



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**AISLAMIENTOS HOSPITALARIOS DE *Pseudomonas  
aeruginosa* PORTADORAS DE GENES DE  
CHAPERONA, INTEGRÓN DE CLASE 1 Y DE  
COLONIZACIÓN.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**SAMANTHA ACOSTA CRUZ**



Facultad de Estudios Superiores

**IZTACALA**

**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS**

Proyecto financiado por la DGAPA, PAPIIT 203723

Tlalnepantla, Edo. de México Octubre 2023.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar este trabajo principalmente a mi mamá, la responsable de que esto fuera posible, que día a día nos alienta a superarnos, tanto a mi como a mis hermanos. Hermanos que también durante toda mi vida me han inspirado, los amo; Y en general a toda mi familia. También va por ti Ari, fuiste clave durante mi estancia en la FESI.

## **Agradecimientos**

A mi mamá, agradezco que entregues tanto de ti siempre, te debo absolutamente todos mis logros; a mis hermanos, Gael y Ashly, que aunque son menores que yo, no hay día que no me motivan; a mis tías, Martha y Lupita, quienes son como otra mamá, y desde que tengo memoria han estado para lo que necesite; a toda mi familia, Chantita, Coyote, mi abue Mari, Wi, y los que me faltan por mencionar, gracias por acompañarme y darme todo tipo de ayuda para alcanzar este logro. A Ari, que siempre me motiva a creer en mí y me recuerda lo capaz que soy de cumplir mis metas, en momentos difíciles, gracias por siempre estar en las buenas, las malas, en mente y corazón. A mis amigos que hice dentro de la FESI, Julio que es de mis primeras amistades que hice en la FESI, Fri, Mel, Kari, Cano, gracias por haber hecho mi paso por la FESI tan agradable, lleno de grandes memorias y a mis amigos externos, Montse y Alex, que desde la prepa me acompañan, los aprecio.

A la FESI-UNAM, por mi formación académica; al PAPIIT, por proporcionar los recursos para que se realizara este proyecto de tesis; a mi tutora la Dr. Gloria Paniagua, por darme la oportunidad de entrar a su laboratorio y concluir mis estudios bajo su tutoría; al Dr. Eric Monroy, por su paciencia y enseñanzas dentro del laboratorio; Susa y Paty, por siempre echarnos una mano a todos los que estamos en el laboratorio; a mis amigas del laboratorio, Danita, Lore, Andy, Alexa y Karen, fue un gusto compartir el laboratorio con ustedes.

## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>6</b>
Patogenicidad.....	6
Factores de virulencia.....	7
Quórum sensing.....	8
Lipopolisacárido (LPS).....	8
Proteínas de la membrana externa.....	9
Colonización y formación de biopelícula.....	10
Chaperona GroEL.....	11
Otros factores.....	<b>12</b>
Resistencia a los antibióticos.....	12
Cambios en la permeabilidad de la membrana exterior.....	13
Bombas de salida contra antibióticos.....	14
Enzimas inactivadoras de antibióticos.....	14
Biopelícula.....	15
Integrines.....	<b>16</b>
Estatus de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en México.....	17
<b>Antecedentes.....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>21</b>
Origen de las cepas.....	21
Resistencia a los antibióticos en las cepas.....	21
Extracción de DNA.....	22
Identificación de las cepas.....	22
Identificación de los genes de virulencia y del integrón clase 1 en las cepas...22	
Electroforesis.....	24
Análisis estadísticos.....	24
<b>Resultados.....</b>	<b>25</b>
Pacientes y diagnósticos.....	25
Identificación de <i>P. aeruginosa</i> .....	27
<b>Detección de genes de virulencia.....</b>	<b>27</b>
Distribución de los genes de virulencia y del integrón de clase 1 en las cepas según el diagnóstico clínico.....	30
Resistograma.....	32
<b>Discusión.....</b>	<b>34</b>
Pacientes estudiados.....	34
Factores de virulencia.....	35

Integrón de clase 1.....	36
Fenotipo de resistencia a los antibióticos.....	37
<b>Conclusiones.....</b>	<b>38</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>39</b>

## Resumen

El incremento de las infecciones hospitalarias y comunitarias causadas por cepas multidrogo-resistentes (MDR) de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras de numerosos factores de virulencia como adhesinas, proteasas, exotoxinas, chaperonas, elastasas, entre otros, es un serio problema de salud que dificulta el tratamiento médico. Objetivos: Establecer la frecuencia de los genes de adhesión (*pilA* y *ndvB*), de chaperona (*groEL*) y del integrón de clase 1 (*int1*), asociados a la multidrogo-resistencia en cepas hospitalarias de *P. aeruginosa*. Metodología: Se analizaron 100 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con diferentes diagnósticos (infecciones vías urinarias, sepsis, infecciones respiratorias, neumonía, y otros) atendidos en el Hospital General Regional (HGR) No.72 del IMSS en Tlalnepantla, Estado de México. La identificación de *P. aeruginosa* se realizó mediante la amplificación de la región 16S del gen *rRNA* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de punto final. El fenotipo de resistencia a los antibióticos se determinó por el método de Kirby-Bauer, y los genes de virulencia por PCR de punto final. Resultados: Los genes de adhesión *ndvB* y *pilA* fueron identificados en el 98% (n=98) y 97% (n=97) de las cepas, respectivamente, el gen de la chaperona *groEL* en el 100% (n=100) y el gen asociado al integrón de clase 1 *int1* en el 95% (n=95). El 97% (n=97) de las cepas fue resistente a la ampicilina y cefalotina, 98% (n=98) a carbenicilina, 96% (n=96) a nitrofurantoína y sulfametoxazol/trimetoprim, en cada caso, 91% (n=91) a cloranfenicol, 89% (n=89) a cefotaxima, 86% (n=86) a netilmicina, 53% (n=53) a norfloxacin y amikacina, en cada caso, 51% (n=51) a ciprofloxacina y 50% (n=50) a gentamicina. Conclusiones: Los resultados mostraron una elevada distribución de los genes de virulencia relacionados con el integrón de clase I y con la multidrogo-resistencia en las cepas hospitalarias de *P. aeruginosa*, por lo que es importante establecer programas que ayuden a mejorar el tratamiento médico contra este importante patógeno.

## Introducción

El género “*Pseudomonas*” fue descrito por primera vez por Walther Migula a finales del siglo XIX, mientras que el nombre de la especie “*aeruginosa*”, el cual hace referencia al color verde que producen algunas colonias de esta bacteria en medios de cultivo, ya se había mencionado con anterioridad en el mismo siglo por Schroeter (De Sousa *et al.*, 2021). Es una especie común, presente en plantas, frutos, suelo y cuerpos de agua, debido a que se adapta fácilmente a diferentes ambientes, incluso los hospitalarios y en presencia de desinfectantes (Mielko *et al.*, 2019; Subedi *et al.*, 2018). *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo que mide de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de largo y de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho, con un único flagelo polar que le proporciona movilidad, no fermentativo, y aeróbico al usar la vía glucolítica para degradar la glucosa con el oxígeno como aceptor final de electrones, no obstante, en condiciones anaeróbicas el nitrógeno puede participar como aceptor final de electrones (De Sousa *et al.*, 2021; Diggle & Whiteley, 2020). Es protótrofo, capaz de utilizar más de 100 moléculas orgánicas como fuente de carbono y/o energía, crece a una temperatura óptima de 37 °C, pero puede sobrevivir a amplios rangos de temperaturas que van desde 4 a 42 °C (Diggle & Whiteley, 2020).

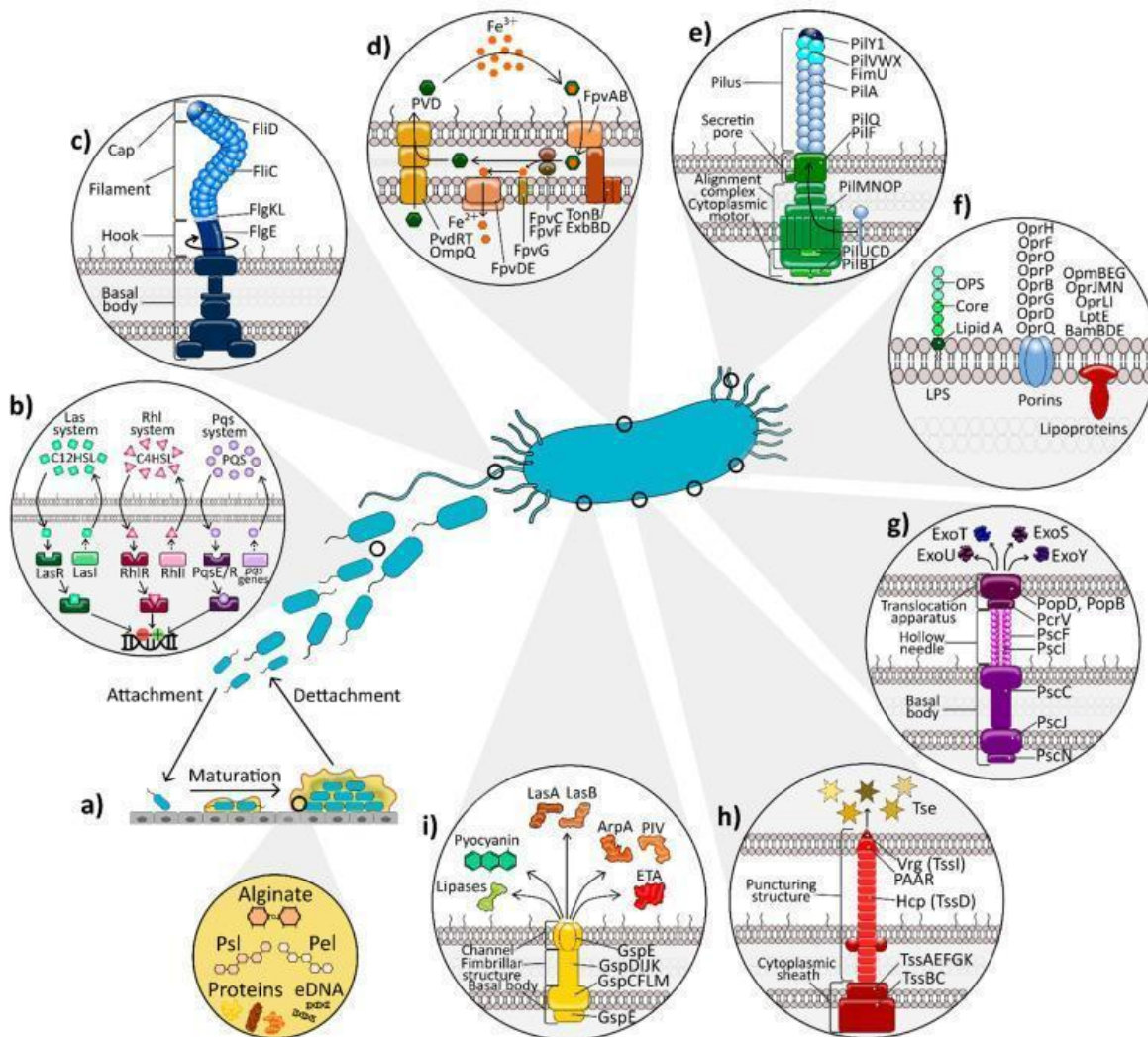
## Patogenicidad

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista, que causa enfermedades tanto en plantas como en animales, representando una de las principales causas de infecciones nosocomiales como lo son las infecciones de vías urinarias, vías respiratorias, heridas quirúrgicas, quemaduras y en sangre, al ser el colonizador más frecuente de dispositivos médicos como catéteres, nebulizadores, y humidificadores; asimismo, está asociado a infecciones adquiridas en la comunidad como la otitis externa (oído del nadador), la queratitis ulcerosa e infecciones de tejidos blandos, afectando especialmente a pacientes inmunocomprometidos, con dispositivos médicos permanentes o con cáncer (Azam & Khan, 2019; Elmouaden *et al.*, 2019; Mielko *et al.*, 2019). Posee la versatilidad de causar tanto enfermedades crónicas como agudas (Jurado-Martín *et al.*, 2021), y se le asocia a una elevada morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ) e incluso en pacientes con un sistema inmune funcional, sin embargo, hasta ahora se desconocen con exactitud las interacciones de este patógeno con el hospedero, lo cual complica el desarrollo de terapias eficaces (Riquelme *et al.*, 2020; Jurado-Martín *et al.*, 2021). Desde el 2017 la Organización Mundial de la Salud ha reconocido a *P. aeruginosa* como uno de los patógenos más importantes, debido a su elevada resistencia intrínseca a los antibióticos, convirtiéndolo en una prioridad el desarrollo de nuevos antibióticos contra este patógeno (WHO, 2017).



