CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES DE CLASE I EN AISLAMIENTOS HOSPITALARIOS DE *Acinetobacter baumannii*

ALEXIS GÁFARO MONTEJO
CÓDIGO: 186288

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS- MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ
2012

CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES DE CLASE I EN AISLAMIENTOS HOSPITALARIOS DE *Acinetobacter baumannii*

ALEXIS GÁFARO MONTEJO
CÓDIGO: 186288

Tesis de Maestría para optar al título de
Magister Scientae en Microbiología

DIRECTORA:
EMILIA MARÍA VALENZUELA DE SILVA
Q.F. MSc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS- MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ
2012

Dedicatoria:

Este trabajo va dedicado a los cinco dedos de mano derecha:

A mi Madre; alegría de plegaria respondida,

A Ibeth; cuento extraño con final feliz,

A Justis; acuario de barro con peces de colores,

A Burrito de plomo; canto de pasos imaginarios,

E Ivancito; corazón con pocas ganas de cansarse….

Y a Dios…. Quien conoce mis pensamientos…..

Agradecimientos

A mi directora de tesis quien me tuvo más paciencia que mi madre;

Al profe Mantilla por mostrarme la pasión de cantar un gol del Santafé en el Campin,

A Marta Fontanilla y a sus palabras,

A Socorrito y el olor a rosas de su oficina,

A Herli por prestarme su brazo enfermo cuando a mi me hicieron falta los míos,

A Yoli y Oscar mis compañeros de corredor,

A Ingrid, Vickytu, Vaneflo y la señorita Stacey, mágicos compañeros de laboratorio,

A mis compañeros de maestría… los estimo a todos,

A Oscar, Alexandra y Mery… el agua, los dNTPs y el cloruro de magnesio,

A Vivian Mejía y Carolina Hernandez los primers que me amplificaron el gen de la alegría,

A mi familia, el termociclador

Y a Jesucristo…. la Taq Polimerasa.

A todos gracias…. Y un abrazo que le rompa la espalda a la distancia.

Resumen

Se analizaron 129 aislamientos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos de hospitales colombianos de tercer nivel con el objetivo de detectar y caracterizar integrones de tipo I (elementos genéticos importantes por la capacidad de adquirir determinantes genéticos de resistencia a los antibióticos) y su relación con el fenotipo de resistencia antibiótica. De los aislamientos estudiados el 24% fueron positivos para la presencia del integrón de tipo I. La caracterización de estos últimos demostró la presencia de dos arreglos diferentes de genes en cassette que también se han reportado en otros lugares del mundo. La relación estadística entre los genes y el fenotipo de resistencia antibiótica señala que las cepas con integrones de tipo I tienden a presentar mayor resistencia hacia antibióticos como los aminoglicósidos. Se pudo concluir que el porcentaje de cepas positivas para integrasa se presenta en un nivel intermedio comparado con otros aislamientos del mundo y la similitud de las regiones variables detectadas hace suponer la estabilidad genética de esta estructura en cepas de diferentes regiones geográficas.

PALABRAS CLAVES: *Acinetobacter baumannii*, integrón, región variable, resistencia antibiótica.

Abstract

We analyzed 129 isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from Colombian tertiary hospitals with the aim of detecting and characterizing integrons of type I (genetic elements important for the ability to acquire genetic determinants of resistance to antibiotics) and its relation to the resistance phenotype antibiotic. Of the isolates studied, 24% were positive for the presence of type I integron. the characterization of the latter showed the presence of two different arrangements of genes on cassettes have also been reported elsewhere in the world. The statistical relationship between genes and antibiotic resistance phenotype indicates that the strains with type I integrons tend to have greater resistance to antibiotics such as aminoglycosides. It was concluded that the percentage of positive strains integrase occurs at an intermediate level compared to other isolates of the world and the similarity of the detected variable regions suggests the genetic stability of this structure in strains from different geographical regions.

KEYWORDS: *Acinetobacter baumannii,* integron, variable region, antibiotic resistance.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción 1

1. Planteamiento del problema 3

2. Justificación 5

3. Objetivos 7

3.1 Objetivo general 7

3.2 Objetivos específicos 7

4. Marco teórico 9

4.1 Generalidades 9

4.2 Relación de los integrones de tipo I con la resistencia antibiótica 10

4.3 Estructura de los integrones 10

4.4 La plataforma de funcionamiento 10

4.5 Diferentes tipos de integrones 12

4.6 Importancia clínica de la asociación integrón-cassette genético de resistencia 14

5. Metodología 17

5.1 Tipo de investigación 17

5.2 Aislamientos incluidos 17

5.3 Pruebas fenotípicas 18

5.3.1 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos 18

5.4 Pruebas genotípicas 18

5.4.1 Obtención del ADN: 18

5.4.2 Realización de la PCR 20

5.4.3 Digestión enzimática de las regiones variables 21

5.5 Relación de los genes de resistencia detectados con secuencias de inserción e integrones. 22

5.6 Asociación de los genes de resistencia detectados con el fenotipo de resistencia observado en los aislamientos de estudio 22

6. Resultados y análisis de resultados 23

6.1 Perfil de susceptibilidad de las cepas estudiadas 23

6.2 Presencia de integrasa tipo I 24

6.3 Caracterización de regiones variables de las cepas positivas para integrasa de tipo I 28

6.3.1 Resultado de la digestión con enzimas de restricción de las regiones variables encontradas 29

6.4 Asociación del integrón de tipo I con elementos de transferencia: secuencia de inserción IS26 32

6.5 Análisis estadístico de la relación integrasa y resistencia antibiótica 34

7. Conclusiones 35

8. Bibliografía 37

Anexos 45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de reacción de PCR 20

Tabla 2 . Condiciones de amplificación para gen de la integrasa 20

Tabla 3 Condiciones de amplificación de las regiones variables de los integrones 21

Tabla 4. Descripción de las regiones variables presentes en cepas positivas para integrasa de tipo I 30

Tabla 5. Otros genes de importancia en cepas positivas para integrasa de tipo I 34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Integración de genes en cassette dentro de un integrón 12

FIGURA 2 Estructura típica de un integrón de clase I 14

FIGURA 3. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de cepas positivas para integrasa tipo I 25

FIGURA 4. Relación integrasa tipo I y fuente de aislamiento 26

FIGURA 5. Presencia de integrasa y porcentaje de resistencia antibiótica 27

FIGURA 6. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de las regiones variables de aislamientos provenientes del hospital 1 28

FIGURA 7. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de las regiones variables de los aislamientos provenientes del hospital 2 28

FIGURA 8. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de la digestión enzimática de regiones variables (hospital 1) 29

FIGURA 9. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de la digestión enzimática de regiones variables (hospital 2) 29

FIGURA 10. Diagrama de la región variable de aislamientos del hospital 1 30

FIGURA 11. Diagrama de la región variable de los aislamientos de los hospitales 2 y 3 30

FIGURA 12. Regiones variables mas prevalentes descritas en aislamientos de *A. baumannii* 32

FIGURA 13. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de la amplificación cruzada *IS26*-integrasa I 32

Introducción

Actualmente, aproximadamente el 13% de los microorganismos que causan algún tipo de enfermedad en los seres humanos son microorganismos emergentes o reemergentes y dentro de estos son las bacterias las que más prevalecen. (Woolhouse, 2005). Inicialmente podría pensarse que este porcentaje de bacterias es relativamente pequeño y no representa un peligro real para la salud del hombre; sin embargo algunos de estos agentes infecciosos han desarrollado diversas estrategias como la resistencia a los antibióticos que dificultan su control en instituciones de salud donde existen un número grande de pacientes susceptibles y las diversas opciones encaminadas a controlar su prevalencia y mortalidad se ven reducidas drásticamente con un aumento considerable en los costos requeridos para controlar sus procesos infecciosos. (Giske, 2008).

Son diversos las especies que se incluyen en el grupo de bacterias emergentes en los últimos años y dentro de estas *Acinetobacter baumannii* es considerada como una de las más importantes en todo el mundo. Varios autores consideran que *A. baumannii* solo genera procesos infecciosos en pacientes susceptibles razón por la cual se describe como un patógeno oportunista. (Bergogne-Berezin, 1997; Guillou, 2005).

La sobrevivencia en ambientes con poca humedad, la resistencia a condiciones adversas y sobre todo la resistencia a la gran mayoría de antibióticos dan a *A. baumannii* una serie de ventajas que dificultan su erradicación y permiten a este la colonización de diversas superficies inertes y el desarrollo de diversos procesos infecciosos dentro de los cuales se incluyen la neumonía, meningitis, septicemias e infecciones de piel. (Jawad, 1998; Fournier, 2006).

Esta resistencia a los antibióticos puede diseminarse entre diferentes cepas porque los genes codificantes de resistencia pueden estar presentes en elementos genéticos que facilitan su movilización. Entre estos se encuentran los integrones que vienen siendo descritos hace algunos años y que se caracterizan por ser capaces de captar genes exógenos (genes cassette) que codifican determinantes de resistencia y determinantes con otras funciones. (White, 2001). Los integrones estructuralmente están formados por tres elementos necesarios para la captura de genes, uno que

codifica la integrasa, el otro es un lugar de recombinación sitio específico y por último un promotor para la expresión de los genes insertados. (Hall, 1995).

Aunque existen varias clases de integrones clasificados según la secuencia de la integrasa presente en el mismo, son los integrones de clase I los que más se han descrito en aislamientos bacterianos resistentes a los antibióticos. (Clark, 2000; Mazel, 2006). La caracterización de su estructura revela detalles de los genes en cassettes presentes en su región variable que pueden estar relacionados con los fenotipos de resistencia observados y describe realidades epidemiológicas típicas de la región a la que pertenecen los aislamientos. (Koeleman, 2001).

1. Planteamiento del problema

Las infecciones nosocomiales se han convertido en un aspecto de gran relevancia para todas las personas que en determinado momento se encuentran dentro de una institución de salud pública; situación que involucra no solo a pacientes y personas encargadas de su cuidado, sino también a diversos objetos inertes y superficies en los que algunas bacterias poseen la capacidad de sobrevivir y que se han relacionado con diversos procesos infecciosos que ponen en riesgo la salud y la vida de cualquier persona susceptible a la acción de las mismas.(Villegas, 2003; Maragakis, 2004).

Entre los diversos grupos bacterianos que se han relacionado con infecciones nosocomiales se mencionan: Las enterobacterias, los cocos grampositivos y bacilos gram negativos no fermentadores. Incluido en el último grupo mencionado esta la especie bacteriana *A. baumannii* que por sus capacidades de sobrevivir en ambientes adversos y su resistencia a los antibióticos se reporta cada vez más como causa de infecciones nosocomiales en muchas regiones del globo terráqueo. (Bergogne-Berezin, 1997; Dijkshoorn, 2007).

A nivel global el CDC (Centro para el Control y Prevención de enfermedades) ha informado un aumento espectacular de la resistencia a la mayoría de antibióticos en cepas de *A. baumannii* y en este momento la utilización de carbapenémicos figura como la estrategia terapéutica mas usada. Los carbapenémicos son fármacos de elección para el tratamiento de infecciones graves por *A. baumannii,* pero la eficacia se ha visto comprometida por el incremento de la resistencia. La prevalencia de cepas resistentes a carbapenémicos en Latinoamérica en el 2001 fue de 25% (Sader, 2004). En el 2005 la resistencia a estos antibióticos en hospitales colombianos ha llegado a 40%.(Miranda, 2006).

Aunque las tasas de resistencia se han incrementado constantemente a nivel mundial en los últimos años, varían significativamente entre las diferentes regiones. De acuerdo con el reporte global (Jones, 2003) y el reporte para Latinoamérica del SENTRY (Programa de Vigilancia Antimicrobiana) (Sader, 2004), las tasas de resistencia a los carbapenémicos tienden a ser mucho más elevadas en los países latinoamericanos que en Estados Unidos y Europa. En este reporte, *Acinetobacter*

spp fue más prevalente (noveno lugar entre los microorganismos más aislados) y presentó las mayores tasas de resistencia antibacteriana en Latinoamérica (10%), comparativamente con otras regiones evaluadas, en las cuales la resistencia estuvo alrededor del 5% (Sader, 2004).

A nivel local y según el último reporte del GREBO (Grupo para la Vigilancia de la Resistencia Bacteriana de Bogotá) en el periodo comprendido entre 2001- 2008 *A. baumannii* estuvo dentro de las diez microorganismos mas frecuentemente aislados en UCI (Unidad de Cuidados Intensivos) y NO UCI en muestras provenientes de 33 instituciones de Bogotá y 7 ciudades fuera de Bogotá. En este reporte puede observarse un perfil de multirresistencia, con un aumento constante en los porcentajes de resistencia para la mayoría de antibióticos, especialmente para carbapenémicos, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, piperacilina tazobactam y ampicilina sulbactam; tanto en UCI como no UCI. (www.grebo.org consultado el 18 de Enero del 2010). En otro estudio local conducido por el CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas) en el 2004, se reportó una variación importante en las tasas de resistencia de *Acinetobacter baumannii* para imipenem entre los 10 hospitales de la red de Colombia (0%-88,9%) y entre las diferentes unidades de los mismos (25,6% en salas Vs. 31,1% en unidades de cuidado intensivo). (Miranda, 2005).

Es posible que la notable resistencia mostrada por *A. baumannii* sea debida a la capacidad inherente de adquirir información genética por mecanismos de transferencia horizontal y a la capacidad de adquirir y movilizar distintos determinantes de resistencia. La diseminación de los genes por transferencia horizontal ha tenido una rápida emergencia entre los aislamientos clínicos de *A. baumannii.* (Ploy, 2000).

La diseminación de los genes de resistencia es bastante efectiva si estos forman parte de un gen en casete desde donde son transferidos por diversos mecanismos. Estos incluyen (i) movilización de genes individuales por la integrasa codificada en el integrón (Collis, 1995), (ii) movimiento de los casetes presentes en el mismo integrón (Brown, 1996; Craig, 1996) (iii) diseminación de largos transposones que acarrean integrones (Liebert, 1999) y movimiento de plásmidos que contienen el integrón. (Ploy, 2000).

