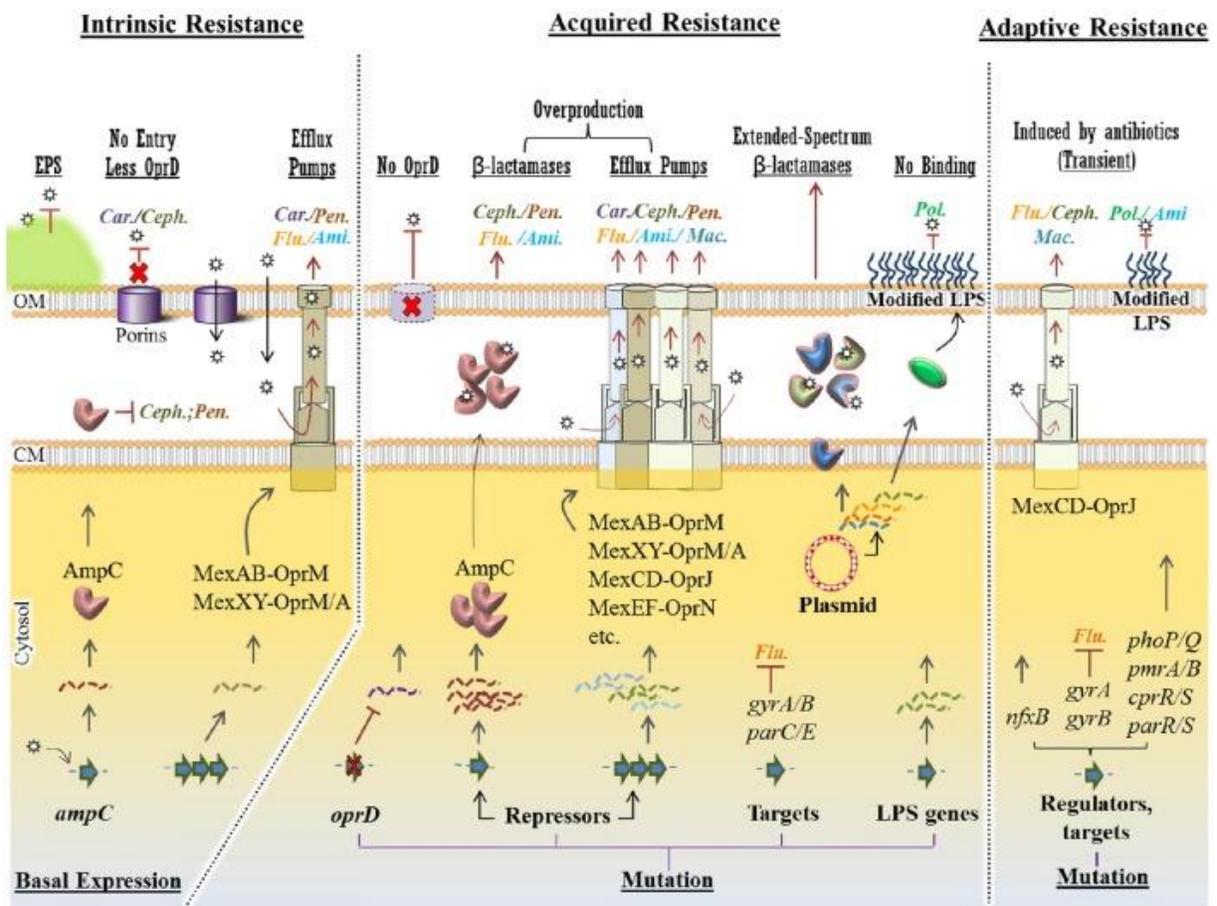


Figura 4. Mecanismos intrínseco, adquirido y adaptativo que confieren resistencia a antimicrobianos a *Pseudomonas aeruginosa*. Moradali, Ghods y Rehm, 2017.

2.3.2. Importancia clínica

Al ser un patógeno humano oportunista, *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de causar una amplia gama de infecciones, particularmente en pacientes con defensa inmune comprometida y es uno de los principales patógenos que se asocia a las infecciones asociadas a la atención de la salud, entre las que se incluyen neumonía asociada a ventilación mecánica, infección del torrente sanguíneo asociada a la línea central, infección relacionada con el catéter urinario e infecciones quirúrgicas y de trasplante, ya que tiene la capacidad de permanecer en superficies y objetos inanimados. Existe también el hecho de que es una bacteria multirresistente lo que afecta las opciones terapéuticas con las que puede ser erradicada, y que se traduce en más días de hospitalización de los pacientes y un incremento en los costos de hospitalización (Lister, Wolter, y Hanson, 2009).

2.4. Género *Acinetobacter*

El nombre *Acinetobacter* proviene del griego “akinetos” que significa no móvil y se aisló por primera vez del suelo por el microbiólogo noruego Beijerinck en 1911, desde entonces se ha clasificado dentro de distintos géneros hasta 1954, cuando Brisou y Prévot propusieron el género *Acinetobacter* para separar los miembros no móviles de los organismos móviles del género. En 1968 Baumann continuó con la caracterización de este género implementando diferentes medios selectivos y pruebas bioquímicas (Baumann et al., 1968).

En la actualidad este género comprende un grupo de cocobacilos Gram negativos (Figura 5), no fermentadores, aerobios estrictos, catalasa positiva y oxidasa, nitrato e indol negativo (Howard et al., 2012).

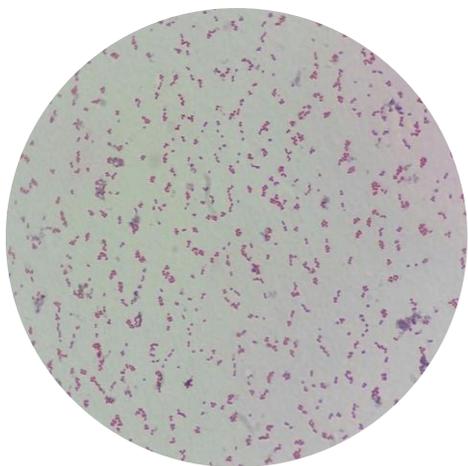


Figura 5. Tinción de Gram de *Acinetobacter baumannii*.

Se observan cocobacilos Gram negativos agrupados en pares. 1000x.

Hasta la fecha se aceptan 33 genopecies que han sido definidas por hibridación DNA-DNA, de estas: *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. calcoaceticus* han sido reunidas en un complejo denominado "*Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*", debido a que están altamente relacionados genéticamente y no pueden ser diferenciadas fenotípicamente (Vanegas Múnera, Roncancio Villamil y Jiménez Quiceno, 2014).

Crece bien en la mayoría de los medios complejos, así como en medios definidos que contienen una sola fuente de carbono y energía; el rango de temperatura al que crece es entre 20 y 37 °C, teniendo una temperatura óptima de crecimiento de entre 33-35 °C. Las colonias generalmente no son pigmentadas y son mucoides cuando las células están encapsuladas (Juni, 2015).

2.4.1. *Acinetobacter baumannii*

El representante más importante del género en el área de la salud es *Acinetobacter baumannii*, debido a que es un patógeno intrahospitalario de difícil control, erradicación y tratamiento, y que ha alcanzado en poco tiempo una amplia distribución a nivel mundial (Peleg, Seifert y Paterson, 2008). En un principio estas cepas eran sensibles a la mayoría de los antimicrobianos, pero rápidamente empezaron a incorporar genes de resistencia y hoy en día, encontramos cepas multiresistentes, por lo que la OMS la considera como la especie más peligrosa del género *Acinetobacter* dado al rango de antibióticos al que ahora es resistente (Figura 6).

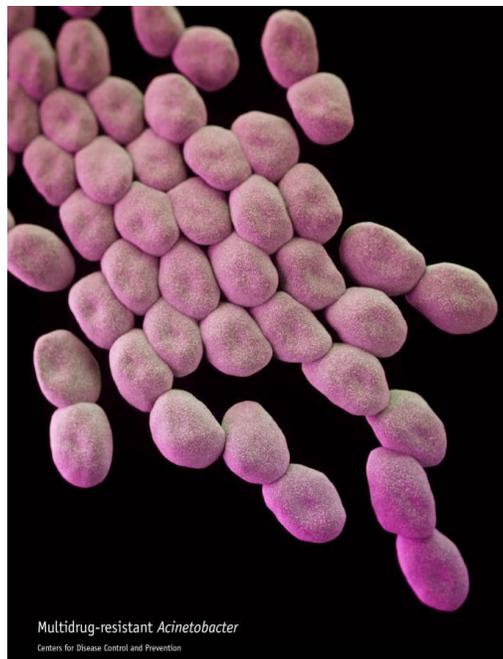


Figura 6. Imagen generada por computadora de *Acinetobacter baumannii* basada en microscopía electrónica de barrido. Public Health Image Library, Center for Disease Control, James Archer, U.S. Centers for Disease Control and Prevention 2013.