## Factores de virulencia

La patogenicidad de *P. aeruginosa* se debe a la amplia variedad de factores de virulencia que tiene (Figura 1), los cuales están dirigidos por circuitos complejos y sistemas de señalización que guían la expresión de estos genes, otorgándoles la capacidad de adaptarse a distintas condiciones (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Mielko *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Esquema representativo de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* (tomado de Jurado-Martín *et al.*, 2021). (a) Formación de biopelícula y su composición (b) Sistemas principales de detección del quórum sensing (QS) (Las, Rhl y Pqs); (c) flagelo (d) sideróforo de pioverdina; (e) pili tipo IV (T4P); (f) lipopolisacárido (LPS) y proteínas de membrana externa (OMP); (g) sistema de secreción de tipo III (T3SS); (h) el sistema de secreción tipo VI (T6SS); (i) sistema de secreción tipo II (T2SS).

### *Quórum sensing*

El quórum sensing (QS) es primordial para regular varios genes, la comunicación entre células y la adaptación a los cambios ambientales. *P. aeruginosa* cuenta con cuatro sistemas QS: el sistema *Las* es el principal, dirige la señalización y controla positivamente la expresión de los otros tres sistemas; el sistema *lqs* tiene un efecto estimulador sobre sistema *Pqs*; y este sobre el sistema *Rhl*, mientras que *Rhl* regula negativamente *Pqs*. Son sistemas adaptables y capaces de responder a factores estresantes externos, proporcionando plasticidad a la bacteria (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Mielko *et al.*, 2019), por lo que representa un papel clave en la virulencia, regulando la liberación de múltiples factores (elastasa, proteasa alcalina, exotoxina A, ramnolípidos, piocianina y lipasa), además de participar en la maduración de la biopelícula (Rezzoagli *et al.*, 2020).

### *Lipopolisacárido (LPS)*

El LPS es el principal factor de virulencia de la pared celular de las bacterias Gram-negativas (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Se compone de 3 dominios, el lípido A, el antígeno O y una región núcleo. Su función primordial es actuar como una barrera física, interviniendo sobre los receptores del hospedero y causando daño a los tejidos debido a su actividad endotóxica. Puede estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de mucina formadora de gel en las células epiteliales de las vías respiratorias, afectando principalmente a pacientes con asma, EPOC y FQ, además de contribuir con la resistencia a los antibióticos y a la formación de biopelícula (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2022).

El lípido A es un glicolípidio hidrofóbico que ancla los otros dos dominios de LPS en la membrana exterior y expresa la endotoxicidad. Está compuesto por un esqueleto de fosfato de diglucosamina con ácidos grasos O- y N-ligados. Sus cadenas de acilo se unen al receptor MD2 de la célula del hospedero, permitiendo la activación de la vía de señalización del receptor TLR4 (receptor de detección de LPS), estas cadenas de acilo junto con los fosfatos interactúan con una quinolona del sistema de quórum sensing (QS), que cuando se exporta a la membrana exterior, induce una curvatura de la membrana que da origen a las vesículas de la membrana externa (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Generalmente la estructura del lípido A se conserva, aunque puede llegar a existir una variación en cuanto al número de cadenas de acilo, de fosfatos, y otras modificaciones, afectando las interacciones con el entorno de la bacteria (Huszczynski *et al.*, 2019).

La región núcleo se divide en dos regiones, el núcleo interno (anclado al lípido A) y núcleo exterior (anclada al antígeno O; Diggle & Whiteley, 2020). El núcleo interno normalmente contiene Kdo (ácido 3-desoxi-D-mano-oct2-ulopiranosónico)

enlazado a varios residuos de heptosa, aunque en algunas estructuras de la región núcleo se sustituye el Kdo, por Ko (ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulopiranosónico). El núcleo exterior varía entre las especies, aunque usualmente contienen hexosas y hexosaminas. En el caso de *P. aeruginosa*, la región núcleo está fuertemente fosforilada y compuesta de Kdo, heptosa, galactosamina, glucosa y ramnosa, las cargas negativas que posee le dan estabilidad a la membrana y un adecuado plegamiento a proteínas de la membrana exterior que dependen de las interacciones de la región núcleo (Huszczynski *et al.*, 2019).

El antígeno O es una cadena larga, variable e inmunogénica de polisacáridos repetitivos que pueden ser lineales o ramificados (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Se sintetiza por separado del lípido A, y eventualmente se unen, por consiguiente se obtiene una superficie heterogénea que contiene LPS con y sin antígeno O; las que contienen LPS con antígeno O a menudo se describen como "liso", mientras que los que carecen de antígeno O se denominan "ásperos", haciendo referencia a la morfología suave o rugosa de las colonias de bacterias cuando se cultivan en medios (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Huszczynski *et al.*, 2019). Existe una clasificación con base en este polisacárido, conocida como O-serotyping, que clasifica las cepas según el antígeno O específico presentado en la superficie celular, *P. aeruginosa* produce dos variables de antígeno O: el antígeno polisacárido común (CPA) y el antígeno O específico (AOS) (Huszczynski *et al.*, 2019). Participa en interacciones hospedero-patógeno, previene la muerte bacteriana inhibiendo mecanismos que participen en este proceso (complejo de ataque a la membrana y fagocitosis) y provee protección contra el estrés oxidativo (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

#### *Proteínas de la membrana externa*

La membrana externa de *P. aeruginosa* está conformada por una bicapa asimétrica que actúa como una barrera selectiva, en la cara interna hay fosfolípidos y en su cara exterior el LPS (Qin *et al.*, 2022; Jurado-Martín *et al.*, 2021). Cuenta con alrededor de 300 proteínas de membrana que desempeñan diferentes funciones, como canales y lipoproteínas (OprL, Lpte, BamBDE, etc.) que participan en la biogénesis y mantenimiento de la misma (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Chevalier *et al.*, 2017). *P. aeruginosa* solo expresa para 26 de estas porinas, cuya forma es de barril beta, se clasifican en: porinas no específicas de las cuales la más abundante es OprF que permite la difusión lenta de la mayoría de las moléculas hidrofílicas pequeñas; porinas específicas OprB, OprD, OprE, OprO y OprP que contienen sitios específicos donde se unen conjuntos de moléculas; porinas dependientes, dependientes de TonB, OprC y OprH que participan en la

captación de complejos iónicos; y porinas de eflujo OprM, OprN y OprJ que componen las bombas de salida. Son multifuncionales, no sólo participan en el transporte de aminoácidos, azúcares y nutrientes, sino también en la resistencia a los antibióticos al disminuir la permeabilidad de la membrana externa reemplazando las porinas por canales específicos que sólo absorban los nutrientes (Qin *et al.*, 2022; De Sousa *et al.*, 2021).

### *Colonización y formación de biopelícula*

La biopelícula que forma *P. aeruginosa* se caracteriza por ser robusta, y altamente resistente, a la acción de los antibióticos y a la respuesta inmune del hospedero (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Esta biopelícula está conformada por exopolisacáridos: el polisacárido capsular alginato y dos polisacáridos agregativos (Psl y Pel), proteínas, vesículas lipídicas y DNA extracelular (eDNA). Su desarrollo se puede dividir en etapas: unión reversible, donde las células móviles se adhieren a una superficie por medio del flagelo; apego irreversible, las células se vuelven más firmes conectado a la superficie a través del eje largo de la celda; formación de microcolonias, las células agregan y secretan componentes de la matriz; biopelícula madura, caracterizada por la forma de hongo “coronado”, hay formación de macrocolonias y canales de fluidos; y la última etapa, dispersión (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Cassin & Tseng, 2019).

Es conocido que varios genes de *P. aeruginosa* participan en la resistencia a los antibióticos, especialmente por medio de la formación de biopelícula, *ndvB* es uno de estos genes, su función es codificar para una glucosiltransferasa que participa en la formación de glucanos cíclicos asociados al desarrollo de la biopelícula, los cuales son polímeros cíclicos de 12 a 15 moléculas de glucosa unidas con sustituciones de fosfoglicerol (Hall *et al.*, 2018; Beaudoin *et al.*, 2012).

En cuanto a las diferentes estructuras que participan en estos mecanismos, destaca el pili tipo IV que está a cargo de la motilidad y colonización de superficies tanto bióticas como abióticas (Jurado-Martín *et al.*, 2021), convirtiéndose en un apéndice indispensable para dar inicio a infecciones por *P. aeruginosa*. El pili tipo IV cuenta con 3 subtipos, con respecto a la secuencia de las pilinas, la longitud del péptido y diferencias en el ensamblado: pili tipo IVa, pili tipo IVb y pili tipo IVb-Tad (Liao *et al.*, 2022; Jacobsen *et al.*, 2020). Son fimbrias motorizadas, ubicadas en los polos, formadas en su mayoría por repetidas copias de una proteína de 14 kDa conocida como pilina (PilA; codificada por el gen *pilA*), junto con pilinas menores que se encuentran en menor abundancia, localizadas en la punta del pilus, subdivididas en pilinas menores centrales y pilinas menores no centrales, que se encargan de la adhesión para colonizar, captación de DNA y agregación. PilA se

compone por tres dominios: un dominio hidrofóbico altamente conservado en la región hélice  $\alpha$  N-terminal; una región central hipervariable y una región semiconservada C-terminal que contiene un dominio de unión para albergar células epiteliales (Jacobsen *et al.*, 2020).

La fuerza para impulsar a la bacteria, se da mediante ciclos de extensión, adhesión y retracción del pili tipo IV, a través de dos ATPasas asociadas a la membrana citoplasmática; PilB cuya función es polimerizar y PilT despolimerizar las subunidades de PilA en su base, así como contribuir a la organización de la microcolonia y la formación de biopelícula (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Craig *et al.*, 2019). La pilina menor ubicada en la punta (PilY1), se encarga de reconocer específicamente un receptor localizado en la superficie de las células epiteliales del hospedero y puede unirse a DNA, acción que probablemente participa en la transformación y formación de biopelícula (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Adicionalmente, el pili tipo IV también se involucra en la transmisión de señales (Webster *et al.*, 2021).

El flagelo de *P. aeruginosa* es un apéndice polar, que se localiza en la superficie bacteriana, su función es la motilidad bacteriana y la quimiotaxis, por ende participa en la colonización bacteriana a través de las subunidades de flagelina y la proteína flagelar FliD, de igual modo promueve la maduración de la biopelícula (Ozer *et al.*, 2021).

#### *Chaperona GroEL*

Las chaperonas moleculares, son una clase especial de proteínas de choque térmico (Hsp) que ayudan durante el plegamiento y formación de la estructura cuaternaria de otras proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*, entre las que se encuentra la chaperona GroEL (Finnan *et al.*, 2004). La chaperona GroEL (codificada por el gen *groEL*) de manera dependiente de ATP, se une a polipéptidos desplegados, para ensamblarse a la chaperona GroES, y de esta manera dar origen al sistema de chaperoninas conocido como GroES/GroEL, ubicado en el citosol de la bacteria, cuyo labor es actuar como una cámara, donde las proteínas recién sintetizadas o desnaturalizadas por estrés se despliegan correctamente (Sivinski *et al.*, 2021; Ambrose *et al.*, 2015). Además tiene el potencial de estimular la producción de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, y promueve la respuesta inmune, estimulando la expresión de PTX3, (Shin *et al.*, 2017; Persyn *et al.*, 2019).

### Otros factores

Sistema de secreción tipo III (T3SS) inyector de efectores virulentos en la célula del hospedero y sus multitoxinas (ExoU, ExoT, ExoS y ExoY); sistema de secreción tipo VI (T6SS) libera toxinas a las bacterias vecinas y participa en la formación de biopelículas; sistema de secreción tipo II (T2SS) segrega al medio extracelular enzimas líticas (lipasas, proteasas); sistema de secreción tipo I (T1SS) segrega proteasas alcalinas y utiliza hierro; sistema de secreción tipo V (T5SS) segrega proteínas relacionadas con la formación de biopelículas y adhesión; elastasas (LasA y LasB) que se encargan de la degradación de proteínas en la célula del hospedero, causando daño en el tejido; exotoxina A (ETA) que inhibe la síntesis de proteínas, induciendo la muerte celular; sideróforo de pioverdina como sistema de captación de hierro; y piocianina que suprime la respuesta inmune, además de ser citotóxico para la célula que infecta en el hospedero (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Liao *et al.*, 2022; Qin *et al.*, 2022).

