

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



---

---

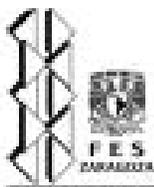
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Análisis de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*  
multidrogorresistente aislada de un hospital de tercer nivel.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO  
PRESENTA:

Diana Itzel Loyola Gómez



DIRECTOR DE TESIS:  
Dra en C. Rosa González Vázquez

ASESOR INTERNO:  
M en C. Ángel García Sánchez

Ciudad de México

2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Agradezco profundamente a cada una de las personas que en su manera me han estado apoyando para lograr la culminación de uno de mis primeros logros que tendré en esta vida, principalmente a mi padre , que a pesar de las adversidades ha estado presente, a mis amistades que han logrado sacar lo mejor de mí , Sin olvidar a mis profesores que han puesto una parte de sí mismos para transmitirme su conocimiento, inclusive esas dificultades que se han presentado en mi camino, que me han puesto a prueba haciéndome más fuerte y capaz cada día.



## ÍNDICE

Introducción.....	5
Marco teórico.....	6
1. Generalidades y taxonomía sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
1.1 Diagnóstico microbiológico.....	6
1.1.1 Fisiología.....	6
1.1.2 Identificación y cultivo.....	7
1.1.3 Métodos de identificación automatizados.....	8
1.1.4. Métodos de identificación molecular.....	9
1.2 Patogenia.....	10
2. Epidemiología.....	11
3. Enfermedades relacionadas.....	12
4. Mecanismos de resistencia.....	14
4.1 Clasificación de las $\beta$ lactamasas.....	16
4.2 Clasificación de resistencia a antimicrobianos en bacterias.....	17
5. Genes de resistencia.....	18
5.1 GES-5.....	18
5.2PER-1.....	18
5.3 CTX-M-2.....	19
5.4 CrpP.....	19
6. Problemas potenciales por el fracaso de terapia antibiótica.....	19
7. Infecciones Asociadas a Atención a la Salud (IAAS).....	20
Planteamiento del problema.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23
Material y Métodos.....	24
Cronograma de actividades.....	30
Resultados.....	31
Discusión.....	45
Conclusión.....	50
Anexos.....	51

Bibliografía.....	57
Referencias.....	59

## Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo oportunista Gram negativo, se asocia a cuadros clínicos, como neumonía asociada a ventilación mecánica, infecciones en piel y músculo esquelético, meningitis, otitis, conjuntivitis, infecciones de vías urinarias (IVU) y septicemia, e incluso puede llevar hasta la muerte.

La prevalencia del microorganismo es del 13% en Infecciones Asociadas a Atención a la Salud (IAAS); estas infecciones se caracterizan por presentarse después de 48 h del ingreso del paciente. Las IAAS representan un problema de suma importancia clínica, ya que aumenta la morbilidad y la mortalidad, además del tiempo de estancia del paciente en el hospital. Actualmente los aislados clínicos han adquirido resistencia a los antimicrobianos a través de diferentes mecanismos, lo que dificulta el tratamiento.

Las enzimas  $\beta$ -lactamasas son un mecanismo de resistencia, hidrolizan antibióticos betalactámicos algunos ejemplos son: penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. son un mecanismo de resistencia; están codificadas por diferentes genes como:

*GES-5*, *PER-1* y *CTX-M-2*. Otro tipo de enzimas son las transferasas, que modifican el antibiótico para que pierda su efectividad como CrpP que adiciona un grupo fosfato en el carbono 6 de las quinolonas.

## MARCO TEÓRICO

### 1. Generalidades y Taxonomía sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

El género *Pseudomonas* spp. Está compuesto por bacilos Gram negativos, móviles y aerobios estrictos, algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles. Abarca una amplia distribución en el suelo, agua, plantas y animales. *P. aeruginosa* a menudo está presente en pequeñas cantidades en la microbiota intestinal normal y en la piel del ser humano.

La clasificación taxonómica del género se basa en la homología de rRNA/DNA y en las características microbiológicas comunes. [1,3]

Tabla 1. Taxonomía de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Pseudomonales</i>
Familia	<i>Pseudomonaceae</i>
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tomado y modificado de [3]

La bacteria se distribuye ampliamente en la naturaleza; como en suelo, compuestos orgánicos en descomposición, vegetación y agua, se encuentra en el ambiente hospitalario, está presente en medios húmedos en los hospitales y causa enfermedades en personas inmunodeficientes. [1, 2,3]

*P.aeruginosa* no es exigente nutricionalmente, puede emplear diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono y nitrógeno, y algunas cepas crecen en agua destilada empleando oligonutrientes. [2]

## 1.1 Diagnóstico microbiológico

### 1.1.1 Fisiología

El metabolismo del microorganismo es oxidativo, sin embargo, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitratos o arginina como aceptor alternativo de electrones. [2]

### 1.1.2 Identificación y cultivo

*Pseudomonas aeruginosa* es un aerobio obligado que se desarrolla fácilmente en varios medios de cultivo, con un olor característico a "mixtamal". La forma de las colonias es redonda y lisa producen pigmentos como: pioverdina (fluoresceína) y piocianina en agar cetrimida o Mueller Hinton (MHI). Algunas cepas producen otros pigmentos la piorrubina y la piomelanina. En gelosa sangre al 5%, se puede apreciar una  $\beta$ -hemólisis total y la consistencia de las colonias es mucoide por la cápsula de polisacárido. [1,2]

*P. aeruginosa* crece a una temperatura de 37 a 42 °C; el crecimiento a 42 °C y la producción de piocianina la distinguen de otras especies de *Pseudomonas* del grupo fluorescente. La presencia de citocromo oxidasa (oxidasa positiva) la distingue de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores como: *Stenotrophomonas*. [1,2]

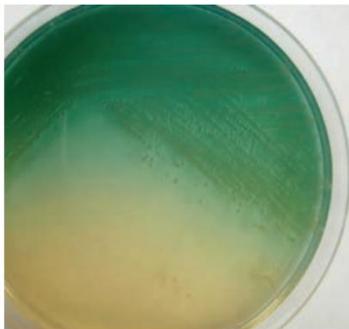


Figura 1.1.2.1 Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* productora de piocianina en agar cetrimida, tomada de: [1]

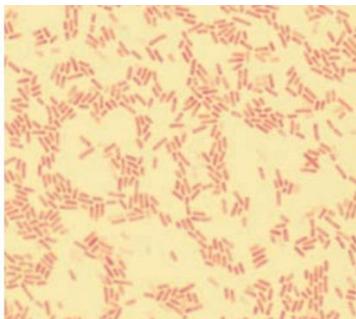


Figura 1.1.2.2 Tinción de Gram de *Pseudomonas aeruginosa*, vista a 100 x tomada de: [1]

### 1.1.3 Métodos de Identificación automatizados

Los métodos de identificación automatizados, en su mayoría está basada en las pruebas bioquímicas convencionales, solo que en vez de ser tubos grandes, se han miniaturizado en formatos que permiten aumentar el número de pruebas y eventualmente automatizar la lectura de los resultados. Dependiendo de las reacciones de cada microorganismo frente a diferentes sustratos, se obtiene un perfil bioquímico, que al ser comparados con perfiles conocidos, permite la identificación. [3]

Tabla 1.1.3. Sistemas para identificación para pruebas bioquímicas.

Metodología de identificación bioquímica	Kit/ Equipos convencionales	Automatizado	Tiempo que demora
Observación visual de turbidez o cambio de pH, por utilización de diversos sustratos	Paneles Api, Crystal, baterías convencionales	No	15 - 24 hrs
Detección de cambios de pH por utilización de Hidratos de carbono, actividad enzimática, patrones de resistencia	Tarjetas Vitek, Phoenix, Microscan tradicionales, Sensititre	Sí	8 - 12 hrs
Detección fluorométrica o colorimétrica de liberación de productos cromogénicos por reacción de enzimas preformadas	MicroScan Rapid panels, BD Phoenix, Vitek, Trek diagnostic Systems	Sí	2 - 4 hrs

Tomado y modificado de [4]

#### 1.1.4 Métodos de identificación molecular

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no definitiva [5].

##### ARN 16S (rr)

Es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosomal ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. De distribución universal, componente crítico en la función celular, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1.500 pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas.

##### 16S - 23S ARNr

Espacio intergénico del 16S-23S ARNr (ITS)<sup>4</sup>. Estas ITS se presentan en un número variable en función del número de operones ARNr o alelos *rrs*.

##### 23S ARN

Es un método auxiliar, que se utiliza cuando no se obtienen resultados concluyentes por el medio de la fracción 16S .

##### *RpoB* (subunidad $\beta$ de la ARN polimerasa).

La ARN polimerasa (RNAP) es una enzima imprescindible en el proceso de transcripción y constituye la diana final de las diferentes rutas que controlan la expresión génica en los organismos vivos.

##### *GyrB* (subunidad $\beta$ de la ADN girasa)

Es el gen codificante de la subunidad  $\beta$  de la ADN girasa o topoisomerasa II y está implicado en la replicación del ADN bacteriano. De distribución universal, la

presencia en monocopia de *gyrB* permite la discriminación e identificación de especies fuertemente relacionadas pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido lácticas,

## 1.2. Patogenia

Los factores de virulencia de *P.aeruginosa*, incluyen toxinas, enzimas y componentes estructurales. [2] La descripción de los factores de virulencia se describe en el cuadro 1.2.

**Cuadro 1.2: Factores de virulencia y su función**

Tipo	Factor de virulencia	Efecto biológico
Adhesinas	Fimbrias	Favorecen la adherencia a las células epiteliales del hospedador.
Enzimas	Elastasas (serina proteasa y metaloproteasa de zinc)	Degradan la elastina, ocasionando daño en los tejidos que lo contienen. Inhiben los componentes del complemento e inhiben la quimiotaxis y función de los neutrófilos.
Enzimas	Proteasa alcalina	Interviene en la destrucción tisular e interfiere en la respuesta inmune y participa en la diseminación de <i>P. aeruginosa</i> .
	Fosfolipasa C	Hemolisina termolábil que degrada los lípidos y la lectina, de modo que facilita la destrucción tisular.

