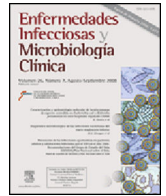




# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital español<sup>☆</sup>



Vanesa Estepa<sup>a</sup>, Beatriz Rojo-Bezares<sup>b</sup>, Jose Manuel Azcona-Gutiérrez<sup>c</sup>, Inés Olarte<sup>c</sup>, Carmen Torres<sup>a,b</sup> e Yolanda Sáenz<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España

<sup>b</sup> Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España

<sup>c</sup> Departamento de Diagnóstico Biomédico, Laboratorio de Microbiología, Hospital San Pedro, Logroño, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 16 de septiembre de 2015

Aceptado el 16 de diciembre de 2015

On-line el 9 de febrero de 2016

#### Palabras clave:

Porina OprD

ST175

*aadB*

Integrón

### R E S U M E N

**Introducción:** Los carbapenémicos son los antibióticos betalactámicos con mayor espectro de actividad en el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente una colección de aislados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (PARC).

**Métodos:** Se recogieron 85 aislados PARC de 60 pacientes en el Hospital San Pedro, Logroño (período 2008-2011). La relación clonal se determinó por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), la sensibilidad a 15 antipseudomónicos por método de difusión en disco y las alteraciones en *oprD*, la caracterización de integrones y la tipificación molecular (MLST) por PCR y secuenciación.

**Resultados:** Las 85 PARC se clasificaron en 35 perfiles diferentes de PFGE. Se seleccionaron 61 cepas de los 60 pacientes y se observó que eran multirresistentes, aunque ninguna mostró fenotipo carbapenemasa. Se detectó un gran polimorfismo de OprD, destacando que el 59% de las cepas presentaban un codón de finalización prematuro. *ISPa1328* e *ISPsp4* truncaban el gen *oprD* en 2 cepas (GenBank KF517097 y KF517098). El 67% de las cepas presentó integrones de clase 1 con genes codificantes de enzimas modificantes de aminoglucósidos, 2 de las cuales portaban un nuevo integrón: *aac(3)-Ia+aadA1h* (nombrado In272, GenBank GQ144317). Se detectaron 4 secuencias tipo (ST) (número de cepas): ST175 (35), ST308 (3), ST235 (2) y ST639 (1).

**Conclusión:** La multirresistencia, el alto polimorfismo de *oprD*, el alto porcentaje de integrones, la moderada relación clonal de las cepas y la elevada diseminación epidémica de clones de alto riesgo son aspectos de gran preocupación clínica para erradicar la diseminación de PARC.

© 2016 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

### Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital

#### A B S T R A C T

**Introduction:** Carbapenems are the beta-lactam antibiotics with the best spectrum of activity in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. The objective of this study was to molecularly characterise a collection of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates (PARC).

**Methods:** A total of 85 PARC isolates were recovered from 60 patients in the Hospital San Pedro, Logroño (period 2008–2011). Clonal relationship was determined using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), susceptibility testing to 15 anti-pseudomonal agents was performed using the disk diffusion method, and alterations in *oprD*, characterisation of integrons and molecular typing (MLST) using PCR and sequencing.

#### Keywords:

Porin OprD

ST175

*aadB*

Integrón

<sup>☆</sup> Parte de este trabajo fue presentado en el XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (abstract 720, Barcelona, España, 19-22 mayo 2010).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ysaez@riojasalud.es (Y. Sáenz).

**Results:** The 85 PARC were classified into 35 different PFGE profiles. Of the 61 selected strains from 60 patients all of them were multiresistant, although none of them showed a carbapenemase phenotype. High polymorphism was detected in *OprD*, emphasising that 59% of the strains had a premature stop codon. *ISPa1328* and *ISPs4* insertion sequences truncated *oprD* gene into 2 strains (GenBank KF517097 and KF517098). Two-thirds (67%) of the strains showed class 1 integrons with genes encoding aminoglycoside modifying enzymes, and 2 of them carried a new integron: *aac(3)-Ia+aadA1h*, named In272, GenBank GQ144317. Four sequence types were detected (Strain Nos.): ST175 (35), ST308 (3), ST235 (2), and ST639 (1).

**Conclusion:** Multidrug resistance, high polymorphism in *oprD*, a high percentage of integrons, moderate clonal relationship of strains, and the high epidemic dissemination of high-risk clones are clinical aspects of great concern in order to eradicate the spread of PARC.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

## Introducción

La especie *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas y nosocomiales de mayor relevancia clínica, no solo por su gran adaptabilidad, diseminación y persistencia (principalmente en ambientes húmedos), sino también por su resistencia intrínseca a diversos agentes antimicrobianos y su facilidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, lo que dificulta el tratamiento exitoso en los hospitales cuando dicha bacteria se encuentra implicada en procesos infecciosos. Además, este patógeno causa infecciones graves en pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas o en pacientes en condiciones de inmunodepresión, principalmente en el ámbito hospitalario, en unidades de cuidados intensivos (UCI) y en unidades de críticos oncohematológicos<sup>1,2</sup>.