### Resistencia a los antibióticos

La penicilina fue el primer antibiótico descubierto en 1928 por Alexander Fleming, y representó un gran logro científico para el tratamiento de infecciones bacterianas, sin embargo, el paso del tiempo llevó a la creación de nuevos antibióticos, considerándose la época dorada de su desarrollo entre la década de los años 50 a la de los años 70 (Osagie & Olalekan, 2019). El incremento drástico de infecciones bacterianas y el uso desmedido de los antibióticos, ha resultado en la aparición de cepas resistentes a múltiples antibióticos (González-Olvera *et al.*, 2019), en la Tabla 1 se mencionan algunos de estos.

**Tabla 1.** Familias de antibióticos y su mecanismo de acción.

Familia	Grupo	Mecanismo de acción	Referencia
Betalactámicos	Penicilinas ej. Penicilina, Amoxicilina, Ampicilina	Inhibición del último paso de la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana.	Eyler & Shvets, 2019.
	Cefalosporinas ej. 1era generación: Cefalexina. 2da generación: Cefuroxima. 3ra generación: Cefminox. 4ta generación: Cefepima.		
	Carbapenémicos ej. Imipenem		

	Monobactámicos ej. Aztreonam		
<b>Macrólidos</b>	ej. Azitromicina, claritromicina y eritromicina	Inhibición de la síntesis de proteínas dirigiéndose a la salida del péptido nascente, en el ribosoma bacteriano (50S).	Vázquez-Laslop & Mankin, 2018.
<b>Tetraciclinas</b>	ej. Clortetraciclina, doxiciclina, minociclina		Vicente & Pérez-Trallero, 2010.
<b>Aminoglucósidos</b>	ej. Amikacina, estreptomina, gentamicina	Inhibición de la síntesis de las proteínas, en el ribosoma bacteriano (30S).	Eyler & Shvets, 2019.
<b>Anfenicoles</b>	ej. Cloranfenicol	Inhibición de la síntesis de las proteínas, en el ribosoma bacteriano (50S).	Calvo & Martínez-Martínez, 2009.
<b>Peptídicos</b>	Polipeptídicos ej. Bacitracina, gramicidina	Despolarizan la membrana celular de la bacteria, lo que provoca pérdida en el potencial de membrana, induciendo la muerte celular.	Eyler & Shvets, 2019.
	Glucopéptidos ej. Vancomicina, teicoplanina		
	Lipopéptidos ej. Daptomicina		
	Polimixinas ej. Polimixina, colistina		
<b>Nitroderivados</b>	ej. Nitrofurantoína, nitrofurazona, metronidazol	Afecta el DNA bacteriano.	Vicente & Pérez-Trallero, 2010.
<b>Quinolonas</b>	ej. Ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino	Causan alteraciones en el metabolismo o en la estructura de ácidos nucleicos.	Calvo & Martínez-Martínez, 2009.
<b>Sulfonamidas y diaminopiridinas</b>	Sulfonamidas ej. Sulfadiazina, sulfametizol, sulfametoxazol	Actúa como inhibidor competitivo de la dihidropteroato sintasa, enzima que participa en la producción de ácido fólico.	Eyler & Shvets, 2019.
	Diaminopiridinas ej. Pirimetamina, trimetoprim		

*P. aeruginosa* posee una resistencia intrínseca y adaptativa a múltiples antibióticos, debido a su gran variedad de mecanismos de resistencia (Figura 2), que afectan la actividad antibiótica, se destacan los principales como:

#### *Cambios en la permeabilidad de la membrana exterior*

En la mayoría de casos para que un antibiótico pueda hacer efecto, necesita ingresar a la bacteria (Pang *et al.*, 2019), por lo que al generarse cambios en la

membrana externa, cambia la permeabilidad, y se evita el ingreso del antibiótico a la bacteria. Esto es dirigido por las porinas, cuyas funciones no solo son permitir el paso de moléculas que benefician a la bacteria, sino que también pueden cambiar a manera de canales específicos que solo permiten el paso de las moléculas que necesitan (De Sousa *et al.*, 2021). *P. aeruginosa* codifica para diferentes porinas, como OprF que intervienen en la formación y unión de la biopelícula protegiendo a la bacteria contra los antibióticos; OprD que al mutar sus características conformacionales causa resistencia a los carbapenémicos; OprH que mantiene la estabilidad de la membrana externa en conjunto con el lipopolisacárido (LPS) para regular la resistencia a los antibióticos; OprM, OprN y OprJ que participan en la expulsión de antibióticos, como la tetraciclina, la norfloxacin y los betalactámicos; aparte de las porinas, encontramos vesículas de la membrana externa, asociadas a la transportación de factores de virulencia, como la fosfolipasa C hemolítica, mRNA, DNA, y betalactamasas (Qin *et al.*, 2022).

#### *Bombas de salida contra antibióticos*

Las bombas de salida en *P. aeruginosa*, bombean al exterior de la bacteria agentes antibióticos, están distribuidas en 5 familias: la superfamilia del cassette de unión a ATP (ABC); la superfamilia de facilitador mayor (MFS); la familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE); la familia de resistencia pequeña a multifármacos (SRM); y la familia de sistemas de resistencia a división por nodulación (RND), siendo esta última la que tiene mayor correlación con la resistencia a los antibióticos (Qin *et al.*, 2022). La familia RND se dividen en el canal de la membrana externa, la proteína adaptadora periplásmica y el transportador de la membrana interna (Azam & Khan, 2019), y está conformada por 12 bombas de salida; donde la bomba MexAB-OprM juega un papel crucial en la resistencia a los carbapenémicos y MexXY-OprM en la resistencia a quinolonas, el cual es un problema clínico persistente (Qin *et al.*, 2022).

#### *Enzimas inactivadoras de antibióticos*

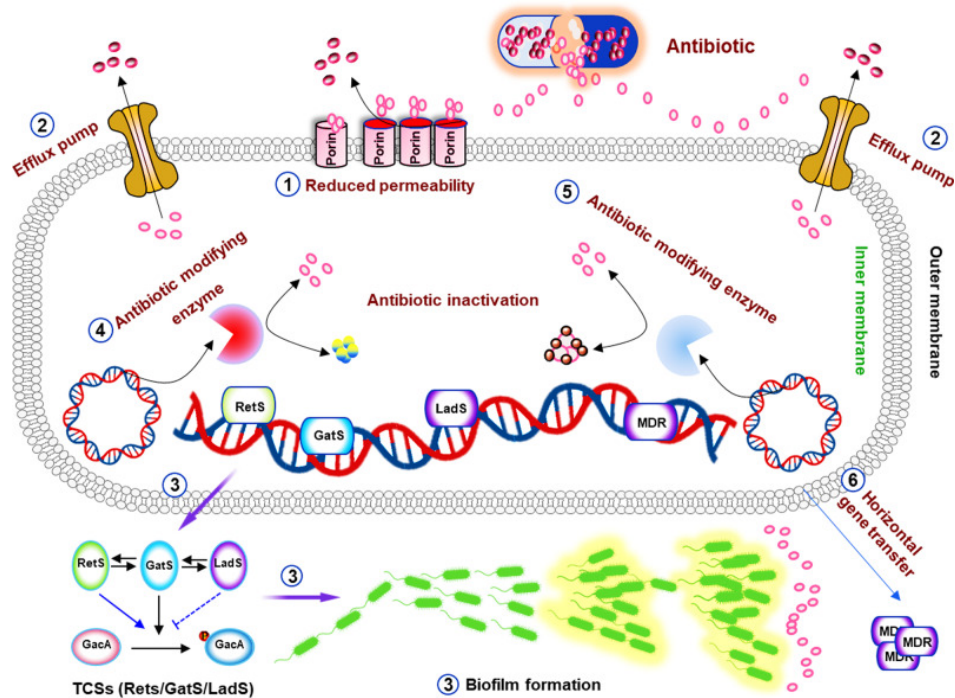
Las bacterias tienen la capacidad de sintetizar enzimas que atacan a los antibióticos y los inactivan mediante alteraciones químicas, como la adición de fracciones químicas específicas o destruyendo la molécula antibiótica (Arzanlou *et al.*, 2017). *P. aeruginosa* es capaz de producir las enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), mediante las cuales se adquiere resistencia a la penicilina, la cefalosporina y el aztreonam; así mismo tiene el poder de modificar los grupos amino y glucosídicos de los antibióticos aminoglucósidos, por medio de tres enzimas: aminoglucósido fosfotransferasa (APH) que inactiva la estreptomycin transfiriendo el grupo fosfato; aminoglucósido acetiltransferasa (AAC) que causa resistencia a la gentamicina al transferir el grupo acetilo al grupo



amino y aminoglucósido nucleótido transferasa (ANT) que inactiva a la amikacina al transferir los grupos adenosina a los grupos amino o hidroxilo de estos aminoglucósidos, se tiene registro de que son más de 50 enzimas las que participan en este tipo de mecanismo (Qin *et al.*, 2022).

### Biopelícula

La biopelícula actúan como una barrera física, afectando la actividad de los antibióticos, particularmente la biopelícula formada por bacterias Gram-negativas, es más persistente en comparación con otras biopelículas, porque sus paredes celulares contienen LPS, lo que mejora aún más la baja penetración de los antibióticos; el alginato que es uno de sus compuestos principales, se encarga de reducir la susceptibilidad a los antibióticos, y a los mecanismos de respuesta inmune (Azam & Khan, 2019). Por otra parte los exopolisacáridos Psl también participan en la protección contra los antibióticos y evita la fagocitosis y Pel por su parte, promueve la tolerancia a los antibióticos aminoglucósidos (Thi *et al.*, 2020).



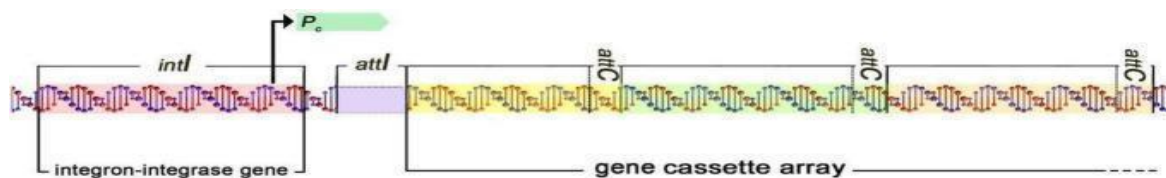
**Figura 2.** Esquema representativo de los mecanismos de resistencia (tomado de Qin *et al.*, 2022).

La existencia de estos mecanismos ha contribuido al surgimiento de cepas super resistentes, al grado de clasificarse en: multidrogo-resistentes (MDR) a  $\geq 3$  familias de antibióticos; extensodrogo-resistentes (XDR) a  $\geq 6$  familias de antibióticos; y pandrogo-resistentes (PDR) a todos los antibiótico probados (González-Olvera, *et al.*, 2019), lo cual genera un serio problema de salud al disminuir las opciones de tratamiento médico (Thi & Rehm, 2020; Haghi *et al.*, 2018). Esta resistencia a los antibióticos se encuentra codificada en genes, algunos de los cuales pueden ser

transferidos horizontalmente por conjugación mediante plásmidos, transposones e integrones (Qin *et al.*, 2022; Sabbagh *et al.*, 2021)

### Integrones

Se define a los integrones como elementos genéticos móviles, que han participado durante la evolución de las bacterias por medio de la adquisición, almacenamiento y desecho de genes de resistencia a los antibióticos, representando hasta el 17% de los cromosomas bacterianos (Osagie & Olalekan, 2019). Se conocen 3 clases distribuidas en las bacterias Gram-negativas (Clase 1, 2 y 3); siendo la clase 1 la más frecuente en las cepas de *P. aeruginosa* (Yalda *et al.*, 2021). Estos elementos se conforman por un segmento conservado 5' y 3', que se divide en 3 partes esenciales; el gen de la integrasa (*int1*, *int2* e *int3*) que codifica para la integrasa; un sitio del receptor *attI* que codifica el sitio de unión; y una secuencia promotora que consta de *P<sub>c</sub>* y *P<sub>int</sub>*, ubicada dentro del gen *int*, o entre el gen *int* y el sitio *attI*, la región de la secuencia promotora es donde se da la expresión de los genes (Figura 3). Este sistema de integrones le permite a la bacteria obtener material genético nuevo en su genoma en el sitio receptor *attI*, sin afectar los genes ya existentes (Sabbagh *et al.*, 2021; Yalda *et al.*, 2021). El número de cassettes que se han encontrado en *P. aeruginosa* alcanza la cantidad de hasta 130, el origen de estos cassettes aún es desconocido, sin embargo, por su tamaño y frecuencia se podría inferir que provienen de organismos que utilizan genes únicos o pares, para crearlos (Liu *et al.*, 2020). Estos cassettes de genes son elementos móviles que van a expresar resistencia a varios antibióticos, como los genes asociados a la resistencia a los betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptotricina, eritromicina, quinolonas, etc. (Sabbagh *et al.*, 2021). La captación de los cassettes de genes se realiza con el gen *int* entre los sitios de recombinación (*attI* y *attC*), este proceso es reversible, por lo que el integrón puede liberar los cassettes de genes en forma de DNA libre (Xu *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Esquema representativo de la estructura de un integrón (tomado de Sabbagh *et al.*, 2021).