Tomado y modificado de: [2,6 y 7]

**Cuadro 1.2: Factores de virulencia y su función**

Tipo	Factor de virulencia	Efecto biológico
Toxinas	Exotoxina A (ETA)	Altera la síntesis de proteína al inhibir la elongación de la cadena peptídica en las células eucariotas.
	Exoenzimas S y T.	Ocasiona daño tisular al ser introducida en la célula favorece la diseminación y necrosis.
Pigmentos	Piocianina	Cataliza la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno, estimula la liberación de IL-8, lo que potencia la quimiotaxis de neutrófilos produciendo inflamación.
	Pioverdina (Sideróforo)	Regula la secreción de otros factores de virulencia.
	Piorrubina	Pigmento derivado de la fenazina, que ocasiona hemólisis.
	Piomelanina	Pigmento sintetizado a partir de tirosina, que tiene actividad lecitinasa y neuraminidasa.

Tomado y modificado de: [2,6 y 7]

## 2. Epidemiología

*P. aeruginosa* es principalmente un microorganismo patógeno oportunista intrahospitalario [1,2,8]. En los últimos años aumentó la resistencia a antimicrobianos incrementando la mortalidad [8,9].

Entre los pacientes con riesgo de desarrollar infecciones por *P. aeruginosa* están los pacientes neutropénicos y los inmunodeprimidos, los pacientes con fibrosis quística, quemados y aquellos que reciben antibióticos de alto espectro (1). A

nivel nacional *P.aeruginosa* tiene una resistencia a carbapenemes y quinolonas que genera una preocupación en neumonía asociada a ventilación.[8]

En Estados Unidos se reporta un 7.5% de prevalencia en IAAS, mientras que en la Unión Europea se reportó con una frecuencia de 11.2 % y en México la prevalencia fue de 13% en 2011, posteriormente en 2013 disminuyó en hospitales de tercer nivel a 11.8 % . En España su frecuencia fue de 10 % en 2016. La resistencia a carbapenémicos es de 25 %, [9]La alta frecuencia puede deberse a que en México se tiene el mayor consumo de antibióticos registrado en Latinoamérica, lo cual favorece la selección de bacterias más resistentes en los hospitales [8].

En febrero de 2019 se notificó un brote de infecciones de herida quirúrgica causada por *Pseudomonas* resistente a antibióticos carbapenémicos, productora de una metalo-betalactamasa codificada en integrón descrito por primera vez en Verona, Italia (VIM-CRPA) en 20 pacientes (16 confirmados y 4 sospechosos) de nueve estados de los Estados Unidos que habían sido sometidos a cirugía bariátrica en un hospital de Tijuana, México. De los 20 casos, dos fueron notificados retrospectivamente y correspondían a pacientes cuyas muestras se tomaron en 2015 y 2017; mientras que en los 18 casos restantes, las muestras se tomaron entre septiembre de 2018 y enero de 2019. En 17 casos en que la información sobre edad y sexo estaba disponible, 14 (82%) eran mujeres con edades comprendidas entre 29 y 62 años [10]. Las cepas que se han encontrado diseminadas internacionalmente, conocidos como clones de alto riesgo en cepas MDR/XDR son ST111, ST175 y ST253. [11]

### **3. Enfermedades relacionadas**

*P. aeruginosa* produce infección en heridas y quemaduras y origina pus de color verde azulado; meningitis, cuando se introduce por punción lumbar; e infecciones urinarias complicadas por el uso de catéteres (sonda de Foley) e instrumentos o soluciones de irrigación. La neumonía está relacionada al uso de ventilador [2].

**Cuadro 3: Enfermedades asociadas a *P. aeruginosa***

<b>Enfermedad</b>	<b>Definición</b>	<b>Factores de riesgo</b>
Infecciones pulmonares	Comprende desde irritación leve de los bronquios hasta necrosis en parénquima pulmonar	Fibrosis quística Neutropenia Enfermedades pulmonares crónicas
Infecciones primarias de piel	Infecciones oportunistas de heridas existentes hasta infecciones localizadas de los folículos pilosos asociadas a inmersión.	Quemaduras Acné Depilación
Infecciones de vías urinarias (IVU)	IVU, complicadas con orina color azul-verdosa.	Sondas urinarias permanentes. Exposición de antibióticos de amplio espectro
Infecciones del oído	Comprenden desde una irritación leve del oído externo hasta la destrucción invasiva de los huesos craneales adyacentes	Nadadores
Conjuntivitis	Infecciones por alguna lesión leve que produce úlceras corneales.	Nadador

Tomado y modificado de: [2 y 9]

**Cuadro 3: enfermedades que provoca *P. aeruginosa***

<b>Enfermedad</b>	<b>Definición</b>	<b>Factores de riesgo</b>
Bacteriemia	Diseminación de las bacterias desde un sitio de infección primario hasta otros órganos y tejidos.	Neutropenia Diabetes Mellitus Quemaduras extensas Neoplasias hematológicas

Tomado y modificado de:[ 2 y 7]

#### **4. Mecanismos de resistencia**

*P. aeruginosa* se caracteriza por una resistencia a varios antibióticos, especialmente a cefalosporinas de espectro extendido, debido a la producción de  $\beta$  lactamasas inducibles de diferentes clases codificadas en el genóforo bacteriano y la producción constitutiva (MexAB - OprM) e inducible de bombas de expulsión. También *P.aeruginosa* es resistente por mutaciones y se clasifican como multidrogorresistentes (MDR), extremo drogo resistentes (XDR) y pandrogorresistentes (PDR) [12,13].

La resistencia se clasifica como naturales (intrínsecos ) y adquiridos (extrínsecos). la resistencia natural es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado genéticamente, y sin correlación con la dosis del medicamento. La resistencia adquirida es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible, pero ha sido modificado genéticamente, yas e por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones, integrones). [13]

Los mecanismos de resistencia se clasifican en 3 de acuerdo a su función:

- Inactivación del antibiótico: Es un procesos molecular caracterizado por la expresión de enzimas que van a realizar dicha función.
- Alteraciones del sitio blanco del antibiótico: Se modifican sitios específicos de la célula bacteriana .
- Alteración de las barreras de permeabilidad: Este mecanismo se debe al cambio en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de la pared celular o la membrana, que influyen en la permeabilidad, así como la pérdida de la capacidad de transporte activo[13]

**Cuadro 4 Ejemplo de los mecanismos de resistencia según su modo de acción**

Mecanismo de resistencia		Antibióticos	Genes
$\beta$ -lactamasas (enzimas)	Hidrolizan el anillo betalactámico.	Betalactámicos como cefalosporinas, penicilinas, carbapenemes, etc.	<i>TEM</i> , <i>SHV</i> , <i>CTM-X</i> , <i>IMP</i> , <i>VIM</i> , <i>SMP</i> , <i>OXA</i> , <i>AmpC</i>
Bombas de eflujo	Transportan activamente los antibióticos para que salgan de la célula	Betalactámicos, Quinolonas, Aminoglucósidos, Tetraciclinas.	<i>MexAB</i> , <i>MexXY</i> , <i>MexEF</i> .
Reducción de permeabilidad	Reducen la expresión de porinas, impidiendo que el antibiótico ingrese	Betalactámicos, Quinolonas, Aminoglucósidos, Tetraciclinas.	<i>OprD</i> , <i>OprM</i> , <i>OprN</i> .

Tomado y modificado de: [14.15,16]

**Cuadro 4. Ejemplo de los mecanismos de resistencia según su modo de acción**

Mecanismo de resistencia		Antibióticos	Genes
Modificación y protección de objetivos	Modifican de configuración del sitio diana por medio de enzimas	Aminoglucósidos Fenicoles Quinolonas	<i>PRP</i>
Mutaciones	Modificación por mutaciones	Polimixinas Quinolonas	<i>Pmr-AB, PhoPQ, PorRS.</i>

Tomado y modificado de: [14,15,16]

#### 4.1 Clasificación de $\beta$ -lactamasas

La clasificación de las  $\beta$ -lactamasas es estructural y funcional: Ambler clasificó las  $\beta$ -lactamasas según el peso molecular, espectro y grado de homología en secuencias de aminoácidos; mientras que Bush se basó en características bioquímicas, físicas, espectro de hidrólisis y de inhibición [17].

**Cuadro 4.1 Clasificación de beta-lactamasas**

Clasificación de Ambler	Clasificación de Bush	Características
Clase A	Grupo II	Denominadas como BLEEs (b-lactamasas de espectro extendido) ,penicilasas Inhibidas por ácido clavulánico
Clase B	Grupo III	Metalobetalactamasa, cefalosporinasa y carbapenemasa. Inhibidas por EDTA

Tomado y modificado de:[14, 15, 16, 17]

#### **Cuadro 4.1 Clasificación de beta-lactamasas**

<b>Clasificación de Ambler</b>	<b>Clasificación de Bush</b>	<b>Características</b>
Clase C	Grupo I	Cefalosporinasas cromosómicas Inhibidas por aztreonam
Clase D	Grupo IV	Oxacilina Inhibidas por cloruros

Tomado y modificado de:[14, 15, 16, 17]

#### **4. 2 Clasificación de resistencia a antimicrobianos en bacterias**

Las definiciones del fenotipo de resistencia son para uso de salud pública y para uso epidemiológico. Se utiliza la definición de la categoría ‘Resistente’ (R) en lugar de ‘no sensible’ para evitar que la definición de MDR, XDR y PDR por los laboratorios clínicos sea confusa debido al análisis adicional de los datos de “resistencia intermedia”. Esto significa que se incluirán para su categorización solo los antibióticos a los que, según el punto de corte, los patógenos analizados sean resistentes

MDR: no sensible al menos a un agente en tres o más categorías antimicrobianas.

XDR: no sensible al menos a un agente en todas las categorías excepto en una o dos de ellas (es decir, los aislamientos bacterianos siguen siendo sensibles solo a una o dos categorías).

PDR: no sensible a todos los agentes en todas las categorías antimicrobianas. [18]

## **5. Genes de resistencia**

### **5.1 GES-5 :**

#### **“Guyana Extended Spectrum”.**

A nivel mundial se han descrito nueve Betalactamasas de espectro extendido de tipo GES en diversas especies bacterianas patógenas, incluyendo *P. aeruginosa* y varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. [19]

El gen GES-5 forma parte de la región variable de un integrón de clase 1. En comparación con GES-1, se observa un resto serina en GES-5 en la posición 170 de Ambler (región loop-loop de la proteína madura), el cual, aumenta la capacidad de hidrólisis, afectando también a carbapenémicos. Es susceptible a inhibidores de betalactamasas [19,20]. Un estudio “Southern blotting” reveló que el gen se localiza en el genóforo bacteriano. [21]

Este gen se encuentra distribuido en Sudáfrica, Puerto Rico, China, Brasil, España. En México no se han encontrado [15,16]. En un estudio realizado por Hishimuna y colaboradores en hospitales de Japón, obtenido de cepas de los años 2012 a 2016, de 1476 aislados de *P.aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, 137 (9.3%) fueron positivos para *bla*GES-5. El origen del aislamiento fue el 71 (68.3%) de vías respiratorias, 22 (21.2%) de IVU, siete (6.7%) de úlceras de cúbito y cuatro (3.8%) de pus. [21]

### **5.2 PER (“Pseudomonas Extended Resistance”):**

PER es una Beta-lactamasa de tipo A según la clasificación de Ambler, este gen se encuentra localizado en un transposón denominado Tn1213 y Tn4176 que favorece su diseminación. [22,23].