Los carbapenémicos son los antibióticos betalactámicos con mayor espectro de actividad y son frecuentemente usados para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*<sup>3</sup>. Para ejercer su acción, los carbapenémicos deben atravesar la pared celular, lo que sucede a través de las porinas de la membrana externa en las bacterias gramnegativas. En concreto, *OprD* es una porina de membrana externa sustrato-específica de *P. aeruginosa*, que permite la difusión de carbapenémicos, aminoácidos básicos y péptidos pequeños<sup>3</sup>. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (PARC)<sup>1,2</sup>. Los principales mecanismos de resistencia a los carbapenémicos en *P. aeruginosa* son: 1) alteraciones o pérdida de la porina *OprD*; 2) sobreexpresión de bombas de expulsión activa; 3) hiperproducción de la betalactamasa cromosómica AmpC, y 4) producción de enzimas carbapenemasas. Se han descrito carbapenemasas de clase A, de clase B o metalo-betalactamasas (MBL), y de clase D, oxacilinasas<sup>4</sup>. Aunque la prevalencia de PARC productoras de MBL está aumentando a nivel mundial, los mecanismos intrínsecos de resistencia a carbapenémicos como la presencia de alteraciones en *OprD* son los mecanismos más frecuentes<sup>5-7</sup>.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente una colección de aislados PARC recogidos en el Hospital San Pedro de Logroño. Se realizó el estudio fenotípico de resistencia a agentes antipseudomónicos, se analizaron los mecanismos de resistencia a carbapenémicos implicados, y se detectó la presencia de integrones, así como la tipificación molecular de los aislados seleccionados.

## Material y métodos

### Aislados clínicos

Se recogieron 85 aislados de *P. aeruginosa* con resistencia al menos a uno de los antibióticos carbapenémicos testados (imipenem, meropenem y/o doripenem), procedentes de muestras clínicas del Hospital San Pedro de Logroño durante el período de septiembre 2008 a diciembre 2011.

Los aislados se obtuvieron de diferentes tipos de muestras: herida (25), orina (16), úlcera (16), frotis rectal (11), frotis faríngeo (6), esputo (3), exudado conjuntival (2) y otros (6: frotis inguinal, exudado nasal, aspirado, punta de catéter central, hemocultivo y lavado broncoalveolar). Recogidas de 60 pacientes hospitalizados (46 hombres y 14 mujeres), cuya media de edad era 69 años (rango de edad entre 16 y 99 años) y procedentes mayoritariamente de los servicios de neumología (15%), cirugía (15%), medicina general (8%), medicina interna (8%), hematología (7%), nefrología (5%), UCI o medicina intensiva (5%) o enfermedades infecciosas (5%).

### Tipificación molecular

La relación clonal entre los aislados se estudió por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Se realizaron los insertos de ADN bacteriano en agarosa según el procedimiento descrito por Rojo-Bezares et al.<sup>8</sup>; y tras digestión con la enzima *SpeI*, los fragmentos se separaron por PFGE bajo las siguientes condiciones: 2 rampas lineales pulsadas de 5-15 s y 15-45 s, respectivamente, durante 10 h cada una, manteniendo un gradiente de voltaje de 6V/cm y a 14 °C. Los perfiles de bandas obtenidos fueron analizados con las recomendaciones de Tenover et al.<sup>9</sup> y, posteriormente, por el programa informático BioNumerics 2.0 (Applied Maths, Bélgica).

La secuencia tipo (ST) se determinó por la técnica de *multilocus sequence typing* (MLST), basada en la amplificación y secuenciación de 7 genes *housekeeping* y comparación de estos alelos con la base de datos <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.

### Estudios de sensibilidad a antibióticos

Se estudió la sensibilidad a 15 agentes antipseudomónicos (ticarcilina, piperacilina, piperacilina-tazobactam [TZP], ceftazidima [CAZ], cefepima, aztreonam, imipenem [IPM], meropenem [MEM], doripenem [DOR], gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino, norfloxacino y colistina) mediante el método de difusión por disco, siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>10</sup>. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos IPM y MEM por el método de dilución en agar<sup>10</sup>, y de los antibióticos TZP y CAZ mediante tiras de test de CMI (Liofilchem, Italia; bioMérieux, Francia).