Aunque los integrones son considerados elementos genéticos móviles, estos no se pueden mover por sí mismo, sino que lo hacen a través de otros elementos genéticos móviles. Particularmente la clase 1 se encuentra en plásmidos

transferibles, por lo que estos plásmidos transportan cassettes de genes que se pueden transferir a otros integrones o al mismo genoma bacteriano, asimismo se pueden transportar por medio de transposones, y en conjunto con secuencias de secreción e islas genéticas, representando un amplio reservorio de información para los integrones, que se comparte entre las bacterias, jugando un papel importante tanto para su adaptación como en su evolución (Sabbagh *et al.*, 2021; Ghaly *et al.*, 2020). En el caso de *P. aeruginosa*, los integrones son responsables de conferir resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol, carbapenémicos y macrólidos (Yalda *et al.*, 2021; Alekshun & Levy 2007).

### **Estatus de *Pseudomonas aeruginosa* en México**

En México, *P. aeruginosa* se coloca como el segundo patógeno oportunista más prevalente, causante de grandes costos económicos tanto para los sistemas de salud como para los pacientes (González-Olvera *et al.*, 2019). El análisis molecular asociado a la multidrogo-resistencia (MDR) y el origen clínico en cepas nosocomiales de *P. aeruginosa* ha sido muy poco estudiado en nuestro país, por lo que en este estudio se analizará la distribución de los genes que participan en la colonización; *ndvB* que codifica para la enzima glucosiltransferasa que cataliza la síntesis de glucanos cíclicos necesarios para la formación de la biopelícula (Beaudoin *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2018), y *pilA* que codifica para la pilina, molécula principal del pili tipo IV que media la formación de biopelículas y la motilidad en distintas superficies (Jurado-Martín *et al.*, 2021). También se analizará la frecuencia del gen *groEL* que codifica para una chaperona que ayuda al plegamiento y formación de la estructura cuaternaria de otras proteínas tanto *in vivo* como *in vitro* (Finnan *et al.*, 2004) y por último el gen *Int1* que codifica para integrones de clase 1 relacionados con la resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, carbapenémicos, y macrólidos (Yalda *et al.*, 2021; López-García *et al.*, 2018).

## Antecedentes

Haghi y colaboradores en Zanjan, Irán en el 2018, realizaron un estudio para detectar la susceptibilidad a los antibióticos y la distribución de genes de virulencia por medio de PCR en 93 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de infecciones por quemaduras en pacientes hospitalizados. Sus resultados arrojaron que el 100% (n=93) de las cepas fue resistente al menos a un antibiótico, siendo el más frecuente la ampicilina con un 91.4% de resistencia. El gen de virulencia más prevalente fue *toxA* con un 97.8%, seguido de *exoT* con el 20.4% y el *pilA* con el 24.7%. Estos autores también reportaron que las cepas MDR portaban al menos 5 factores de virulencia.

Kaiser y colaboradores en el 2016 aislaron 295 cepas de *P. aeruginosa* durante un período de 5 años (2009-2014) en el Hospital Universitario de Heidelberg, en Alemania. Las cepas de *P. aeruginosa* recolectadas se clasificaron en 3 grupos; extensamente drogo-resistentes (XDR) (n=211 cepas clínicas), susceptibles (n=38 cepas clínicas y ambientales), y cepas ambientales (n=47 cepas obtenidas del servicio de agua interno). La frecuencia de los genes de virulencia en las cepas fue la siguiente; *exoA* (294/295), *exoT* (294/295), *exoY* (276/295), *cif* (292/294) y *lasA* (289/295), mientras que *exoS* y *exoU* (103/ 295), en cada caso, se detectaron en menor cantidad. Finalmente las frecuencias de *nan1* y *lasB* fueron más bajas en el grupo de cepas XDR, en comparación con las cepas susceptibles y ambientales.

Park y colaboradores en el Centro Médico Boramae en Seúl, Corea, en el 2017, describieron en 47 cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infección en sangre, tracto respiratorio (grupo control) y otitis media crónica (OMC), la prevalencia del gen *groEL* fue de 100% y 100% (n=30/n=17), tanto en grupo control como en el de OMC, respectivamente; *pilA* 10% y 0% (n=3/n=0), *ndvB* 93.3% y 100%(n=28/n=17), *lasB* 100% y 100% (n=30/n=17), *rhII* 100% y 100% (n=30/n=17), y *apr* 100% y 100% (n=30/n=17), así como la relación que tienen estos con la resistencia a los antibióticos. Sus resultados arrojaron que en los pacientes con OMC la tasa positiva de *exoU* (n=2/n=12) fue significativamente más alta que en el grupo control, y está relacionado a la resistencia que presenta contra ciprofloxacino y tobramicina, lo que podría explicar la cronicidad y la dificultad en el manejo del tratamiento médico de estos pacientes.

Yalda y colaboradores en Shiraz, Irán en el 2021, evaluaron en su estudio la prevalencia de las 3 clases de integrones relacionados con la resistencia a carbapenémicos y pruebas de sensibilidad a los antibióticos en 75 cepas de *P. aeruginosa* recolectadas del Hospital Nemazee. El 64% (n=48) de las cepas fue

portadora del integrón clase 1, el 20% del integrón clase 2 y no se encontraron integrones clase 3. Respecto al fenotipo de resistencia a carbapenémicos, el 42.7% fue resistente a imipenem y el 29.3% a meropenem.

## Objetivos

Objetivo general:

Determinar la distribución de los genes de la chaperona *groEI*, el integrón de clase 1 y los genes de adhesión en cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Objetivos particulares:

- Establecer la frecuencia del gen de la chaperona *groEL* en las cepas.
- Identificar en las cepas la prevalencia del gen *int1* que codifica para integrones de clase 1.
- Determinar la distribución de los genes de adhesión *ndvB* y *pilA* en las cepas.
- Determinar en las cepas el resistograma a doce antibióticos por el método de Kirby-Bauer.

## Material y Métodos

### *Origen de las cepas*

Se analizó un grupo de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con diferentes infecciones (neumonía, bacteriemia, infecciones de vías respiratorias altas, del tracto urinario, catéter y heridas quirúrgicas) del Hospital General Regional (HGR) no. 72 (IMSS) ubicado en la zona norte del Edo. de México (Tlalnepantla de Baz). Las cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de los pacientes se sembraron para su purificación en Agar Cetrimida (MCD Lab., México), y se incubaron por 24 horas a 37°C.

### *Resistencia a los antibióticos en las cepas*

Para determinar la resistencia o susceptibilidad a los antibióticos se utilizó el método de Kirby-Bauer, para lo cual se tomaron 6 colonias de cada una de las cepas crecidas en el agar cetrimida por medio de un hisopo estéril y se realizó un sembrado masivo sobre la totalidad del Agar Müeller-Hinton (MCD Lab., México). Posteriormente se colocó un sensidisco para bacterias Gramnegativas que contiene los doce antibióticos a probar: ampicilina (AM), carbenicilina (CB), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ciprofloxacina (CPF), cloranfenicol (CL), nitrofurantoína (NF), amikacina (AK), gentamicina (GE), netilmicina (NET), norfloxacina (NOF), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), y se incubó a 37°C por 24 horas. Al término se leyó la respuesta del antibiograma midiendo los halos de inhibición para determinar sensibilidad y/o resistencia con base en las instrucciones del fabricante (MULTIBAC I.D., México; Tabla 2).

**Tabla 2.** Comparación de halos de inhibición para determinar resistencia/sensibilidad a los antibióticos.

Antibiótico	Concentración (mcg)	Resistente (Halo ≤ en mm)	Sensible (Halo ≥ en mm)	Antibiótico	Concentración (mcg)	Resistente (Halo ≤ en mm)	Sensible (Halo ≥ en mm)
AM	10			NF	300	14	17
CB	100			AK	30	14	17
CF	30	14	18	GE	10	12	15
CFX	30	14	23	NET	30	12	15
CPF	5	15	21	CL	30	12	18
NOF	10	12	17	SXT	25	10	16

### *Extracción de DNA*

A partir del crecimiento bacteriano de cada una de las cepas en Agar Cetrimida se tomaron varias colonias y se depositaron en diferentes tubos de rosca de 16x150 mm, estériles, que contenían 2 mL de agua desionizada estéril, y se suspendieron las bacterias por agitación en un Vórtex durante 20 segundos. En seguida los tubos se llevaron a ebullición (100°C) durante 20 minutos, y posteriormente se enfriaron en hielo (0°C) durante 10 minutos. El sobrenadante fue separado en tubos eppendorf nuevos y estériles por centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contiene el DNA se separó y se depositó en tubos eppendorf etiquetados, y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

### *Identificación de las cepas*

La especie de *P. aeruginosa* fue identificada por PCR de punto final mediante la amplificación del gen 16rRNA (Kaszab *et al.*, 2011). El volumen final por mezcla de reacción fue de 15 µL: 6 µL de Master Mix RED (AMPLIQON), 4 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL del primer forward, 1 µL de primer reverse (la concentración de los primers fue de 10 pmol/µL; Tabla 2) y 3 µL del DNA molde. La cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se utilizó como control positivo. El control negativo contenía todos los componentes de la mezcla de reacción excepto DNA, en su lugar se añadieron 3 µL de agua libre de nucleasas.

### *Identificación de los genes de virulencia y del integrón clase 1 en las cepas*

La identificación de los genes que codifican para chaperona (*groEL*), el integrón clase I (*int1*) y las adhesinas (*pilA* y *ndvB*) en las cepas, se realizó por PCR de punto final. El volumen final por mezcla de reacción fue de 15 µL: 6 µL de Master Mix RED (AMPLIQON), 4 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL del primer forward, 1 µL de primer reverse (la concentración de los primers era 10 pmol/µL) y 3 µL del DNA molde. En el caso de los controles se prepararon del mismo modo solo que para el positivo se utiliza el DNA molde de una cepa con el gen de interés, y para el negativo no se utilizó DNA, en su lugar se añadieron 3 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación se observan en la Tabla 3:



**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados y sus condiciones para la PCR.

Gen	Secuencia 5'-3'	Condiciones PCR	Tamaño amplicón (pb)	Referencia
<i>16S rRNA</i>	F-GGGGGATCTTCGGACCTCA R-CCTTAGAGTGCCACCCG	Desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 25 s, primer alineamiento a 58°C durante 40 s, extensión a 72°C durante 40 s y una última extensión de 72°C por 60 s.	956	Kaszab <i>et al.</i> , 2011
<i>pilA</i>	F-AGCTCAAAAAGGCTTTACCTTGAT R-ACTTGGTCACGCACATACGTAATA	Desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 s, primer alineamiento a 57°C durante 60 s, extensión a 72°C durante 60 s y una última extensión 72°C por 30 s.	315	Park <i>et al.</i> , 2017; Ullah <i>et al.</i> , 2017
<i>ndvB</i>	F-GAAGGCTACAGCTACTTCGTCATC R-CTGTA CTGCTGGCTGTAGTCGTAG		317	Park <i>et al.</i> , 2017; Ullah <i>et al.</i> , 2017
<i>groEL</i>	F-AGCCAT GGA AAA AGT CGG TAA AG R-CGGATGTTGGAGATCTTCTTGT	Desnaturalización inicial a 96 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, primer alineamiento a 62°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 1.5 min y una última extensión 72°C por 5 min.	200	Finnan <i>et al.</i> , 2004; Park <i>et al.</i> , 2017.

int1	<p>F-GGTCAAGGATCTGGATTTTCG</p> <p>R-ACATGCGTGTAATCATCGTC</p>	<p>Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 60 s, primer alineamiento a 57°C durante 60 s, extensión a 72°C por 2 min y una última extensión a 72°C por 10 min.</p>	483	Yalda <i>et al.</i> , 2021
------	--	--	-----	----------------------------

### *Electroforesis*

Se preparó una solución stock concentrada 10X de Tris-borato (TBE) con 108 g de Tris base, 40 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0), 55 g de ácido bórico y esta se aforó a 1 L con agua destilada. A partir de esta solución se realizó una dilución 1:100, para obtener TBE con concentración 1X. Para el gel de agarosa, se utilizó una solución de agarosa al 2% (2 g de agarosa en 100 mL de TBE 1X), se mezcló y calentó hasta quedar homogénea con una apariencia transparente, posteriormente se le agregaron 4 µL del fluoróforo de DNA Midori Green Advance (Nippon Genetics) y se mezcló hasta que se incorporó en la agarosa. La agarosa fue vertida en un contenedor de la cámara de electroforesis que posee un par de peines para la formación de los pozos, una vez que está completamente gelificada la agarosa se retiraron estos peines y se agregó el buffer TBE 1X, cubriendo todo el gel. A cada pozo se le depositó un volumen de 5 µL de los amplicones obtenidos en la PCR, incluyendo los controles (positivo y negativo) y en el caso del marcador de peso molecular solo se depositó el volumen de 3 µL. Las cámaras de electroforesis se conectaron a las fuentes de poder bajo las condiciones de 120 volts, 94 mA, durante 40 minutos para su corrida. Los geles de agarosa fueron visualizados utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y posteriormente fotografiados con el sistema de fotodocumentación G Logic 100 (Kodak).