2.4.2. Epidemiología

La mayoría de las especies del género *Acinetobacter* son microorganismos que se encuentran en el ambiente (agua, plantas, vegetales, suelo), sin embargo, *Acinetobacter baumannii* no es un microorganismo ubicuo y no se observa con frecuencia en la naturaleza, ni como colonizador en la comunidad. Por el contrario, esta bacteria coloniza e infecta pacientes hospitalizados, siendo una bacteria que se halla con frecuencia en unidades de cuidado intensivo y unidades de quemados (Peleg et al., 2008).

Acinetobacter baumannii es uno de las bacterias más frecuentes en brotes de infección intrahospitalaria, esto se debe principalmente a la capacidad de adherencia y persistencia en equipos biomédicos, teclados, cortinas e incluso teléfonos celulares de los trabajadores de salud, siendo usualmente resistente a desinfectantes de nivel bajo o intermedio, así mismo la capacidad que tiene para desarrollar resistencia a los antibióticos hace de esta genoespecie un agente causal de diversas infecciones intrahospitalarias y elevadas tasas de mortalidad (Vanegas Múnera et al., 2014).

Las especies de *Acinetobacter* se consideran microorganismos poco virulentos, salvo en pacientes críticamente enfermos o inmunocomprometidos, por lo que se asocian más a menudo con infecciones nosocomiales que comunitarias. Sin embargo, en regiones tropicales existen reportes, de neumonía adquirida en la comunidad ocasionada por *Acinetobacter baumannii*, que comúnmente se presentan en meses húmedos y cálidos.

Entre los factores de riesgo que predisponen a los pacientes a la colonización o infección por cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, se encuentran los factores dependientes del hospedero como lo son la enfermedad grave, infección o sepsis previa, cirugía mayor reciente, traumatismo y quemaduras, también están los factores externos como la estancia hospitalaria prolongada, el ingreso prolongado en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI), el ingreso en un servicio donde *Acinetobacter baumannii* sea endémico, la exposición a equipo médico contaminado, el uso de ventilación mecánica, el uso de dispositivos intravasculares, sondas vesicales o tubos de drenaje, así como el uso previo de antimicrobianos (Rodríguez, Bustillo, Caicedo, Cadena y Castellanos, 2016).

2.4.3. Mecanismos de patogenicidad

Hasta la fecha, son pocos los mecanismos que se han descrito en *Acinetobacter baumannii*, entre estos se encuentran los determinantes de virulencia responsables de la patogenicidad como los lipopolisacáridos (LPS), ya que se ha visto que su presencia se asocia a una respuesta inmune innata exagerada; los polisacáridos capsulares (CPS) que evitan la actividad bactericida del complemento; la proteína de membrana externa de *Acinetobacter baumannii* (AbOmpA), que media la liberación de la molécula pro-apoptótica citocromo C y el factor inductor de la apoptosis que causa daño a las células de las vías respiratorias humanas, también se cree desempeña un papel en la adherencia y la invasión de células epiteliales. Las vesículas de membrana externa (OMV) participan en la administración de factores de virulencia al interior de las células hospedadoras, lo que facilita la transferencia horizontal de genes y protege a las células bacterianas de la respuesta inmune del huésped. La fosfolipasa D (PLD) es la responsable de segmentar a los fosfolípidos de las células hospedadoras, promoviendo la invasión bacteriana. *Acinetobacter* también es capaz de formar biopelículas, las cuales son complejos multicelulares con estructura tridimensional, que están formados con la superficie de las células del hospedero y los dispositivos médicos permanentes, como lo son los catéteres (Nowak, P. y Paluchowska, 2016; Rodríguez, 2016).

2.4.4. Mecanismos de resistencia

La capacidad de *Acinetobacter baumannii* de presentar resistencia a múltiples antimicrobianos se debe a diversos mecanismos, entre los que se encuentran la adquisición de genes de resistencia procedentes de otros organismos mediante transferencia horizontal como en el caso de plásmidos e integrones, debido a mutaciones en la población o por selección de subpoblaciones con resistencia preexistente que, bajo presión antimicrobiana selectiva, emergen y se hacen dominantes (Rodríguez y et al. 2016).

- a) Enzimas inactivadoras de antimicrobianos: Posee una amplia variedad de β -lactamasas que hidrolizan y confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Las cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter* (CDAs) confieren resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y algunas cepas de *Acinetobacter* expresan además, metalo- β -lactamasas (MBLs) que hidrolizan a un amplio espectro de agentes antimicrobianos, como los carbapenémicos (Hernández Torres y et al. 2010; Vanegas Munera, 2014).

- b) Limitación del acceso a los sitios de acción: Los canales de porinas y otras proteínas de la membrana externa se encargan entre otras cosas, del transporte de agentes antimicrobianos en la célula o para poder acceder a las dianas bacterianas. La resistencia a carbapenémicos se ha relacionado con la pérdida de proteínas que forman parte de los canales de porinas de la membrana externa, mientras que la resistencia a los β -lactámicos está relacionado no sólo a la presencia de enzimas, sino a alteraciones en la membrana externa. Posee además bombas de eflujo capaces de expulsar de forma activa un amplio espectro de agentes antimicrobianos que actúan sobre la pared bacteriana (Hernández Torres, 2010).
- c) Mutaciones que alteran los sitios de acción o las funciones celulares; éstas son mutaciones puntuales que alteran las dianas, provocando una disminución en la afinidad de los distintos antimicrobianos o suprarregulando las funciones celulares, tales como la producción de bombas de eflujo u otras proteínas (Hernández Torres, 2010).

2.5.Sulfonamidas

El término sulfonamida se utiliza como nombre genérico de los derivados de la *p*-amino-benceno-sulfonamida (sulfanilamida), éstos, fueron los primeros compuestos eficaces que se utilizaron por vía sistémica para el tratamiento de infecciones bacterianas en el ser humano. En términos generales, las sulfonamidas ejercen sólo un efecto bacteriostático y, los mecanismos de defensa celular y humoral del hospedador son esenciales para erradicar finalmente la infección (Brunton, 2012).

Su descubrimiento tuvo gran relevancia en el campo de la medicina y la salud pública, al lograrse dar tratamiento y disminuir la morbilidad y mortalidad de infecciones estreptocócicas y meningocócicas (Franklin y Snow, 2005). Sin embargo, con el advenimiento de la penicilina y de los antibióticos, su uso disminuyó, hasta que a mediados del decenio de 1970 se combinó con el trimetoprim, una aminopiridina, ésta combinación es utilizada hoy en día como profilaxis y en el tratamiento de infecciones microbianas, especialmente las urinarias.

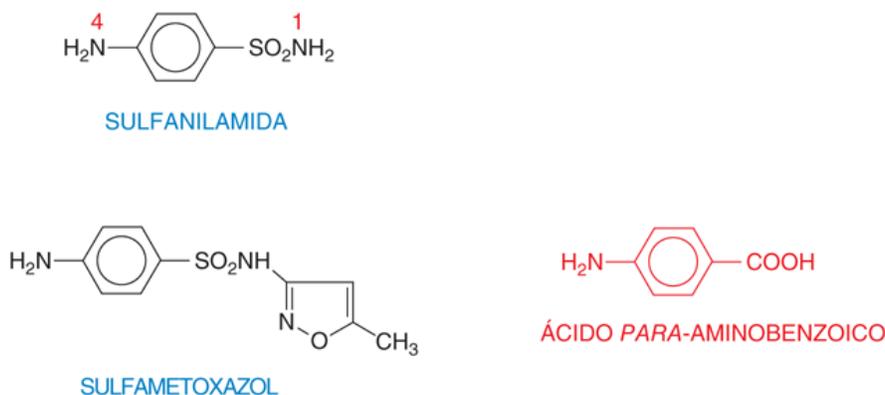


Figura 7. Estructura química de las sulfanilamidas, sulfametoxazol y el ácido p-aminobenzoico. Brunton, L. et al. Consultado en: www.accessmedicina.com

2.5.1. Sulfametoxazol - Trimetoprim

La actividad antimicrobiana que posee el sulfametoxazol en conjunto con el trimetoprim, se debe al sinergismo, resultado de la acción en dos fases de la vía enzimática en la síntesis del ácido tetrahidrofólico; ya que la sulfonamida inhibe la incorporación del ácido *p*-aminobenzoico (PABA) en el ácido fólico y el trimetoprim evita la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato.

Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas competitivos del PABA, lo que los hace inhibidores competitivos de la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), la cual incorpora PABA en el ácido dihidropteroico, precursor inmediato del ácido fólico. El trimetoprim actúa en forma de un inhibidor competitivo potente y selectivo de la enzima dihidrofolato reductasa, la cual reduce el dihidrofolato en tetrahidrofolato (Brunton, 2012).

Por lo anterior, la administración simultánea de una sulfonamida y de trimetoprim induce bloqueos seriados en la vía por la que los microorganismos sintetizan tetrahidrofolato, a partir de moléculas precursoras, provocando un efecto sinérgico que permite que el antimicrobiano actúe con mayor eficacia a como lo haría por separado.

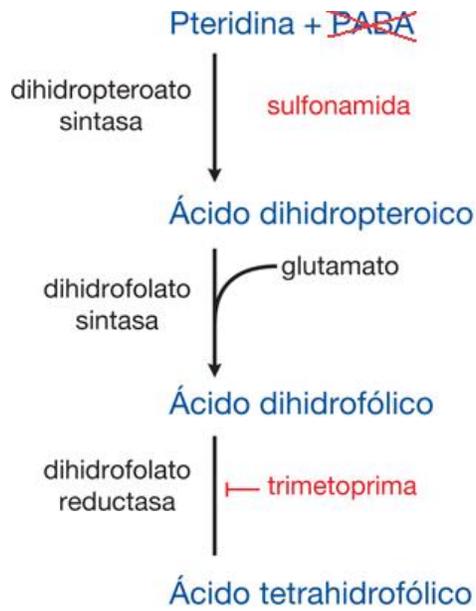


Figura 8. Mecanismo de acción de Sulfametoxazol-trimetoprim. Modificado de Brunton, L. et al. Consultado en: www.accessmedicina.com

2.5.2. Resistencia bacteriana adquirida a las sulfonamidas

La resistencia a las sulfonamidas está dada por una alteración en la constitución enzimática de la bacteria, que se caracteriza por:

- Menor afinidad hacia las sulfonamidas por parte de la dihidropteroatosintasa
- Decremento de la permeabilidad bacteriana o flujo de salida activo del fármaco
- Una vía metabólica alternativa para la síntesis de un metabolito esencial
- Mayor producción de un metabolito esencial o de un antagonista del compuesto.

(Brunton, 2012)

La resistencia a las sulfonamidas puede surgir debido a mutaciones cromosómicas del gen que codifica para la enzima DHPS o con mayor frecuencia, por la adquisición de genes que codifican DHPS alternativas (Adnan, M. et al., 2017), estos últimos son los genes *sul*, los cuales fueron identificados primeramente en cepas pertenecientes a *Escherichia coli* y se han observado en bacterias Gram negativas, principalmente enterobacterias. De estos genes, hasta la fecha, sólo se han descubierto cuatro distintos tipos, los cuales difieren en la cantidad y tipos de aminoácidos que integran a la proteína, así como en los elementos genéticos móviles donde se encuentran ubicados (Sköld, O., 2000).

El gen *sul1*, se ha observado como parte de la secuencia conservada en el extremo 3' en los integrones clase 1, mientras que el gen *sul2* generalmente se localiza en pequeños plásmidos de resistencia no conjugativos, plásmidos de resistencia transmisibles o en elementos de secuencia de inserción de región común (ISCR2); el gen *sul3*, se ha encontrado hasta el momento sólo en *E. coli* aislada de distintos animales, como cerdos, ganado y aves de corral, relacionándose ocasionalmente con el integrón de clase I no clásico (sin la secuencia conservada 3'), transposones y plásmidos; finalmente el gen *sul4* fue descubierto en el 2017, en integrones presentes en cepas de *E. coli* pero hasta el presente trabajo aún no se conoce el rango de hospedadores que lo presenta o si existe otra forma de transmisión aparte de los integrones (Grape, Farra, Kronvall y Sundström, 2005; Razavi et al., 2017; Shin, et al., 2015).

Las pruebas de susceptibilidad generalmente se realizan para la combinación de antimicrobiano conocida como sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) y los resultados de las pruebas realizadas con cualquiera de los fármacos solos son insuficientes. Sin embargo, a pesar del aumento en los niveles de resistencia a trimetoprim durante las últimas décadas, la resistencia a las sulfonamidas suele ser más común. Además, la resistencia a SXT es algo menos frecuente que la resistencia a sulfonamidas solas o trimetoprim solo (Huovinen, 2001).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la resistencia bacteriana se ha convertido en un grave problema a nivel mundial, ya que a pesar de la amplia y diferente gama de antimicrobianos que se han desarrollado en el último siglo, también lo han hecho los diferentes mecanismos con los que las bacterias los enfrentan.

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) también se han convertido en un tema de gran importancia, ya que un factor a tener en cuenta son las malas prácticas de higiene en el ambiente hospitalario, que van desde el lavado de manos por parte del personal hasta la limpieza de material y de objetos que están en contacto con diferentes pacientes; otro factor es la administración inadecuada de antimicrobianos a los pacientes, ya que uno de los principales efectos secundarios es que las bacterias adquieren resistencia.

Tanto *Acinetobacter baumannii* como *Pseudomonas aeruginosa* son consideradas unas de las principales bacterias causantes de las IAAS a nivel mundial, además de que poseen un perfil de multiresistencia lo que dificulta su erradicación no sólo en los pacientes sino en el medio hospitalario. Ambas bacterias pueden ser aisladas principalmente de catéteres y respiradores, así como de material inanimado en las salas hospitalarias.

Por lo tanto, se puede suponer que, en algún momento de la estancia hospitalaria del paciente, puede ocurrir un contacto entre bacterias de distinta familia, género o especie y que por consiguiente se genere un intercambio de información genética entre ellas, sin embargo, no se han descrito con exactitud los mecanismos que nos indiquen si efectivamente la convivencia en este ambiente entre distintas bacterias incrementa la resistencia.

Lo anterior da como resultado, entre otras cosas, la adquisición de factores asociados a la resistencia a antimicrobianos, con lo cual se ve afectado el éxito en la terapéutica de los pacientes que se encuentran internados en los hospitales, lo que conlleva también a altos niveles de mortalidad y genera un aumento en los gastos de los servicios de salud, ya que significa más días de hospitalización, medicamentos, antimicrobianos, personal, etc.

En el presente trabajo se estudia la interacción *in vitro* entre *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como la búsqueda de factores asociados a la resistencia antimicrobiana que puedan ser intercambiadas entre ellas.

4. HIPÓTESIS

Al cultivar *Acinetobacter baumannii* sensible a sulfonamidas, en presencia de sobrenadantes de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* resistente, ocurrirá un cambio en su perfil de resistencia debido a la transferencia horizontal de genes asociados con la resistencia a sulfonamidas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Evaluar el cambio en el perfil de sensibilidad a antimicrobianos en *Acinetobacter baumannii*, asociado a factores de resistencia liberados por *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar los perfiles de sensibilidad a diferentes antimicrobianos de la cepa de *Acinetobacter baumannii* A424 y de una cepa clínica multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Estandarizar las condiciones óptimas de cultivo para favorecer la inducción de resistencia a sulfametoxazol en *Acinetobacter baumannii*.
- Evaluar el perfil de sensibilidad de la cepa de *Acinetobacter baumannii* y confirmar su resistencia a sulfonamidas, después de cultivarla en presencia de sobrenadantes de la cepa multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la presencia del integron de clase I en *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente mediante la técnica de PCR.
- Determinar la presencia del integron de clase I en *Acinetobacter baumannii* A424 inducida a resistencia de sulfonamidas mediante la técnica de PCR.