Los fenotipos betalactamasa de espectro extendido (BLEE), metalo-betalactamasa (MBL) y carbapenemasa de clase A fueron analizados por la técnica del test sinérgico de doble disco. Los discos empleados en cada caso fueron los siguientes: 1) cefepima-amoxicilina/ácido clavulánico-clavulanzidima; 2) IPM-EDTA (0,5 M, pH8)-MEM, y 3) IPM-ácido 3-aminofenilborónico (300 µg)-MEM. La hiperproducción de la betalactamasa AmpC se investigó en las cepas CAZ resistentes usando placas en presencia y ausencia de cloxacilina (250 µg/ml) con tiras de E-test de CAZ (bioMérieux,

**Tabla 1**  
Cebadores empleados en el análisis del gen *oprD*

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	Referencias
OprD-F	CGCCGACAAGAAGAACTAGC	12
OprD-R	GTCGATTACAGGATCGACAG	12
OprD-seq	GCCGACCACCGTCAAATCG	12
OprDlong-F	CTACGCAGATGCCAGATGC	11
OprDlong-R	CCTTTATAGGCGCGTTGCC	11
ISPs92-F <sup>a</sup>	TCTTGCTGATGTTGCGTAGC	En este estudio
ISPs92-R <sup>a</sup>	CGCTGAGGTTATCGGTGATT	En este estudio
ISW64-F <sup>a</sup>	GGCAGATTCCAGAGATGGTC	En este estudio
ISW64-R <sup>a</sup>	AGCGGGATTGTGACTTGGT	En este estudio

<sup>a</sup> Cebadores diseñados en este estudio para completar la secuencia del gen *oprD* en las cepas Ps92 y W64.

Francia). Las cepas PAO1 y PAOΔdB se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente. Se definió el aislado hiperproductor de AmpC cuando se observaba una diferencia de, al menos, una dilución doble entre la CMI de CAZ y CAZ con cloxacilina.

#### Análisis de los genes determinantes de metalo-betalactamasas y carbapenemasas de clase A

La presencia de genes codificantes de MBL (IMP, VIM, GIM, SIM y SPM) o de carbapenemasas de clase A (KPC, SME, IMI y GES) se llevó a cabo por PCR múltiples<sup>8</sup>.

#### Caracterización de la porina OprD

Los cambios aminoacídicos en la proteína OprD se analizaron por PCR<sup>11,12</sup>, secuenciación y posterior comparación con la secuencia de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (número de acceso en GenBank: AE004091) empleada como cepa de referencia. Se diseñaron nuevos cebadores de secuenciación para los aislados Ps92 y W64 en los que diferentes secuencias de inserción truncaban el gen *oprD* (tabla 1).

#### Detección y caracterización de integrones

La detección de los genes codificantes de las integrasas de tipo 1, 2 o 3, así como la presencia del segmento 3' conservado *qacEΔ1+sul1* (característico de los integrones de clase 1) fueron estudiados por PCR. El polimorfismo de los promotores Pc y P2, y la caracterización de las regiones variables de los integrones de clase 1 se analizaron por PCR y secuenciación<sup>13</sup>.

## Resultados

#### Relación clonal de los aislados

Se estudió mediante PFGE la relación clonal de los 85 PARC aislados de 60 pacientes. Se observó que las cepas provenientes de un mismo paciente mostraban perfiles de PFGE indistinguibles, excepto en un paciente en el que las 2 cepas aisladas presentaban patrones diferentes. Para continuar el estudio, el criterio de selección fue caracterizar una cepa PARC por paciente (salvo la inclusión de las 2 cepas con distinto PFGE aisladas de un mismo paciente). Se seleccionaron 61 cepas de los 60 pacientes, entre las que se observaron 35 patrones de bandas de PFGE diferentes. En la figura 1 se puede observar el dendrograma de PFGE obtenido con estas 61 cepas.

#### Perfiles de sensibilidad a antibióticos

La figura 2 muestra los porcentajes de resistencia a los 15 antibióticos testados en las 61 cepas seleccionadas. Todas mostraban un fenotipo de multiresistencia, según el criterio de

Magiorakos et al.<sup>14</sup>. Los porcentajes de resistencia a IPM, MEM, CAZ y TZP fueron 88, 82, 15 y 20%, respectivamente, observándose unos rangos de resistencia según CMI de 8 a >64 μg/ml para IMP; 8 a 128 μg/ml para MEM; 32 a >256 μg/ml para CAZ, y >256 μg/ml para TZP entre las cepas resistentes a dichos antibióticos. Ninguna de las cepas presentó el fenotipo BLEE, MBL o carbapenemasas de clase A, ni fue resistente a colistina, y solo un único aislado resistente a CAZ (Ps75) mostró un fenotipo de hiperproducción de AmpC. Se observó corresponsencia de los carbapenémicos (nuestro criterio de selección) con los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas.