### *Análisis estadísticos*

Se realizó la prueba de Chi-cuadrada para ver si existían diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la presencia del integrón de clase 1 con relación al fenotipo de resistencia a los antibióticos.

## Resultados

### Pacientes y diagnósticos

En total se analizaron 100 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes del Hospital Regional No. 72. La distribución de acuerdo al género arrojó el mismo valor porcentual tanto para hombres como para mujeres con 47% (n= 47; Figura 4). Respecto a la distribución por edad, el grupo más frecuente se encontró en el rango de 51 a 60 años (23%) (Figura 5). El diagnóstico clínico con mayor frecuencia entre los pacientes fue la infección de vías urinarias (IVU) con 16% (n=16/100), seguido de sepsis con 10% (n=10/100) y neumonía con 7% (n=7/100) (Figura 6).

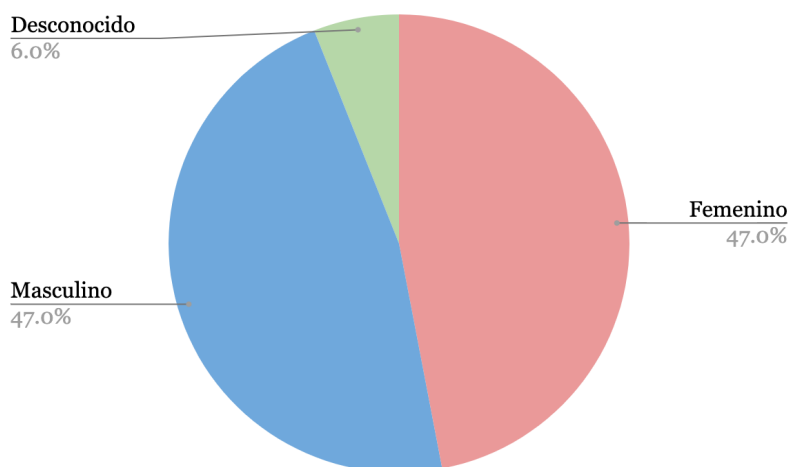


Figura 4. Distribución de los pacientes de acuerdo al sexo.

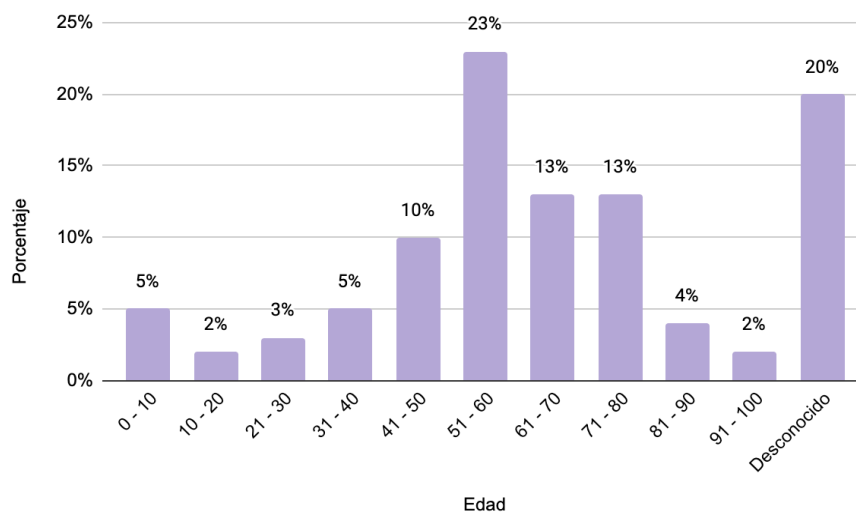
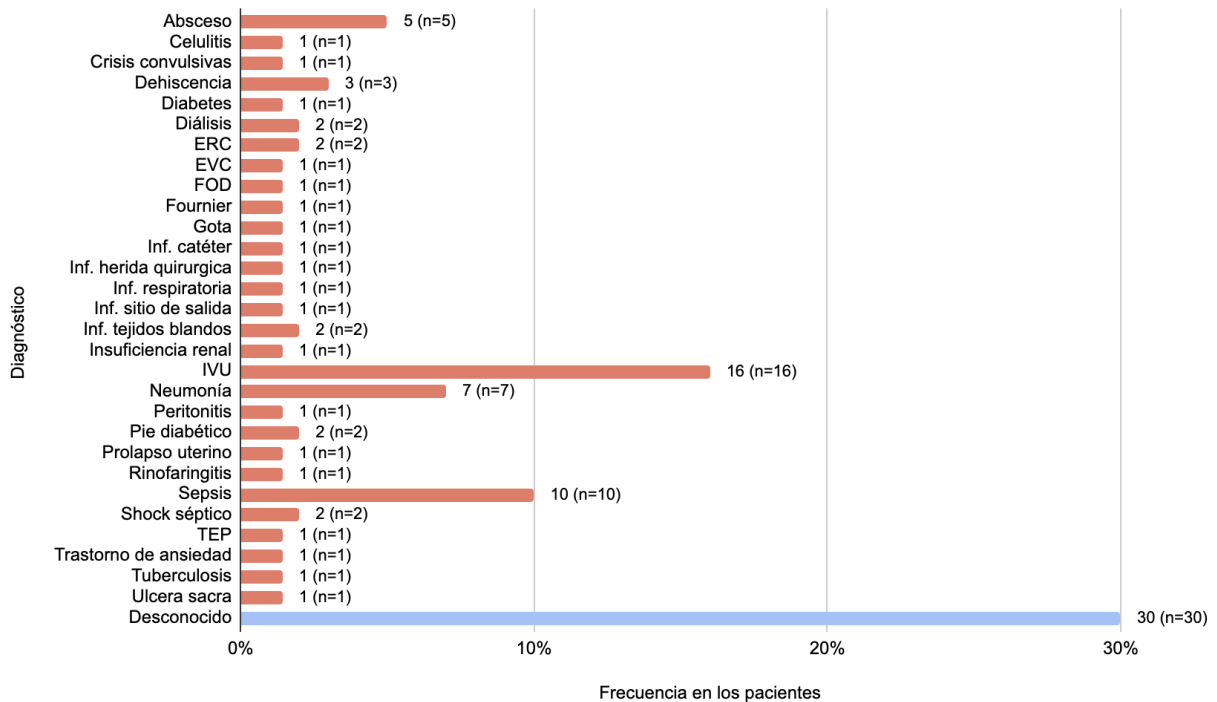


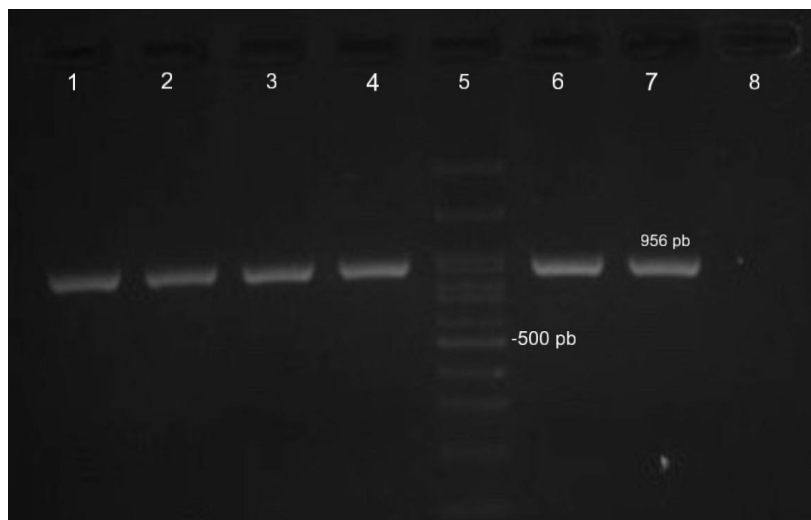
Figura 5. Distribución porcentual de los pacientes de acuerdo a su edad.



**Figura 6. Distribución porcentual de los pacientes de acuerdo a su diagnóstico.** Los pacientes fueron reportados con los siguientes diagnósticos: Absceso, celulitis, crisis convulsivas, dehiscencia, desconocido, diabetes, diálisis, enfermedad renal crónica “ERC”, enfermedad vascular cerebral “EVC”, fiebre de origen desconocido “FOD”, Fournier, gota, infección catéter, infección respiratoria, infección sitio de salida, infección tejidos blandos, insuficiencia renal, infección vías urinarias “IVU”, neumonía, peritonitis, pie diabético, rinofaringitis, sepsis, shock séptico, tromboembolismo pulmonar “TEP”, trastorno de ansiedad, tuberculosis y úlcera sacra.

### Identificación de *P. aeruginosa*

El 100% (n=100) de las cepas estudiadas correspondió a la especie de *P. aeruginosa* (Figura 7).



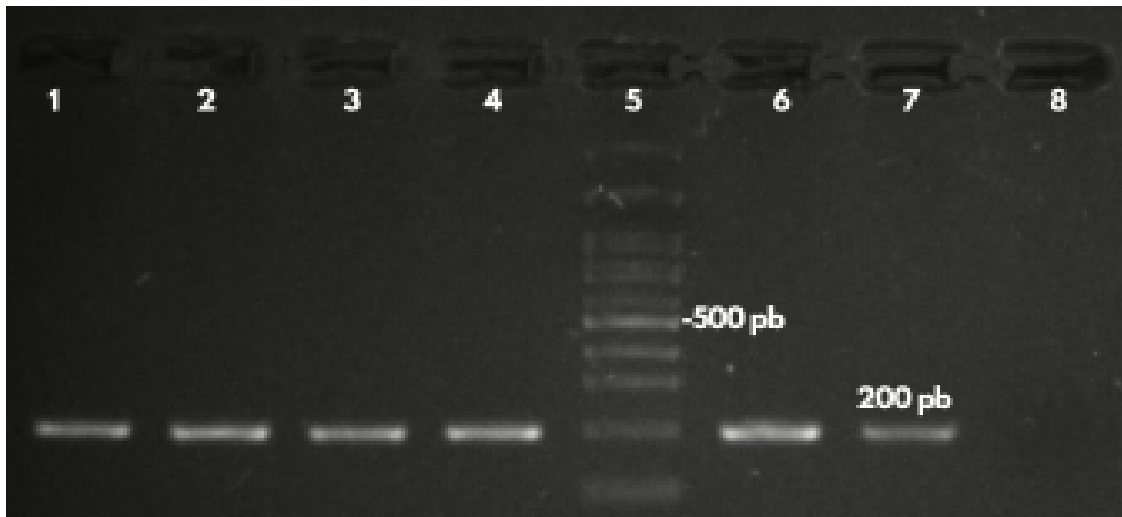
**Figura 7. Detección de 16S rRNA (956 pb) por PCR en las cepas de *P. aeruginosa*.** Carriles 1- 4 y 6: cepas positivas, carril 5: MWM (100-1500 pb), carril 7: control positivo (ATCC 27853), carril 8: control negativo (sin DNA molde).