6. MATERIAL Y METODOS

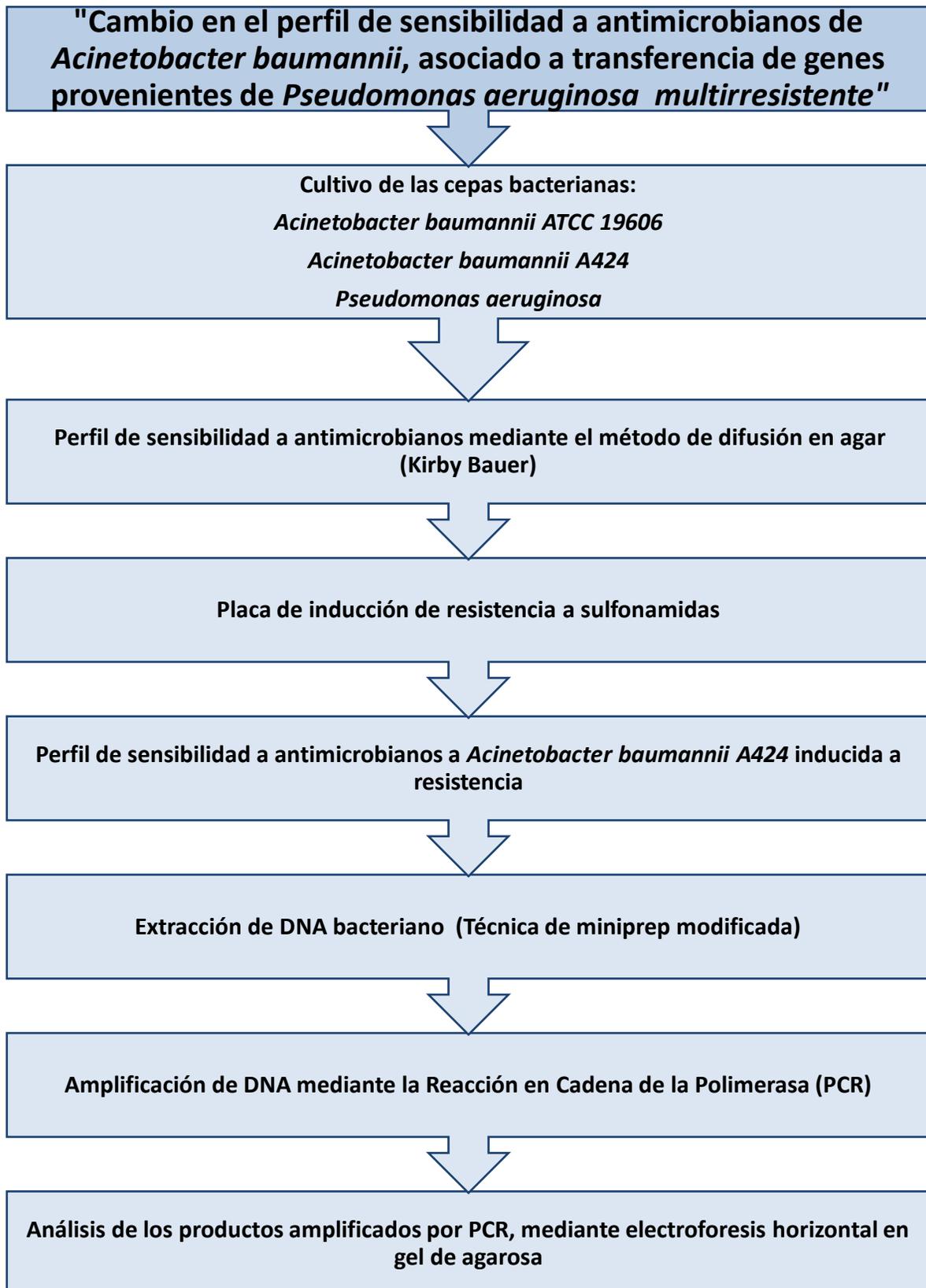
6.1. Equipo

- Microscopio óptico (Zeiss)
- Centrífuga (Hettich, Rotina 35 R)
- Incubadora (Blue-M)
- Balanza analítica (Ohaus AV313)
- Espectrofotómetro UV/Vis (Jenway 6320D)
- Microcentrífuga (Hermle Z400K)
- Termociclador (Techne TC-3000)
- Cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad)
- Transiluminador (WiseUV WUV-L50)

6.2. Cepas

- *Acinetobacter baumannii* A424
- *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
- *Pseudomonas aeruginosa*. Cepa de origen clínico, aislada de punta de catéter por la Bioquímica Diagnóstica Beatriz Soto Rincón en el 2016, para su trabajo titulado "Mortalidad asociada a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente aislada en puntas de catéter de pacientes pediátricos"

6.3. Diagrama general del desarrollo experimental



6.3.1. Cultivos bacterianos

Para preparar las suspensiones y ajustarlas a los estándares de turbidez de McFarland, las cepas se sembraron en placas de Agar Soya Tripticaseina (AST), mediante la técnica de dilución, a una temperatura de 37 °C durante 18 horas.

En lo que respecta a la obtención de los sobrenadantes de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, la cepa se sembró en placas de Agar Luria Bertani, adicionado con sulfametoxazol [23.75 µg/mL] e incubó a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Se seleccionaron colonias aisladas y sembraron en 5 mL de Caldo Luria Bertani, incubándose a una temperatura de 37 °C durante 24 horas.

Para llevar a cabo la extracción de DNA bacteriano, las cepas se sembraron en placas de AST, mediante la técnica de dilución, a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Se seleccionaron colonias aisladas y sembraron en 5 mL de Caldo Luria Bertani, incubándose a una temperatura de 37 °C durante 48 horas

6.3.2. Prueba de difusión en agar (Kirby-Bauer)

La metodología realizada se basó en la citada guía M02 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Se utilizaron cepas de 24 horas de crecimiento en placa.

Se seleccionaron colonias y se suspendieron en 3 mL de solución salina fisiológica (SSF) estéril. Se estandarizó la turbidez de la solución, comparándola visualmente contra el patrón 0.5 del estándar de turbidez de McFarland, se sumergió un hisopo de algodón estéril en esta solución e inoculó toda la superficie de una placa de Agar Muller-Hinton. Se colocaron unidiscos de antibiótico, con una distancia de 25 mm entre ellos y las paredes de la placa, e incubaron durante 18 horas a 37 °C. Al término se midieron los halos de inhibición de cada unidisco con una regla graduada milimétricamente y se compararon con los parámetros establecidos por la CLSI para determinar su sensibilidad o resistencia.

6.3.3. Placa de inducción de resistencia a sulfonamidas

A partir del caldo Luria Bertani sembrado con *Pseudomonas aeruginosa*, se centrifugó a 2000 RFC durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró en un tubo estéril, con una membrana de 0.2 µm de poro, a éste, se le realizó una prueba de

esterilidad, sembrando directamente en placas de Agar Soya Trypticaseína durante 24 horas a 37 °C.

En una placa de 6 pozos, se colocaron 2 mL de Agar Antibiótico 1, a cada uno de los pozos, una vez solidificado se colocó 1 mL de Agar Blando tibio junto con 1 mL de filtrado del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*. Después de solidificado, se colocaron 10 µL de una suspensión de *Acinetobacter baumannii* A424 en SSF, igualada al estándar de McFarland 0.5 y se incubó durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

De cada pozo, se tomó parte del crecimiento mostrado en la parte superior, y se realizó una igualación, en SSF, al estándar de McFarland 0.5 y se procedió a realizar una prueba de difusión en agar, como se describe en el punto 5.3.2, los unidiscos utilizados se enlistan en la tabla 1. Para las pruebas de difusión en disco se utilizaron como controles las cepas de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y *Acinetobacter baumannii* A424 sin inducir.

Se realizaron 5 repeticiones de este procedimiento para validar los resultados obtenidos. La identidad de las colonias presentes en la parte superior de cada pozo se determinó mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias para confirmar que en cada caso correspondía a *Acinetobacter baumannii* (Figura 13).

6.3.4. Extracción de DNA genómico

Se cultivaron las bacterias en 5 mL de caldo nutritivo durante 48 horas a 37 °C y al finalizar este tiempo se centrifugaron 1.5 mL del medio de cultivo durante 2 minutos a 18,000 RFC y se eliminaron los sobrenadantes. Se resuspendieron los botones en 200 µL de amortiguador TE y se adicionaron 30 µL de SDS al 10% y 10 µL de proteinasa K al 10%, se mezclaron por agitación e incubaron durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 100 µL de NaCl 5M, se mezclaron e incubaron durante 10 minutos a 65 °C, al finalizar, se adicionaron 350 µL de cloroformo, se mezclaron y microcentrifugaron durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadió un volumen equivalente de fenol: cloroformo, se mezclaron y microcentrifugaron durante 5 minutos a 18,000 RFC; se transfirió nuevamente el sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionó 0.6 de volumen de isopropanol, se mezcló y colocó en hielo por 15 minutos, para posteriormente microcentrifugarlo durante 2 minutos a 15,500 RFC. Se decantó y lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70%, se microcentrifugó por 5 minutos a

18,000 RFC, se descartó el sobrenadante y se colocó el tubo durante 15 minutos en una estufa a 37 °C, para permitir la evaporación del etanol. Se resuspendió el precipitado en 60 µL de agua bidestilada estéril.