#### Caracterización de la proteína OprD

En la tabla 2 se muestran las alteraciones de la porina OprD encontradas en las 61 PARC seleccionadas, observando que en todas ellas se detectaron una gran variedad de cambios aminoacídicos (sustituciones, presencia de inserciones, deleciones y codones de finalización prematuros). Cabe destacar que el 59% (36/61) de las cepas estudiadas presentaban un codón de finalización prematuro, y 31 de las cuales (pertenecientes a 9 patrones de PFGE diferentes) lo mostraban en el aminoácido 142 (sustitución Q142stop).

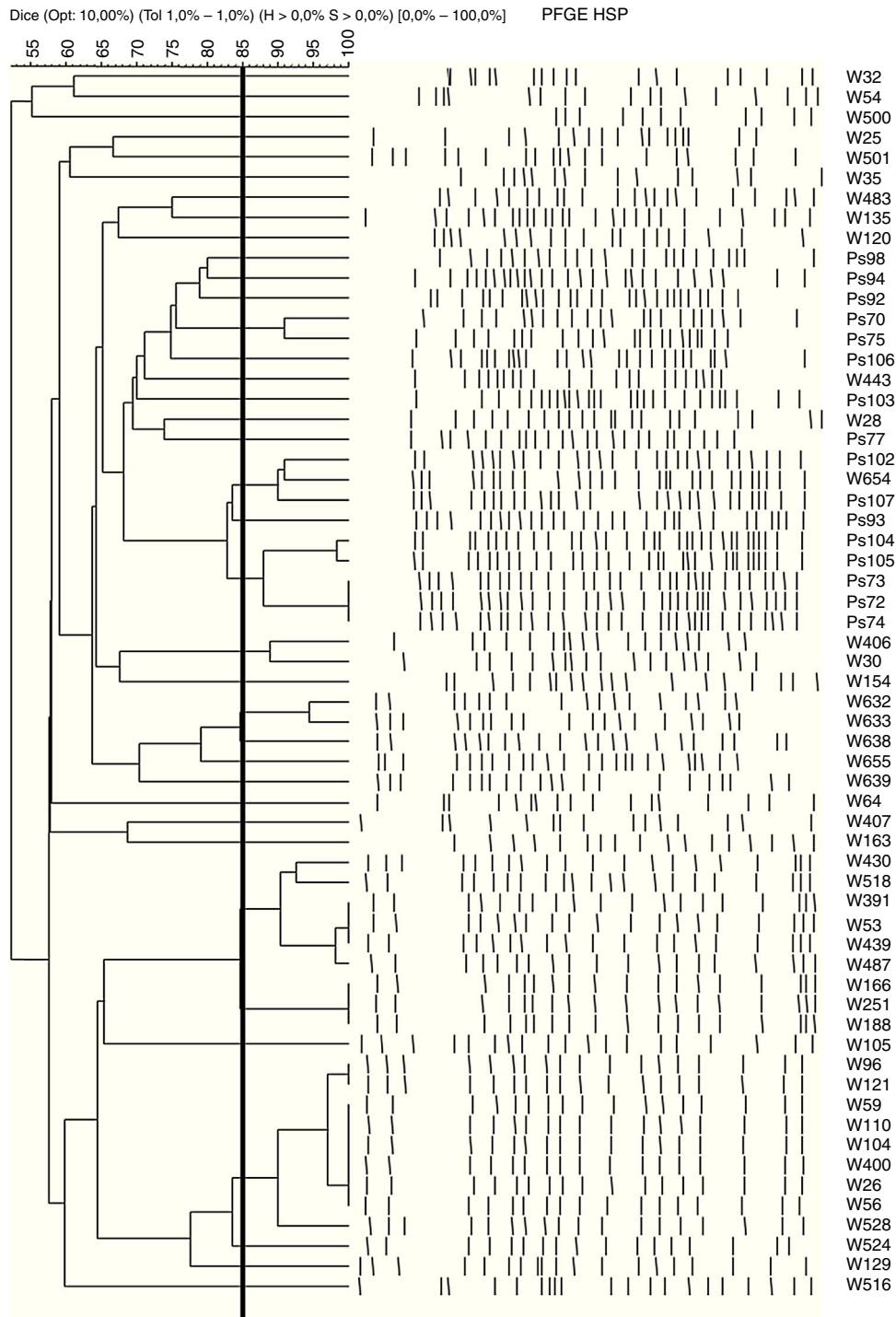
Del mismo modo, se observaron diferentes inserciones/deleciones, tanto en tamaño (desde 1 pb hasta >1.000 pb) como en posición (desde el nucleótido 8 hasta el nucleótido 1212), destacando las cepas Ps92 y W64 que presentaban el gen *oprD* interrumpido por las secuencias de inserción ISPa1328 e ISPsp4, respectivamente. ISPa1328 pertenece a la familia de IS256 e ISPsp4 a la familia de IS30. Las secuencias del gen *oprD* en las cepas Ps92 y W64 fueron nuevas y por ello se introdujeron en la base de genes GenBank, cuyos números de acceso fueron KF517097 y KF517098, respectivamente.