Desde 1995, los organismos productores de PER-1 se han difundido en Italia, Bélgica, Francia, España, Rumania, Hungría, Serbia, Corea, Japón, Turquía, Polonia, Grecia y China. En Europa, el gen *bla* PER-1 se encuentra principalmente en *P. aeruginosa*. La expresión de PER-1 (y la de PER-2) generalmente confiere

una resistencia clara a los oximiino- $\beta$ -lactámicos, especialmente ceftazidima, ceftibuten y aztreonam [23,24].

### **5.3 CTX-M-2 (Cefotaxime):**

Muchas de estas enzimas han evolucionado a partir de las  $\beta$ -lactamasas de TEM y SHV, recientemente se ha descrito una gran cantidad de BLEE no relacionadas con TEM y SHV, como OXA, CTM-X y PER[25]. Estas enzimas son codificadas en plásmidos, generan resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación tales como cefotaxime, ceftriaxona y ceftazidime. Las enzimas se encuentran principalmente en algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* entre ellos: *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y en *P. aeruginosa*. [25, 26]

Se encuentran distribuidas en países como Brasil, Bolivia e Irán [26]

### **5.4 CrpP**

El plásmido pUM505, aislado de *P. aeruginosa*, confiere resistencia a ciprofloxacino (CIP) cuando se transfiere a la cepa *P.aeruginosa* PAO1. CIP es un antibiótico de la familia de las quinolonas.

El plásmido transporta varios genes adaptativos, como *umuD* (que codifica un regulador transcripcional de la respuesta SOS), genes implicados en la virulencia de *Pseudomonas* y genes que aumentan la estabilidad del plásmido]. Este gen se ha encontrado en México.[27]

## **6. Problemas potenciales por el fracaso de terapia antibiótica contra el microorganismo.**

Las bacterias resistentes a los antibióticos son una carga económica y de salud considerable para el sistema de atención médica en el mundo, así como para los pacientes y sus familias.

Entre los problemas que representa *P. aeruginosa* MDR son la adición de costos considerables al sistema de salud, la administración de antibióticos que son más tóxicos para el paciente y a su vez, más costosos. Inclusive se requiere una estancia hospitalaria más prolongada (de 6 a 12 días aproximadamente), más visitas al médico y los pacientes experimentan una mayor incidencia de discapacidad a largo plazo. [28]

### **7. Infecciones Asociadas a Atención a la Salud (IAAS).**

Una infección asociada con la atención a la salud se define como una condición localizada o generalizada secundaria a la presencia de un agente infeccioso o su toxina y que además no estaba presente o en un periodo de incubación al momento del ingreso hospitalario, que ocurrió 48 a 72 h posterior a su estancia hospitalaria.[29]

Las IAAS son consecuencia directa de la atención integral a pacientes hospitalizados, relacionadas con múltiples factores de riesgo; la adquisición de patógenos hospitalarios dependen de las características del huésped, el medio ambiente y el agente (hongos, virus, parásitos, bacterias). Para ello se requiere de un reservorio (huésped, personal hospitalario, ambiente y fómites); una fuente de infección (medio, pacientes y personal); la transmisión que puede ser directa o indirecta, puede ser a través de aerosoles (tuberculosis pulmonar, varicela o influenza); un vehículo común (soluciones y medicamentos contaminados) y el contacto (manos del personal, equipo médico contaminado como es el estetoscopio, la bata, la corbata, etcétera). [29, 30]

Las IAAS representan un problema de gran importancia clínica y epidemiológica ya que, se incrementan las tasas de morbilidad y mortalidad; el costo social de años de vida, así como de años de vida saludables perdidos por muerte prematura o vividos con discapacidades, lo cual se suma al incremento en los días de hospitalización y del gasto económico. [30]

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*P. aeruginosa* es un microorganismo oportunista que se asocia a Infecciones Asociadas a Atención la Salud (IAAS) que incrementan las tasas de mortalidad y morbilidad.

Las consecuencias de estas infecciones implican el agravamiento del estado del paciente, lo cual, provoca el prolongamiento de la estancia hospitalaria del paciente, una discapacidad temporal, e inclusive hasta la muerte; el aumento de los costos en los hospitales, y la falla terapéutica por la diseminación de cepas Multidrogorresistentes (MDR), Extremodrogorresistentes (XDR) y Pan Drogorresistente (PDR). El incremento de la resistencia es por transferencia horizontal de genes entre cepas del mismo género o de géneros diferentes.

Según la OMS, en México se calcula que 450.000 casos de infección se relacionan con la atención sanitaria, causando 32 muertes por cada 100.000 habitantes al año. El costo anual por IAAS se aproxima a 1,500 millones de pesos.

La importancia de detectar genes que codifican en enzimas que inactivan el antibiótico tales como  $\beta$  - lactamasas de Espectro extendido y transferasas nos ayuda a tener una mejor vigilancia epidemiológica para tomar medidas de control en la dispersión del microorganismo debido al perfil de resistencia y elementos genéticos móviles que posee.

## HIPÓTESIS

La presencia de enzimas que inactivan el antibiótico se presentan en aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a betalactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos por lo que presentaran los genes *bla<sub>GES-5</sub>*, *bla<sub>PER-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CRP, I</sub>*, de codificación plasmídica y cromosomal.

## OBJETIVOS:

### Objetivo Generales

- Determinar la resistencia genóticamente de aislados clínicos de *P.aeruginosa* provenientes de hospitales de tercer nivel.

### Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia de los genes *bla<sub>GES-5</sub>*, *bla<sub>PER-1</sub>* *bla<sub>CTX-M-2</sub>* y *bla<sub>CTDP</sub>* en cepas MDR, XDR, PDR de *P. aeruginosa* proveniente de aislados clínicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tipo de estudio:** Observacional, Prospectivo transversal, comparativo.

### **Universo de estudio:**

- Población: 148 aislados clínicos de *P. aeruginosa* MDR, XDR y PDR provenientes de hospitales de tercer nivel (Hospital militar y Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional “La raza”) provenientes de orina, sangre, LCR u otro tipo de secreción en un periodo comprendido de 2018-2019.

### **Criterios de selección:**

#### Criterios de inclusión:

- Aislados clínicos de *P. aeruginosa* que fueron resistentes a antibióticos betalactámicos (cefalosporinas, penicilinas, carbapenemes), y fluoroquinolonas (ciprofloxacino).

#### Criterios de exclusión:

- Aislados clínicos diferentes a *P. aeruginosa*
- Aislados clínicos de *P. aeruginosa* que fueron sensibles a antibióticos betalactámicos (cefalosporinas, penicilinas, carbapenemes), y fluoroquinolonas (ciprofloxacino)

### **Variables:**

CMI de antibióticos: Cuantitativa continua.

Presencia de genes: cualitativa nominal.

## Metodología

### 1. Diagrama general de trabajo

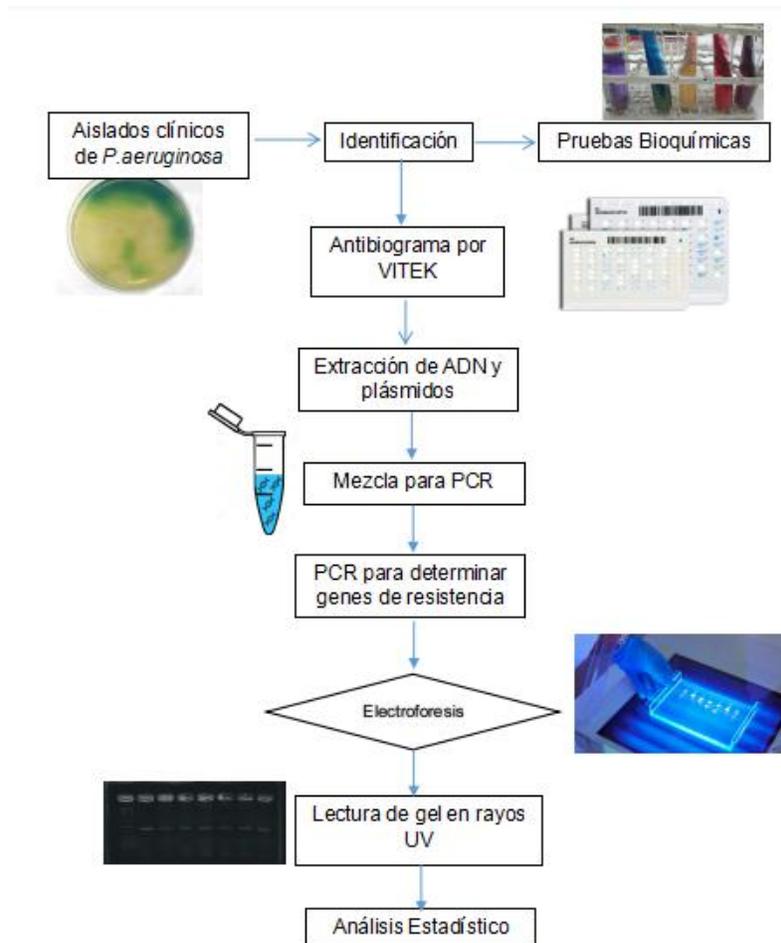


Figura 1. Diagrama general de trabajo.

### 2. Identificación de cepas.

La identificación bioquímica de *P. aeruginosa* fue a través de pruebas bioquímicas de catalasa (+), oxidasa (+), movilidad, producción de  $N^2$ , citrato (+), TSI (A/A) y la producción de pigmentos (fluoresceína y piocianina).

La identificación de género y especie se realizó mediante el sistema automatizado VITEK 2, así como las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.

En la resiembra de las cepas , se utilizó agar BHI (Brain-Heart Infusion), y TSA (Agar Soya Tripticasa). Para comprobar la pureza de la cepa se sembró por estría cruzada en 4 cuadrantes. Ya que la cepa está pura se procedió a sembrar por estría masiva en una placa para obtener biomasa suficiente para la extracción de ADN y plásmidos.