Las características de estos elementos genéticos confieren a *A. baumannii* una estrategia de diseminación y sobrevivencia en los hospitales que pone en peligro la vida de las personas infectadas, pero el conocimiento de las bases moleculares de este proceso aun no son del todo comprendidas en nuestro país en el que las investigaciones con este microorganismo son escasas.

2. Justificación

A. baumannii es generalmente considerado un microorganismo no patogénico para los individuos sanos. Sin embargo, varias especies persisten en los entornos hospitalarios y causan infecciones graves que ponen en peligro la vida de los pacientes inmunocomprometidos (Bergogne-Berezin, 1997). El espectro de resistencia a los antibióticos junto con sus capacidades de supervivencia lo han convertido en una amenaza seria para los hospitales, con brotes recurrentes en todo el mundo. *A. baumannii* es frecuentemente aislado de infecciones nosocomiales y es especialmente habitual en las unidades de cuidados intensivos (UCI), donde tanto los casos esporádicos como los epidémicos y endémicos son comunes. Entre las infecciones que causa figura en primer lugar la neumonía asociada a ventilación mecánica y en segundo lugar las infecciones de la piel y heridas, bacteriemias y meningitis. (Bergogne-Berezin, 1997; Garnacho, 2005).

La resistencia mostrada por *Acinetobacter* a los antibióticos esta asociada a cierto tipo de elementos genéticos móviles como los integrones que son claves en la diseminación de diversos determinantes genéticos de resistencia en los diferentes ambientes en los que encuentra por su asociación con elementos transponibles como los plásmidos y los transposones y aunque el rol de estos últimos en la multirresistencia es bien conocido solo en los últimos años se esta estudiando la participación de los casetes genéticos de resistencia ; por lo que es de interés estudiar la presencia de genes codificantes de resistencia a antibióticos que se encuentren asociados a integrones.

A pesar de conocer la relación entre los integrones y los genes en casetes codificantes de resistencia a antibióticos la manera como ocurre la diseminación de estos elementos en los hospitales no es clara por lo que es importante señalar que la descripción genética de este tipo de elementos aporta datos de interés epidemiológico que esclarecen los mecanismos asociados con la diseminación de resistencia en hospitales, ciudades y países.

El grupo de Epidemiologia Molecular de la Infección Nosocomial de la Universidad Nacional de Colombia ha realizado entre los años 2006-2008 tres trabajos de investigación con aislamientos provenientes de centros hospitalarios de tercer nivel en Bogotá y Neiva, con el fin de caracterizar poblaciones de *A. baumannii* multirresistentes. En todas estas investigaciones se demostró la permanencia en los hospitales de clones endémicos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos y en dos de ellos se estudiaron brotes epidémicos. La resistencia a los carbapenémicos se relacionó con la presencia de enzimas carbapenemasas tipo *OXA* y la secuencia de inserción IS*aba1*. (Pinzón, 2006, Reguero, 2008; Saavedra, 2008).

Por último cabe señalar que aunque en el mundo los estudios con cepas de *A. baumannii* multirresistentes va en aumento estas investigaciones no se han realizado en Colombia en donde las realidades epidemiológicas son diferentes. Es probable que la diseminación y la prevalencia de diversos clones multirresistentes de *A. baumannii* contraste con los encontrados en otras regiones del mundo. Mencionando además que nuestro país presenta todas las condiciones climáticas y no climáticas para que la prevalencia de *A. baumannii* este presente y haya diseminación de genes asociados a la resistencia antibiótica.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar integrones de tipo I en aislamientos de *A. baumannii* provenientes de hospitales colombianos de tercer nivel.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar los integrones de tipo I en los aislamientos de *A. baumannii.*
- Caracterizar las regiones variables de los integrones detectados.
- Determinar la posible relación de los integrones detectados con el fenotipo de resistencia antibiótica.

4. Marco teórico

4.1 Generalidades

El género *Acinetobacter* incluye cocobacilos gram negativos, oxidasa negativos, no fermentadores, no esporulados y aerobios estrictos. (Bouvet, 1986).

Se encuentra ampliamente disperso en la naturaleza, mayoritariamente en agua y suelo. (Baumann, 1968, Iacono M, 2008). En personas sanas ha sido aislado de la piel, faringe y otras localizaciones (Tjernberg, 1989; Seifert, 1997; Valentine, 2008). Inicialmente *A. baumannii* es considerado una especie no patogénica pero puede invadir y causar infecciones en personas críticamente enfermas o que posean una enfermedad inmunológica de base. La identificación inicial de este género se realizó en 1954 gracias a los trabajos de Brisou y Prévot quienes caracterizaron y dieron al género el nombre de *Acinetobacter*. Sin embargo las modificaciones taxonómicas que ha sufrido este género en los últimos 30 años han sido notables. Actualmente se han identificado 31 especies diferentes, pero sólo 17 cuentan con nombre. Por otro lado la estrecha relación genética y las característica bioquímicas similares entre *A. calcoaceticus, A. baumannii*, genoespecie 3 y genoespecie 13 TU, llevaron a Gerner-Smitd a la inclusión de estas cuatro especies dentro de un complejo denominado *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*. (Bouvet, 1986, Tjernberg, 1993; Seifert, 1997; Higgins, 2010).

Muchos de los problemas de caracterización de *Acinetobacter* se han dado porque no existían métodos ya sea fenotípicos o genotípicos confiables. Esto en ocasiones ha conducido a diagnósticos erróneos, sin embargo de las especies identificadas, *Acinetobacter baumannii* ha emergido como una de las más problemáticas en instituciones de salud en el mundo (Shelburne, 2008; Vallenet, 2008).

Su significancia clínica en los últimos quince años se debe a la capacidad de este microorganismo para adquirir o sobreexpresar determinantes genéticos de resistencia haciéndolo resistente a la mayoría de antibióticos usados actualmente (Mahgoub, 2002; Simor, 2002; Manchanda, 2010). Sumado a esto *A. baumannii* posee la capacidad de sobrevivir en superficies secas por periodos prolongados de tiempo convirtiéndolo en un agente importante de infecciones nosocomiales. Dentro de los

factores de riesgo que potencian la infección por *A. baumannii* se cuentan las estancias prolongadas en el hospital, las lesiones pronunciadas de la piel, el uso de equipos de ventilación mecánica y el empleo excesivo de antibióticos. Aunque la neumonía es la enfermedad más comúnmente asociada a infección *por A. baumannii* se han reportado también infecciones del sistema nervioso central (SNC), piel y tejidos blancos y huesos (Larson, 2005).

4.2 Relación de los integrones de tipo I con la resistencia antibiótica

El estudio de la resistencia antibiótica en bacterias, a nivel genómico, ha llevado al descubrimiento de muchos elementos de naturaleza móvil, incluyendo transposones y plásmidos conjugativos. El análisis comparativo de la secuencia de estos elementos en última instancia condujo al descubrimiento de los integrones. Según la definición mas reciente dada por Didier Mazel los integrones son "elementos genéticos capaces de adquirir y reorganizar marcos abiertos de lectura (ORF) presentes en genes en cassette y convertirlos en genes funcionales, garantizando su correcta expresión". (Mazel, 2006).

4.3 Estructura de los integrones

Todos los integrones se componen de una plataforma estable, que contiene los elementos funcionales necesarios para el funcionamiento del sistema, asociado con un conjunto variable de cassettes genéticos que codifican funciones accesorias.

4.4 La plataforma de funcionamiento

La enzima presente en el integrón que se encarga de la integración y escisión de los diferentes genes se conoce con el nombre de integrasa y se trata de una tirosina recombinasa tipo específico (Stokes, 1989; Hall, 1995). Ahora, la integración de estos genes se realiza en una región concreta adyacente a la integrasa que se conoce como el sitio *attI* (Collis, 1993, Collis, 1995; Jove, 2010). Los genes que pueden ser integrados o escindidos por la acción de la integrasa reciben el nombre de genes cassette y constituyen una porción del integrón que se conoce como región variable.

Los cassettes genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen sólo un marco de lectura abierta completo (*orf*), o región codificante (gen) (Hall, 1995, Recchia, 1997). Contienen un sitio llamado *att*C o elemento de 59 pb que es reconocido por la integrasa y que hace posible la

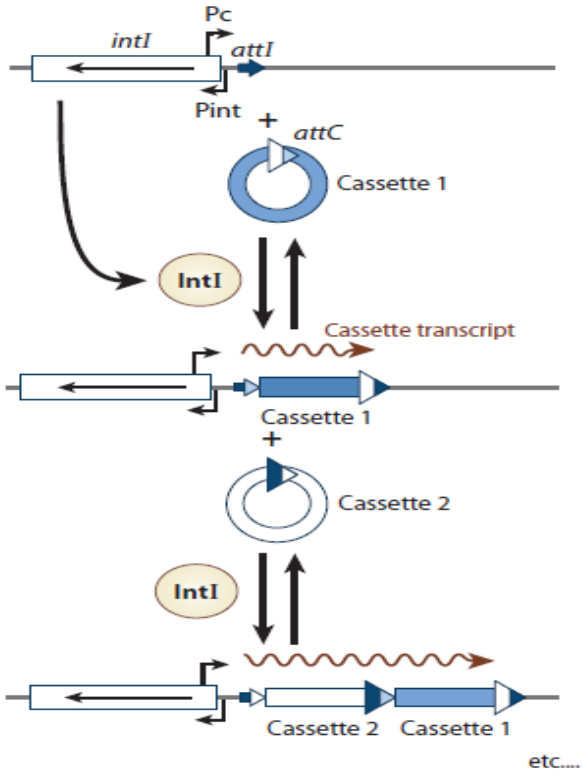
integración. (Collis, 1993; Partridge, 2009). Aunque se considera que los cassettes genéticos son elementos móviles (Recchia, 1997), no codifican enzimas u otros productos involucrados en su propia movilización (Hall 1995). Estos elementos pueden existir libremente en forma de moléculas circulares covalentemente cerradas, generadas por acción de la integrasa que escinde el cassette desde un integrón (Collis, 1993; Partridge, 2009). La inserción específica de sitio de los cassettes genéticos al interior de la región variable de los integrones ha sido solamente detectada en las células que expresan la actividad de la integrasa. Esto indica que esta recombinasa es necesaria para la integración de los cassettes, predominantemente dentro del sitio *attI* del integrón (Collis, 1993; Caratolli, 2001), aunque también es posible la recombinación entre dos sitios *attC* (Collis ,1995).

La integrasa reconoce los sitios de integración presentes en el integrón y en el gen en cassette. Este reconocimiento genera una especificidad en la orientación de los cassettes genéticos permitiendo que la transcripción pueda realizarse desde un promotor común localizado en el extremo 5'CS de los integrones, cuya secuencia nucleotídica es altamente conservada y en el cual pequeñas variaciones afectan la fuerza de transcripción del promotor. Puede suceder que una pequeña alteración en el promotor no permita la expresión de un gen en cassette dentro del integron o la permita en niveles muy bajos haciendo que la bacteria aparezca fenotípicamente susceptible, aunque es potencialmente resistente por poseer el gen que codifica la resistencia(Hall, 1995, Caratolli, 2001, Mazel, 2006).

Es así que la presión que ejerce el uso de un antibiótico especifico puede seleccionar las cepas con promotores más fuertes y capaces de expresar el gen, determinando la resistencia de las bacterias al antibiótico (Collis, 1995). El nivel de resistencia a un determinado antibiótico, codificado por un cassette genético de resistencia, depende de su posición en el integrón, más cercana o lejana del promotor común (Collis, 1995). Esta demostrado que las bacterias manifiestan niveles de resistencia más elevados cuando el gen de resistencia se ubica en el primer cassette, esto es, muy cercano al promotor y estos niveles se reducen a medida que los genes están en cassettes posteriores, río abajo del promotor.

En la mayoría de los integrones clase 1 descritos hasta ahora existe un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes *qacED1, sul1* y *orf5* que codifican resistencia, respectivamente, a compuestos de amonio cuaternario, a bromuro de etidio, a sulfonamidas y una proteína con función desconocida(Recchia 1997; Caratolli, 2001). Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de cassettes genéticos de resistencia. Las otras clases de integrones relacionados con resistencia a antibióticos no poseen extremos 3' altamente conservados, ya que sus secuencias pueden variar por inserción o deleción de algunos genes o secuencias de inserción.

FIGURA 1 Integración de genes en cassette dentro de un integrón



Tomado de Nature Reviews, Microbiology, (2008)

4.5 Diferentes tipos de integrones

A pesar de que presentan una organización similar, los integrones móviles (IM) e integrones cromosomales (IC) muestran características distintivas que sustentan diferentes historias evolutivas (Mazel, 2006). Los integrones móviles (IM) corresponden a las plataformas funcionales que están físicamente asociados con los elementos móviles del ADN (Transposones), y pueden ser transportados por plásmidos conjugativos. Estos elementos se utilizan como vehículos genéticos naturales, lo que permite la transmisión eficiente entre las bacterias de la misma especie o especies diferentes (White, 2001). Los IM contienen sólo unos pocos cassettes que parecen ser de orígenes heterogéneos y se recogieron probablemente en diferentes contextos genómicos.

La región variable más grande identificada hasta ahora se compone de ocho genes en cassette (Naas, 2001). La heterogeneidad de los cassettes esta atestiguada por los codones inconsistentes, los *orf*s que codifican y por la secuencia y la diversidad de tamaño de sus sitios *att*C.

En contraste con su aparente origen heterogéneo, los genes en cassette muestran una homogeneidad funcional sorprendente, ya que la mayoría se relaciona con la resistencia a antibióticos. Hasta al momento han sido identificados más de 130 genes en casete que codifican varios genes de resistencia a antibióticos (Fluit, 2004, Partridge, 2009).

En conjunto, estos cassettes proporcionan resistencia a la mayoría de las clases de antibióticos, incluyendo β-lactámicos, aminoglucósidos , cloranfenicol, trimetoprim, estreptotricina, rifampicina, eritromicina, la fosfomicina, lincomicina, quinolonas y antisépticos de amonio cuaternario (Fluit, 2004; Mazel , 2006 ; Partridge, 2009). Sólo unos pocos IM cassettes identificados tienen funciones desconocidas. Cinco clases diferentes de IM se han definido hasta la fecha, sobre la base de la secuencia de los integrasas codificadas (40% -58% de identidad). Aunque sólo los tres primeros han sido históricamente involucrados en la propagación de la fenotipos de multiresistencia (Mazel, 2006).