#### Caracterización de integrones y secuencias tipo

El 67% (41/61) de las cepas estudiadas amplificaron el gen codificante de la integrasa de tipo 1 (*intI1*) y el segmento 3' conservado (*qacEΔ1+sul1*), mientras que todas ellas fueron negativas para las integrasas de tipo 2 y 3. Todas las cepas *intI1*-positivas incluían genes codificantes de enzimas modificantes de aminoglucósidos en sus regiones variables. Es importante resaltar que ninguna de nuestras cepas presentó 2 o más integrones simultáneamente (tabla 3).

El casete génico más prevalente fue *aadB*<sub>2</sub> regulado por un promotor híbrido tipo 1 (PcH1), presente en 35 de las cepas *intI1*-positivas (85%). Este casete génico es idéntico al descrito en la base de datos GenBank con el número de acceso AJ871915; ambos presentan 4 mutaciones aminoacídicas respecto al casete génico de *aadB* (número de acceso GenBank: L06418): K11Q, I60M, M69T y V142M.

Además, se encontraron otras estructuras génicas (número de cepas): *aac(6')*-Ib-3 (2), *aac(6')*-Ib'-3 (2) y la combinación *aac(3)*-Ia+*aadA1h* (2). La diferencia existente entre *aac(6')*-Ib-3 y *aac(6')*-Ib'-3 es una mutación en la posición 102 (L102S), mientras que ambos genes presentaban la mutación N5T respecto del gen *aac(6')*-Ib (número de acceso GenBank: AF034958). Los promotores asociados en estos casos fueron promotor débil (PcW) para el casete génico *aac(6')*-Ib-3, mientras que en el caso de *aac(6')*-Ib'-3 se observaba el promotor PcH1. Por último, la combinación *aac(3)*-Ia+*aadA1h* estaba asociada a un promotor híbrido de tipo 2 (PcH2). Este integrón, descrito por primera vez en este estudio y encontrado en 2 cepas (W30 y W406) de diferentes pacientes y aisladas en 2 años distintos (2008 y 2009, respectivamente), fue depositado en la base de genes GenBank con el número de acceso GQ144317 y fue denominado como In272 en la base de datos de INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>).



**Figura 1.** Dendrograma de las 61 PARC seleccionadas del Hospital San Pedro (HSP).

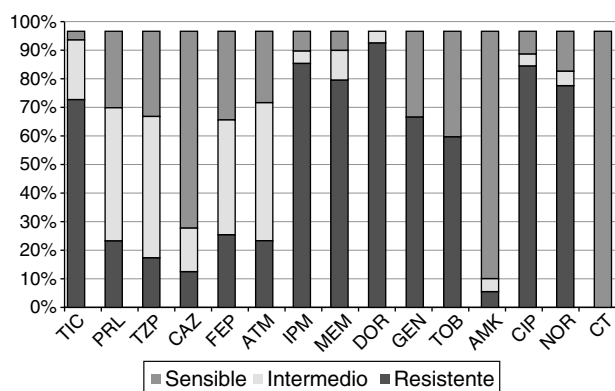
Por otro lado, se analizó la ST en todas las cepas portadoras de integrón. Entre las 41 cepas se detectaron únicamente 4 ST diferentes (número de cepas): ST175 (35), ST308 (3), ST235 (2) y ST639 (1). En la [tabla 3](#) se puede ver la asociación de la ST con el integrón detectado en las cepas portadoras de estos. Todas las cepas portadoras del integrón con el casete génico *aadB*<sub>2</sub> (11 patrones de PFGE diferentes) pertenecieron a la ST175, destacando además que en este grupo se incluyen las 31 cepas que presentaban la mutación Q142stop en la porina OprD. Mientras que la ST308 se encontró asociada a cepas portadoras de diferentes tipos de integrones *-aac(6')-Ib-3* y *aac(6')-Ib'-3* e, incluso, uno de ellos relacionado también con la

ST639. ST308 y ST639 no están relacionados, puesto que la combinación alélica de ambos ST es totalmente diferente.