Los aislados clínicos se conservaron en caldo BHI con 10 % de glicerol, a una temperatura de -2 °C.

### **3. Identificar el origen de las muestras**

El origen de las muestras se encuentra en el reporte de susceptibilidad a los antimicrobianos, expedido por el sistema VITEK. Se ordenaron conforme a la clave de la cepa con fines estadísticos.

### **4. Identificar el origen de las salas de dónde provienen los aislados clínicos.**

El origen de las salas donde provienen los aislados clínicos se encuentra en el reporte de susceptibilidad a los antimicrobianos, expedido por el sistema VITEK. Se ordenaron conforme a la clave de la cepa con fines estadísticos,

### **5. Determinación de Resistencia**

El Antibiograma se realizó en equipo automatizado VITEK 2 por medio de tarjetas de susceptibilidad que contiene diferentes concentraciones de cada antibiótico, obteniéndose la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de manera exacta y precisa, arrojando el resultado si es Sensible (S), Intermedia(I) o resistente (R)

### **6. Extracción de DNA con el método de Tiocianato de Guanidina (TG)**

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Tiocianato de Guanidina con algunas modificaciones para realizar la extracción de ADN de *P.aeruginosa*. Ver anexo.

## 7. Extracción de plásmidos

la extracción de plásmidos se realizó mediante el método de lisis alcalina con algunas modificaciones para realizar la extracción de plásmidos de *P.aeruginosa*. Ver anexo 2.

## 8. Detección molecular de enzimas que modifican el antibiótico.

La detección molecular de los genes que codifican para enzimas que modifican el antibiótico se realizó por medio de PCR de punto final. Los iniciadores se muestran en el cuadro 5 la mezcla de reacción y las concentraciones de los reactivos se indican en el cuadro 6. se muestra la mezcla de reacción y en el cuadro 7 se muestra el programa de amplificación se refiere en el cuadro 7, las condiciones de PCR, fueron estandarizadas.

**Cuadro 8.1** Iniciadores para la identificación de genes

*bla<sub>GES-5</sub>*, *bla<sub>PER-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CrypP</sub>*,

Gen	Nombre de primer	Secuencia 5' - 3'	pb	Tm °C	Referencia
GES-5	GES-1A	ATGCGCTTCATTCACGCAC	846	58	14,15
	GES-1B	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	846	58	14,15
PER	PERA	ATGAATGTCATTATAAAAGC	925	52	17,18,19
	PERD	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	925	52	17,18,19

**Cuadro 8.1 Iniciadores para la identificación de genes**

*bla<sub>GES-5</sub>*, *bla<sub>PER-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CrpP</sub>*,

Gen	Nombre de primer	Secuencia 5' - 3'	pb	Tm °C	Referencia
crpP	PuM505	CAACATGATGAATTCTACCGGA AAC	123	70	7
	PuM505	GAGAAATGAAGCTTGCGTTGTT	123	62	7
CTM-X.-2	CTXM2	ATGATGACTCAGAGCATTGG	876	50	20, 21
	CTXM2	TGGGTTACGATTTTCGCCGC	876	50	20,21,

**Cuadro 8.2 Mezclas de reacción para genes GES-5, PER, CTX-M-2 y CrpP**

Las cantidades proporcionadas en la tabla establece volumen (µL) que se utilizó en una reacción con un volumen final de 25 µL, también se indica la concentración de cada reactivo.

Reactivo	Concentración	Volumen (µL) para 1 reacción
Regulador	10 x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.0 µL
dNTPs	10 mM	2.0 µL
Forward	64 mM	2.0 µL
Reverse	64 mM	2.0 µL

**Cuadro 8.2 Mezclas de reacción para genes GES-5, PER,CTX-M-2 y CrpP**

Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L
DNA	0.1 mg/mL	2.0 $\mu$ L
Agua	--	12.3 $\mu$ L

**Cuadro 8.3. Programas para amplificación de PCR de genes**

Las condiciones de PCR varían con relación al gen (cuadro 6.3), también se indica el número de ciclos que se requiere para la amplificación

<b>GEN</b>	<b>GES-5</b>	<b>CTX-M-2</b>	<b>PER-1</b>	<b>CrpP</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	93 ° c 3 min	96 °C 5 min	94 °C 5 min	95 °C 5 min
<b>Desnaturalización</b>	93 °C 1 min	96 °C 1 min	95 °C 5 min	95 °C 5 min
<b>Amplificación</b>	58 °C 1 min	55 °C 1 min	55 °C 1 min	50 °C 1 min
<b>Terminación</b>	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min
<b>Ciclos</b>	30	35	40	30

### 9. Análisis Estadístico:

La prueba de Mann-Whitney se empleó para la comparación de variables tomando una significancia de  $p < 0.05$  con IC 95%.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad/Mes	Febrero- Marzo	Abril - Mayo	Junio - Julio	Agosto- Septiembre	Octubre - Noviembre	Diciembre
Elaboración de escrito y metodología						
Aislamiento e identificación de aislados clínicos						
Propagación de aislados clínicos						
Conservación						
Extracción de ADN						
Cuantificación de ADN						
Amplificación de genes de resistencia						
Electroforesis						

## RESULTADOS

### 1. Clasificación de Resistencia

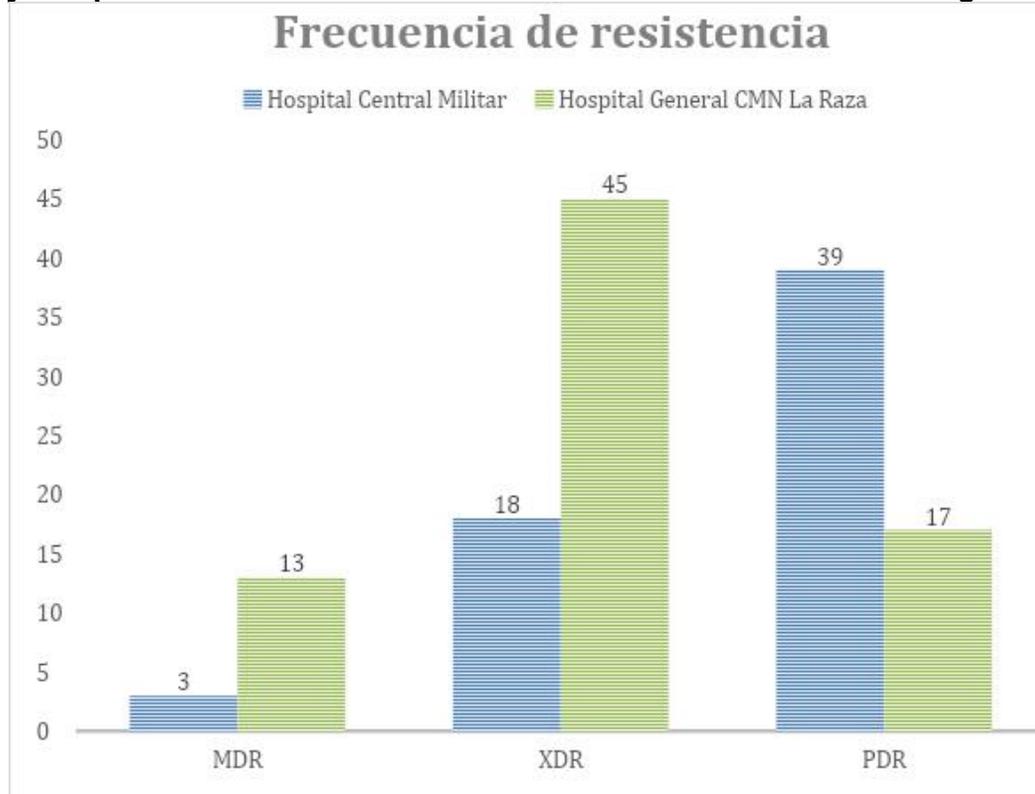
En el Hospital Central Militar existe un mayor cantidad de cepas que son posiblemente PDR con un porcentaje de 65 % mientras que en el hospital CMN La Raza prevalecen más las muestras que son XDR con un porcentaje de 60 %. Las probables causas son la inadecuada administración de antibióticos, lo que genera una selección en bacterias resistentes, la transmisión del microorganismo por la inadecuada higiene de manos y por el uso de ventilador sin ser sanitizado correctamente.

En ambos hospitales prevalece menos las cepas MDR; en el hospital Central Militar están en un porcentaje del 5% y en el Hospital CMN La Raza predomina en un 17.33 %, como lo muestra el cuadro 1.1 y la grafica 1.1

**Cuadro 1.1 Frecuencia de resistencia nivel de resistencia entre Hospital Central Militar y Hospital General CMN La Raza de aislados clínicos de *P. aeruginosa* .**

Clasificación	Hospital Central Militar	Hospital General CMN La Raza
MDR	3/71 (5%)	13/77 (17.33%)
XDR	18/71 (30 %)	45/77 (60 %)
Posible PDR	39/71 (65%)	17/77 (22.67 %)

**Gráfica 1.1 comparación de nivel de resistencia entre Hospital Central Militar y Hospital General CMN La Raza de aislados clínicos de *P.aeruginosa* .**