6.3.5. Condiciones de amplificación de la PCR

Se utilizaron para cada reacción, 25 µL de MyTaqTMMix (Bioline), 1 µL del cebador *forward* y 1 µL del cebador *reverse*, ambos a una concentración de 20 µM y 1 µL de DNA bacteriano a una concentración de 200 ng/µL, en un volumen final de 50 µL. Los cebadores utilizados se sintetizaron en Integrated DNA Technologies (IDT) con las especificaciones mostradas en el Cuadro 1. Se realizaron 35 ciclos en PCR de punto final, estableciéndose en 95 °C/ 15 seg; 42.7 °C/ 15 seg y 72 °C/15 seg.

Cuadro 1. Características del par de cebadores utilizados para amplificar el gen Intl 1 del Integrón clase 1 según Koeleman y col (2001).

Cebadores	Gen diana	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto amplificado
Intl1 <i>Forward</i>	Intl 1	CAG TGG ACA TAA GCC TGT TC	160 pb
Intl1 <i>Reverse</i>		CCC GAG GCA TAG ACT GTA	

6.3.6. Electroforesis horizontal

Se realizó un gel de agarosa al 2%. Las condiciones de corrimiento fueron de 90 v durante 60 minutos. Para determinar los pares de bases del amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 100-3000 pb, Bioline®.

7. RESULTADOS

7.1. Perfil inicial de sensibilidad a antimicrobianos

Al determinar la resistencia a antimicrobianos en la prueba de difusión en agar, se encontró que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* poseía resistencia a fluoroquinolonas, sulfonamidas y carbapenémicos, mientras que la cepa de *Acinetobacter baumannii* A424 sólo fue resistente a un carbapenémico y para el resto de los antimicrobianos probados resultó sensible, el control positivo utilizado *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 mostró resistencia a sulfonamidas, cefalosporinas y carbapenémicos, como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Perfil de sensibilidad para *Acinetobacter baumannii* A424, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

Antimicrobiano		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> A424	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606
Familia	Nombre			
Aminoglucósidos	Amikacina	S	S	S
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	R	S	S
Sulfonamidas	Sulfametoxazol/ Trimetoprim	R	S	R
Cefalosporinas	Cefepime	S	S	S
	Ceftazidima	S	S	S
	Cefotaxime	I	I	R
Carbapenemicos	Meropenem	R	R	R
	Imipenem	S	S	S
Macrolidos	Azitromicina	S	S	S

Perfil realizado mediante la técnica de difusión en agar antes de realizar la placa de inducción a resistencia en cepas de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y A424, así como para *Pseudomonas aeruginosa*. R: Resistencia, S: Sensible, I: Intermedio.

7.2. Perfil de sensibilidad a antimicrobianos posterior a la inducción de resistencia

El cambio en el perfil de resistencia a antimicrobianos después de realizarse la inducción se determinó mediante una prueba de difusión en agar para las cepas empleadas (Figura 9, 10, 11 y 12). En la cepa *Acinetobacter baumannii* A424 a la que se indujo resistencia, se presentó un cambio notorio para el caso del antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprim, ya que pasó de ser sensible a resistente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Perfil de antibiograma para la cepa inducida a resistencia *Acinetobacter baumannii* A424

Antimicrobiano		Control negativo	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5
Familia	Nombre						
Sulfonamidas	Sulfametoxazol/	S	R	R	R	R	R
	Trimetoprim	18 mm	7 mm	7 mm	7 mm	7 mm	7 mm
Aminoglucósidos	Gentamicina	S	S	S	S	S	S
		23 mm	21 mm	22 mm	21 mm	21 mm	22 mm
Cefalosporinas	Cefepime	S	S	S	S	S	S
		21 mm	22 mm	21 mm	22 mm	22 mm	22 mm
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S
		27 mm	28 mm	28 mm	27 mm	28 mm	28 mm
Carbapenemicos	Meropenem	R	R	R	R	R	R
		7 mm	13mm	14mm	13mm	13mm	14mm

Perfil de sensibilidad a antimicrobianos para la cepa inducida a resistencia *Acinetobacter baumannii* A424 después de su exposición con sobrenadantes de *Pseudomonas aeruginosa*, extraída de cada uno de los 5 pocillos de la placa de inducción a resistencia comparada con el control negativo *Acinetobacter baumannii* A424 y el control positivo *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

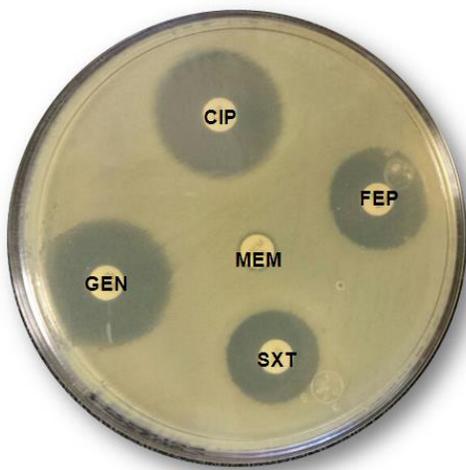


Figura 9. Prueba de difusión en agar para la cepa *Acinetobacter baumannii* A424 no inducida a resistencia. Halos de inhibición de crecimiento para los antimicrobianos CIP: ciprofloxacino, FEP: cefepime, GEN: gentamicina, MEM: meropenem y SXT: sulfametoxazol-trimetoprim

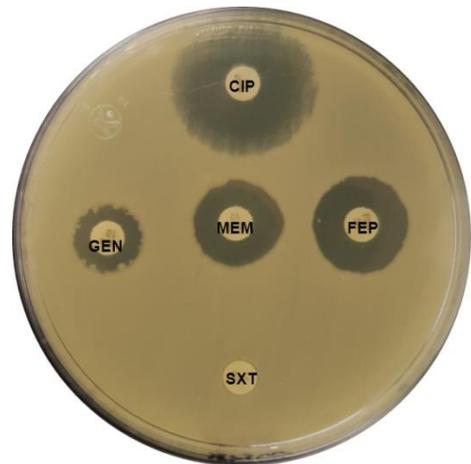


Figura 10. Prueba de difusión en agar para la cepa *Acinetobacter baumannii* A424 inducida a resistencia. Halos de inhibición de crecimiento para los antimicrobianos CIP: ciprofloxacino; FEP: cefepime; GEN: gentamicina; MEM: meropenem y SXT: sulfametoxazol-trimetoprim

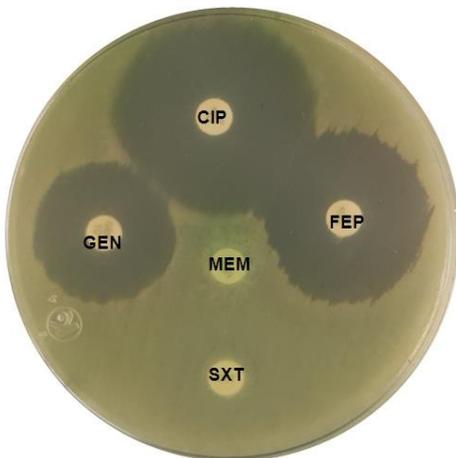


Figura 11. Prueba de difusión en agar para la cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Halos de inhibición de crecimiento para los antimicrobianos CIP: ciprofloxacino; FEP: cefepime; GEN: gentamicina; MEM: meropenem y SXT: sulfametoxazol-trimetoprim

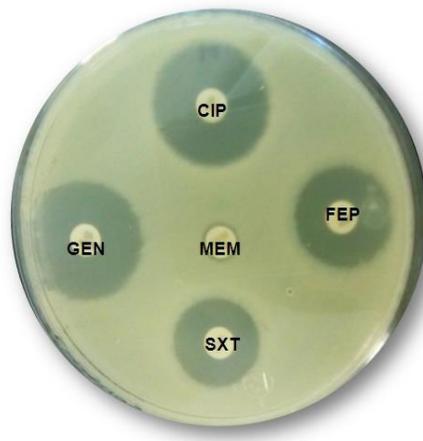


Figura 12. Prueba de difusión en agar para la cepa *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Halos de inhibición de crecimiento para los antimicrobianos CIP: ciprofloxacino; FEP: cefepime; GEN: gentamicina; MEM: meropenem y SXT: sulfametoxazol-trimetoprim

De igual manera a todas las cepas trabajadas se les realizó un ensayo de sensibilidad a antimicrobianos y de identificación de bacterias Gram negativas, utilizando una placa MicroScan®, esto con el fin de corroborar la identidad de cada una de ellas y obtener un perfil de sensibilidad más completo, puesto que este sistema cuenta con un grupo de antimicrobianos a evaluar más grande que el que se puede realizar mediante la prueba de difusión en agar. Se encontró que tanto la identidad como el perfil de resistencia, comparadas con las realizadas por difusión en agar, fueron equivalentes. La lectura e interpretación de cada una de las pruebas se realizó manualmente, según las indicaciones del fabricante.