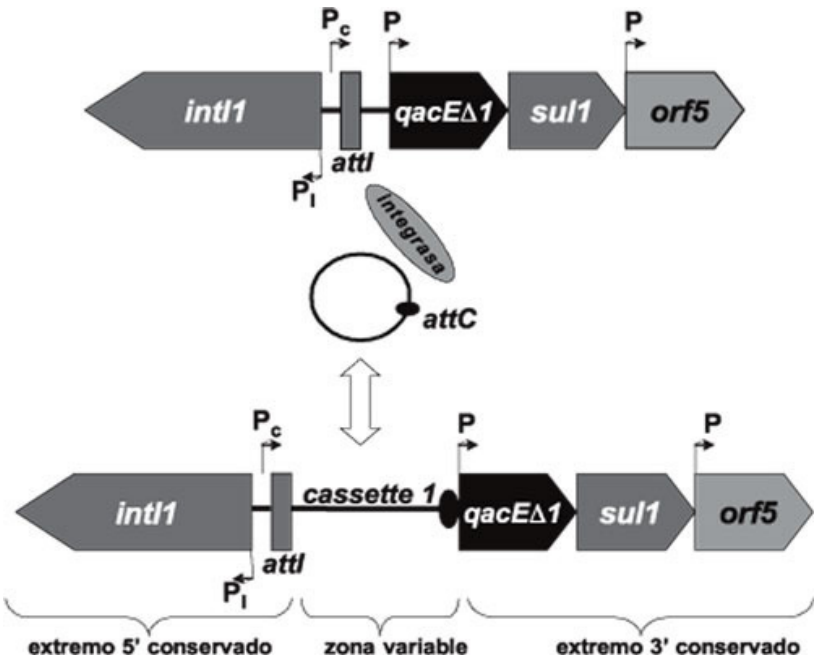
Los integrones de clase 1 son los más extendidos y de importancia clínica, ya que se detectan en el 22% a 59% de las bacterias Gram-negativas pertenecientes a aislamientos clínicos (Levesqué, 1995), y también han sido identificados en bacterias Gram-positivas en algunas ocasiones (Nandi, 2004; Shi, 2006). Como tales, constituyen los principales modelos experimentales de integrones. Son asociados con transposones funcionales y no funcionales derivados de Tn402, que puede integrarse también en las grandes transposones tales como Tn21. Los integrones de clase 2 se asocian exclusivamente con derivados del Tn7, y muestran una docena de diferentes arreglos de cassette (Biskri, 2003; Ramírez, 2010). El gen de la integrasa de integrones de clase 2, *intI*2, por lo general contiene una mutación sin sentido en el codón 179 que produce proteínas no funcionales (Hansson, 2002).

Los integrones de clase 3 también se cree que se encuentran en un transposón (Collis, 2002) y son menos frecuentes que los de clase 2. Los otros dos tipos de IM se encuentran en especies de *Vibrio*. La integrones de clase 4 está integrados en un subconjunto de elementos de integración y de conjugación en *Vibrio cholerae* (Hochhut, 2001). El integrón de clase 5 está situado en un transposón compuesto en el plásmido pRSV1 de *Alivibrio salmonicida* (Sorum, 1992).

Los integrones de Clase 1 y clase 3 que no están asociadas con la resistencia han sido recuperados en bacterias del medio ambiente (Stokes, 2006; Xu, 2007; Gillings; 2008). En todos los casos, estos genes en cassette tienen funciones desconocidas (Barlow, 2006; Márquez, 2008). Estos datos indican que los IM no están específicamente dedicados a la resistencia a los antibióticos, pero es probable que en términos generales estén involucrados en la mediación de la adaptación bacteriana.

La prevalencia de las funciones de resistencia refleja el éxito evolutivo de los integrones en estas adaptaciones.

FIGURA 2 Estructura típica de un integrón de clase I



Representación esquemática de la estructura básica de un integrón de tipo I y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. *intI1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados; P_I: promotor que transcribe la integrasa; P_C: promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados. *attC* : sitio de recombinación del *cassette* genético. *Tomado de Rev. Méd. Chile, 2004*

4.6 Importancia clínica de la asociación integrón-cassette genético de resistencia

La demostración de que la diseminación de los genes de resistencia antibiótica aumenta si estos hacen parte de *cassettes* genéticos móviles fue realizada por *White et al* en el 2001. Los genes en cassette están habilitados para transferirse horizontalmente por varios mecanismos. Algunos incluyen la movilización de *cassettes* entre integrones, mediada por la integrasa. En el caso de integrones que forman parte de un transposón, pueden transponerse desde el cromosoma hacia plásmidos y viceversa (White, 2001).

Por su parte, la transmisión de plásmidos conjugativos es un fenómeno conocido desde antes del descubrimiento de los integrones y la transferencia de estos de una bacteria a otra de la misma o diferente especie se ha demostrado en bacterias aisladas de ambientes hospitalarios donde el uso de los antibióticos es continuo

(Levy, 1997, Mazel, 2006). Como se mencionó anteriormente los cassettes genéticos codifican resistencia a una amplia gama de compuestos antibacterianos. (Fluit, 2004; Mazel, 2006; Partridge, 2009). Además, la presencia de los genes *qacED1* y *sul1* como parte de su estructura conservada 3'CS codifican resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfonamidas (Bennett, 1997).

Los mecanismos de resistencia relacionados con genes de integrones son variados e incluyen la síntesis de enzimas como las modificadoras de aminoglicósidos (Fluit, 2004), cloramfenicol acetil transferasas (White, 2001; Riley, 2009) y modificantes de rifampicina (Tribuddharat 1999, Doi, 2007), algunas ß-lactamasas, especialmente aquellas de más reciente descripción, incluyendo carbapenemasas (Poirel, 2000, Mazel, 2006) y dihidrofolato reductasas (Peters, 2001). También, se han descrito proteínas protectoras de la ADN girasa y bombas de eflujo (Bonomo, 2006; Shete, 2010).

Los integrones han sido encontrados frecuentemente en cepas de origen nosocomial (Caratolli, 2001, Gillings, 2008). De igual forma estas estructuras, con sus respectivos cassettes de resistencia, han sido detectadas en bacterias aisladas de ambientes acuáticos (Rosser, 1999; Henriques, 2006) y de animales domésticos y de crianza (Goldstein, 2001, Gillings, 2008), lo cual refleja su amplia diseminación en la naturaleza. Algunas clases de integrones han sido detectadas exclusivamente en cepas ambientales (*Treponema denticola, Geobacter sulfurreducens, Shewanella putrefaciens*) (Sabate, 2002). También se ha demostrado la presencia de integrones en microorganismos ancestrales de diferentes géneros, corroborando que estas estructuras son antiguas y que han evolucionado conjuntamente con el genoma bacteriano (Sabate, 2002; Mazel, 2006).

Existen escasos estudios sistemáticos acerca de la distribución de integrones en diferentes especies bacterianas, pero los que han sido realizados establecen que la prevalencia de una u otra clase de integrón en bacterias Gram negativas depende de la especie bacteriana en cuestión y, en algunos casos de la localización geográfica en que se recolectan las cepas (Gallego 2001, Mazel, 2006).

5. Metodología

5.1 Tipo de investigación

Este proyecto de investigación corresponde un estudio de tipo descriptivo el cual se llevó a cabo por medio de ensayos de biología molecular para caracterizar cepas de *A. baumannii* resistentes a antibióticos. Se analizó la presencia de integrones de tipo I y su relación con el fenotipo de resistencia antibiótica.

5.2 Aislamientos incluidos

Los aislamientos bacterianos incluidos en este trabajo, corresponden a 129 aislamientos de *A. baumannii* previamente identificados a través del sistema automatizado VITEK (BioMerieux S.A, France), y posteriormente identificados por métodos moleculares, ITS y *rpo*B, en el laboratorio de Epidemiología Molecular de Instituto de Biotecnología, (Hernandez, 2011). Estos aislamientos proceden de hospitales de Bogotá, los cuales en el presente trabajo son identificados con los números 1, 2 y 3; y fueron recolectados en el periodo comprendido entre los años 2004 y 2007. Se asociaron con eventos de colonización, de infección nosocomial y algunos fueron obtenidos del entorno hospitalario. 33 aislamientos provenían del hospital 1, 66 aislamientos del hospital 2 y 30 aislamientos del hospital 3. El 57% fueron causantes de infección hospitalaria, el 37% de colonización y el 6% se aislaron del ambiente hospitalario. De estos el 5.4% provenían de orina, el 16.3% de secreciones, el 46.5% de sangre, el 0.8 % de traqueotomías, el 14.7% de catéter, el 4.7% de ambiente, el 1.6 % de quemaduras, el 9.3 % de lavados y el 0.8 % de esputo. Los aislamientos se encuentran almacenados en el cepario del laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

5.3 Pruebas fenotípicas

5.3.1 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos

La susceptibilidad a diferentes antibióticos se realizó por el método de difusión en agar, bajo los criterios establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de Estados Unidos de América (CLSI, 2008). Se evaluó la actividad frente diferentes grupos de antibióticos clasificados de la siguiente manera: **carbapenémicos**: imipenem (10*u*g) y meropenem (10*u*g); **quinolonas**: ciprofloxacina (30*u*g), **cefalosporinas de tercera y cuarta generación**: ceftazidime (30*u*g), cefotaxima (30*u*g) y cefepime (30*u*g), **aminoglicósidos**: gentamicina (10*u*g) y amikacina (10*u*g) e **inhibidores de folato**: trimetoprim/ sulfametoxazol (10*u*g). Se utilizó como control de la actividad de los antibióticos la cepa Esc*herichia coli* ATCC 25922. De acuerdo consu perfil de susceptibilidad las cepas se clasificaron como no resistentes (sensibles a todos los antibióticos evaluados), resistentes y multirresistentes (resistencia a tres o más grupos de los antibióticos evaluados).

5.4 Pruebas genotípicas

5.4.1 Obtención del ADN:

Para la obtención y purificación del ADN se siguió el siguiente protocolo establecido en el laboratorio de Epidemiología Molecular (IBUN):

EXTRACCIÓN DEL ADN

- Los aislamientos se inocularon en agar nutritivo y se incubaron a 37 ℃ por 18 – 24 horas.
- Se tomaron, con asa bacteriológica varias colonias (2 o 3) aisladas del cultivo fresco y se inocularon en un erlenmeyer con 25 ml de caldo LB (Luria Bertani). Posteriormente se incubaron a 37 con agitación a 180 rpm hasta que la absorbancia del cultivo estuvo entre 0.6-0.8 (leída a 600nm).
- Posteriormente el caldo fue transferido a un tubo de centrífuga.
- Se centrifugó de 5.000-6.000 rpm por 5 minutos y se lavaron las células con solución salina – EDTA (SSE: 0.15 M NaCl; 0.1 M EDTA pH 8) y nuevamente se centrifugó bajo las condiciones anteriormente descritas.
- Se diluyó el pellet en 600ul de SSE y se transfirió este volumen a un tubo de 2ml.
- Se adicionó SDS (Dodecil-sulfato de Sodio) al 10 %(hasta una concentración final del 2%) y se dejo en baño María a una temperatura de 60ºC por 10 minutos mezclándolo suavemente.

- Luego se agregó un volumen de fenol saturado y centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos.

- Posteriormente la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se descartó lo demás.

PURIFICACIÓN DEL ADN POR EXTRACCIÓN CON SOLVENTES (EXTRACCIÓN FENÓLICA)

- Se agregó un volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos.

- La fase acuosa fue separada y colocada en un tubo limpio y lo demás fue descartado.

- A la fase acuosa se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico y se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos.

- Se separó la fase acuosa en un tubo nuevo y se descartó lo demás.

PRECIPITACIÓN DEL ADN

- A la fase acuosa obtenida se añadieron acetato de amonio hasta una concentración final de 2.5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.

- Se dejó precipitar durante 2 horas a 4ºC.

- Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos.

- Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 75%.

- Se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos.

- Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet.

- Para terminar se disolvió el pellet en 500 ul de agua destilada.

Con el ADN obtenido se realizó la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) con diferentes iniciadores.

5.4.2 Realización de la PCR

Tabla 1. Mezcla de reacción de PCR

Reactivos	Orden de adición	[Stock]	Concentración en la mezcla final
Agua HPLC	1		
Buffer	2	10x	1x
MgCl2	3	50mM	1,5mM
dNTPS (Mezcla A,C,G,T)	4	1,25 mM	0.2 mM
Primer 1	5	20 µM	1 µM
Primer 2	6	20 µM	1 µM
***Taq* ADN polimerasa .**	7	5 U/µL	0.04U/ µL
ADN molde	8	1/5 del volumen de reacción total.	~100ng

DETECCIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES DE LA INTEGRASA I

La detección del gen de la integrasa clase 1 se realizó mediante PCR con los iniciadores descritos por (Koeleman, 2001). El tamaño del amplímero esperado es de **160 pb.** El amplímero obtenido se envió a secuenciar y se comparó con secuencias presentes en las bases de datos públicas para corroborar el resultado.

IntI F 5' CAGTGGACATAAGCCTGTTC 3'
IntI R 5' CCCGAGGCATAGACTGTA 3'

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Tabla 2 . Condiciones de amplificación para gen de la integrasa

Ciclo 1 (1 repetición)	
Desnaturalización	94°C , por 5 minutos
Ciclo 2 (30	
Desnaturalización	94°C , por 30 segundos
Asociación	55°C , por 30 segundos
Extensión	72°C , por 30 segundos
Ciclo 3 (1 repetición)	
Extensión final	72°C , por 10 minutos

DETECCIÓN DE LAS REGIONES VARIABLES ASOCIADAS A LOS INTEGRONES DE CLASE I

La detección de las regiones variables asociadas a integrones de tipo I se realizó mediante PCR con los iniciadores descritos por Levesqué *et al* (Levesqué 1995). El tamaño del amplímero depende de la longitud de la región variable.