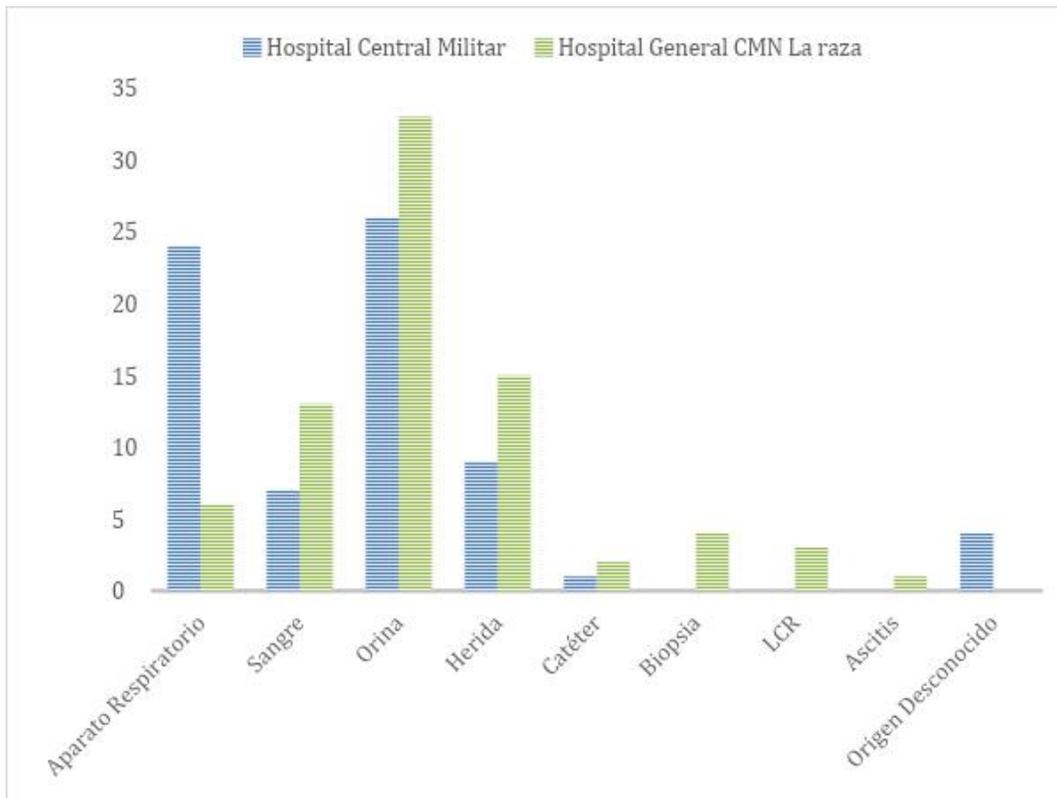
## 2. Origen de las muestras

En el cuadro 2.1 se observa que el tipo de muestra dónde hubo un mayor aislamiento fue en orina en el Hospital General CMN La Raza, mientras que en el Hospital Central Militar fue el segundo tipo de aislamiento más frecuente, después de las muestras extraídas del aparato respiratorio, que en este caso, fue la que más prevaleció. En ambos Hospitales quedan en tercer lugar las muestras provenientes de torrente sanguíneo (hemocultivos) y en menor medida de catéter. Sólo en el Hospital General CMN La Raza se obtuvieron aislados de biopsia, líquido cefalorraquídeo (LCR) y por ascitis.

**Cuadro 2.1 Sitios provenientes de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital Central Militar y Hospital General CMN La Raza.**

<b>Muestra</b>	<b>Hospital Central Militar</b>	<b>Hospital General CMN La Raza</b>
Aparato Respiratorio	26(36.62%)	6(7.79 %)
Sangre	9(12.68%)	13(16.88%)
Orina	24(33.80%)	33(42.85%)
Herida	7(9.86%)	15(19.48%)
Catéter	1(1.41%)	2(2.59%)
Biopsia	0	4(5.19%)
LCR	0	3(3.90%)
Ascitis	0	1(1.30%)
Origen Desconocido	4(5.63%)	0

**Gráfica 2.1 Comparación de sitios provenientes de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital Central Militar y Hospital General CMN La Raza.**



### 3. Lugares de aislamiento.

El aislamiento de *P. aeruginosa*, también se hizo de diferentes áreas hospitalarias o especialidades. En el Hospital Médico Militar prevalece más en el área de terapia intensiva con un porcentaje de 22.53 % mientras que en donde reside menos es en área de oncología con un 1.41%

**Cuadro 3. 1 Salas en donde fueron aisladas las muestras provenientes por *P. aeruginosa* del Hospital Médico Militar.**

Sala	Número	Porcentaje
Infectología	2/71	2.82
Otorrinología y Oftalmología	2/71	2.82
Neurología	3/71	4.22
Neumología	2/71	2.82
Medicina de hombres	2/71	2.82
Urgencias	5/71	7.04
Urología	3/71	4.22
Cirugía Cardiotorácica	2/71	2.82
Terapia Intensiva	16/71	22.53
Inmunología	2/71	2.82
Laboratorio	2/71	2.82

**Cuadro 3. 1 Salas en donde fueron aisladas las muestras provenientes por *P. aeruginosa* del Hospital Médico Militar.**

Sala	Número	Porcentaje
Cardiología	2/71	2.82
Cirugía de hombres	2/71	2.82
Oncología quirúrgica	1/71	1.41
Desconocido	25/71	35.21

En el Hospital General CMN La Raza, las áreas donde reside *P. aeruginosa* están representadas en el cuadro 4. En el área donde más prevalece es en urología con un 20.57 % mientras que en donde menos prevalece es en el área de cirugía maxilofacial, hemodiálisis y unidad de trasplante renal con un porcentaje de 1.40 %.

**Cuadro 3.2 Salas en donde fueron aisladas las muestras provenientes por *P.aeruginosa* del Hospital General CMN La Raza**

Sala	Número	Porcentaje
Hematología	6/77	7.80
Medicina Interna	4/77	5.19
Neurología	2/77	2.60
Cirugía General	7/77	9.09
Neurocirugía	9/77	11.69
Reumatología	2/77	2.60

**Cuadro 3.2 Salas en donde fueron aisladas las muestras provenientes por *P.aeruginosa* del Hospital General CMN La Raza**

Sala	Número	Porcentaje
Urología	20/77	25.97
Cirugía Plástica y Reconstructiva	2/77	2.82
Terapia Intensiva	8/77	10.39
Unidad de trasplante renal	1/77	1.30
Hemodiálisis	1/77	1.30
Angiología	4/77	5.19
Gastroenterología	2/77	2.60
Nefrología	5/77	6.49
Unidad Coronaria	2/77	2.60
Cirugía Maxilofacial	1/77	1.30

#### 4. Antibiograma

Los resultados que arrojó el sistema VITEK para determinar los niveles de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo para los distintos tipos de betalactámicos, comenzando por las penicilinas, Hay una mayor distribución de cepas resistentes en el Hospital de especialidades CMNR la Raza (Hospital II) que en el Hospital Central Médico Militar(Hospital I); predominando más en la piperacilina de 24/31.17 % contra 17/23.94% , teniendo ambos CMI de 128 µg/mL ;

y ampicilina con 48/62.34 % contra 1/1.41% con un CMI de 32 µg/mL respectivamente.

La mezcla de penicilina con un inhibidor de β-lactamasas que fue utilizado en ambos hospitales fueron sulbactam con ampicilina (SAM), piperacilina con tazobactam (PTZ), y ticarcilina con ácido clavulánico (TAC). En el Hospital I el inhibidor que presentó más resistencia fue PTZ con un 52/73.24 %y un CMI predominante de 64 µg/mL , mientras que en el Hospital II fue SAM con un 73/94.08 % con un CMI de 32 µg/mL mientras que Hospital I no hay cepas sensibles. En el Hospital II un 28/36.37 % son sensibles a PTZ y 5/ 6.49 % a TAC con CMI predominante de 8 µg/mL .

Las cefalosporinas es otro tipo de antibiótico betalactámico utilizado contra *P. aeruginosa*. En el Hospital I tuvo un mayor número de cepas resistentes a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, a diferencia del Hospital II que es mayor la cantidad de cepas sensibles. Ceftriaxona y cefazolina se utilizaron en el Hospital I con CMI predominantes de 64 µg/mL , con un porcentaje de 3/4.33% y 5/7.04% respectivamente. La cefalosporina de 3ra generación que se utilizó en ambos hospitales fue Ceftazidime; el porcentaje de cepas resistentes que prevalece es de 54/76.06 % con un CMI de 16 µg/mL en el Hospital I y de 19/24.67% en el Hospital II con un CMI de 64 µg/mL, mientras que, las muestras sensibles son 9/12.68 % con CMI predominante de 1 µg/mL 33/42.86% con CMI predominante de 4 µg/mL. La cefalosporina de 4ta generación, cefepime, es la que mayor porcentaje de resistencia presenta en ambos hospitales, con una cantidad de 59/83.10 % y un CMI predominante de 16 µg/mL en el Hospital I y en el Hospital II fue de 44/57.14 % con un CMI predominante de 64 µg/mL contra las cepas sensibles que prevalecieron en 12/9.91% con una CMI predominante de 8 µg/mL y 33/42.86% con un CMI predominante de 1 µg/mL respectivamente. Aztreonam es un monobactámico utilizado sólo en el Hospital Médico Militar, el cual tiene un porcentaje de resistencia del 30/42.27% con un CMI de 16 µg/mL entre las cepas y sensibilidad de 4/5.63% con un CMI de 8 µg/mL.

Los carbapenémicos son los betalactámicos utilizados únicamente a nivel hospitalario. meropenem e imipenem fueron administrados por ambos hospitales. En ambos Hospitales se presentó mayor porcentaje de cepas de *P.aeruginosa* resistentes para meropenem con 55/77.47% con una CMI predominante de para Hospital I y 43/55.84% y una CMN predominante de 16 µg/mL para el II El porcentaje de cepas sensibles a meropenem en Hospital I es 13/18.31% con una CMI predominante de 1 µg/mL para a ambos carbapenémicos y 33/38.96 % para Hospital II, con una CMI predominante de 0.25 µg/mL para meropenem y 2 µg/mL para imipenem; siendo este el que tiene lugar a más cepas sensibles a este grupo de antibióticos.

En cuanto a los aminoglucósidos, son un grupo de antibióticos bactericidas que actúan sobre los ribosomas provocando la producción de proteínas tóxicas. La gentamicina y tobramicina fueron utilizados en ambos hospitales, la amikacina sólo en el Hospital central militar. El antibiótico de este grupo que más resistencia presentó fue tobramicina en el Hospital I con un porcentaje 54/76.06% con una CMI predominante de 8 µg/mL y en el Hospital II fue gentamicina con un porcentaje de 20/25.97% y un CMI predominante de 16 µg/m. En el Hospital I presenta un mayor número de cepas resistentes a este grupo, mientras que en el hospital II presenta una mayor cantidad de cepas sensibles, principalmente a tobramicina con 35/ 45.45 % con un CMI de 1 µg/mL contra 22/30.98% con un CMI predominante de 16 µg/mL de amikacina del Hospital I.