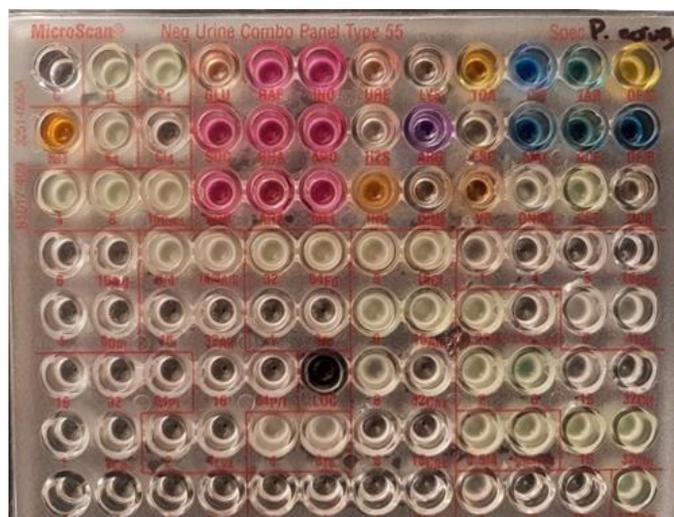


Figura 13. Placa MicroScan sembrada con *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 14. Placa MicroScan sembrada con *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606



Figura 15. Placa MicroScan sembrada con *Acinetobacter baumannii* A424

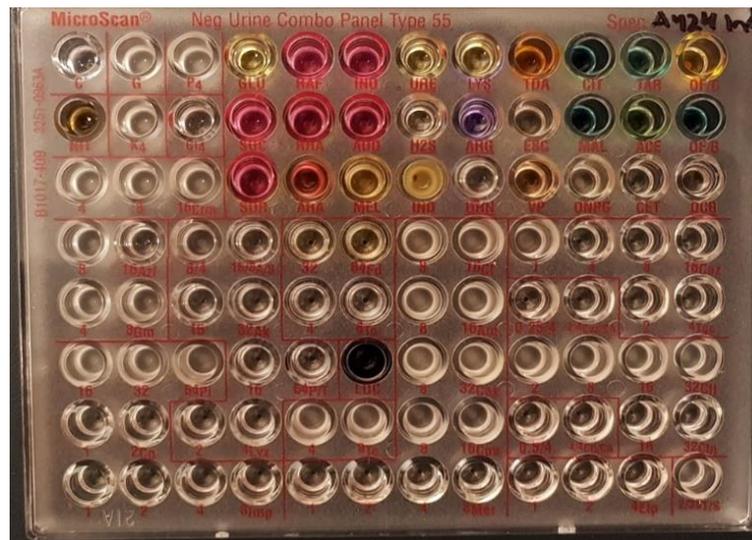


Figura 16. Placa MicroScan sembrada con *Acinetobacter baumannii* A424 inducida a resistencia

7.3. Transferencia horizontal de material genético

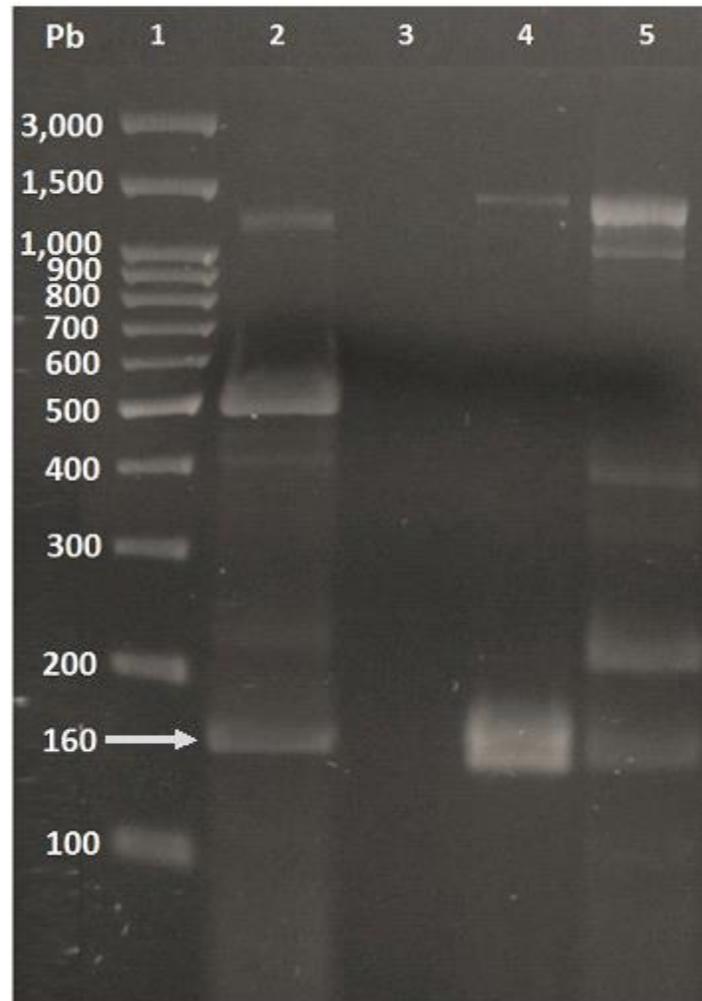
Se realizó una amplificación del gen *IntI*, el cual codifica para la integrasa presente en el integrón tipo 1, el tamaño de este amplificado es de 160 pb, las muestras amplificadas corresponden a cada una de las cepas utilizadas en el presente trabajo y que se visualizan en la Figura 17.

Se encontró que las muestras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* A424 inducida a resistencia y *Acinetobacter baumannii* 19606 presentaban una banda de 160 pb, que corresponde al tamaño del gen *IntI*.

La cepa de *Acinetobacter baumannii* A424 sin inducir, no presentó ninguna banda, indicando que la cepa no posee el gen *IntI* y por lo tanto no está presente el integrón tipo I.

Se obtuvieron también otras bandas inespecíficas de distintos tamaños, las cuales pueden corresponder a fragmentos de DNA cuyas secuencias o parte de ellas, coinciden con las pertenecientes al par de cebadores utilizados.

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa para los amplificados correspondientes al gen *IntI* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.



1, Marcador de peso molecular de 100 pb; 2, *P. aeruginosa*; 3, *A. baumannii* A424; 4, *A. baumannii* inducida a resistencia; 5, *A. baumannii* ATCC 19606.

8. DISCUSIÓN

Las bacterias intrahospitalarias *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, son conocidas por su capacidad de generar resistencia a distintos antimicrobianos, así como por su capacidad de permanecer en el ambiente y en objetos inanimados. La resistencia que ambas poseen es determinada no sólo intrínsecamente, sino por la adquisición de material genético de manera horizontal. Lo anterior nos indica, que en el medio hospitalario una interacción entre ambas bacterias puede ocurrir y que por lo tanto existir una transferencia de los genes asociados a la resistencia antimicrobiana.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* con la que se trabajó es de origen clínico, aislada de una punta de catéter que posee resistencia, entre otros antimicrobianos, a sulfametoxazol (Soto Rincón, B. 2016), se trabajó también con una cepa de *Acinetobacter baumannii* A424 que presenta un perfil de sensibilidad hacia sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), ambos perfiles se presentan en el Cuadro 2.

Con el fin de simular, *in vitro*, el tipo de interacción que mantienen las bacterias en el ambiente hospitalario, se realizó en una placa de 6 pozos una inducción a resistencia, utilizándose los sobrenadantes pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* y como bacteria receptora a *Acinetobacter baumannii* A424.