## Discusión

*P. aeruginosa* es uno de los patógenos más problemáticos en el ámbito clínico y el aumento en la resistencia a carbapenémicos en esta especie es de gran preocupación a nivel mundial debido a las limitaciones que supone en su tratamiento clínico. Existen múltiples publicaciones sobre la presencia de PARC, incluso en forma de brotes epidémicos, en las UCI de diferentes hospitales<sup>15,16</sup>.





**Figura 2.** Porcentajes de resistencia de las 61 cepas PARC del HSP frente a los 15 antibióticos testados.

AMK: amikacina; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; CT: colistina; DOR: doripenem; FEP: cefepime; GEN: gentamicina; HSP: Hospital San Pedro; IPM: imipenem; MEM: meropenem; NOR: norfloxacino; PRL: piperacilina; TIC: ticarcilina; TZP: piperacilina-tazobactam; TOB: tobramicina.

Sin embargo, en nuestro trabajo solo el 5% procedían de UCI o medicina intensiva. Por otro lado, a pesar de que las 61 PARC seleccionadas mostraban un fenotipo de multirresistencia, ninguna de ellas mostraba el fenotipo BLEE, MBL o carbapenemasas de clase A. Existen multitud de artículos alertando en los últimos años del problema emergente de la diseminación de PARC portadoras de carbapenemasas<sup>7,17</sup>. Sin embargo, la prevalencia de PARC productoras de MBL en España es todavía relativamente baja comparada con la de otros países como Italia o Brasil<sup>5-8,18</sup>. De hecho, al igual que se observa en nuestro trabajo, la presencia de alteraciones en OprD es el mecanismo más frecuentemente implicado en la resistencia a imipenem<sup>6,16,19</sup>. Entre la gran cantidad de alteraciones en OprD de las 61 cepas analizadas, la presencia de codones de finalización prematuros encontradas en 36 de las cepas estudiadas o el truncamiento de *oprD* por la inclusión de secuencias o un elemento de inserción, inactivan OprD relacionándolo directamente con la resistencia a imipenem<sup>8,12,19</sup>. La alteración en OprD más frecuentemente detectada entre nuestras cepas es Q142stop, asociada con cepas adscritas a la línea clonal ST175. Esta mutación en OprD se ha observado en cepas multirresistentes de la línea clonal ST175 diseminadas en otros hospitales españoles<sup>20</sup>.

**Tabla 2**

Alteraciones encontradas en la porina OprD de las 61 cepas PARC seleccionadas

Grupo OprD	Nombre cepas (patrón PFGE)	Tamaño OprD (aa)	Alteraciones en OprD	
			Sustituciones	Inserciones/delecciones
1	(31 cepas) <sup>a</sup>	142	D43N, S57E, S59R, Q142stop	-
2	W500 (20)	236	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, Q236stop	-
3	W105 (10)	259	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, Y259stop	-
4	W407 (21)	305	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, Y305stop	-
5	W32 (22)	415	D43, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, W417stop	Loop L7-corto <sup>b</sup>
6	W391 (2a), W516 (17), Ps77 (18), Ps106 (19)	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L	Loop L7-corto <sup>b</sup>
7	W501 (25)	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, K398L, V401D	Loop L7-corto <sup>b</sup>
8	Ps98 (23)	195	D43N, S57E, S59R	inserción 7 pb (nt 538)
9	W639 (11)	345	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G	inserción 2 pb (nt 847)
10	Ps107 (6c)	431	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L	delección 1 pb (nt 1094)
11	W120 (24)	> 443	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L	Loop L7-corto <sup>b</sup>
12	Ps70 (26a), Ps75 (26b)	227	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A	inserción 1 pb (nt 1205)
13	Ps94 (15)	405	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G	delección 4 pb (nt 638)
14	W54 (27)	431	V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, G312R, A315G, L347M, S403A	delección 108 pb (nt 1000)
15	W35 (28)	432	E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q	Loop L7-corto <sup>b</sup>
16	W154 (29)	339	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, W339stop	delección 27 pb (nt 895)
17	Ps92 (30)	-	T103S, K115T	-
18	W25 (12), W163 (13)	364	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T	ISPa1328 (nt 463) <sup>c</sup>
19	W28 (31)	> 443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G	inserción 59 pb (nt 905)
20	W64 (32)	-	-	inserción 1 pb (nt 1206)
21	W30 (16a), W406 (16b)	49	-	ISPsp4 (nt 8) <sup>d</sup>
22	Ps103 (14)	73	-	delección 11 pb (nt 55)
23	W135 (33), W483 (34)	218	-	inserción 1 pb (nt 194)
24	W443 (35)	344	-	inserción 1 pb (nt 635)
				delección 1 pb (nt 909)

aa: aminoácidos; nt: nucleótido; PARC: *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos; PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado.