### Detección de genes de virulencia

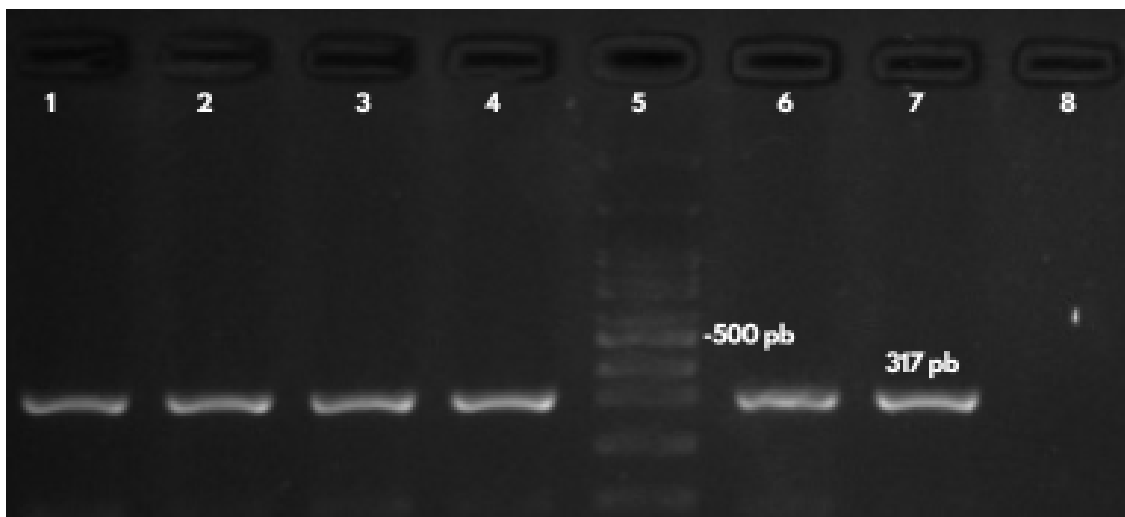
Todas las cepas fueron portadoras del gen *groEL* (Figura 7), por su parte los genes de adhesión *ndvB* (Figura 9) y *pilA* (Figura 10), así como el gen *int1* (Figura 11) fueron detectados en altos porcentajes en las cepas (Tabla 4). El 90% (n=90) de las cepas fue portadora de los 4 genes.

**Tabla 4.** Frecuencia de los genes de virulencia y resistencia a los antibióticos.

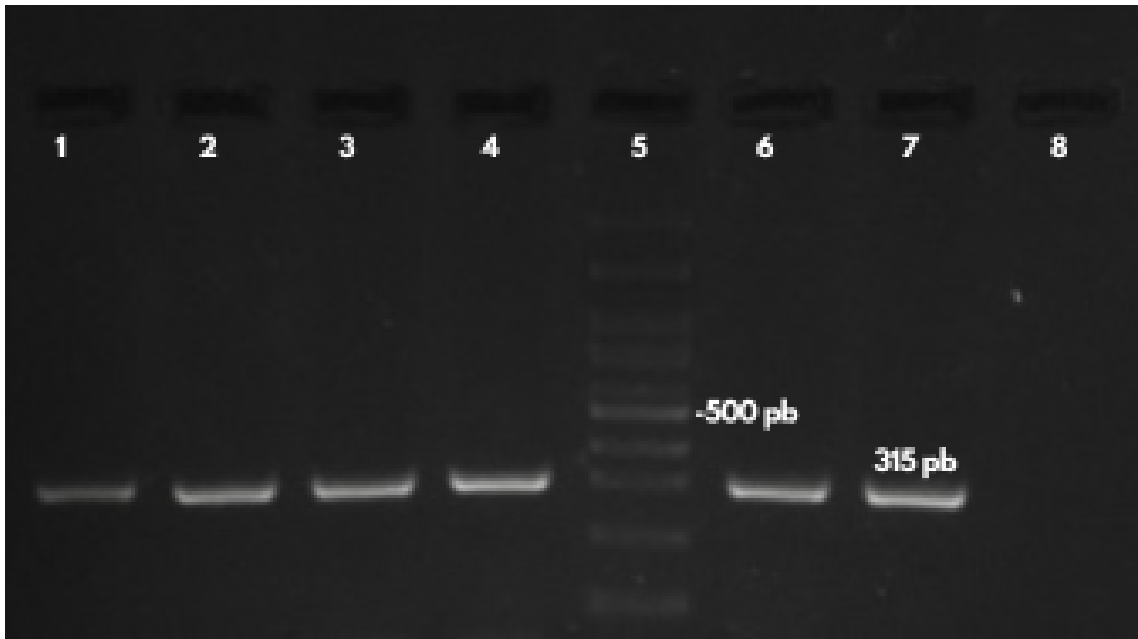
Función	Gen	Porcentaje (Número)
Adhesión	<i>ndvB</i>	98 (n=98)
	<i>pilA</i>	97 (n=97)
Chaperona	<i>groEL</i>	100 (n=100)
Integrón	<i>int1</i>	95 (n=95)



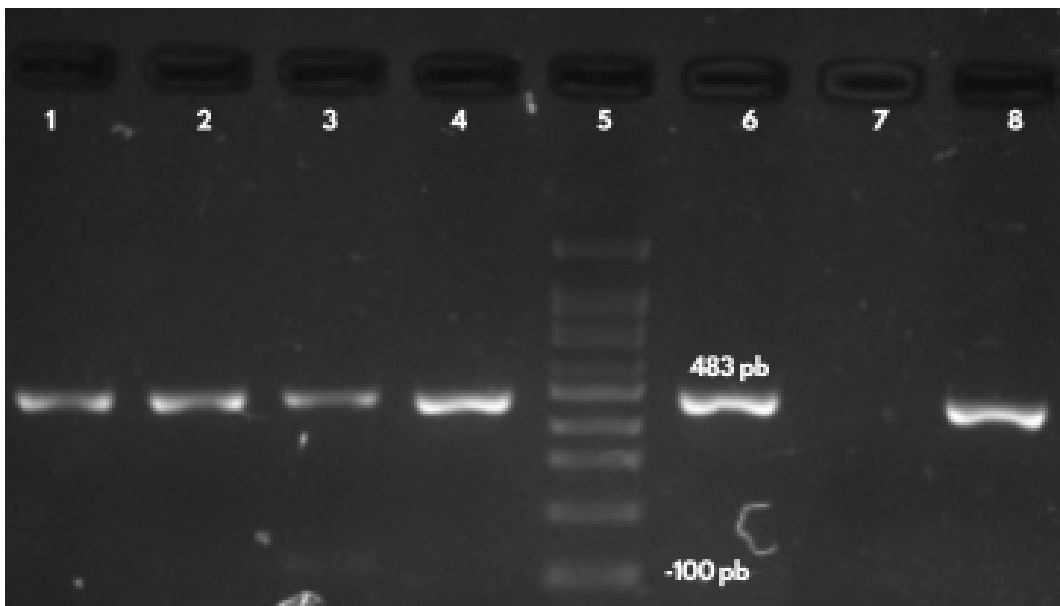
**Figura 8. Detección de *groEL* (200 pb) por PCR de punto final en las cepas de *P. aeruginosa*.** Carriles 1- 4 y 6: cepas positivas, carril 5: MWM (100-1500 pb), carril 7: control positivo (cepa del cepario del laboratorio), carril 8: control negativo (sin DNA molde).



**Figura 9. Detección de *ndvB* (317 pb) por PCR en las cepas de *P. aeruginosa*.** Carriles 1- 4 y 6: cepas positivas, carril 5: MWM (100-1500 pb), carril 7: control positivo (cepa del cepario del laboratorio), carril 8: control negativo (sin DNA molde).



**Figura 10. Detección de *pilA* (315 pb) por PCR en las cepas de *P. aeruginosa*.** Carriles 1-4 y 6: cepas positivas, carril 5: MWM (100-1500 pb), carril 7: control negativo (sin DNA molde), carril 8: control positivo (cepa del cepario del laboratorio).



**Figura 11. Detección de *int1* (483 pb) por PCR en las cepas de *P. aeruginosa*.** Carriles 1-4 y 6: cepas positivas, carril 5: MWM (100-1500 pb), carril 7: control negativo (sin DNA molde), carril 8: control positivo (cepa del cepario del laboratorio).

*Distribución de los genes de virulencia y del integrón de clase 1 en las cepas según el diagnóstico clínico*

En su mayoría los 4 genes se encontraron presentes en las cepas asociadas a los distintos diagnósticos de los pacientes estudiados, a excepción de las IVU, donde solo el 87.5% (n=14) presentó los genes *int1* y *ndvB*; en diálisis el 50% (n=1) de las cepas presentó *pilA*; en neumonía el 85.8% (n=6) de las cepas acarreó *int1*; en sepsis el 90% (n=9) presentó *int1*, y el gen *pilA* no se detectó en ninguna de las cepas relacionadas a TEP (Tabla 5).

**Tabla 5. Frecuencia de los genes de virulencia en las cepas asociada a los distintos diagnósticos.**

<b>Diagnóstico (n=total)</b>	<b><i>ndvB</i> No. (%)</b>	<b><i>pilA</i> No. (%)</b>	<b><i>groEL</i> No. (%)</b>	<b><i>int1</i> No. (%)</b>
Absceso (n=5)	100	100	100	100
Celulitis (n=1)	100	100	100	100
Crisis convulsivas (n=1)	100	100	100	100
Dehiscencia (n=3)	100	100	100	100
Diabetes (n=1)	100	100	100	100
Diálisis (n=2)	100	50 (n=1)	100	100
ERC (n=2)	100	100	100	100
EVC (n=1)	100	100	100	100
FOD (n=1)	100	100	100	100
Fournier (n=1)	100	100	100	100
Gota (n=1)	100	100	100	100
Inf. catéter (n=1)	100	100	100	100
Inf. herida quirúrgica (n=1)	100	100	100	100



Inf. respiratoria (n=1)	100	100	100	100
Inf. sitio de salida (n=1)	100	100	100	100
Inf. tejidos blandos (n=2)	100	100	100	100
Insuficiencia renal (n=1)	100	100	100	100
IVU (n=16)	87.5 (n=14)	100	100	87.5 (n=14)
Neumonía (n=7)	100	100	100	85.8 (n=6)
Peritonitis (n=1)	100	100	100	100
Pie diabético (n=2)	100	100	100	100
Prolapso uterino (n=1)	100	100	100	100
Rinofaringitis (n=1)	100	100	100	100
Sepsis (n=10)	100	100	100	90 (n=9)
Shock séptico (n=2)	100	100	100	100
TEP (n=1)	100	0 (n=1)	100	100
Trastorno de ansiedad (n=1)	100	100	100	100
Tuberculosis (n=1)	100	100	100	100
Úlcera sacra (n=1)	100	100	100	100
Desconocido (n=30)	100	96.7 (n=29)	100	96.7 (n=29)

## Resistograma

Todas las cepas (n=100) fueron resistentes al menos a un antibiótico, utilizando el criterio de González-Olvera, *et al.*, (2019), donde se considera multidrogo-resistentes a cepas con resistencia a  $\geq 3$  categorías de antibióticos (MDR); resistencia extendida a  $\geq 6$  categorías de antibióticos (XDR); y pandrogo-resistencia cuando son resistentes a todos los antibióticos probados (PDR), en este trabajo obtuvimos cepas MDR y XDR, de las 6 familias de antibióticos probados (Tabla 6). El 54% (n=54) fue MDR y el 37% (n=37) fue XDR, el resto fue sensible al menos un antibiótico de 4 de las 6 categorías. La mayoría de los antibióticos presentó una respuesta poco eficaz contra el crecimiento bacteriano, siendo la familia de los aminoglucósidos la que mayor efecto tuvo; gentamicina (GE) y amikacina (AK), seguida de la familia de las quinolonas, ciprofloxacina (CPF) y norfloxacino (NOF) que también obtuvieron altos porcentajes de cepas que fueron sensibles ante estos antibióticos. Por el contrario la familia de los betalactámicos tuvieron de los menores porcentajes de cepas sensibles; ampicilina (AM), carbenicilina (CB) y cefalosporina (CF) (Tabla 6).

En cuanto a la presencia/ausencia del gen *int1* y su participación en la resistencia a los antibióticos, solo se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de ampicilina (AM), carbenicilina (CB), y ciprofloxacina (CPF) (Tabla 7)

**Tabla 6. Porcentaje de resistencia a los antibióticos.**

Familia	Antibióticos	Resistencia %	Familia	Antibióticos	Resistencia %
Betalactámicos	AM	97	Nitroderivados	NF	96
	CB	98		AK	53
	CF	97		GE	50
	CFX	89		NET	86
Quinolonas	CPF	51	Anfenicoles	CL	91
	NOF	53	Sulfonamidas	SXT	96

Ampicilina (AM), carbenicilina (CB), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ciprofloxacina (CPF), norfloxacina (NOF), nitrofurantoina (NF), amikacina (AK), gentamicina (GE), netilmicina (NET), cloranfenicol (CL), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT).