En la investigación es rutinario utilizar medios de cultivo suplementados con antimicrobianos cuando se requiere aislar colonias resistentes a algún antimicrobiano específico, principalmente cuando esta resistencia es dada por una transferencia horizontal de genes, como es el caso de los plásmidos. Esto se debe a que la presencia del antibiótico sólo permitirá que se desarrollen colonias resistentes al mismo, por lo tanto, esta selección permite únicamente el crecimiento de colonias bacterianas que poseen dentro de su información genética los genes que codifican para otorgar resistencia al antimicrobiano de interés. El Agar Blando permitió la difusión de las partículas presentes en el mismo hacia zonas cercanas, en este caso, la superficie, donde entró en contacto con las células bacterianas de *Acinetobacter baumannii*, ya que posee un porcentaje menor de agar.

Se utilizó la concentración de 25 µg/ mL de sulfametoxazol debido a que ésta es la concentración utilizada en los unidiscos comerciales para determinar la sensibilidad de una cepa, y es diferente a las concentraciones de antimicrobianos que se manejan en la terapéutica. La concentración que se maneja en los unidiscos se utiliza únicamente como medida de potencia y está estandarizada para su uso *in*

vitro, con el fin de determinar si un microorganismo es sensible o resistente; mientras que las concentraciones del antimicrobiano que se administran a los pacientes se determinan en base a distintos parámetros, principalmente la posología del fármaco, tomando en cuenta también, que se administra en conjunto con trimetoprim.

Aun cuando no hay reportes bibliográficos de una metodología parecida a la realizada en este trabajo, si existen trabajos como el de Tanner y col. en el 2017, en el cual realizaron una transferencia de un plásmido, que otorga resistencia a betalactamasas, en *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de *E. coli*. En el 2009 Okamoto y col. realizaron una transferencia del integrón clase I de cepas de *Salmonella entérica* a partir de *E. coli*, realizando perfiles de resistencia y amplificadores del integrón para demostrar que existía una transferencia horizontal de una bacteria a otra, éste y otros trabajos nos indican que es posible inducir resistencia en una bacteria mediante la transferencia horizontal de genes, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la resistencia inducida a sulfonamidas se debe a una transferencia horizontal de genes, específicamente a los genes *sul* y posiblemente los *dfr*, aunque estos últimos no fueron evaluados.

Al compararse los perfiles de sensibilidad de *Acinetobacter baumannii* A424 antes y después de la inducción a resistencia, hay un cambio drástico únicamente en el antimicrobiano correspondiente a SXT, ya que pasa de ser sensible a resistente, mientras que para el resto de los antimicrobianos a los que se midió la sensibilidad no cambian su perfil, es decir los que eran sensibles antes de la inducción permanecen de esa manera, de acuerdo a las guías del NCLSI, M 100-S21. La metodología para inducir resistencia se repitió 5 veces, utilizando siempre las mismas condiciones, manejando como control negativo, un pozo sin sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* y sembrado con *Acinetobacter baumannii* A424.

A pesar de que se presenta una resistencia al complejo formado por los antimicrobianos sulfametoxazol y trimetoprim, los genes y mecanismos por los que las bacterias presentan resistencia es diferente para cada uno de ellos, ya que en el caso de sulfonamidas los genes *sul* son los encargados de codificar la resistencia, mientras que los genes *dfr* son los que codifican para la resistencia a trimetoprim (Frank et al., 2007).

Para conocer completamente el mecanismo mediante el cual se genera la resistencia al antimicrobiano SXT en las bacterias, es necesario investigar a los genes *sul* y a los genes *dfr*, sin embargo no se conoce por completo la secuencia

de los genes *sul*, lo que dificulta su estudio; mientras que para el caso de resistencia a trimetoprim existen otros mecanismos mediante los que se genera resistencia en las bacterias, como son bombas de eflujo, mutaciones, modificaciones en el sitios de acción, etc. (Shin et al., 2015), y por lo tanto se debería hacer un estudio inclusivo de todos estos mecanismos. El presente trabajo sólo se enfocó en el estudio de las sulfonamidas, y se exploró únicamente el gen *sul1* presente en el integrón de clase I.

Se estudió concretamente al integrón de clase I, ya que a pesar de que se han descrito al menos seis clases de integrones, los de clase 1 son los más comunes en aislamientos clínicos de bacterias Gram-negativas, además de ser el único integrón que se conoce que estructuralmente posee un extremo 3' altamente conservado, que contiene al gen *sul1*, responsable de otorgar resistencia a sulfonamidas (Turton, J. F., 2005).

Para determinar si existía una relación entre la resistencia a sulfonamidas y la presencia de los integrones clase I en las cepas trabajadas, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés; en este caso los cebadores utilizados se basaron en los diseñados por Koeleman y col. (2001), los cuales amplifican un fragmento de 160 pb del gen *IntI*, el cual corresponde al gen de la integrasa presente únicamente en el integrón clase 1. Este gen es el encargado de codificar a la integrasa la cual permite la interacción entre su sitio de reconocimiento (*attI*) y el sitio de reconocimiento de los casetes genéticos que pueda poseer el integrón (*attC*), formando por lo tanto una parte fundamental de la estructura del integron (González et al., 2004).

La utilización del par de cebadores, se basó en un análisis bibliográfico enfocado a la búsqueda de diseños preexistentes de pares de cebadores asociados a la resistencia de sulfonamidas, realizado en la base de datos PubMed del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

A pesar de que existen artículos que informan el uso de cebadores asociados al gen *sul1*, no se tomaron en cuenta debido al hecho de que no está reportada la secuencia del gen en el NCBI, y por lo tanto no podríamos asegurar que los amplificadores realmente correspondan al gen, buscándose en su lugar cebadores relacionados al Integrón clase I, que como ya se ha descrito anteriormente se conoce que en su región conservada 3' está integrado el gen *sul1*.

En el 2001, Koeleman y col., fueron los primeros en desarrollar y utilizar cebadores enfocados en el gen *IntI*, del integrón clase I, los cuales han sido utilizados en

distintas investigaciones de *Acinetobacter baumannii* y otras bacterias Gram negativas con éxito. A pesar de que son varios los pares de cebadores se decidió trabajar únicamente con uno de ellos, el cual se eligió tomando como base que fue uno de los más utilizados y que además ofreció buenos resultados en la bibliografía consultada, tal y como en el caso de Dillon y col., en el 2005; Japoni y col., en el 2013 y Makowska y col., en el 2015.

Como se puede apreciar en la Figura 17, la presencia de una banda correspondiente a un fragmento de 160 pb, en las muestras de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* A424 inducida a resistencia, indica la presencia del integrón clase I en las mismas, mientras que la ausencia de la misma banda en la muestra de *Acinetobacter baumannii* A424, revela que no posee el integrón; la intensidad de la banda, en cada una de las muestras, difiere, debido a que es proporcional a la cantidad que posee cada una de las bacterias, esto indica que la misma cepa antes de someterla al proceso de inducción de resistencia no posee el gen para la misma, y después de inducir su resistencia a sulfonamidas si lo presenta.

La presencia de bandas inespecíficas, aun después de estandarizar la metodología de la PCR, se puede asociar a coincidencias en la secuencia de bases en el DNA, mismas que modificando las condiciones de la PCR podrían ser eliminadas, sin embargo solo se trabajó en la mejor visualización de la banda correspondiente al integrón clase I.

Al realizar una comparación de los resultados de la electroforesis contra los del perfil de sensibilidad (Figura 17 y Cuadro 3) se observa que hay una relación directa entre la presencia del integrón clase I y la resistencia hacia sulfametoxazol-trimetoprim. Ya que en el caso de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* A424 después de ser manipulada, se presenta una resistencia *in vitro* hacia el antimicrobiano y se presenta la banda relacionada con el integrón clase I; mientras que en el caso de la cepa de *Acinetobacter baumannii* A424 antes de ser manipulada, no se observa resistencia hacia SXT ni se aprecia la banda que se relaciona con la presencia del integrón clase I., lo anterior indica que con las cepas trabajadas, se presentó una resistencia inducida hacia el antimicrobiano sulfametoxazol.

A pesar de haber obtenidos resultados favorables en este trabajo, se debe tomar en cuenta que no en todos los casos clínicos existe una relación directa entre los integrones clase I y la resistencia hacia sulfonamidas, esto debido a que estudios

como los de Dillon, B. y col. del 2005, hallaron que sólo un porcentaje de los aislados clínicos de cepas de *Acinetobacter baumannii* poseían este integrón, mientras que en el resto de los aislados la resistencia se ha asociado a otro tipo de integrón, como el de clase II, a otros elementos genéticos móviles como plásmidos o simplemente no se encontró un mecanismo con el cual relacionarlo.