IntI F 5' CAGTGGACATAAGCCTGTTC 3'
IntI R 5' CCCGAGGCATAGACTGTA 3

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Tabla 5.3 Condiciones de amplificación de las regiones variables de los integrones

Ciclo 1 (1 repetición)	
Desnaturalización inicial	94°C , por 5 minutos
Ciclo 2 (30 repeticiones)	
Desnaturalización	94°C , por 30 segundos
Asociación	55°C , por 1 minuto
Extensión	72°C , por 1 minuto
Ciclo 3 (1 repetición)	
Extensión final	72°C , por 10 minutos

El ADN amplificado se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X a 5 V/cm, teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/mL); se utilizó como referencia de tamaños el marcador ADN de 100 pb ladder (Invitrogen®).

5.4.3 Digestión enzimática de las regiones variables

Para la digestión con enzimas de restricción, se obtuvieron secuencias de regiones variables descritas de *A. baumannii* I en la base de datos publica del NCBI. Posteriormente se realizaron digestiones *in silico* usando el software PDRAW 32. Solo se tuvieron en cuenta las enzimas que generaron más de un corte en las regiones variables analizadas. A continuación se realizo la digestión *in vivo* siguiendo las especificaciones dadas por la casa comercial (Invitrogen) y los productos de la digestión se evaluaron por electroforesis. Los amplímeros con el mismo patrón de digestión se consideraron iguales y de estos se envió a secuenciar un representante. Las secuencias obtenidas se compararon con las reportadas en las bases públicas de datos. (GenBank EMBL acceso www.ncbi.nlm.gov).

5.5 Relación de los genes de resistencia detectados con secuencias de inserción e integrones

Para establecer la presencia de las secuencias de inserción *IS26* con los integrones de tipo I se realizaron amplificaciones con combinaciones de los iniciadores Forward de la secuencia de inserción (5'TCACTCCACGATTTACCGCT 3') y Reverse del gen *IntI* (5'CCCGAGGCATAGACTGTA 3'). Posteriormente los productos obtenidos para las diferentes reacciones de amplificación se secuenciaron y se compararon con las reportadas en las bases públicas de datos (GenBank EMBL acceso www.ncbi.nlm.gov).

5.6 Asociación de los genes de resistencia detectados con el fenotipo de resistencia observado en los aislamientos de estudio

La asociación de los genes de resistencia detectados con el fenotipo de resistencia se realizó por medio de intervalos de confianza para proporciones que nos permiten con un límite inferior y otro superior, con un 95% de confianza obtener el valor de la relación existente entre los datos.

Para realizar el cálculo se necesita establecer la proporción muestral (p_n), el coeficiente de confianza ($z_{\alpha/2}$), que para el 95% es de 1.96 y el tamaño de la muestra (n). (Montgomery, 2007)
Se construyen intervalos con confianza 1-α=95%

$$(p_n - z_{\alpha/2}\sqrt{\frac{p_n(1-p_n)}{n}},\ p_n + z_{\alpha/2}\sqrt{\frac{p_n(1-p_n)}{n}})$$

El intervalo de confianza para estimar una proporción p
p_n: proporción muestral
n: tamaño de la muestra
Nivel de confianza del (1-α) 100% (Valor $z_{\alpha/2}$: 1.96)

Para establecer diferencias significativas entre las cepas con integrasa y las cepas sin integrasa se aplico el test estadístico de Bonferroni usando el software estadístico STATA.

6. Resultados y análisis de resultados

6.1 Perfil de susceptibilidad de las cepas estudiadas

Los perfiles de susceptibilidad de las cepas estudiadas se obtuvieron aplicando la técnica de difusión en agar y los aislamientos se catalogaron como multiresistentes cuando mostraron resistencia a más de dos grupos de antibióticos clasificados según su modo de acción así: **carbapenémicos**: imipenem (10*u*g) y meropenem (10*u*g); **quinolonas**: ciprofloxacina (30*u*g), **cefalosporinas de tercera y cuarta generación**: ceftazidime (30*u*g), cefotaxima (30*u*g) y cefepime (30*u*g), **aminoglicósidos**: gentamicina (10*u*g) y amikacina (10*u*g) e **inhibidores de folato**: trimetoprim/sulfametoxazol (10*u*g). (Falagas, 2006). El 66,2% (92) de los aislamientos presentaron resistencia a tres o mas grupos de antibióticos evaluados y se clasificaron como multiresistentes. El 79,1% (110) de los aislamientos presentaron resistencia a cefalosporinas de espectro extendido. El 74,8% (92) mostraron resistencia a ampicilina-sulbactam. El 79,1% (100) de los aislamientos exhibieron resistencia a imipenem y meropenem. El 80,6% (94) fueron resistentes a ciprofloxacina. El 83,5 % (106) presentaron resistencia al menos a un aminoglicósido (amikacina o gentamicina). En conjunto 82 de los 129 aislamientos (63.6%) presentaron resistencia a los 5 grupos de antibióticos evaluados. (Para ver resistencia y presencia de integrasas ver figura 5).

Estos datos son importantes si se tiene en cuenta que la resistencia antibiótica esta enmarcada como uno de losprincipales factores que dificultan el tratamiento en las infecciones por *A. baumannni* y aunque estas están documentadas mundialmente, la susceptibilidad antimicrobiana de *A. baumannii* varía de país en país, destacándose algunas regiones con alta prevalencia de cepas multiresistentes. Las tendencias de resistencia de *A. baumannii* a antimicrobianos han sido evaluada en dos estudios de vigilancia epidemiológica. La base datos del estudio SENTRY entre 1997 y 1999 muestra una mayor susceptibilidad de los aislados de Norteamérica (Canadá y E.U.A.) respecto de los latinoamericanos. Sader y cols comunicaron en el año 2004 diferencias geográficas significativas del SENTRY en el perfil de susceptibilidad de *A. baumannii* (Sader, 2004).

En Europa existe menor susceptibilidad a imipenem (74,3%) *versus* Norteamérica (87,9%) y Latinoamérica (91,2%). La base de datos SCOPE 41 que incluye 49 hospitales estadounidenses muestra una disminución de la susceptibilidad de *A. baumannii* a cefalosporinas y fluoroquinolonas (Diomedi, 2005). Diversos reportes de

A. baumannii resistentes a carbapenémicos se han informado en E.U.A., Canadá y Latinoamérica (Gales, 2001, Mahgoub, 2002, Landman, 2002). Estudios mas recientes con países europeos muestran a Turquía con las cepas con mayores tasas de resistencia a casi todos los antibióticos probados, seguida de Italia y el Reino Unido con tasas de resistencia a meropenem (43,4%) e imipenem (42,5%)(Sader, 2004).

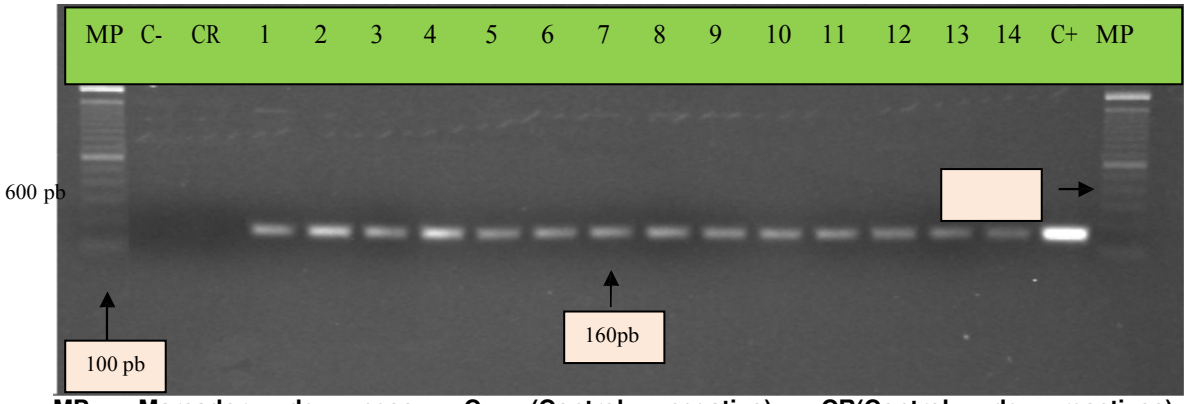
Por su parte en Latinoamérica algunos países como Chile reportan resistencias de 37,4% a ampicilina/sulbactam, 36,6% a cefoperazona/sulbactam, 47,9% a amikacina y 0% a imipenem en muestras clínicas (Diomedi, 2005). Trucco y cols, en 45 cepas de *A. baumannii* evaluadas durante 2001, detectaron 30% de resistencia a ampicilina/sulbactam, 80% a cefoperazona/sulbactam, 47% a amikacina, 20% a cefepime, y 10% a imipenem(Trucco, 2002). Finalmente un estudio llevado a cabo por la Sociedad Chilena de Infectología en el 2002, que incluía cepas clínicas de pacientes en UCI de cuatro centros nacionales, se documentó resistencia a cefoperazona/sulbactam entre 21 y 78% y a imipenem entre 0 y 7%(Diomedi, 2005).

La comparación entre los resultados del presente trabajo y los reportados en la literatura revela que las cepas de nuestro país son menos susceptibles y que la alta tasa de resistencia a carbapenémicos se convierte en una situación preocupante teniendo en cuenta que los carbapenémicos son la primera opción terapéutica frente a las infecciones por *A. baumannii*.

6.2 Presencia de integrasa tipo I

El gel de la figura 3 detalla el tamaño del amplímero (160pb) correspondiente a una región conservada del gen de la integrasa de tipo I. Este fragmento se secuenció y se comparó con secuencias obtenidas bases de datos públicas. Adicionalmente se usó otro par de primers que amplifica un fragmento del gen de la integrasa tipo I de aproximadamente 900 pb (Goldstein, 2001). Las cepas positivas amplificaron con ambos pares de primers. La secuencia obtenida se presenta en el anexo 1.

FIGURA 3. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de cepas positivas para integrasa tipo I



MP: Marcador de peso. C- (Control negativo), CR(Control de reactivos) 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14: cepas positivas para integrasa tipo I. C+: Control positivo. Tamaño del amplimero: 160pb.

De las muestras analizadas el 24% fueron positivas para la integrasa de tipo I. Su relación con la susceptibilidad antimicrobiana y la fuente del aislamiento se muestran la en la figura 4. (Ver también anexos 5 y 6)

El hallazgo de este tipo de estructura genética puede relacionarse con la resistencia antibiótica debido a la capacidad de adquisición de genes codificantes de resistencia y su posterior expresión gracias a la acción de la integrasa de tipo I. Hasta el momento se han reportado mas de 120 genes cassette que incluyen genes que dan resistencia a β-lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptomicina, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina, quinolonas y antisépticos de amonio cuaternario (Mazel 2006).

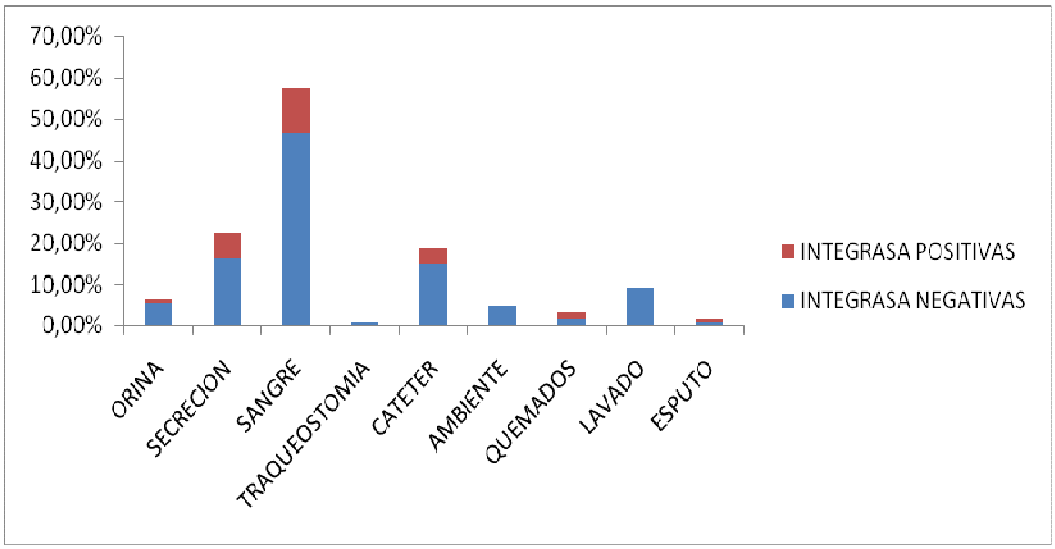
Los integrones de tipo I son los más comunes en los aislamientos clínicos y aunque varían en tamaño, es posible que tengan la misma estructura así se trate de de cepas que se encuentren en diferentes lugares del mundo (Mazel, 2006).

El porcentaje de cepas positivas para la integrasa de tipo I presenta variaciones. Regiones como Norteamérica para el 2002 mostraban porcentajes de cepas positivas a integrasas de tipo I hasta de un 28 %. Una de las principales fuentes de cepas de *A. baumannii* multiresistente es este país es el personal militar involucrado en conflictos armados en el medio oriente (Scott, 2007). En otras regiones como China y Japón en el mismo año el promedio de cepas multiresistentes positivas para integrasa de tipo I es de 53 % y 55 % respectivamente y en su mayoría las muestras fueron aisladas de secreciones y bacteremias (Manchanda, 2010). Un caso particular se tiene en los países de Europa Central y el Reino Unido, en donde el control y el seguimiento de *A. baumannii* está bien establecido y que revela que aunque los porcentajes de

susceptibilidad de sus cepas son menores a las de nuestro país, el hallazgo de cepas positivas puede alcanzar hasta un 80 % en países como Turquía, Grecia, Italia y Dinamarca. Se trata de cepas que pertenecen a clones ya descritos previamente denominados Clon I, II y III diseminados a través de instituciones médicas de toda Europa (Nemec, 2004, Diancourt, 2010).