<sup>a</sup> Cepas (patrón PFGE): W26(1a), W56(1a), W59(1a), W104(1a), W110(1a), W400(1a), W96(1b), W121(1b), W528(1c), W524(1d), W53(2a), W439(2a), W487(2b), W166(2c), W188(2c), W251(2c), W518(2d), W430(2e), Ps104(3a), Ps105(3b), W632(4a), W633(4b), W638(4c), Ps72(5), Ps73(5), Ps74(5), W654(6a), Ps102(6b), W129(7), W655(8), Ps93(9). Todas estas cepas pertenecen a la línea clonal ST175.

<sup>b</sup> Acortamiento del Loop L7: 372-VDSSSYAGL-383 se denomina como Loop L7-corto.

<sup>c</sup> Nueva secuencia de *oprD* truncado por la secuencia de inserción ISPa1328 (incluida en GenBank con número de acceso KF517097).

<sup>d</sup> Nueva secuencia de *oprD* truncado por la secuencia de inserción ISPsp4 (incluida en GenBank con número de acceso KF517098).

**Tabla 3**  
Integrones de clase 1 y secuencias tipo detectadas en las 41 cepas *intI1*-positivas

Integrón de clase 1		Cepas	Secuencia tipo
Combinaciones génicas	Promotor		
<i>intI1+aadB2+qacEΔ1/sul1</i>	PcH1	(35 cepas) <sup>a</sup>	ST175
<i>intI1+aac(6′)-Ib-3+qacEΔ1/sul1</i>	PcW	W25, W163	ST308
<i>intI1+aac(6′)-Ib′-3+qacEΔ1/sul1</i>	PcH1	Ps103, Ps94	ST308, ST639
<i>intI1+aac(3)-Ia+aadA1h+qacEΔ1/sul1</i>	PcH2	W30, W406	ST235

<sup>a</sup> Cepas: W26, W53, W56, W59, Ps74, W96, W104, W105, W110, W121, W129, W166, W188, W251, W391, W638, W439, W400, W430, W487, W518, W524, W528, W633, W632, W639, W654, W655, Ps72, Ps73, Ps93, Ps102, Ps104, Ps105, Ps107.

Dos cepas (Ps92 y W64) tenían truncado el gen *oprD* por las secuencias de inserción *ISPa1328* e *ISPs4*, respectivamente. Wolter et al.<sup>11</sup> describieron por primera vez la inactivación de la expresión del gen *oprD* por la presencia de secuencias de inserción (*ISPa1328* e *ISPa1635*), lo que permitía a sus cepas un incremento de la resistencia a los carbapenémicos. En los últimos años, se ha incrementado el número de trabajos que describen la inclusión de secuencias de inserción (*ISPa27*, *ISPa45*, *ISPa46*, *ISPa47*, *ISPa133*, *ISPa1328*, *ISPa1635*, *ISPst12* o *ISPPu21*, entre otras) impidiendo la funcionalidad de *OprD*, aunque no existe una posición concreta donde se introducen estas secuencias de inserción interrumpiendo la lectura del gen, así como tampoco su direccionalidad o la familia de IS a la que pertenecen<sup>8,12,19,21-23</sup>.

Por otra parte, no todas las alteraciones encontradas en nuestras cepas clínicas están implicadas en la manifestación de resistencia a imipenem y/o meropenem. Existen cambios aminoacídicos (como los observados en los patrones de *OprD* 6 y 7 en este trabajo), que se han descrito tanto en cepas resistentes como en cepas sensibles a carbapenémicos<sup>8,22,24</sup>. Del mismo modo, el acortamiento del Loop-7 en 2 aminoácidos es una alteración que no implica directamente la resistencia a carbapenémicos porque la porina sigue mostrando una apertura suficiente que no interrumpe la penetración óptima del antibiótico<sup>25</sup>. Otros mecanismos cromosómicos como la hiperproducción de bombas de expulsión activa o de AmpC podrían estar implicados en la resistencia a carbapenémicos<sup>1,6</sup>.