9. CONCLUSIONES

- Se logró inducir resistencia a sulfametoxazol en una cepa de *Acinetobacter baumannii*, asociada a la presencia de una cepa multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa*.
- La resistencia se comprobó mediante la prueba de difusión en agar y la lectura en placa MicroScan®.
- La resistencia encontrada parece deberse a la presencia del gen *sul1* dentro del integrón clase 1, cuya presencia fue comprobada por la amplificación de un fragmento específico de su extremo 3' por PCR.
- Se demostró que ocurrió un cambio en el perfil de sensibilidad a sulfametoxazol en *Acinetobacter baumannii*, pasando de ser sensible a resistente.

10. REFERENCIAS

1. Adnan, M., Khan, H., Kashif, J., Ahmad, S., Gohar, A., Ali, A., Khan, M. A., Shah, S. S.A., Hassan, M. F., Irshad, M., Khan, N. A. y Rahman, S. U. (2017). Clonal expansion of sulfonamide resistant *Escherichia coli* isolates recovered from diarrheic calves. *Pakistan Veterinary Journal*, 37(2). 230-232. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/314306112_Clonal_Expansion_of_Sulfonamide_Resistant_Escherichia_coli_isolates_Recovered_from_Diarrheic_Calves
2. Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R., Y. (1968). A Study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology*, 95(5), 1520–1541.
3. Brisou, J., Prevot A., R. (1954). Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Annales De l'Institut Pasteur*, 86(6):722-8.
4. Brunton, L. L., Chabner, B. A. y Knollmann, B. C. (2012) *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com>
5. Chalmers, R. y Blot, M. (1999) Insertion Sequences and Transposons. American Society for Microbiology. 151-169.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (2011). M100-S21 (M2). Disk diffusion supplemental tables, CLSI, Wayne Pa.
7. CLSI (2018) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13ª ed. CLSI standard M02. Wayne PA.
8. DiConza, J. A., y Gutkind, G. O. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista argentina de microbiología*, 42(1). 63-78. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412010000100014&lng=es&tlng=es
9. Franklin, T. J. y Snow, G. A. (2005). *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action*. U.S.A: Springer Science & Business Media. 6ª Edición.
9. Dillon, B., Thomas, L., Mohmand, G., Zelynski, A. y Iredell, J. (2005) Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates *J. Microbiol. Methods*, 62 pp. 221-232. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.010
10. Frank, T., Gautier, V., Talarmin, A., Bercion, R. y Guillaume, A. (2007). Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4). 742–745. doi.org/10.1093/jac/dkl538

11. Garza Ramos, U., Silva Sánchez, J., y Martínez Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, 51(3), s439-s446. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900009
12. González R, G., Mella M, S., Zemelman Z, R., Bello T, H., y Domínguez Y, M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revistamédica de Chile*, 132(5), 619-626. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000500013>
13. Grape, M., Farra, A., Kronvall, G. y Sundström, L. (2005) Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(3). 185-192. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.01059.x
14. Hernández Ramírez, K. C. (2017). Plásmidos bacterianos. [Figura] *Saber más*, 6 (33) 27-29. Recuperado de <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/283-numero-33/510-plasmidos-bacterianos.html>
15. Hernández Torres, A., García Vázquez, E., Yagüe, G. y Gómez Gómez, J. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Revista Española de Quimioterapia*, 23(1), 12-19
16. Hui, L., Yi-Feng, L., Williams, B. y Timothy, S. (2011). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(2). 63-68. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.10.001.
17. Huovinen, P. (2001) Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole, *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1608–1614.
18. Japoni Nejad, A., Farshad, S., Belkum, A. V. y Ghaznavi Rad, E. (2013) Novel cassette array in a class 1 integron in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from central Iran. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8). 645-650. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.09.005>
19. Juni, E. (2015). *Acinetobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01203
20. Koeleman, J.G.M., Stoof, J., Van Der Bijl, M.W., Vandenbroucke Grauls, C.M.J.E., Savelkoul, P.H.M., (2001). Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J. Clinical Microbiology Reviews*, 39. 8 – 13.

21. Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610. <http://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
22. Loera Valenzuela, P. B., López Ortiz, C. E., Romero Vela, C. D., Luévanos Escareño, M. P. y Balagurusamy, N. (2016). Mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos en bacterias. *Revista Médica de Tlaxcala*, 8(2), 67-76. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/312324922_Mecanismos_de_resistencia_intrinseca_y_adquirida_a_antibioticos_en_bacterias
23. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. y Monnet, D. L. (2012), Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
24. Makowska, N., Koczura, R. y Mokracka, J. (2015). Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. *Chemosphere*. 144. 1665-1673. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.044
25. Moradali, M. F., Ghods, S. y Rehm, B. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, (39). doi:10.3389/fcimb.2017.00039
26. Muñoz López, M., y García Pérez, J. L. (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, 11(2), 115–128. doi:10.2174/138920210790886871
27. Nowak, P. y Paluchowska, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance-role of carbapenemases. *Folia HistochemCytobiol*. Vol 54, No. 2, 2016 pp.61-74
28. Ochoa, S. A., López Montiel, F., Escalona, G., Cruz Córdova, A., Dávila. L., López Martínez, B., Jiménez Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández Castro, R. y Xicohtencatl Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*,

- 70(2). 138-150. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010
29. Okamoto, AS, Andreatti Filho, RL, Rocha, TS, Menconi, A, & Marietto-Gonçalves, GA. (2009). Detection and transfer of antimicrobial resistance gene integron in *Salmonella* Enteritidis derived from avian material. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 11(3), 195-201. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2009000300009>
 30. Palleroni N. J. (2015). *Pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. doi:10.1002/9781118960608.gbm01210
 31. Peleg, A. Y., Seifert, H. y Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538–582. <http://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
 32. Razavi, M., Marathe, N. P., Gillings, M. R., Flach, C. F., Kristiansson, E., y Joakim Larsson, D. G. (2017). Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome*, 5(160). doi 10.1186/s40168-017-0379-y
 33. Rice, L. B. (2008) Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. doi:10.1086/533452
 34. Rodríguez, R. D., Bustillo, D. E., Caicedo, D. C., Cadena, D.C. y Castellanos, C. (2016). *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente. *Medicas UIS*, 29(2). 113-35. <http://dx.doi.org/10.18273/revmed.v29n2-2016010>
 35. Schroeder, M., Brooks, B. D., y Brooks, A. E. (2017). The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes*, 8(39). doi:10.3390/genes8010039
 36. Shin HW, Lim J, Kim S, Kim J, Kwon GC y Koo SH. (2015) Characterization of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance genes and their relatedness to class 1 integron and insertion sequence common region in gram-negative bacilli. *J MicrobiolBiotechnol*. 25(1):137-42. Recuperado de <http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1409.09041>
 37. Shin, H. W., Lim, J., Kim, S., Kim, J., Kwon, G. C., y Koo, S. H. (2015). Characterization of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance genes and their relatedness to class 1 integron and insertion sequence common region in Gram-negative bacilli. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 137–142. doi 10.4014/jmb.1409.09041

38. Sköld, O. (2000) Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), 155–160. doi 10.1054/drup.2000.0146
39. Soto Rincón, B. (2016) *Mortalidad asociada a Pseudomonas aeruginosa multiresistente aislada en puntas de catéter de pacientes pediátricos* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
40. Tanner, W. D., Atkinson, R. M., Goel, R. K., Toleman, M., Benson, L. S., Porucznik, C. A. y Van-Derslice, J. A. (2017). Horizontal transfer of the blaNDM-1 gene to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 364(8) 102-120. doi:10.1093/femsle/fnx048 file
41. Turton, J. F., Kaufmann, M. E., Glover, J., Coelho, J. M., Warner, M., Pike, R., y Pitt, T. L. (2005). Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3074–3082. doi:10.1128/JCM.43.7.3074-3082.
42. Vanegas Múnera J. M., Roncancio Villamil G. y Jiménez Quiceno J. N. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Medicina*, 28(2), 233-246. Recuperado de <http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/2857>
43. Vignoli, R. y Seija, V. (2008). *Principales mecanismos de resistencia antibiótica*. 380-391. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
44. Watson, J. D. (2006) *Biología molecular del gen*. Medica Panamericana. Madrid, España. p. 350-352