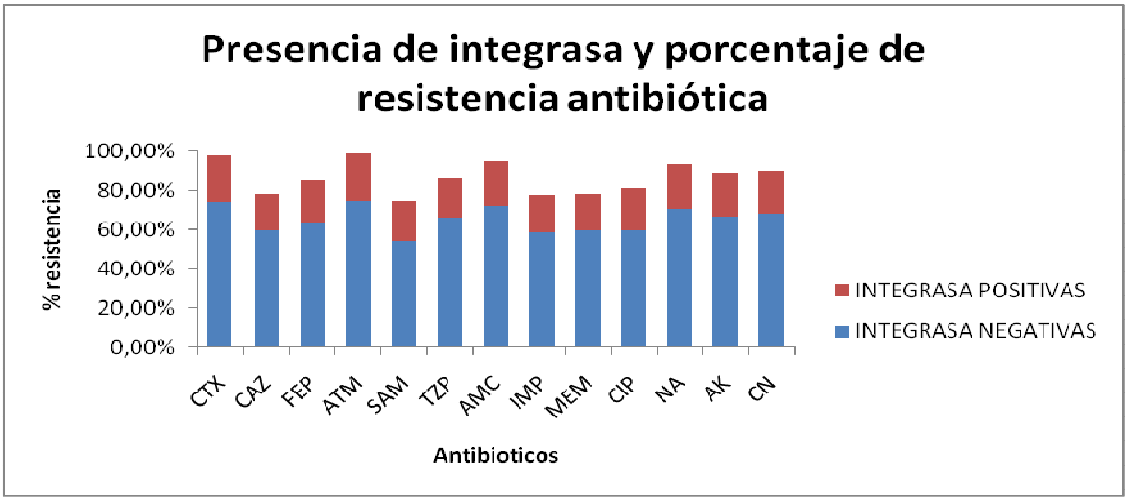
En Latinoamérica la cantidad de trabajos relacionados con la presencia de integrones es reducida en comparación las anteriores regiones descritas. En Chile existe una mayor prevalencia de cepas con integrasa de tipo II que de tipo I y en Brasil se han reportados porcentajes muy bajos (hasta de 0%) para la prevalencia de integrasa de tipo I en cepas multiresistentes aisladas de ambientes hospitalarios (Diomedi, 2005).

FIGURA 4. Relación integrasa tipo I y fuente de aislamiento



En la figura 4 se muestra la relación entre las cepas positivas a la integrasa de tipo I y la fuente de aislamiento de las muestras. El porcentaje total de cepas provenientes de cada lugar corresponde a la barra completa. El recuadro rojo superior es el porcentaje de cepas que fueron positivas para la integrasa de tipo I. Como puede verse, el mayor número de muestras de nuestro estudio proviene de sangre y en concordancia con datos a nivel mundial la mayoría de cepas positivas a integrasa y multiresistentes son obtenidas de muestras sanguíneas y secreciones. (Villegas, 2003).

FIGURA 5. Presencia de integrasa y porcentaje de resistencia antibiótica



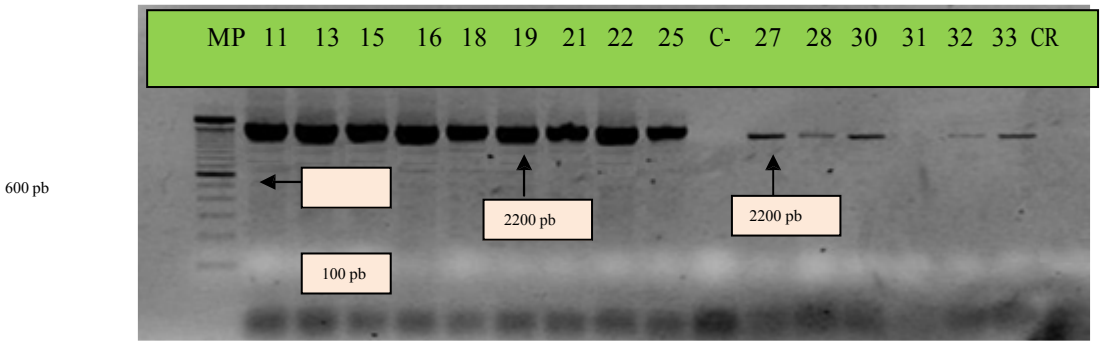
CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, SAM: Ampicilina-sulbactam, TZP: Piperacilina-tazobactam, AMC: Amoxicilina-clavulanico, IMP: Imipenem, MEM: meropenem, CIP: Ciprofloxacina, NA: Acido nalidíxico, AK: Amikacina, CN: Gentamicina

En la figura 5 el recuadro rojo superior representa el porcentaje de cepas que fueron positivas para la integrasa de tipo I. Esta gráfica junto con el anexo 6 muestra los respectivos porcentajes de resistencia a los antibióticos evaluados y la presencia de integrasa de tipo I. Como lo muestra la figura 5 un mayor porcentaje de muestras positivas para integrasa está en las cepas con resistencia a los cefalosporinas de tercera generación y el aztreonam. Le siguen las cepas que fueron resistentes a los aminoglicosidos, gentamicina y amikacina. Sin embargo la resistencia a las cefalosporinas parece estar relacionada con la expresión de otros genes no asociados a integrones de tipo I, ya que los genes en cassette que fueron encontrados no se relacionan con la resistencia a este grupo de antibióticos. En el anexo 4 se presentan las cepas positivas a integrasa y sus perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. Es importante resaltar que un alto porcentaje (90.3 %) de cepas positivas a integrasa presentaron resistencia a la mayoría de antibióticos evaluados. La presencia de genes en cassette como los *aadA1* y *aacA1* dentro del integrón puede explicar la resistencia de estas cepas a los aminoglicosidos, pero se asume que las resistencia a otros antibióticos esta dada por la presencia de genes no asociados a integrones de tipo I.

6.3 Caracterización de regiones variables de las cepas positivas para integrasa de tipo I

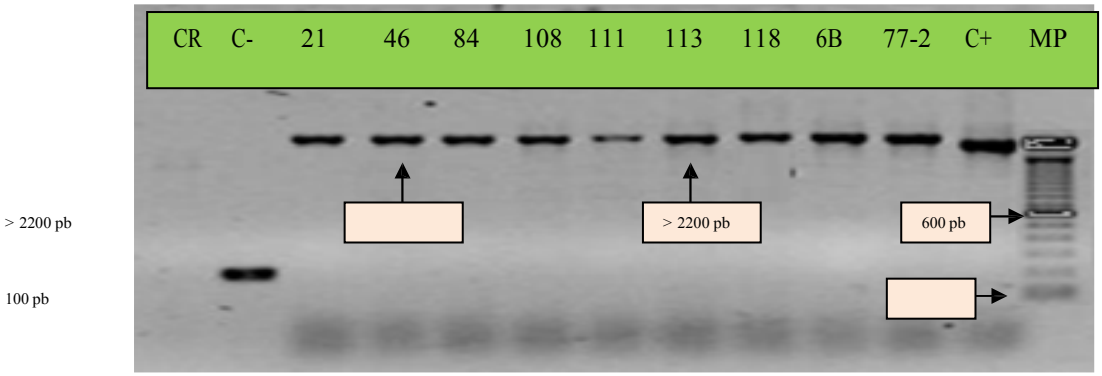
Los geles de las figuras 6 y 7 muestran los tamaños de las regiones variables encontradas en las cepas de los hospitales 1 y 2 respectivamente. Se trata de una región variable con un tamaño aproximado de 2200 pb (hospital 1) y una región variable mayor a 2200 pb para el hospital 2.

FIGURA 6. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de las regiones variables de aislamientos provenientes del hospital 1



MP: Marcador de peso. 11, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 25,27,28,30,32,33: cepas positivas para integrasa tipo I. C- : Control negativo; C+: Control positivo. Tamaño del amplimero: Aprox. 2200

FIGURA 7. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de las regiones variables de los aislamientos provenientes del hospital 2

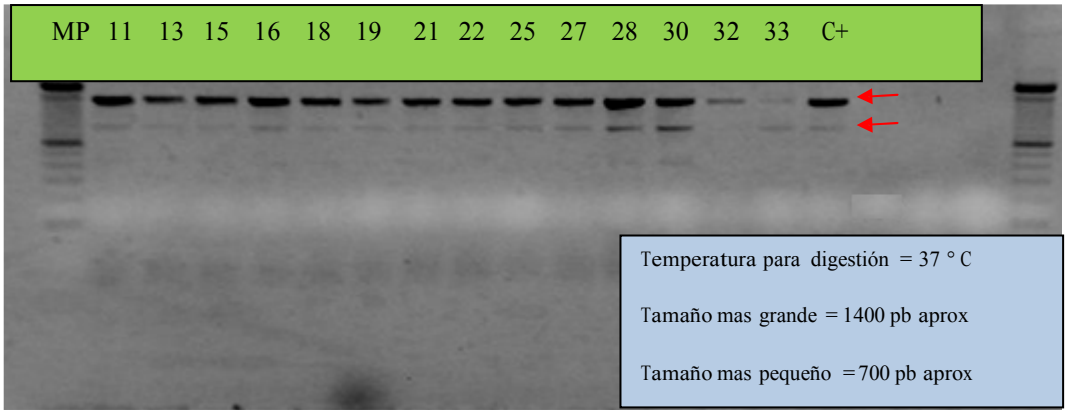


MP: Marcador de peso. 21, 46, 84, 108, 111, 113, 118,6B, 77-2. Cepas positivas para integrasa tipo I. provenientes del hospital 2. C+: Control positivo, C- : Control negativo. CR: Control de reactivos Tamaño del amplimero: > 2200 pb

6.3.1 Resultado de la digestión con enzimas de restricción de las regiones variables encontradas

Las regiones variables amplificadas en las cepas del Hospital 1 se digirieron con la enzima *EcoRV g*enerando fragmentos de 700 y 1400 aproximadamente. Se concluyó que las regiones variables podrían tener secuencias semejantes. Se secuenciaron dos de estas muestras.

FIGURA 8. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de la digestión enzimática de regiones variables (hospital 1)



Para la digestión de las regiones variables del hospital 2 se usó la enzima de restricción *Pvu II* y los fragmentos generados corresponde a tamaños de 1400, 900 y 450 pb (aproximadamente). Pudo concluirse que se trataba de regiones variables similares por lo que se seleccionaron dos representantes para su posterior secuenciación. La secuencia obtenida se muestra en el anexo 2.

FIGURA 9. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de la digestión enzimática de regiones variables (hospital 2)

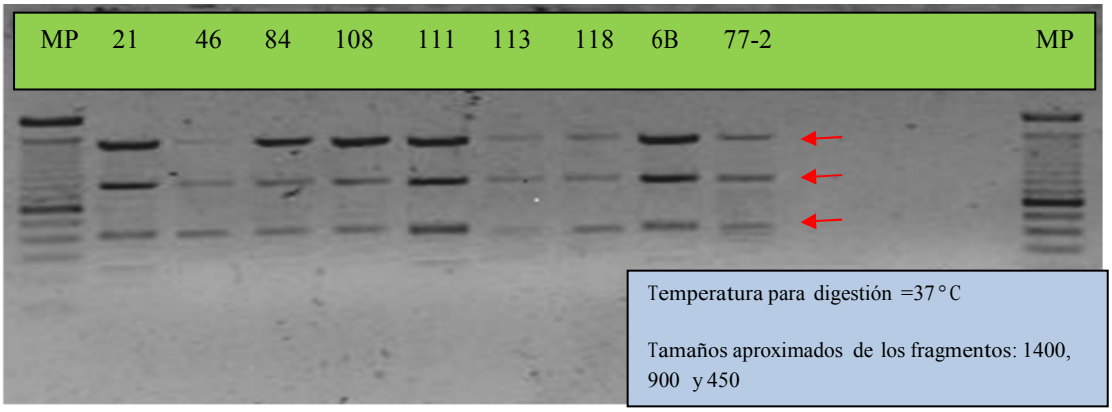


Tabla 4. Descripción de las regiones variables presentes en cepas positivas para integrasa de tipo I

HOSPITAL	CEPAS POSITIVAS	TAMAÑO DE LA REGIÓN VARIABLE (Kb)	GENES PRESENTES EN LA REGION VARIABLE
1	9, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33.	2.5	*aacA1, orfP, orfQ, aadA1*
2	21 , 46, 84, 108, 111, 113, 118, 6b, 77-2	3.0	*aacA1, orfP, orfP, orfQ, aadA1*
3	1, 4, 9, 14	3.0	*aacA1, orf P, orf P, orfQ, aadA1*

Para la caracterización de las regiones variables de los integrones de tipo I obtenidos se realizaron digestiones enzimáticas *in sílico* e *in vivo* y los patrones de digestión en cada hospital fueron similares. Cada patrón se envió a secuenciar y las secuencias obtenidas tuvieron un 100 % de similaridad con otras secuencias ya reportadas en bases públicas (GenBank). Las regiones variables amplificadas de las cuatro cepas provenientes del hospital 3 tenían un tamaño parecido al de las cepas del hospital 2 y se secuenciaron sin digestión previa. La región variable caracterizada fue similar a la que se presentó en el hospital 2. Los diagramas de las regiones variables secuenciadas se presentan a continuación:

FIGURA 10. Diagrama de la región variable de aislamientos del hospital 1

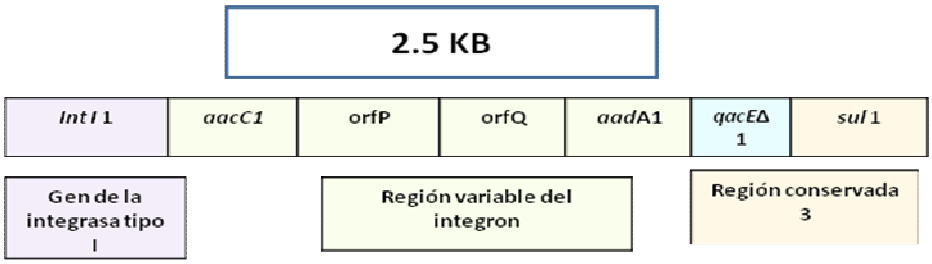
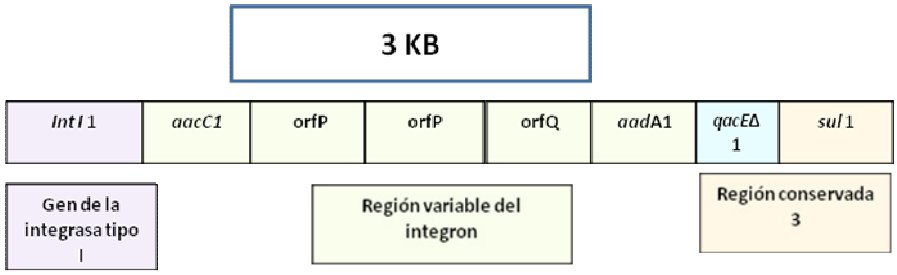
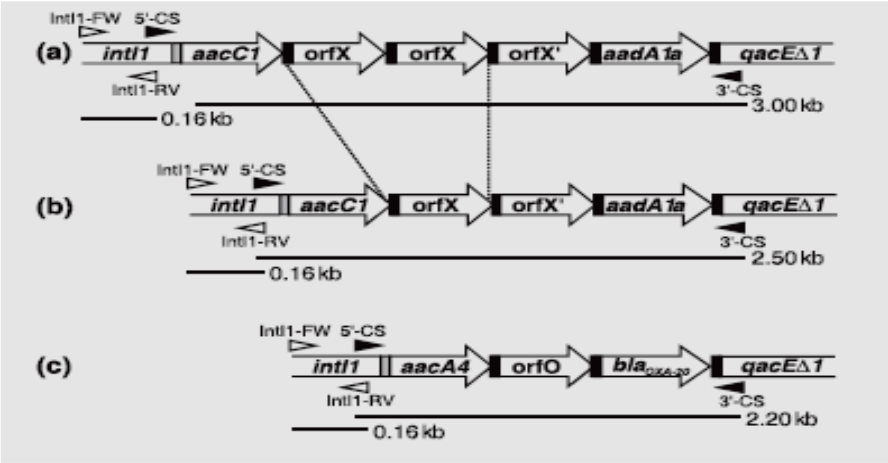


FIGURA 11. Diagrama de la región variable de los aislamientos de los hospitales 2 y 3



La región variable detectada en los aislamientos hospital 1 esta conformada por cuatro genes en cassette dispuestos en el siguiente orden: *aac*A1, orf P (orf X) orf Q (orf X') *y aad*A 1. Los aislamientos positivos a integrasa de tipo I pertenecientes a los hospitales 2 y 3 constan de la siguiente región variable: *aac*A1, *orf* P (orf X), *orf* P (orf X), *orf* Q (orf X') *y aad*A 1 y como es evidente la única diferencia es una copia adicional del orf P. Los genes codificantes de resistencia a aminoglicósidos se reportan como los más predominantes en los integrones de tipo I. De estos genes son conocidas las funciones del gen ***aac***C1 que codifica una aminoglicósido N-acetiltransferasa que confiere resistencia a la gentamicina y esta difundido ampliamente entre miembros de la familia Enterobacteriaceae y Gram negativos no fermentadores (Hoek, 2011). El gen ***aad***A1 es codificante de una aminoglicósido N-adeniltransferasa que confiere resistencia a la estreptidina y estreptomicina (Gestal, 2005). Los genes *orf*P Y *orf*Q codifican proteínas con función desconocida. Los genes en casete presentes en la región variable aquí descrita concuerdan con los descritos en otros estudios relacionados con la presencia de integrones de tipo I en cepas de *A. baumannii* con resistencia a antibióticos y han sido ampliamente detectados como parte de los clones Europeos I y II, Italia, Rusia, Reino Unido y Estados Unidos en el que este tipo de arreglo solo difiere en algunas ocasiones por la presencia de una copia adicional del gen orfP (Dijkshoorn, 2008). Los aislamientos clínicos de *A. baumannii* de diversos lugares parecen haber adquirido sus mecanismos de resistencia de otros géneros por una variedad de mecanismos, incluida la difusión de los integrones. Una vez que estos se incorporan en el genoma de la bacteria, *A. baumannii* a veces es capaz de transferir el integrón a otras especies bacterianas. La estabilidad de esta estructura dentro del integrón a pesar de las diferentes localizaciones geográficas de los centros médicos permite hacer algunas deducciones: **(i)** existe una alta diseminación del mismo integrón entre cepas genotípicamente diferentes; pues no se trata de las mismas cepas y **(ii)** hay una probable selección independiente desde un ancestro común (Turton, 2006). Tal como lo señalan *Gombac et al* el hallazgo del mismo integrón en las cepas sugiere la transferencia horizontal de todo el integrón y una vez esta ha tenido lugar se mantiene muy estable. La presencia de estructuras muy similares en Enterobacterias propone una posible transferencia inter-especies, sin embargo no se han descrito estructuras similares en plásmidos por lo que la transferencia puede deberse a otro mecanismo (Gombac, 2002; Navia, 2004; Hoek, 2011).

FIGURA 12. Regiones variables mas prevalentes descritas en aislamientos de *A. baumannii*

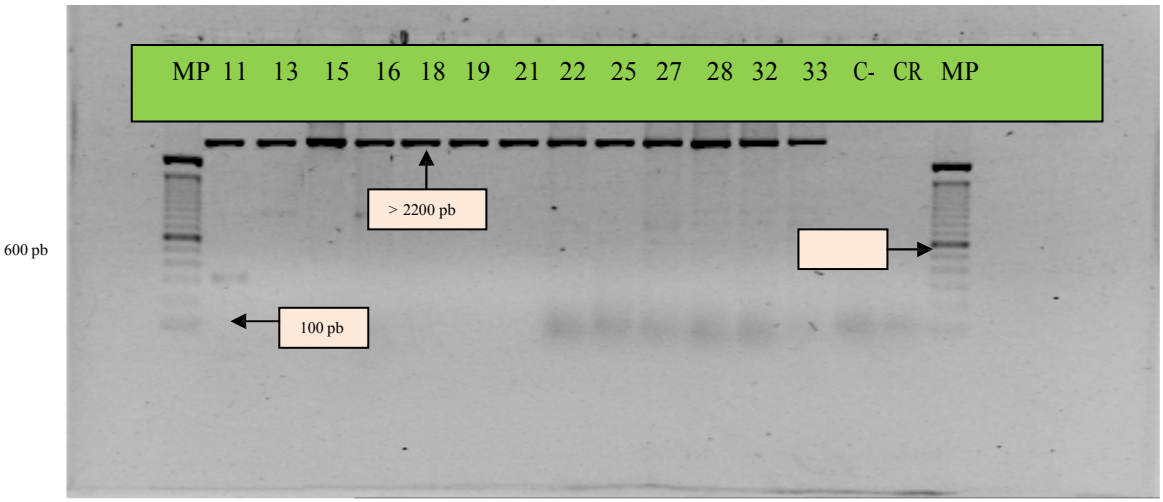


Tomado de Healthcare Epidemiology, 2006

6.4 Asociación del integrón de tipo I con elementos de transferencia: secuencia de inserción *IS26*

En la figura 13 se muestra la amplificación cruzada del gen de la integrasa y la secuencia de inserción ubicada corriente arriba. Se trata de la suma de los tamaños de la secuencia de inserción, el gen de la integrasa y las secuencias no codificantes.

FIGURA 13. Patrón de bandas obtenido por electroforesis en gel de la amplificación cruzada *IS26*-integrasa I



El tamaño del amplímero es superior a 2200 pb. (Suma de la secuencia de inserción con un tamaño aproximado de 920 pb, el gen de la integrasa con alrededor de 950pb y las repeticiones invertidas y otras secuencias no codificantes (410 aprox).

Cuando se efectuaron las amplificaciones cruzadas para observar la relación del integrón con algún elemento genético que participe en su posible movilización, fueron positivas las amplificaciones cruzadas con el la *IS26* corriente arriba del integrón en las cepas provenientes del hospital 1 (la secuencia obtenida se muestra en el anexo 3). La presencia de esta secuencia es importante porque se ha relacionado con la movilización de diferentes genes. Diversos estudios en *Salmonella* han mostrado su relación con los genes *aac* (3)-IV y *aph* (4) ubicados dentro de un plásmido. Estos genes codifican resistencia a gentamicina y higromicina respectivamente. (Depardieu, 2007). En *Klebsiella* se ha reportado su relación con una 3-O-fosfotransferasa en la que la IS26 funciona como un promotor fuerte que aumenta la expresión de este gen (Miriagou, 2005, Depardieu, 2007) Otros genes codificantes de resistencia a aminoglicósidos también se han relacionado con la IS26 y entre estos están el gen *aph (3)-Ia* que codifica resistencia a kanamicina, neomicina, lividomicina, paromomicina y ribostamicina (Kim, 2009). Otros estudios han observado su relación con la expresión de genes que participan en la resistencia a cefoxitin, carbapenémicos y quinolonas (Jacoby, 2003; Hoek, 2011). Hay investigaciones que establecen la relación de la IS26 con integrones In4 que hacen parte de un loci de multirresistencia en plásmidos de enterobacterias. (Miriagou, 2005). La presencia de esta IS26 hace suponer su participación en la movilización del integrón entre diferentes moléculas de ADN. Los resultados de estas amplificaciones se muestras en la figura 13.

Todo el segmento obtenido que incluye el integrón y la secuencia de inserción IS26 presenta similaridades con un segmento de la isla de resistencia *AbaR5* reportada en Sídney, Australia, pero se requieren más estudios para confirmar dicha similitud (Post, 2008).

Las islas de resistencia son definidas como regiones del ADN donde se ubican preferentemente diferentes determinantes relacionados con resistencia se han descrito mayormente en microorganismos Gram negativos, principalmente en Enterobacterias y microorganismos Gram negativos no fermentadores (Schmidt, 2004; Vernikos, 2008).

En relación con las demás secuencias de inserción examinadas, diversos estudios muestran la importancia de la secuencia IS*aba*1 en la expresión de determinantes genéticos de resistencia como los genes codificantes de B-lactamasas (Aubert, 2006; Heritier, 2006; Mugnier, 2009). Aunque en nuestros aislamientos pudo detectarse la presencia de esta secuencia de inserción considerada como intrínseca de *A. baumannii*, la relación con los integrones de tipo I hallados fue negativa.

6.5 Análisis estadístico de la relación integrasa y resistencia antibiótica

Se aplicó el test estadístico de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre las cepas positivas o negativas a integrasa y el fenotipo de resistencia antibiótica con un 95 % de confiabilidad. (Anexo 5). El test aplicado señala que existen diferencias significativas entre las cepas que poseen el gen de la integrasa y las que no lo poseen y el fenotipo de resistencia antibiótica. Sin embargo aunque el test señala que las cepas con integrasa tienden a ser más resistentes a los antibióticos no indica a cuales. Es esta la razón que justifica el uso de intervalos de confianza. Esta última herramienta es útil porque establece la relación entre un gen en cassette específico y un antibiótico específico. Lo importante es que ambos análisis estadísticos se complementan y son útiles si se desean crear relaciones de este tipo. Cuando se establecieron intervalos de confianza para la relacionar la presencia de los genes *aac*A1 y *aad*A1 y la resistencia al aminoglicósido gentamicina y este intervalo estuvo entre un 0.18 y 0.32. Es necesario aclarar que muchas cepas negativas a integrasa fueron resistentes a la mayoría de antibióticos usados lo que indica que la presencia del integrón no es la única estrategia genética presente en las bacterias para evadir la acción de los antibióticos.

Tabla 5. Otros genes de importancia en cepas positivas para integrasa de tipo I

GEN	CEPAS POSITIVAS	PORCENTAJE	RESISTENCIA
blaTEM	102	79	Cefalosporinas
blaADC	109	84	Ceftazidima
ampC	110	85	Cefalosporinas de tercera generación
aacC2	112	86	Gentamicina
aphA6	11	8	Amikacina

Como la resistencia antibiótica no puede ser explicada del todo con la presencia de los integrones de tipo I se examinó la presencia de otros genes como *bla*ADC, *amp*C, *arm*A, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M que también se han relacionado con la resistencia de cepas de *A. baumannii* en todo el mundo (Heritier, 2006; Hujer, 2006). La tabla 7 resume la presencia de estos genes en las cepas estudiadas y puede observarse que un alto porcentaje de cepas poseen genes codificantes para resistencia a cefalosporinas y aminoglucósidos. Por su parte el gen *aph*A6 que codifica resistencia a amikacina y que también se ha asociado a integrones de tipo I solo estuvo presente en un 8 % de las cepas. (Tabla 7). Finalmente debe recordarse que la intervención de las secuencias de inserción y la integración de genes en cassette gracias a la integrasa tipo I convierten a los integrones de tipo I en posibles agentes de resistencia a todos los antibióticos de uso.

7. Conclusiones

- Los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que el porcentaje de resistencia a los antibióticos observado en las cepas estudiadas es más alto que los observados a nivel mundial en periodos de tiempo similares. Dentro de los antibióticos a los que las cepas presentan resistencia se encuentran los carbapenémicos (meropenem e imipenem), primera opción terapéutica contra las infecciones por *A. baumannii*.

- El porcentaje de cepas resistentes a antibióticos con integrasa de tipo I y presentes en ambientes hospitalarios es intermedio si se compara con otras regiones del mundo (34 %). En países orientales y de Europa Central los porcentajes de presencia de integrasa tipo I en cepas resistentes son superiores y están en rangos del 60 al 80 %. Por su parte otros países como Chile y Brasil reportan porcentajes mas bajos de presencia de integrones de tipo I en aislamientos de *A. baumannii*.

- La relación entre la presencia de integrasa y la resistencia es significativa según los procedimientos estadísticos aplicados a los datos obtenidos. Estos resultados sugieren que la resistencia entre cepas positivas y negativas a integrasa es fenotípicamente diferente y que los integrones participan directamente en la generación de resistencia a algunos antibióticos como los aminoglicósidos.

- No es posible explicar toda la resistencia antibiótica solamente con la presencia de los integrones de tipo I. La presencia de otros genes codificantes de resistencia a antibióticas esclarece de manera significativa la alta tasa de resistencia antibiótica de los aislamientos estudiados. Estos genes se presentan en porcentajes considerables en las cepas evaluadas y la mayoría se relaciona con la resistencia a las cefalosporinas.

- La región variable que se describió en los aislamientos es idéntica a las reportadas en muchos lugares del mundo. Parece ser que se trata de una porción genética bastante estable que se ha diseminado entre muchos hospitales de un gran número de regiones.

8. Bibliografía

1. Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. 2006. Functional characterization of IS*1999*, an IS*4* family element involved in mobilization and expression of β-lactam resistance genes. J. Bacteriol. 188:6506–6514.