**Tabla 7. Comparación de cepas resistentes, según la presencia/ausencia del gen Int1.**

Familia	Antibióticos	Presente Int1%	Ausente Int1%	Cepas resistentes%	Valor de P (P<0.05)
<b>Betalactámicos</b>	AM	93	4	97	<b>0.02*</b>
	CB	94	4	98	<b>0.003*</b>
	CF	92	5	97	0.69
	CFX	85	4	89	0.51
<b>Quinolones</b>	CPF	51	0	51	<b>0.02*</b>
	NOF	51	2	53	0.55
<b>Nitroderivados</b>	NF	92	4	96	0.06
<b>Aminoglucósidos</b>	AK	51	2	53	0.55
	GE	49	1	50	0.16
	NET	82	4	86	0.69
<b>Afenicoles</b>	CL	87	4	91	0.38
<b>Sulfonamidas</b>	SXT	92	4	96	0.06

Ampicilina (AM), carbenicilina (CB), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ciprofloxacina (CPF), norfloxacina (NOF), nitrofurantoina (NF), amikacina (AK), gentamicina (GE), netilmicina (NET), cloranfenicol (CL), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT).

Nota: \*Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

## Discusión

### *Pacientes estudiados*

Se analizaron 100 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con procesos infecciosos hospitalarios (Figura 6), donde el 47% (n=47) fueron mujeres y 47% (n=47) hombres (Figura 4). Estos porcentajes contrastan con lo descrito por Gonçalves *et al.*, (2017) donde el 66.8% (n=105) de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con distintas infecciones provenían de hombres, por el contrario Khosravi *et al.*, (2016) reportó que el 54.5% (n=82) de los pacientes infectados fueron mujeres. Estas diferencias de porcentajes pueden deberse a que en este estudio no se logró identificar el sexo en el 6% (n=6) de los pacientes estudiados, además del diferente tamaño de la muestra. Hasta ahora no se ha reportado que el sexo sea un factor de riesgo para contraer infección por *P. aeruginosa*. El rango de edad más frecuente entre los pacientes infectados fue el de 51-60 años (Figura 5), que coincide con lo reportado por Gonçalves *et al.*, (2017). El hecho de que la mayoría de los pacientes (n=55) hayan presentado una edad comprendida en el intervalo de edad de 51-100 años, puede deberse a que durante esa etapa de la vida, es más recurrente que exista comorbilidad como; diabetes, insuficiencia renal, hipertensión, etc, lo cual coadyuvó al incremento de las infecciones en este grupo de pacientes.

*P. aeruginosa* es uno de las principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales en México, en nuestro estudio los 3 principales diagnósticos fueron, IVU con 16% (n=16), sepsis con 10% (n=10) y las infecciones del tracto respiratorio (neumonía, infección respiratoria y rinofaringitis) con 9% (n=9; Figura 6), caso parecido a lo reportado por López-García *et al.*, (2018) que obtuvo IVU con 46.2% (n=18), seguido de las infecciones del tracto respiratorio con 30.8% (n=12), y sepsis con 10.2% (n=4). La patogenidad de *P. aeruginosa* está asociada a los diferentes factores de virulencia que posee, lo cual sumado a su multidrogo-resistencia, incrementa la mortalidad de los pacientes infectados, principalmente los inmunocomprometidos. El análisis molecular del genotipo de virulencia relacionado con el fenotipo de resistencia a los antibióticos en cepas hospitalarias de *P. aeruginosa* en México ha sido muy poco estudiado, por lo que en este estudio se analizó la frecuencia de genes de virulencia (adhesión y chaperona) asociados al Integrón de clase 1 (*int1*).

### *Factores de virulencia*

El gen *groEL* fue detectado en el 100% (n=100; Tabla 4) de las cepas hospitalarias de *P. aeruginosa*, porcentaje que coincide con lo descrito por Park *et al.*, (2017), donde la frecuencia de *groEL* fue del 100% (n=17/n=30) en el grupo de cepas provenientes de otitis crónica media (OMC) y en el de cepas provenientes de infecciones diferentes a OMC por *P. aeruginosa*, respectivamente. También coincide con lo descrito por Finnan *et al.*, (2004) en un estudio de genética evolutiva en cepas clínicas y ambientales de *P. aeruginosa*, donde el 100% (n=17) de las cepas fue portadora de *groEL*. Estos autores concluyeron que *groEL* es un gen conservado que cumple funciones básicas, está presente en todas las cepas y no está bajo presión selectiva, lo que lo convierte en un indicador confiable para establecer relaciones genéticas. La presencia de *groEL* está asociado a la expresión de la proteína GroEL, cuya función es esencial dentro de un sistema de chaperonas conocido como GroEL/ES, el cual se encarga de que exista un correcto plegamiento de las proteínas (Ambrose *et al.*, 2015), por ende su presencia en las cepas aisladas de *P. aeruginosa* sugiere que este sistema, promueve la supervivencia de la bacteria al permitirle un correcto plegamiento tanto a los polipéptidos recién sintetizados como a las proteínas ya existentes que se desnaturalizan por estrés (Sivinski *et al.*, 2021), incrementando la cronicidad de las infecciones y la virulencia. Por otra parte, se ha mencionado a la proteína GroEL como un objeto blanco, al activar la respuesta inmune innata, induciendo la expresión de la proteína pentraxina-3 (PTX3; Persyn *et al.*, 2019), y como parte primordial del sistema GroEL/ES para el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antibacteriana (Sivinski *et al.*, 2021).

El gen *pilA* se detectó en el 97% (n=97; Tabla 4) de las cepas y en la mayoría de los diagnósticos, excepto el de diálisis y tromboembolismo pulmonar (TEP) (Tabla 5). La frecuencia observada de *pilA* en las cepas en este trabajo es muy superior a lo reportado por Park *et al.*, (2017), donde *pilA* no se detectó en el grupo de cepas de *P. aeruginosa* provenientes de otitis crónica media (OMC), pero sí lo detectaron en el 10% (n=3) de las cepas provenientes de infecciones diferentes a OMC por *P. aeruginosa*. Por el contrario, Bogiel *et al.*, (2021) reportaron que el 15.9% (n=17) de las cepas estudiadas fue portadora de *pilA*, mientras que Haghi *et al.*, (2018) describieron la presencia de *pilA* en el 24.7% (n= 23) de las cepas aisladas de infecciones por quemaduras. En este trabajo, la presencia elevada de *pilA* en las cepas, estaría demostrando la capacidad de *P. aeruginosa* para causar infecciones agudas o crónicas (IVU, heridas, septicemias, etc.), debido a que la proteína PilA forma parte de una estructura retráctil ubicada en la superficie de la bacteria, conocida como pili tipo IV, esta estructura favorece la capacidad de adhesión a distintas superficies, ya sea directo en alguna herida expuesta o en los

dispositivos médicos (catéteres, humidificadores, etc.), asimismo está involucrada en la formación de la biopelícula (Coggan *et al.*, 2022), lo que aumenta la evasión de la respuesta inmune del hospedero y la resistencia contra los antimicrobianos.

El gen *ndvB* se detectó en el 98% (n=98; Tabla 4) de las cepas, lo cual sí coincide con lo reportado por Park *et al.*, (2017) que detectó el gen en el 93.3% (n=28) de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con otitis media crónica (OMC) y en el 100% (n=17) de sus cepas provenientes de infecciones diferentes a OMC por *P. aeruginosa*. El hecho de que el gen *ndvB* esté presente en la mayoría de las cepas analizadas, podría implicar también el aumento de la cronicidad, colonización y resistencia a los antibióticos en procesos infecciosos por *P. aeruginosa*, ya que se ha estudiado que al codificar para la enzima glucosiltransferasa, cuya función es participar en la síntesis de glucanos cíclicos, va a facilitar la formación de la biopelícula por medio de estos (Hall *et al.*, 2018). Existen estudios que han reportado que los glucanos cíclicos, atrapan e impiden la actividad de algunos antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (Sadovskaya *et al.*, 2010 y Mah *et al.*, 2003).

#### *Integrón de clase 1*

En este trabajo el gen *int1*, se detectó en el 95% (n=95; Tabla 4) de las cepas, y estuvo presente en la mayoría de los diagnósticos clínicos excepto en; IVU con 87.5% (n=14), neumonía con 85.8% (n=6), y sepsis con 90% (n=9; Tabla 5). Este porcentaje es similar a lo reportado por López-García *et al.*, (2018), donde la frecuencia de *int1* fue del 100% (n=59) y también coincide con lo reportado por Zarei-Yazdeli *et al.*, (2018) donde el 82.6% (n=119) de las cepas de *P. aeruginosa* portó el gen *int1*. La elevada frecuencia del gen *int1*, evidencia un serio problema para el tratamiento médico de los pacientes infectados, debido a que el integrón de clase 1, acarrea diferentes genes de resistencia a los antibióticos, y puede propagarse, por medio de plásmidos o transposones, en bacterias de la misma especie o interespecie (Sabbagh *et al.*, 2021). Estos genes de resistencia presentes en el integrón de clase 1 abarcan ampliamente distintas familias de antibióticos, como los betalactámicos, aminoglucósidos, anfenicoles, macrólidos y sulfonamidas (Sabbagh *et al.*, 2021; Yalda *et al.*, 2021). En este trabajo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el fenotipo de resistencia de los antibióticos betalactámicos (AM y CB) y uno de las quinolonas (CPF), con respecto a la presencia del gen *int1*, lo que hace suponer probablemente la presencia de estos genes de resistencia dentro del integrón de clase 1.

No obstante, la elevada frecuencia del gen *int1* detectada en este trabajo, es superior a la descrita por Yalda *et al.*, (2021), quienes lo identificaron en el 64% de las cepas (n=48), y también es superior a lo reportado por por Ahmadian *et al.*, (2020), que fue del 42% (n=42) en las cepas estudiadas. En otros estudios realizados en Asia, como China, Malasia y Tailandia o Nigeria en África, se han descrito porcentajes de detección de *int1* >50% (Heidarzadeh *et al.*, 2020), por ejemplo, Liu *et al.*, (2020) detectaron el gen en el 12.4% (n=14) de las cepas estudiadas. Estos hallazgos nos hablan de una marcada diferencia entre la presencia o ausencia del integrón de clase I en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes de diferentes ubicaciones geográficas, por lo que es importante realizar estudios sobre la distribución de los integrones y su implicación en la multiresistencia a los antibióticos en las cepas de *P. aeruginosa*.

#### *Fenotipo de resistencia a los antibióticos*

Son alarmantes los datos obtenidos a partir del resistograma en las cepas, donde se mostraron elevados porcentajes de resistencia a los grupos de antibióticos, betalactámicos (89-97%), nitroderivado (96%), aminoglucósido (50-86%), anfenicoles (91%) y sulfonamidas (96%; Tabla 6). Estos resultados evidenciaron la multidrogo-resistencia (MDR; 54/100) y extensodrogo-resistencia (XDR; 37/100) en las cepas causantes de las infecciones de los pacientes estudiados, lo cual coincide con la descrito previamente en México (Camacho-Silvas *et al.* 2021). Sin embargo, también al comparar los resultados de este trabajo, con anteriores investigaciones realizadas en el país, encontramos un claro incremento de cepas altamente resistentes, por ejemplo; González-Olvera *et al.*, (2019) reportó el 28.2% (n=26) de cepas de *P. aeruginosa* MDR y 22.7% (n=21) XDR, mientras López-García *et al.*, (2019) describió el 69.5% (n=41) de cepas MDR, y en otros países los porcentajes de MDR van del 41-60% (Ahmadian *et al.*, 2020; Zarei-Yazdali *et al.*, 2018). Los porcentajes tan altos de cepas MDR y XDR obtenidos en este trabajo, podrían explicarse por la elevada frecuencia de los genes de virulencia y resistencia a los antibióticos presentes de manera intrínseca y/o adquiridos, incluyendo el integrón de clase 1, que han sido descritos en *P. aeruginosa* (Qin *et al.*, 2022; Jurado-Martín *et al.*, 2021; Sabbagh *et al.*, 2021). Es por ello que los estudios sobre la multidrogo-resistencia son de prioridad, se prevé que para el año 2050 las muertes causadas por bacterias multidrogo-resistentes alcanzarán la cifra de 10 millones al año (O'Neill, 2014).