Por último, las quinolonas es otro grupo de antibióticos utilizados que actúan inhibiendo la síntesis de ADN. En ambos hospitales fueron utilizados ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino. En el Hospital I el antibiótico que prevaleció con resistencia fue ciprofloxacino con 57/80.21 % con una CMI predominante de 2 µg/mL mientras que, en el Hospital II prevaleció más moxifloxacino con 44/57.14% con un CMI de 8 µg/mL. En ambos hospitales tuvo mayor cantidad de cepas sensibles con 12/16.90% y 30/38.96% respectivamente

a ciprofloxacino, con un CMI de 1 µg/mL para el Hospital I y una CMI predominante de 0.5 µg/mL para el Hospital II

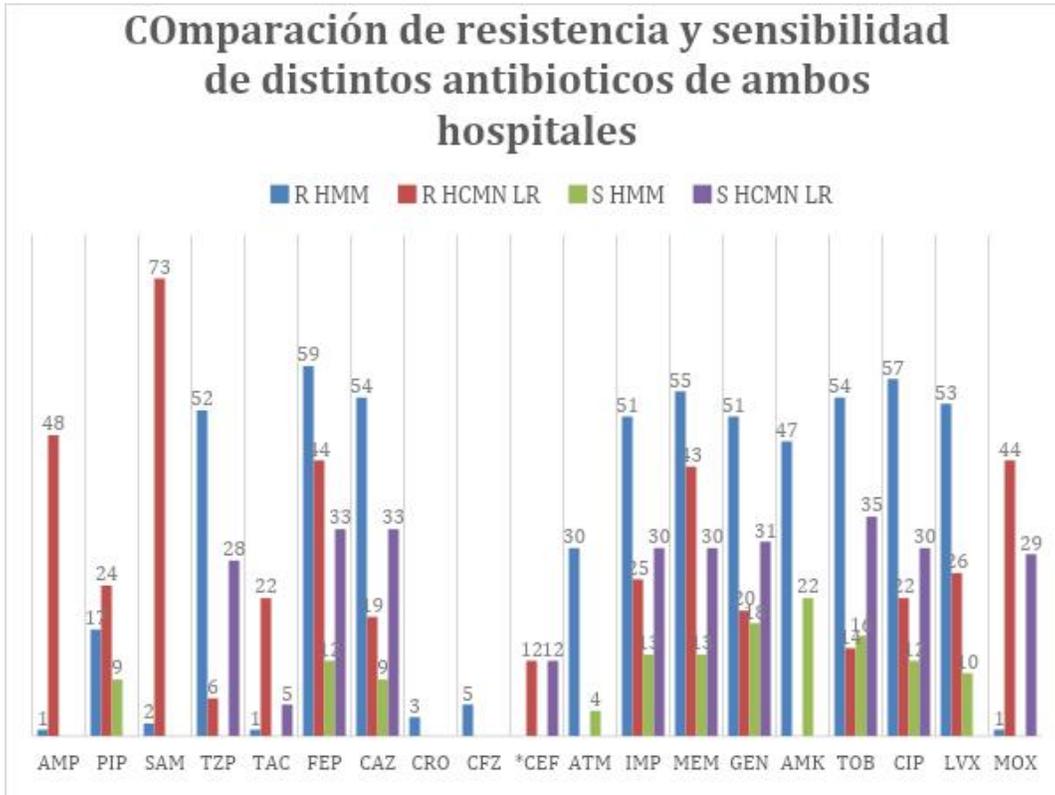
**Cuadro 4.1 Comparación de la cantidad de cepas resistentes y sensibles de aislados clínicos de *P. aeruginosa* entre Hospital Central Militar y Hospital CMN La Raza.**

Antibiótico/CMI	Hospital Central Militar		Hospital CMN La Raza	
	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible
Penicilinas				
Ampicilina	1(1.41%)	0	48(62.34%)	0
Piperacilina	17(23.94%)	9(12.67%)	24(31.17%)	0
Penicilinas + inhibidor				
SAM	2(2.82%)	0	73(94.80%)	0
PTZ	52(73.24%)	0	6(7.79%)	28(36.37%)
TAC	1(1.41%)	0	22(28.57%)	5(6.49%)
Cefalosporinas				
Cefepime	59(83.10%)	12(19.91%)	44(57.14%)	33(42.86%)
Ceftazidime	54(76.06%)	9(12.68%)	19(24.67%)	33(42.86%)
Ceftriaxona	3(4.22%)	0	0	0
Cefazolina	5(7.04%)	0	0	0
Cefezima	0	0	12(15.58%)	12(15.58%)

**Cuadro 4.1 Comparación de la cantidad de cepas resistentes y sensibles de aislados clínicos de *P. aeruginosa* entre Hospital Central Militar y Hospital CMN La Raza.**

Antibiótico/CMI	Hospital Central Militar		Hospital CMN La Raza	
	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible
<b>Monobactámico</b>				
Aztreonam	30(42.25%)	4(5.63%)	0	0
<b>Carbapenemes</b>				
Imipenem	51(71.83%)	13(18.31%)	25(32.47%)	30(38.96%)
Meropenem	55(77.47%)	13(18.31%)	43(55.84%)	30(38.96%)
<b>Aminoglucósidos</b>				
Gentamicina	51(71.83%)	18(25.35%)	20(25.97%)	31(40.26%)
Amikacina	47(66.20%)	22(30.98%)	0	0
Tobramicina	54(76.06%)	16(22.53%)	14(18.18%)	35(45.45%)
<b>Quinolonas</b>				
Ciprofloxacino	57(80.21%)	12(16.90%)	22(28.57%)	30(38.96%)
Levofloxacino	53(74.61%)	10(14.08%)	26(33.77%)	0
Moxifloxacino	1(1.41%)	0	44(57.14%)	29(37.66%)

**Gráfica 4.1 Comparación de la cantidad de cepas resistentes y sensibles de aislados clínicos de *P.aeruginosa* entre Hospital Central Militar y Hospital CMN La Raza.**



### 5. Amplificación de los genes por el método de PCR

En el Hospital Central Médico hay un total de 55 cepas resistentes a carbapenémicos, 25 son positivas al gen GES-5 correspondiendo al 45.45% mientras que en el Hospital General CMN La Raza hay un total de 43 cepas resistentes a carbapenémicos, 29 son positivas al gen GES-5 correspondiendo al 67.41%. En ambos hospitales no hay presencia de los genes CTX-MX-2, PER-1 y CrpP.

**Cuadro 5.1 Resultados de la presencia de los genes GES-5, CTX-M-2, PER-1 Y CrpP presentes en aislados clínicos de *P.aeruginosa***

	Hospital Central Militar	Hospital General CMN La Raza	Total
GES-5	25/55 (45.45%)	29/43 (67.41%)	54
CTX-M-2	0	0	0
PER-1	0	0	0
CrpP	0	0	0

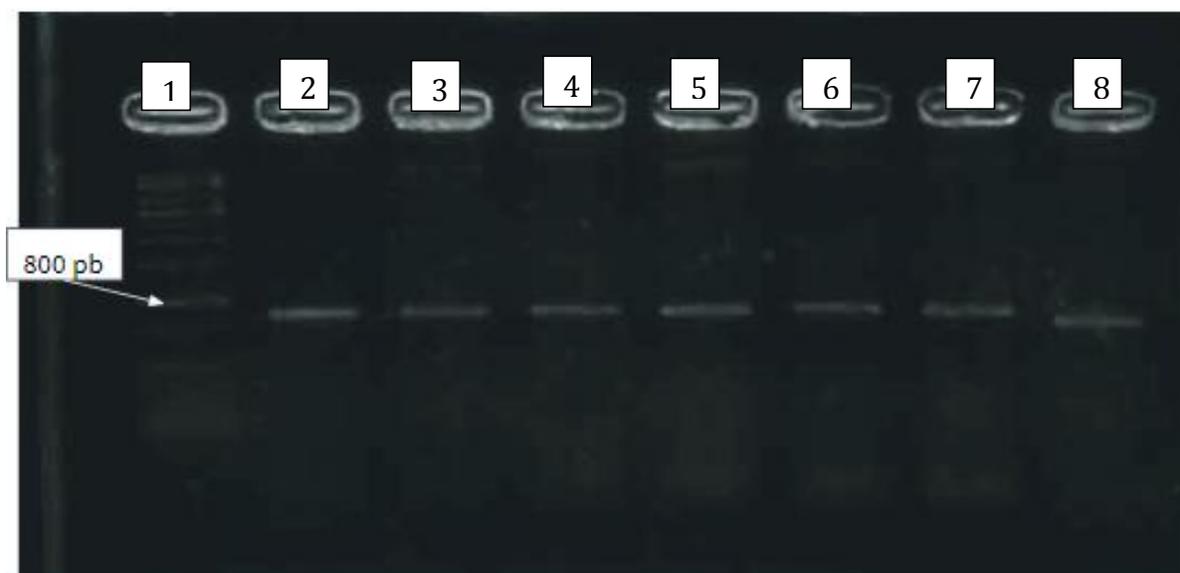


Figura 5.1 Estandarización del gen GES-5; donde se aprecia en cada carril, de izquierda a primera, en el primero, el marcador de talla molecular, el segundo carril corresponde a una Temperatura de 58°C , el tercero a 57 °C y así sucesivamente. El marcador de talla molecular que se utilizó es de 100 pby fue hecho en gel de agarosa al 1.5 %, utilizando bromuro de etidio y rayos UV para poder visualizar el gel con un voltaje de 80 V durante 1 hora.

## 7. Análisis estadístico

Se utilizó el modelo de Mann-Whitney, relacionando la CMI de meropenem e imipenem relacionado con la presencia del gen GES-5, con una confianza del 95 % y una significancia mayor a 0.5, hay relación entre las variables.

**Cuadro 7. Estadística de la resistencia de los carbapenémicos Imipenem y Meropenem relacionado con CMI en el Hospital Central Militar y Hospital General CMN La Raza, utilizando modelo de Mann-Whitney.**

<b>Carbapenémicos</b>	<b>Hospital Central Militar</b>	<b>Hospital General CMN La Raza</b>
<b>Meropenem</b>	0.732	0.263
<b>Imipenem</b>	0.041	0.731

## DISCUSIÓN.

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno que en los últimos años se ha convertido en una amenaza para la salud pública, principalmente para los pacientes inmunocomprometidos de Unidades de Cuidados Intensivos [31]. Posee resistencia adquirida por transferencia horizontal (vía extrínseca); de la misma manera la adquiere por medio de múltiples determinantes cromosómicos (vía intrínseca). Entre estos mecanismos se encuentra la hiperproducción inducible de cefalosporinasa AmpC, la producción de bombas de eflujo y la reducción de porinas, provocando resistencia a distintos tipos de antibióticos [21,32, 33, 34, 35].

Los autores Kanayama, Telling, Schäfer y Polotto coinciden en que las muestras provenientes del aparato respiratorio son predominantes, al igual que en el Hospital Central Militar (HCM) [31,32, 33,37].

Las muestras provenientes del tracto urinario son el segundo tipo que más predomina en HCM, coincidiendo con Polotto y Schäfer [33,34] y en el Centro Médico Nacional (CMN) La Raza es la más predominante.