2. Baumann P. 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J Bacteriol. 96(1):39–42.

3. Barlow RS, Gobius KS. 2006. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. J Antimicrob Chemother. 58:1133–1138.

4. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev; 9:148-165.

5. Biskri L, Mazel D. 2003. Erythromycin esterase gene *ere*(A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. Antimicrob. Agents Chemother; 47:3326-3331.

6. Bonomo RA, Szabo D. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis; 43(Suppl 2):S49–56.

7. Bouvet P, Grimont P. 1986. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii.* International Journal of systematic bacteriology. 36 (2):228-240

8. Brown HJ, Stokes HW, Hall RM. 1996. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. J. Bacteriol. 178:4429-4437.

9. Carattoli A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet. Res. 32, 243–259.

10. Clark CA, Purins L, Kaewrakon P, Focareta T, Manning PA. 2000. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. Microbiology 146:2605-2612.

11. Collis CM, Hall RM. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. Mol Microbiol. 1992; 6:2875–2885.

12. Collis CM, Hall RM. 1995 Expression of resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother. 39:155–62.

13. Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, et al. 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. J. Bacteriol. 184:3017–3026.

14. Craig NL. 1996. Transposon Tn7. Curr Top Microbiol Immunol. 204:27–48.

15. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev.; 20(1):79–114.

16. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS One.5

17. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat. Rev. Microbiol. 5:939-951.

18. Diomedi A. 2005. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. Revista Chilena de Infectología. 22 (4):298-320.

19. Doi Y, Adams-Haduch JM., Paterson DL. 2008. Genetic environment of 16S rRNA methylase gene *rmtD*. Antimicrob. Agents Chemother. 52:2270–2272.

20. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis LA. 2006. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medical Microbiology; 55: 1619–1629

21. Fluit AC, Schmitz FJ. 2004 Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect; 10:272–288.

22. Fournier PE, Richet H. 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis; 42:692–699.

23. Gales AC, et al. 2001. Emerging importance of multidrug-resistant Acinetobacter species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). Clin. Infect. Dis. 32(Suppl. 2):S104–S113.

24. Gallego L, Towner KJ. 2001. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. J. Med. Microbiol. 50**:**71-77.

25. Garnacho J, Ortiz C, Fernandez E, Aldabo T, Cayuela A, et al. 2005. *Acinetobacter baumanni* ventilator- associated pneumonia: Epidemiological and clinical findings. Intensive Care Med.; 31:649–55.

26. Gestal AM, Stokes HW, Partridge SR, Hall RM. 2005. Recombination between the *dfrA12*-orfF-*aadA2* cassette array and an *aadA1* gene cassette creates a hybrid cassette, *aadA8b*. Antimicrob. Agents Chemother. 49**:**4771-4774.

27. Gillings M, Boucher Y, Labbate M, et al. 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. J. Bacteriol.; 190:5095–5100.

28. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. 2008 .Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother. 52(3):813-21.

29. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. Antimicrob Agents Chemother.; 45(3):723–726.

30. Gombac F, Riccio ML, Rossolini GM, Lagatolla C, Tonin E, Monti-Bragadin C, Lavenia A, Dolzani L. 2002. Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. Antimicrob Agents Chemother; 46:3665–3668.

31. Hall RM, Collis CM. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol. Microbiol. 15, 593–600.

32. Hansson K, Sundström L, Pelletier A, et al. IntI2 integron integrase in Tn*7*. J. Bacteriol. 2002; 184:1712–1721.

33. Henriques I, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. 2006. Occurrence and diversity of integrons and β-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. Res. Microbiol. 157**:**938-947.

34. Hernández MA, Valenzuela EM, Pulido IY, Reguero MT, Restrepo S, Gualtero S, Plazas M, Quintero LE, Mantilla JR. 2011. The genomic identification of Colombian Acinetobacter baumannii clinical isolates by RFLP-PCR analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region**.** Revista Colombiana de Biotecnologia. Vol 13 Nº 1. Pág : 110-114

35. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. 2006.Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect.; 12:123–30.

36. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. 2010. gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. J Clin Microbiol. 12:4592-4

37. Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, et al. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1SXT constins. Antimicrob Agents Chemother; 45:2991–3000.

38. Iacono M, Villa L, Fortini D, Bordoni R, Imperi F, Bonnal RJ, Sicheritz-Ponten T, De Bellis G, Visca P, Cassone A, Carattoli A. 2008. Whole-genome

pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. Antimicrob Agents Chemother; 52:2616–2625.

39. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother.;47:559–62

40. Jawad A, Seifert H, Snelling A, Heritage J, Hawkey P. 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. J Clin Microbiol.; 36:1938–1941.

41. Joly-Guillou ML. 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect.; 11:868–873.

42. Jones RN. 2003. Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). Semin. Respir. Crit. Care Med. 24:121-134.

43. Jové T, Da RS, Denis F, Mazel D, Ploy MC. 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. PLoS Genet.;6

44. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. 2009. oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother.;53:3582–3584

45. Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. 2001. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. J. Clin. Microbiol. 39:8-13.

46. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, et al. 2002. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and Pseudomonas aeruginosa in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. Arch Intern Med.; 162:1515–20.

47. Larson EL, Cimiotti JP, Haas J, Nesin M, Allen A, Della-Latta P, Saiman L. 2005. Gram-negative bacilli associated with catheter-associated and non-catheter-associated bloodstream infections and hand carriage by healthcare workers in neonatal intensive care units. Pediatr. Crit. Care Med. 6457-461.

48. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy P. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother.; 39:185–191.

49. Levy S. 1997. Antibiotic resistance: An ecological imbalance. Ciba Found Symp; 207:1-14.

50. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. 1999. Transposon Tn*21*, flagship of the floating genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev.; 63:507–22.

51. Mahgoub S, Ahmed J, Glatt AE. 2002. Completely resistant *Acinetobacter baumannii* strains. Infect Control Hosp Epidemiol; 23:477–9.

52. Manchanda V, Sanchaita S, Singh NP. 2010. Multidrug resistant Acinetobacter. J Global. Infect Dis.; 2:291–304.

53. Maragakis LL, Perl TM. 2008. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis; 46:1254-63.

54. Márquez C, Labbate M, Ingold AJ, Chowdhury P, Ramírez MS, Centrón D, Borthagaray G, Stokes HW**.** 2008. Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. Antimicrob. Agents Chemother. 52**:**4153-4154.

55. Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat. Rev. Microbiol. 4, 608–620.

56. Miranda MC, Perez F, Zuluaga T, Olivera MR, Correa A, Reyes SL, Villegas MV, and Grupo de Resistencia Bacteriana Nosocomial de Colombia. 2006. Resistencia a antimicrobianos en bacilos Gram negativos aislados en unidades de cuidado intensivo en hospitales de Colombia, WHONET2003, 2004 y 2005. Biomedica 26:424-433.

57. Miriagou V, Carattoli A, Tzelepi E, Villa L, Tzouvelekis LS. 2005. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. Antimicrob. Agents Chemother. 49:3541–3543

58. Mugnier P, Poirel L, Nordmann P. 2009. Functional analysis of insertion sequence ISAba1, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 191**:**2414-2418.

59. Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. J Bacteriol.; 183:235–249.

60. Nandi, S, Maurer JJ, Hofacre C, Summers AO. 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:7118-7122.

61. Navia M, Ruiz J, Vila**.** 2004. Molecular characterization of the integrons in *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 48**:**175-179.

62. Nemec A, Dolzani S, van den Broek P, and Dijkshoorn L. 2004. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European Acinetobacter baumannii clones. J. Med. Microbiol. 53**:**1233-1240.

63. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol. Rev. 33, 757–784.

64. Peters ED, Leverstein-van, Hall MA, et al. 2001. Novel gene cassettes and integrons. Antimicrob Agents Chemother.; 45(10):2961–2964.

65. Pinzón J, Mantilla J, Valenzuela E, Fernández F, Álvarez C, Osorio E. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii provenientes de la unidad* de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. Infection; 10(2): 71-78

66. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. 2000. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii:* description of a hybrid class 2 integron. Antimicrob Agents Chemother.; 44:2684–2688.

67. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. 2007.Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol.; 2:501–12.

68. Post V, Hall R. M. 2009. AbaR5, a large multiple-antibiotic resistance region found in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. 53:2667–2671.

69. Ramirez MS, Pineiro S, Centron D. 2010. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. Antimicrob Agents Chemother.;54:699–706

70. Rechia GD, Hall RM. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology 141, 3015–3027.

71. Riley MA, Lizotte-Waniewski M. 2009. Population genomics and the bacterial species concept. Methods Mol Biol.; 532:367–77.

72. Rosser SJ, Young HK. 1999. Identification and characterisation of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. J Antimicrob Chemother.; 44:11–18.

73. Saavedra SY, Nuñez JC, Pulido IY, González EB, Valenzuela EM, M.Reguero MT, Mantilla JR, Arango AI, Bravo P. 2008. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus–A. baumannii* complex isolates in a third-level hospital in Bogotá, Colombia. International Journal of Antimicrobial Agents. 31:389-391.

74. Sabaté M, Prats G**.** 2002. Structure and function of integrons. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 20**:**341-345.

75. Sader H, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC, and the SENTRY Participants Group (Latin America). 2004. The SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz. J. Infect. Dis. 8:25-79

76. Scott P et al. 2007. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin. Infect. Dis. 44**:**1577-1584.

77. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I and MVaneechoutte M. 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin:

comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J. Clin. Microbiol. 35:2819-2825.

78. Sengstock DM et al. 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging pathogen among older adults in community hospitals and nursing homes. Clin. Infect. Dis. 50:1611–1616.

79. Shelburne SA, Singh KV, Clinton-White A, Byrne L, Carmer A, Austin C, E. Graviss E, Stager C, Murray BE, and Atmar RL. 2008. Sequential outbreaks of infections by distinct *Acinetobacter baumannii* strains in a public teaching hospital in Houston, Texas. J. Clin. Microbiol. 46:198-205.

80. Shete VB, Ghadage DP, Muley VA, Bhore AV. 2010. Multi-drug resistant *Acinetobacter* ventilator-associated pneumonia. Lung India. 27(4):217-20

81. Shi L, Zheng M, Xiao Z, Asakura M, Su J, Li L, and Yamasaki S. 2006. Unnoticed spread of class 1 integrons in gram-positive strains isolated in Guangzhou, China. Microbiol. Immunol. 50463-467.

82. Simor AE, Lee M, Vearncombe M, Jones-Paul L, Barry C, Gomez M, et al. 2002. An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: risk factors for acquisition and management. Infect Control Hosp Epidemiol.; 23:261–7.

83. Sorum H, Roberts MC, Crosa JH. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen Vibrio salmonicida. Antimicrob Agents Chemother.; 36:611–615.

84. Stokes HW, Hall RM. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol. Microbiol. 31669-1683.

85. Stokes HW, Nesbo CL, Holley M, Bahl MI, Gillings M, and Boucher Y**.** 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with Tn*402*-like transposition genes are present in a sediment microbial community. J. Bacteriol. 188**:**5722-5730.

86. Tjernberg I, Ursing J. 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. Apmis; 97:595–605.

87. Tribuddharat C, Fennewald M. 1999. Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother.; 43:960–962.

88. Trucco O, Prado V, Duran C y grupo PRONARES. 2002. Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES: Informe primer semestre 2001. Rev Chil Infect; 19: S140-S8.

89. Turton JF, et al**.** 2006. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. J. Clin. Microbiol. 44**:**2630-2634.

90. Valentine SC et al. 2008. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. J. Clin. Microbiol. 46:2499–2507.

91. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S. 2008. Comparative analysis of *Acinetobacters*: Three genomes for three lifestyles. PLoS ONE.; 3:e1805.

92. van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol.; 2:203.

93. Vernikos GS, Parkhill J. 2008. Resolving the structural features of genomic islands: a machine learning approach. Genome Res; 18(2):331–42.

94. Villegas MV, Hartstein AI. 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 24:284-295.

95. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother; 47:2242–2248.

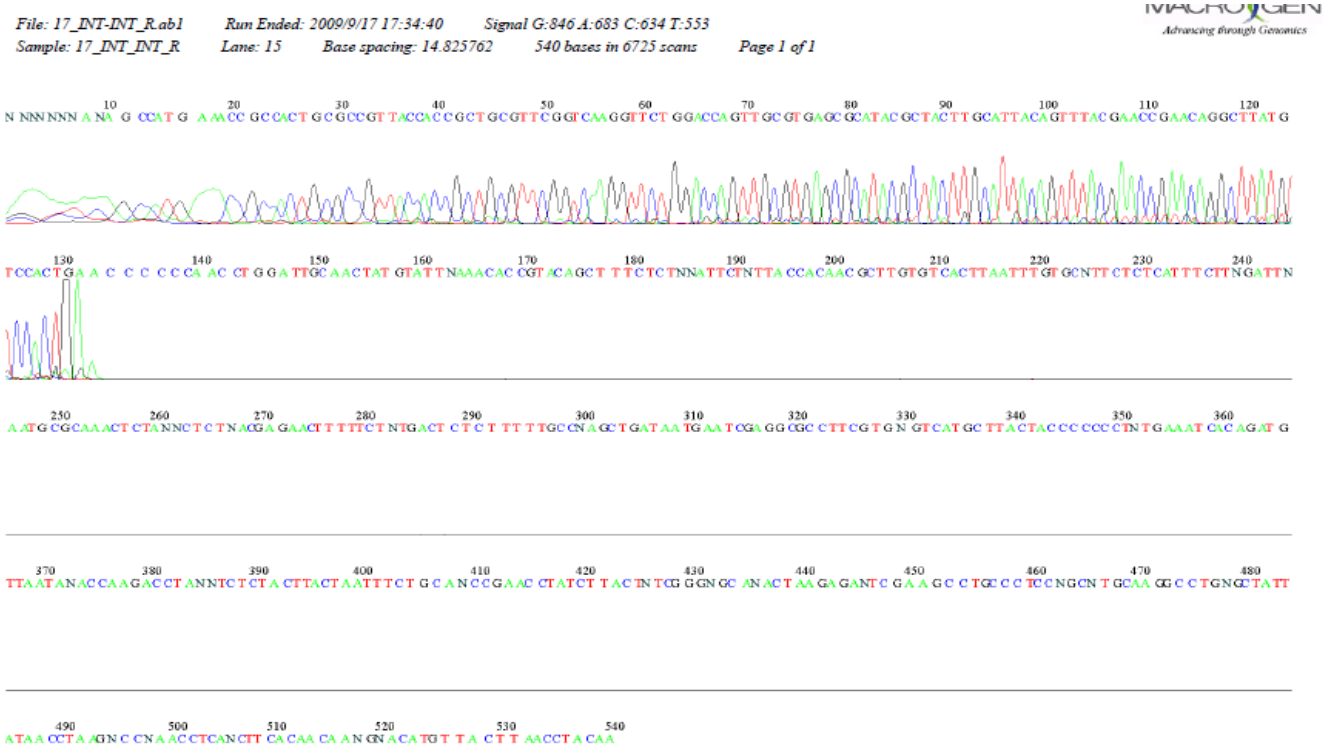
96. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother. 45:2658-2661

97. Woolhouse ME, Haydon DT, Antia R. 2005. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. Trends Ecol. Evol. 20, 238–244.