Como ocurre en nuestro trabajo, en cepas clínicas de *P. aeruginosa* se ha observado una asociación de resistencia entre betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas<sup>2,26</sup>, lo que dificulta la elección adecuada del tratamiento antibiótico para erradicar esta especie en el ámbito hospitalario<sup>1,27</sup>. En cuanto a los valores de resistencia a otros antibióticos no betalactámicos, se debe destacar la alta resistencia a aminoglucósidos encontrada entre nuestras cepas (> 60% para gentamicina y tobramicina). La mayoría de las cepas resistentes a aminoglucósidos portaban integrones de clase 1, que a su vez albergaban en su región variable algún gen codificante de enzimas modificantes de aminoglucósidos. También se ha descrito en otros trabajos que en *P. aeruginosa* los principales casetes génicos incluidos en integrones de clase 1 confieren resistencia a betalactámicos y/o a aminoglucósidos<sup>8,28</sup>.

La variante del casete génico *aadB* (*aadB2*) se detectó en el 85% de las cepas integrón-positivas y todas ellas adscritas al clon ST175. Esta asociación ya había sido descrita por Nemeč et al.<sup>29</sup> en la República Checa y por trabajos previos de nuestro grupo de investigación<sup>8</sup>. En los últimos años, la diseminación de clones de alto riesgo en la especie *P. aeruginosa* ha desempeñado un papel primordial en la expansión de la resistencia a nivel mundial<sup>27</sup>. Entre los clones de alto riesgo diseminados por los hospitales de todo el mundo, las secuencias tipo ST235, ST111 y ST175 son las más frecuentes, normalmente asociadas con cepas multirresistentes, portadoras de integrones de clase 1, resistentes a carbapenémicos y/o productoras de MBL<sup>6,8,20,30,31</sup>.

En resumen, no se han detectado carbapenemasas entre las cepas de PARC aisladas de muestras clínicas en el hospital de estudio. Sin embargo, el alto polimorfismo observado en el gen *oprD*, así como la presencia de elementos de inserción truncándolo, inactivarían la porina *OprD* relacionándose directamente con la resistencia a carbapenémicos entre nuestras cepas. Asimismo, se han detectado cepas multirresistentes que, albergando integrones de clase 1 con casetes génicos implicados en la resistencia a aminoglucósidos, pertenecerían a clones epidémicos de alto riesgo (ST175 y ST235). El fenotipo de multirresistencia, el alto polimorfismo de *oprD*, el alto porcentaje de cepas portadoras de integrones, la moderada relación clonal de las cepas y la elevada diseminación epidémica de clones de alto riesgo son aspectos de gran preocupación que requieren un control y seguimiento que eviten la diseminación de estas PARC.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Instituto de Salud Carlos III (proyecto FIS PI12/O1276). Vanesa Estepa disfrutó de una beca predoctoral de la Universidad de La Rioja (España) durante la realización del estudio experimental de este trabajo.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## Bibliografía

- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:582–610.
- Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011;2:65.
- Fresnadillo-Martínez MJ, García-García MI, García-Sánchez E, García-Sánchez JE. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28 Suppl 2:53–64.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440–58.
- Riera E, Cabot X, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: Impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:2022–7.
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015;2:21–2, 41–59.
- Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:1804–14.
- Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin *OprD* and integrons. *Int J Med Microbiol.* 2014;304:405–14.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233–9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second informational supplement. M100-S22. Wayne, PA, USA: CLSI; 2012.
- Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236:137–43.
- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:4329–35.
- Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3996–4001.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:268–81.
- Knoester M, de Boer MGJ, Maarleveld JJ, Claas ECJ, Bernardis AT, de Jonge E, et al. An integrated approach to control a prolonged outbreak of multidrug-resistant

- Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:O207–15.
16. Fournier D, Richardot C, Müller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:1772–80.
  17. Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: Molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infect Dis.* 2013;13:505.
  18. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: A summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 4:S276–8.
  19. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4783–8.
  20. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6349–57.
  21. Diene SM, L'homme T, Bellulo S, Stremier N, Dubus JC, Mely L, et al. ISPa46, a novel insertion sequence in the oprD porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42:268–71.
  22. Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Sáenz Y. Genetic Lineages and antimicrobial resistance in *Pseudomonas* spp. isolates recovered from food samples. *Foodborne Pathog Dis.* 2015;12:486–91.
  23. Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, d'Ostuni V, Fusté E, Vinuesa T, Viñas M. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Microbiol.* 2011;14:51–8.
  24. Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macía MD, et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1703–13.
  25. Epp SF, Köhler T, Plésiat P, Michéa-Hamzehpour M, Frey J, Pechère JC. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1780–7.
  26. Palzkill T. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1277:91–104.
  27. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35:736–55.
  28. Viedma E, Estepa V, Juan C, Castillo-Vera J, Rojo-Bezares B, Seral C, et al. Comparison of local features from two Spanish hospitals reveals common and specific traits at multiple levels of the molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2454–8.
  29. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol.* 2010;161:234–42.
  30. García-Castillo M, del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, et al. Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2905–10.
  31. Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, et al. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:346–52.