También proviene de sangre, heridas, biopsias, líquido Cefalorraquídeo (LCR), catéter. *P.aeruginosa* es un patógeno oportunista, como podemos observar el área que ataca más no sólo en México, si no en varias regiones del mundo es en el aparato respiratorio, siendo la condición más común la fibrosis quística, seguido infecciones en tracto urinario y bacteriemias por mala higiene al aplicar catéter [30].

⋮

En el HCM, la sala donde más aislados hubo fue Terapia Intensiva con 22.53%, coincidiendo con los resultados obtenidos de Kanayama con un porcentaje de 22%; Schäfer 66.7% y Picao con 58.13%. [31, 33]

Los tipos de sala de cirugía donde se obtuvieron muestras en el HCM son de cirugía para hombres y Cirugía cardiotorácica con 2.82% cada una, mientras que en el CMN La Raza fue Cirugía General con 9.09%, Neurocirugía

11.69%, Cirugía Plástica y reconstructiva con 2.60 %, y Cirugía Maxilofacial en 1.30 %. Kanayama menciona 2 salas, de las cuales obtuvo 13 y 17% de los aislados clínicos, similar a la sala de neurocirugía y Cirugía General en La Raza y Picao obtuvo el 2.33% de los aislados clínicos provenientes de salas de Cirugía en un 2.33%, Similar a las salas de cirugía para hombres y cirugía cardiorádica del HCM y Cirugía Plástica y Maxilofacial del CMN La Raza. [31,34]. En el CMN La Raza fue Urología 25.97% donde se obtuvo mayor concentración de los aislados clínicos [31,33,34]. El autor Picao obtuvo el 2.33% de sus aislados clínicos en el área de Hemodiálisis, siendo el doble que del CMN La Raza con 1.30%.

La resistencia adquirida por medio de transferencia horizontalmente son las betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y carbapenemasa. Los genes que codifican las BLEE y las carbapenemasas se encuentran generalmente en los integrones de clase 1 junto con los determinantes de la resistencia a los aminoglucósidos. [35]

La presencia de la bomba MexAB-OprM juega un papel en la reducción de la susceptibilidad de los betalactámicos y las fluoroquinolonas [35].

Las cefalosporinas más empleadas por ambos Hospitales fueron Cefepime y Ceftazidime, teniendo mayor porcentaje de resistencia en el HCM (83.01 % y 76.06 %), al igual que en los estudios realizados por Kanayama, Polotto y Rafie [31,37, 38]. La resistencia de ceftazidime (26.67%) fue más baja en el CMN La Raza, coincidiendo con Telling obteniendo un 26.1%. [32].

GES-5 es una BLEE y carbapenemasa del tipo A según la clasificación de Ambler. Con respecto a las BLEE de tipo GES, aunque estas enzimas no se consideran  $\beta$ -lactamasas primarias en *P. aeruginosa*, la adquisición en condiciones de presión antimicrobiana puede ser beneficiosa [39]. GES-5 se encontró en el HCM en un 45.45 % mientras que en el CMN La Raza se encuentra en un 67.41 %. Polotto obtuvo 1% del gen GES-5 entre los aislados, pero obtuvo más de CTX-M-2 (9.6

%).CTX-M-2 y PER -1 son BLEE de Clasificación según Ambler [40]. Aunque su perfil de resistencia sea similar, en este estudio no se encontró ningún aislado clínico que posea este gen [37]. Rafiee obtuvo 21.6 % de PER-1, pero en este estudio tampoco se encuentra este gen en los aislados clínicos de ambos Hospitales. Mientras tanto, en 2 publicaciones de Telling obtuvo el 1% de GES [32] Y 3% [40] en Estonia. En ambos casos, lo que se puede inferir es que el gen GES - 5 tiene una pequeña influencia en la resistencia a las cefalosporinas , ya que en los estudios de los autores citados se encuentran enzimas diferentes, como por ejemplo ; Telling encontró en sus aislados OXA-2 y OXA 101. (28, 37). Otro mecanismo que presenta *P.aeruginosa* son las bombas de eflujo; del tipo MexXY para cefepime y los aminoglucósidos [35].

Los carbapenémicos presentaron un alto porcentaje de resistencia en el HCM con Imipenem 71.83 %, Meropenem 77.47 % coincidiendo con los resultados de los estudios de Rafiee y Polotto [37,38]. Estadísticamente, con una significancia mayor 0.05, La presencia del gen GES-5 influye en la resistencia de Meropenem, pero no de Imipenem. El 45.45 % de los aislados clínicos de este Hospital contiene este gen. En el CMN La Raza mostró Imipenem 32.47 %, Meropenem 55.84 %, coincidiendo con los estudios realizados por Telling, Kanayama y Shahbazzadeh [36, 39, 40]. A diferencia del Hospital CMN La Raza, en ambos carbapenémicos el gen influye en la resistencia; y presenta un 67.41 %. Otros tipo de enzima que podrían estar presentes son las MBL. Las que se han reportado en *P.aeruginosa* son: IMP, VIM, SPM, GIM, NDM, GIM. La reportada en México es VIM en el periodo de 2005 - 2010. [42]

La presencia de AmpC influye en la susceptibilidad reducida de Imipenem ya que la estabilidad hidrolítica de este antibiótico se ve afectada hasta cierto punto por su alta potencia inductora . La inactivación de la porina oprD impulsa la resistencia a imipenem y reduce la susceptibilidad de meropenem. La combinación de sobreexpresión de MexAB-OprM e inactivación de OprD es una de las principales causas de resistencia al meropenem entre las cepas clínicas[32,34,35,37, 41].

La resistencia a las penicilinas (Ampicilina y Piperacilina), En el CMN La Raza obtuvo una gran porcentaje (62.43%) mientras que en el HCM (1.41%) en la resistencia a la ampicilina fue baja. En Piperacilina ambos son de 31.17% y 23.94% respectivamente; el autor Khan et al obtuvo un porcentaje de resistencia similar (21%), de los aislados Australianos [45], al igual que Shabazzadeh que obtuvo 19.8 %. [40]

En los inhibidores de betalactamasas, la combinación de Sulbactam y Amoxicilina fue la más resistente en el CMN La Raza, mientras que en el HCM la combinación que presentó mayor porcentaje de resistencia fue Piperacilina con Tazobactam, (73.24 %), coincidiendo con Polotto con un 80% y Raffie con 88% [37,38].

Picao se aproximó en el nivel de resistencia a Aztreonam del HCM. [34].

En cuanto a los aminoglucósidos, el HCM obtuvo Gentamicina 71.83 %, Amikacina 66.20 %, Tobramicina 76.06 %, un porcentaje alto, que coincide con Polotto [33] a comparación con el CMN La Raza Gentamicina 25.97 %, Tobramicina 18.18 % que coincide con Kanayama, Telling y Tobramicina con Khan [36, 43, 45].

Además de la presencia de la bomba de eflujo MexXY [35], la resistencia por medio horizontal se encuentra por medio del integrón de clase 1, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio ya que GES-5 puede estar en plásmidos e integrones. Las más comunes son las acetiltransferasas de clase AAC (3) que pertenece a gentamicina y AAC (6) que pertenece a amikacina y tobramicina, en las cuales se ha reportado también resistencia con ciprofloxacino [35, 47] y nucleotidil transferasa ANT (2') (amikacina y tobramicina). [32,41,45].

Finalmente la resistencia en las Quinolonas Ciprofloxacino y Levofloxacino también fue más alta en el HCM a comparación del CMN La Raza, con porcentaje

de ciprofloxacina 80.21 %, Levofloxacino 76.61 %, los cuales coinciden con Polotto, Khan Rafiee [37,38,45] contra 28.57% para Ciprofloxacino y 33.77% para Levofloxacino que coincide con Kanayama y Telling del CMN La Raza [32, 38]. En ambos Hospitales no se encontró el gen CrpP, que proviene de plásmidos y codifica una fosfotransferasa que inactiva la actividad de las quinolonas. Se ha reportado por Chavez-Jacobo que las quinolonas pueden adquirir resistencia horizontal por medio de transferencia de plásmidos que acarrean el gen CrpP [27]. Las cepas que pertenecen al HCM y CMN La Raza no contienen este gen, lo que sugiere que la resistencia podría provenir intrínsecamente, por medio de determinantes Qnr.

Surge con frecuencia mutaciones en ADN girasas (GyrA y GyrB) y topoisomerasas de tipo IV (ParC y ParE). También influye la sobreexpresión [32,35, 41,44,45].

En el estudio de Fornou encontró bombas de eflujo de múltiples fármacos involucrados en la proteína de fusión de membrana (*mecX*), el transportador de membrana (*mexD*), la proteína de la membrana externa (*oprJ* y *oprN*) y el regulador transcripcional (*nfxB*). También está involucrado el sistema de bomba MexC-MexD-OprJ. [44]

Khan además de CrpP, encontró qnr VC1 aislamientos indios pero no australianos. Este gen de resistencia a las fluoroquinolonas se ha informado en aislamientos de quemaduras y se ha identificado como transportado en un integrón [44].

## CONCLUSIÓN:

La resistencia de los aislados clínicos de *P.aeruginosa* a - lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas; no es mediada solamente por enzimas, sino también posee otros mecanismos como la pérdida de porinas, bombas de eflujo y mutaciones en el sitio blanco.

La resistencia que se encontró mediada por enzimas fue adquirida por transferencia horizontal, mediada por plásmidos.

.

## ANEXOS:

### ANEXO 1: METODOLOGÍA: Extracción de DNA con el método de Tiocianato de Guanidina (TG)

1. Sembrar por estría masiva un inóculo de *P.aeruginosa* en un medio enriquecido (Agar soya Trypticasa) en media caja petri.
2. Incubar por 24 h a 37°C
3. Colectar en 1.0 mL de solución salina 0.85% la cepa de *P.aeruginosa* en un tubo Ependorff de 3.0 mL.
4. Calentar el tubo a la temperatura de ebullición durante 7 min.
5. Adicionar 1 mL de solución de lisis.
6. incubar a una temperatura de 60 - 65 °C durante 2 h
7. Adicionar 500  $\mu$ L de TG y 25  $\mu$ L de sarcosinato de sodio 5%. Mezclar por inversión a temperatura ambiente durante 5 min.
8. Transcurridos los 5 minutos se colocan los tubos en hielo por 5 min.
9. Se adicionan 250  $\mu$ L de acetato de amonio. Se mezcla por inversión a temperatura ambiente durante 5 min.
10. Repetir paso 8.
11. Se adicionan 500  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo/ alcohol isoamílico 24:1
12. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min
13. Recuperar la fase acuosa.
14. Repetir 2 veces más paso 12 y 13
15. Adicionar 200  $\mu$ L de isopropanol frío e incubar durante toda la noche.
16. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min.
17. Decantar
18. Lavar la pastilla 2 veces con etanol al 70%.
19. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min.
20. Secar al aire durante 2 h.
21. Disolver la pastilla en 100 $\mu$ L de agua inyectable.
22. Calentar a 60°C durante 25 minutos.