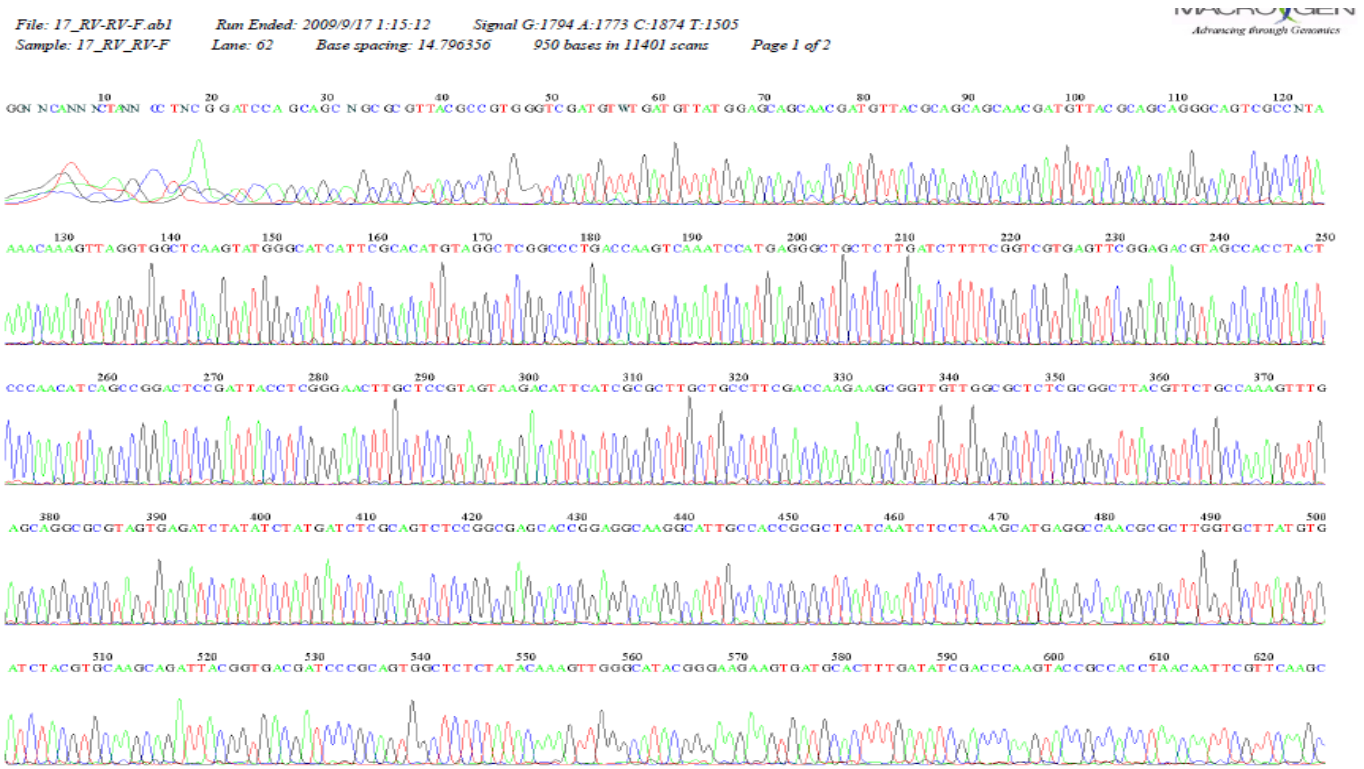
98. Xu H, Davies J, Miao V**.** 2007. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. J. Bacteriol. 189**:**6276-6283.

Anexos

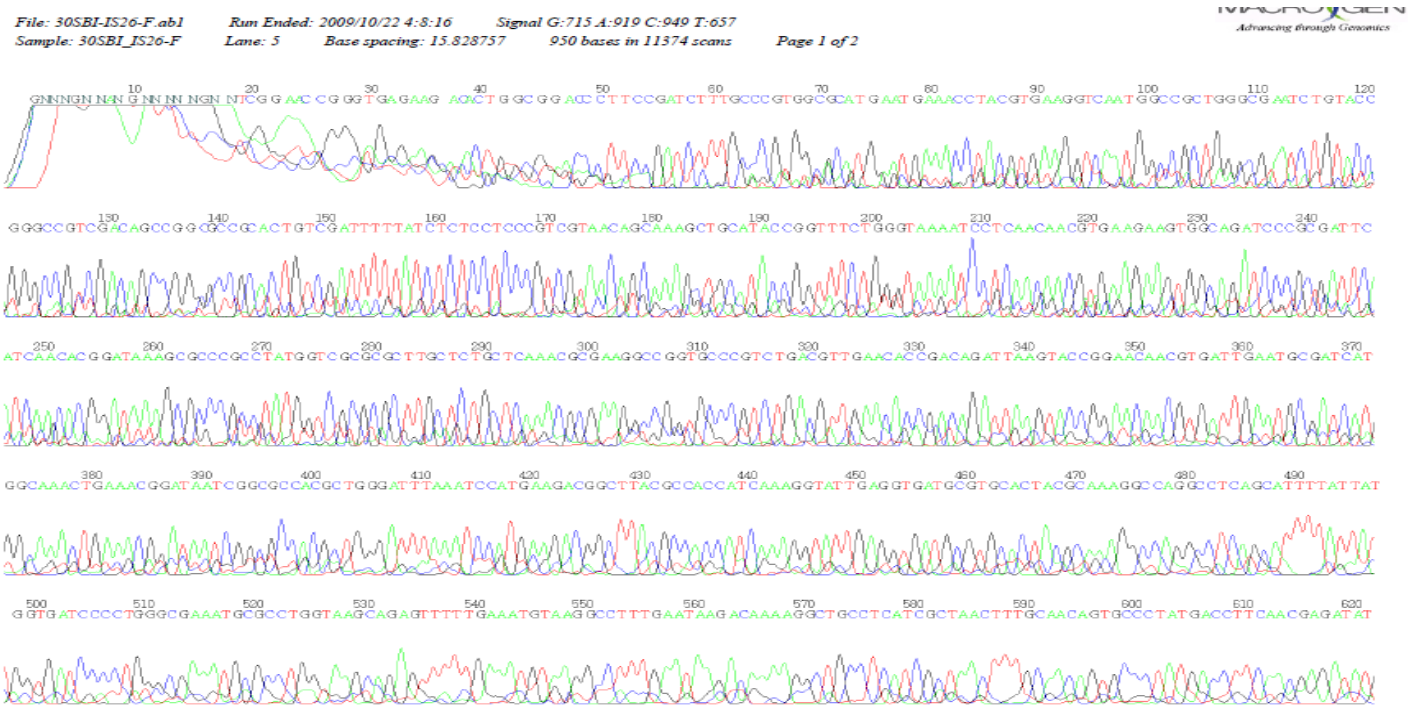
ANEXO 1. SECUENCIA DE LA INTEGRASA TIPO I



ANEXO 2. SECUENCIA DE REGIÓN VARIABLE HOSPITAL 1



ANEXO 3. SECUENCIA DE LA AMPLIFICACIÓN CRUZADA INTEGRASA TIPO I- IS26



ANEXO 4. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS POSITIVAS PARA INTEGRASA DE TIPO I

hospital	Nº	0XA23	0XA24	0XA51	0XA58	CTX	CAZ	FEP	ATM	SAM	TZP	AMC	IMP	MEM	CIP	NA	AK	CN	ADC	ISAba1 ADC	TEM	CTX	SHV	aadA1	aadB	aacA4	aacC1	aacC2	aphA6	armA	Int1 aacC1	Int1 aacC2	Int1 aphA6	Int1 aadA1	Int I 1
3	1	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NA	POS	POS
3	4	POS	NEG	POS	NEG	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	POS
3	9	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
3	14	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	9	NEG	NEG	POS	NEG	R	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R	R	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NA	POS	POS
1	11	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	13	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	15	NEG	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	16	POS	NEG	POS	NEG	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	17	NEG	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NA	POS	POS
1	18	NEG	NEG	NEG	NEG	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	I	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	19	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	21	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	22	POS	NEG	POS	NEG	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	POS
1	24	NEG	NEG	NEG	NEG	R	I	I	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NA	POS	POS
1	25	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	27	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	28	POS	NEG	POS	NEG	I	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	POS
1	30	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NA	POS	POS
1	31	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	32	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
1	33	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
2	21	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	POS
2	46	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	POS
2	84	NEG	NEG	POS	NEG	I	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	POS
2	108	POS	NEG	POS	NEG	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	POS
2	111	POS	NEG	POS	NEG	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
2	113	POS	NEG	POS	NEG	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS
2	118	NEG	NEG	NEG	NEG	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	POS
2	6b	POS	NEG	POS	NEG	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	POS
2	77-2	POS	NEG	POS	NEG	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NA	NEG	NA	NA	POS

ANEXO 5. RELACIÓN PORCENTUAL DE CEPAS POSITIVAS Y FUENTE DE AISLAMIENTO

FUENTE DE AISLAMIENTO	*NUMERO DE CEPAS (# / %)*	*CEPAS POSITIVAS PARA INTEGRASA (# / %)*
ORINA	7 (5.4%)	1 (0.8 %)
SECRECIÓN	21(16.3%)	8 (6.2 %)
SANGRE	60 (46.5%)	14 (10.85%)
TRAQUEOSTOMÍA	1(0.8 %)	0
CATÉTER	19(14.7%)	5 (3.9 %)
AMBIENTE	6(4.7%)	0
QUEMADOS	2(1.6 %)	2(1.6 %)
LAVADO	12 (9.3 %)	0
ESPUTO	1(0.8 %)	1 (0.8%)

ANEXO 6. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE INTEGRONES DE TIPO I Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

ANTIBIÓTICO	CEPAS RESISTENTES	CEPAS RESISTENTES POSITIVAS A INTEGRASA	CEPAS NO RESISTENTES	CEPAS NO RESISTENTES POSITIVAS A INTEGRASAS
CTX	126 (97.6%)	31 (24 %)	3 (2.4)	0 (0 %)
CAZ	101 (78.3 %)	24 (18.6 %)	25 (19.4 %)	7 (5.4 %)
FEP	109 (84.5 %)	27 (20.9%)	20 (15.5 %)	4 (3.1 %)
ATM	127 (98.5 %)	31(24 %)	2 (1.5 %)	0 (0%)
SAM	96 (74.4 %)	26 (20.1 %)	33 (25.5 %)	5 (3.9 %)
TZP	111 (86 %)	26(20.2 %)	18 (14%)	5 (3.4 %)
AMC	122(94.6)	29(22.5 %)	7(5.4 %)	2 (1.6 %)
IMP	100(77.5 %)	24 (18.6 %)	29(22.5 %)	7(5.4 %)
MEM	101 (78.3 %)	24(18.6 %)	28(21.7 %)	7(5.4 %)
CIP	104(80.6 %)	27(20.9 %)	25(19.4 %)	4(3.1 %)
NA	120(93.0 %)	29(22.4 %)	9(7 %)	2(1.6 %)
AK	114(88.3 %)	28 (21.7 %)	15 (11.7 %)	3(2.3 %)
CN	116(90 %)	28(21.7 %)	13(10 %)	3(2.3 %)

CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, SAM: Ampicilina-sulbactam, TZP: Piperacilina-tazobactam, AMC: Amoxicilina-clavulanico, IMP: Imipenem, MEM: meropenem, CIP: Ciprofloxacina, NA: Acido nalidíxico, AK: Amikacina, CN: Gentamicina

ANEXO 7. POSTEST DE BONFERRONI (RESULTADO OBTENIDO DEL PROGRAMA ESTADÍSTICO STATA)

			resistentes int - vs resistentes int +		
	Row Factor		resistentes int - resistentes int +	Difference	95% CI of diff.
CTX	73,64	24,03	-49,61	-49.61 to -49.61	
CAZ	60,47	18,60	-41,87	-41.87 to -41.87	
FEP	63,57	20,93	-42,64	-42.64 to -42.64	
ATM	74,42	24,03	-50,39	-50.39 to -50.39	
SAM	54,26	20,16	-34,10	-34.10 to -34.10	
TZP	65,89	20,16	-45,73	-45.73 to -45.73	
AMC	72,09	22,48	-49,61	-49.61 to -49.61	
IMP	58,91	18,60	-40,31	-40.31 to -40.31	
MEM	59,69	18,60	-41,09	-41.09 to -41.09	
CIP	59,69	20,93	-38,76	-38.76 to -38.76	
NA	70,54	22,48	-48,06	-48.06 to -48.06	
AK	66,67	21,71	-44,96	-44.96 to -44.96	
CN	68,22	21,71	-46,51	-46.51 to -46.51	

Row	Factor	Difference	t	P value	Summary
CTX	-49,61	141500000	P<0.001		***
CAZ	-41,87	119400000	P<0.001		***
FEP	-42,64	121600000	P<0.001		***
ATM	-50,39	143700000	P<0.001		***
SAM	-34,10	97230000	P<0.001		***
TZP	-45,73	130400000	P<0.001		***
AMC	-49,61	141500000	P<0.001		***

Se observa el valor t. Este valor es muy pequeño lo que establece que existen diferencias significativas entre los grupos analizados.