En este estudio los antibióticos más eficaces para contrarrestar las infecciones causadas por *P. aeruginosa* fueron los aminoglucósidos, particularmente amikacina y gentamicina (Tabla 6), hecho que coincide con lo descrito por González-Olvera *et al.*, (2019).

## Conclusiones

- Las cepas de *P. aeruginosa* presentaron elevada resistencia a los antibióticos betalactámicos (ampicilina, carbenicilina, y cefalotina) y fueron más sensibles a los aminoglucósidos (amikacina y gentamicina).
- El diagnóstico con mayor frecuencia entre los pacientes estudiados fueron las infecciones de vías urinarias.
- Se identificó una elevada distribución de los genes de adhesión *ndvB* y *pilA*, del gen *groEL* de la chaperona y del gen *int1* del integrón de clase 1 en las cepas.
- Es importante establecer programas de detección de los genes de virulencia y de la resistencia a los antibióticos en las cepas hospitalarias de *P. aeruginosa*.



## Referencias

1. Ahmadian, L., Haghshenas, M. R., Mirzaei, B., Norouzi Bazgir, Z., & Goli, H. R. (2020). Distribution and Molecular Characterization of Resistance Gene Cassettes Containing Class 1 Integrons in Multi-Drug Resistant (MDR) Clinical Isolates of
2. Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128 (6), 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
3. Ambrose, A., Fenton, W., Mason, D. J., Chapman, E., & Horwich, A. L. (2015). Unfolded DapA forms aggregates when diluted into free solution, confounding comparison with folding by the GroEL/GroES chaperonin system. *FEBS letters*, 589 (4), 497–499. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.01.008>
4. Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in biochemistry*, 61(1), 49–59. <https://doi.org/10.1042/EBC20160063>
5. Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug discovery today*, 24(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
6. Beaudoin, T., Zhang, L., Hinz, A. J., Parr, C. J., & Mah, T. F. (2012). The biofilm-specific antibiotic resistance gene ndvB is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology*, 194(12), 3128–3136. <https://doi.org/10.1128/JB.06178-11>
7. Bogiel, T., Depka, D., Rzepka, M., Kwiecińska-Piróg, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Prevalence of the Genes Associated with Biofilm and Toxins Synthesis amongst the *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(3), 241. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030241>
8. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
9. Camacho-Silvas, L. A., Portillo-Gallo, J. H., Rivera-Cisneros, A. E., Sánchez-González, J. M., Franco-Santillán, R., Duque-Rodríguez, J., Velo-Méndez, G., & Ishida-Gutiérrez, C. (2021). Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México. Multidrug, extended and pan-resistance to antimicrobials at the North of México. *Cirugía y cirujanos*, 89(4), 426–434. <https://doi.org/10.24875/CIRU.20000304>
10. Cassin, E. K., & Tseng, B. S. (2019). Pushing beyond the Envelope: the Potential Roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Pathogenicity. *Journal of bacteriology*, 201(18), e00050-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00050-19>
11. Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Dufour, A., & Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS microbiology reviews*, 41(5), 698–722. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
12. Coggan, K. A., Higgs, M. G., Brutinel, E. D., Marden, J. N., Intile, P. J., Winther-Larsen, H. C., Koomey, M., Yahr, T. L., & Wolfgang, M. C. (2022). Global Regulatory Pathways Converge To Control Expression of *Pseudomonas*

- aeruginosa* Type IV Pili. *mBio*, 13(1), e0369621. <https://doi.org/10.1128/mbio.03696-21>
13. Craig, L., Forest, K. T., and Maier, B. (2019). Type IV Pili: Dynamics, Biophysics and Functional Consequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (7), 429–440. doi: 10.1038/s41579-019-0195-4
  14. De Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L. N. E., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
  15. Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading, England)*, 166(1), 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
  16. Elmouaden, C., Laglaoui, A., Ennanei, L., Bakkali, M., y Abid, M. (2019). Virulence genes and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *Journal of infection in developing countries*, 13(10), 892–898. <https://doi.org/10.3855/jidc.10675>
  17. Eyler, R. F., & Shvets, K. (2019). Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 14(7), 1080–1090. <https://doi.org/10.2215/CJN.08140718>
  18. Finnan, S., Morrissey, J. P., O'Gara, F., y Boyd, E. F. (2004). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5783–5792. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5783-5792.2004>
  19. Gonçalves, I., Dantas, R. C. C., Ferreira, M. L., Batistão, D. W. D. F., Gontijo-Filho, P. P., & Ribas, R. M. (2017). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 48(2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.004>
  20. Ghaly, T. M., Geoghegan, J. L., Tetu, S. G., & Gillings, M. R. (2020). The Peril and Promise of Integrins: Beyond Antibiotic Resistance. *Trends in microbiology*, 28(6), 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.002>
  21. González-Olvera, E. M., Pérez-Morales, R., González Zamora, A., Castro-Escarpulli, G., Palma-Martínez, I., y Alba-Romero, J. J. (2019). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in public hospitals of northeastern Mexico. *Journal of infection in developing countries*, 13(5), 374–383. <https://doi.org/10.3855/jidc.10953>
  22. Haghí, F., Zeighami, H., Monazami, A., Toutouchi, F., Nazarian, S., y Naderi, G. (2018). Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microbial pathogenesis*, 115, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.052>
  23. Hall, C. W., Hinz, A. J., Gagnon, L. B., Zhang, L., Nadeau, J. P., Copeland, S., Saha, B., y Mah, T. F. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Antibiotic Resistance Gene ndvB Expression Requires the RpoS Stationary-Phase Sigma

- Factor. *Applied and environmental microbiology*, 84(7), e02762-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02762-17>
24. Heidarzadeh, S., Enayati Kaliji, Y., Pourpaknia, R., Mohammadzadeh, A., Ghazali-Bina, M., Saburi, E., Vazini, H., & Khaledi, A. (2019). A Meta-Analysis of the Prevalence of Class 1 Integron and Correlation with Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Recovered from Iranian Burn Patients. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*, 40(6), 972–978. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irz135>
  25. Huszczyński, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>
  26. Jacobsen, T., Bardiaux, B., Francetic, O., Izadi-Pruneyre, N., & Nilges, M. (2020). Structure and function of minor pilins of type IV pili. *Medical microbiology and immunology*, 209(3), 301–308. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00642-5>
  27. Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., y McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
  28. Kaiser, S. J., Mutters, N. T., DeRosa, A., Ewers, C., Frank, U., y Günther, F. (2017). Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 36(2), 243–253. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2792-8>
  29. Kaszab, E., Szoboszlay, S., Dobolyi, C., Háhn, J., Pék, N., & Kriszt, B. (2011). Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. *Bioresource technology*, 102(2), 1543-1548.
  30. Khosravi, A. D., Shafie, F., Abbasi Montazeri, E., & Rostami, S. (2016). The frequency of genes encoding exotoxin A and exoenzyme S in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 42(5), 1116–1120.
  31. Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>
  32. Liu, M., Ma, J., Jia, W., & Li, W. (2020). Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Gene Cassettes from Class 1 Integrons in *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 26(6), 670–676. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0406>
  33. López-García, A., Rocha-Gracia, R., Bello-López, E., Juárez-Zelocualtecal, C., Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M., López-Pliego, L., González-Vázquez, M. C., Torres, C., Ayala-Núñez, T., Jiménez-Flores, G., Arenas-Hernández, M., y Lozano-Zarain, P. (2018). Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered

- from a Mexican Hospital. *Infection and drug resistance*, 11, 1523–1536. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173455>
34. Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., & O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426(6964), 306–310. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
  35. Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Lukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2019). Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(11), 178. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>
  36. O'Neill, J. I. M. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antimicrob. Resist.*
  37. Osagie, E. A., & Olalekan, S. H. (2019). Multiple Drug Resistance: a Fast-Growing Threat. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, 21(2). <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.21.003572>
  38. Ozer, E., Yaniv, K., Chetrit, E., Boyarski, A., Meijler, M. M., Berkovich, R., et al. (2021). An Inside Look at a Biofilm: *Pseudomonas Aeruginosa* Flagella Biotracking. *Sci. Adv.* 7 (24), eabg8581. doi: 10.1126/sciadv.abg8581
  39. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
  40. Park, M. H., Kim, S. Y., Roh, E. Y., y Lee, H. S. (2017). Difference of Type 3 secretion system (T3SS) effector gene genotypes (*exoU* and *exoS*) and its implication to antibiotics resistances in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic otitis media. *Auris,nasus, larynx*, 44(3), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2016.07.005>
  41. Persyn, E., Sassi, M., Aubry, M., Broly, M., Delanou, S., Asehnoune, K., Caroff, N., & Crémet, L. (2019). Rapid genetic and phenotypic changes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains during ventilator-associated pneumonia. *Scientific reports*, 9(1), 4720. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41201-5>
  42. Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., y Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
  43. Rezzoagli, C., Archetti, M., Mignot, I., Baumgartner, M., and Kümmerli, R. (2020). Combining Antibiotics With Antivirulence Compounds can Have Synergistic Effects and Reverse Selection for Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Biol.* 18 (8), e3000805. doi: 10.1371/journal.pbio.3000805
  44. Riquelme, S. A., Liimatta, K., Wong Fok Lung, T., Fields, B., Ahn, D., Chen, D., Lozano, C., Sáenz, Y., Uhlemann, A. C., Kahl, B. C., Britto, C. J., DiMango, E., y Prince, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Utilizes Host-Derived Itaconate to Redirect Its Metabolism to Promote Biofilm Formation. *Cell metabolism*, 31(6), 1091–1106.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.04.017>

45. Sabbagh, P., Rajabnia, M., Maali, A., & Ferdosi-Shahandashti, E. (2021). Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. *Iranian journal of basic medical sciences*, 24(2), 136–142. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.48905.11208>
46. Sadvovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J., Hachani, A., Kowalska, K., & Filloux, A. (2010). High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated  $\beta$ -(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology*, 20(7), 895-904.
47. Shin, H., Jeon, J., Lee, J. H., Jin, S., & Ha, U. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* GroEL Stimulates Production of PTX3 by Activating the NF- $\kappa$ B Pathway and Simultaneously Downregulating MicroRNA-9. *Infection and immunity*, 85(3), e00935-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00935-16>
48. Sivinski, J., Ambrose, A. J., Panfilenko, I., Zerio, C. J., Machulis, J. M., Mollasalehi, N., Kaneko, L. K., Stevens, M., Ray, A. M., Park, Y., Wu, C., Hoang, Q. Q., Johnson, S. M., & Chapman, E. (2021). Functional Differences between *E. coli* and ESKAPE Pathogen GroES/GroEL. *mBio*, 12(1), e02167-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02167-20>
49. Subedi, D., Vijay, A. K., & Willcox, M. (2018). Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clinical & experimental optometry*, 101(2), 162–171. <https://doi.org/10.1111/cxo.12621>
50. Thi, M., Wibowo, D., & Rehm, B. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
51. Ullah, W., Qasim, M., Rahman, H., Jie, Y., y Muhammad, N. (2017). Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Phenotypic characteristics and molecular identification of virulence genes. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 80(3), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2016.08.011>
52. Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A. S. (2018). How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in biochemical sciences*, 43(9), 668–684. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011>
53. Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28(2), 122-130.
54. Webster, S. S., Lee, C. K., Schmidt, W. C., Wong, G., and O'Toole, G. A. (2021). Interaction Between the Type 4 Pili Machinery and a Diguanylate Cyclase Fine-Tune C-Di-GMP Levels During Early Biofilm Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States America* 118 (26), e2105566118. doi: 10.1073/ pnas.2105566118
55. World Health Organization. *Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research and Development of New Antibiotics for Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017.
56. Xu, Z., Li, L., Shi, L., & Shirtliff, M. E. (2011). Class 1 integron in staphylococci. *Molecular biology reports*, 38(8), 5261–5279. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0676-7>

57. Yalda, M., Sadat, T. Z., Elham, R., Mohammad, T. S., Neda, M., y Mohammad, M. (2021). Distribution of Class 1-3 Integrons in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Inpatients in Shiraz, South of Iran. *Ethiopian journal of health sciences*, 31(4), 719–724.
58. Zarei-Yazdeli, M., Eslami, G., Zandi, H., Kiani, M., Barzegar, K., Alipanah, H., Mousavi, S. M., & Shukohifar, M. (2018). Prevalence of class 1, 2 and 3 integrons among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Yazd, Iran. *Iranian journal of microbiology*, 10(5), 300–306.