## **ANEXO 2: Metodología: Extracción de plásmidos**

1. Cosechar crecimiento de un cultivo de 24 h.
2. Transferir 2 mL de medio LB con antibiótico.
3. Incubar toda la noche a 37°C con agitación constante.
4. Centrifugar 12000 rpm durante 2 min.
5. Conservar el remanente de cultivo a 4°C.
6. Homogeneizar el medio con aspiración.
7. Resuspender el paquete en 100  $\mu$ L de solución fría y asegurarse de la solución total (usar vortex) .
8. Agregar 200  $\mu$ L de solución II (en frío incubar 5 min). Invertir y mezclar 5 veces (sin usar vortex) rápidamente.
9. Agregar 150  $\mu$ L de solución III fría.
10. Cerrar el tubo y resuspender 10 s para dispensar la solución III.
11. Colocar en hielo 5 min
12. Centrifugar 10000 rpm durante 10 min.
13. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
14. Centrifugar 12000 rpm durante 2 min a 4°C.
15. Transferir el sobrenadante en un tubo nuevo.
16. Precipitar el ADN con isopropanol frío. Incubar toda la noche a 4°C.
17. Centrifugar 12000 rpm durante 2 min a 4°C.
18. Remover el sobrenadante.
19. Agregar 150 $\mu$ L de etanol al 70% a 4°C: Remover el sobrenadante y secar el DNA durante 10 min
20. Disolver el DNA con 50  $\mu$ L de agua inyectable.
21. Congelar el DNA a 2 °C.

### **SOLUCIONES:**

Solución I: 25 mM de dextrosa, 10 mM de tris pH 8 y 1mM EDTA.

Solución II: 10 M Hidróxido de potasio, 0.5% de SDS (Dodecil sulfonato de sodio)

Solución III: Acetato de potasio 10 M y ácido acético 5 M

### ANEXO 3: Resultados

**Cuadro anexo 3.1 Nivel de resistencia por concentración mínima Inhibitoria (CMI) hacia varios antibióticos en aislados clínicos de *P.aeruginosa* del Hospital Central Militar.**

Antibiótico	Resistente			Sensible		
Betalactámicos	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) (			CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
Penicilinas:	128	$\geq 64$	$\geq 32$	$\leq 16$	-	-
Ampicilina	0	0	0	0	-	-
Piperacilina	1	8	8	9	-	-
Penicilinas + inhibidor	128	$\geq 64$	$\geq 32$	$\leq 16$	-	-
SAM	0	1	1	0	-	-
PTZ	3	46	3	0	-	-
TAC	1	0	0	15		
Cefalosporinas	$\geq 64$	$\geq 32$	$\geq 16$	$\geq 8$	$\geq 4$	$\geq 1$
Cefepime	6	1	52	8	3	1
Ceftazidime	0	0	54	1	3	5

**Cuadro anexo 3.1 Nivel de resistencia por concentración mínima Inhibitoria (CMI) hacia varios antibióticos en aislados clínicos de *P.aeruginosa* del Hospital Central Militar.**

<b>Antibiótico</b>	<b>Resistente</b>			<b>Sensible</b>		
<b>Betalactámicos</b>	<b>CMI (µg/mL) (</b>			<b>CMI (µg/mL)</b>		
Ceftriaxona	1	1	1	0	0	0
Cefazolina	4	1	0	0	0	0
Monobactámico	≥16	-	-	≤8	-	-
Aztreonam	30	-	-	4	-	-
Carbapenemes	≥16	≥8	4	2	≤1	
Imipenem	2	49	0	1	12	-
Meropenem	5	49	1	3	10	-
Aminoglucósidos	≥64	≥32	≥16/8	≤16/8	≤4	≤2/1
Gentamicina	0	2	5/44	0	16	2/0
Amikacina	4	43	0	19/3	0	0
Tobramicina	0	2	7/45	0	13	0/3
Quinolonas	≥8	≥4	≥2	≤2	≤1	0.5
Ciprofloxacino	0	4	53	0	11	1

Levofloxacino	1	53	0	10	0	0
Moxifloxacino	1	0	0	0	0	0

**Cuadro anexo 3.2. Nivel de resistencia por concentración mínima inhibitoria (CMI) hacía varios antibióticos en aislados clínicos de *P.aeruginosa* Hospital de especialidades CMN La raza**

Antibiótico/CMI	Resistente			Sensible		
Betalactámicos	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )			CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
Penicilinas	128	$\geq 64$	$\geq 32$	$\leq 16$	-	-
Ampicilina	0	0	48	0	-	
Piperacilina	24	0	0	0	-	-
Penicilinas + inhibidor	128	$\geq 64$	$\geq 32$	$\leq 16$	8	$\leq 4$
SAM	0	0	73	0	0	0
PTZ	0	3	3	2	21	5
TAC	20	1	1	2	3	0
Cefalosporinas	$\geq 64$	$\geq 32$	$\geq 16$	$\geq 8$	$\geq 4$	$2/\geq 1$
Cefepime	35	1	8	7	6	6/14
Ceftazidime	12	0	7	5	17	4/7

**Cuadro anexo 3.2 Nivel de resistencia por concentración mínima inhibitoria (CMI) hacia varios antibióticos en aislados clínicos de *P.aeruginosa* Hospital EspecialidadesCMN La raza.**

<b>Antibiótico/CMI</b>	<b>Resistente</b>			<b>Sensible</b>		
<b>Betalactámicos</b>	<b>CMI (µg/mL)</b>			<b>CMI (µg/mL)</b>		
Cefezima	12	0	0	0	12	0/0
Monobactámico	≥16	-	-	≤8	-	-
Aztreonam	0	-	-	0	-	-
Carbapenemes - Imipenem -Meropenem	≥16	≥8	4	2	≤1	≤0.5/0.25
	22	3	0	23	7	0
	30	3	10	3	10	4/13
<b>Aminoglucósidos</b>	≥16	8	-	4	2	≤1
Gentamicina	12	8	5/44	3	2	26
Tobramicina	12	2	-/-	0	0	35
<b>Quinolonas</b>	≥8	≥4	≥2	≤2	≤1	≤0.5/0.25
Ciprofloxacino	0	19	3	0	3	13/14
Levofloxacino	24	2	0	0	0	0
Moxifloxacino	42	2	0	15	8	3/3

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AMP: Ampicilina

AMK: Amikacina.

ATM: Aztreonam.

ARNr: Ácido Ribonucleico ribosomal

BLEE: Betalactamasa de Espectro Extendido.

CAZ: Ceftazidime.

CEF: Cefixima.

CFZ: Cefazolina.

CIP: Ciprofloxacino.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

CMN: Centro Médico Nacional.

CRO: Cefotaxima.

CTX: Cefotaxime.

EDTA: Etilendiamino Tetraacetato.

ETA: Exotoxina A.

FEP: Cefepime.

GEN: Gentamicina.

GES: Guyana Extended Spectrum.

IAAS: Infecciones Asociadas a Atención a la Salud.

IMP: Imipenem

ITU: Infecciones de Tracto Urinario.

IVU: Infección de Vías Urinarias.

LCR: Líquido Cefalorraquídeo.

LVX: Levofloxacino.

MDR: Multidrogorresistente.

MEM: Meropenem.

MOX: Moxifloxacino.

OXA: Oxacilina.

PCR: Polymerase Chain Reaction : Reacción de Cadena de la Polimerasa

PDR: Pan drogorresistente.  
PER: *Pseudomonas* Extended Resistance.  
PIP: Piperacilina.  
PTZ: Piperacilina con tazobactam  
SAM: Sulbactam con Amoxicilina.  
SHV: Sulfhidric terminal variant.  
TAC: Ticarcilina con ácido clavulánico.  
TEM: Temereira.  
TOB: Tobramicina.  
TSI: Triple Sugar Iron: Triple Azúcar con Hierro  
UV: Ultravioleta  
VIM: Verona Integron Metalobetalactamasa.  
VITEK:  
XDR: Extremodrogorresistente.

## REFERENCIAS:

1. Brooks G.F, Carroll K.C, Butel J. S, Morse S.A, Mietzner T.A. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. 25 ed. Ciudad de México: McGraw - Hill; 2011 pp. 227 - 230
2. Murray P.R. Rosenthal K.S. Pfaller M.A. Microbiología médica. 8ed. España: Elsevier; 2017 pp 162 – 163; 272 - 27
3. Pseudomonas aeruginosa, P. putida, P. fluorescens; Morfología, medios de cultivo, enfermedades y más. [Internet] Microbitos. 2017 [Citado el 28 de enero del 2019] A partir de: <http://microbitosblog.com/2015/04/28/pseudomonas-aeruginosa-p-putida-p-mfluorescens-morfologia-medios-de-cultivo-enfermedades-y-mas/>
4. Herve B. 2015. Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. [REV. MED. CLIN. CONDES - 2015; 26(6) 753-763]
5. Bou G, Fernandez-Olmos A, Garcia C, Saez-Nieto J, Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(8):601–608
6. Saha, S., R. Thavasi and S. Jayalakshmi, 2008. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants.. Res. J. Microbiol., 3: 122-1
7. Cano Luz Elena. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. Infect. 2008 ; irr 12( 2 ): 128-148
8. Arias-Flores R, Rosado-Quiab U, Vargas-Valerio A, Grajales-Muñiz C. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2016;54(1):20-4; 2016
9. Hernández A, Yagüe G, García E, Simón M, Moreno L, Canteras M, Gómez J. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. Sociedad española de Quimioterapia, 2017.
10. Alerta epidemiológica. Brotes por microorganismos resistentes relacionados al turismo médico. [Internet] Organización Panamericana de la salud (Citado el 26 de julio de 2021) A partir de : file:///C:/Users/Usuario/Downloads/2019-abril-16-phe-alerta-epi-brotes-infeccion-microorganismos-resistentes.pdf
11. Oliver A. Epidemiología y mecanismos de resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*: papel de los clones de alto riesgo en la multirresistencia. Enferm Infecc. Microbiol. Clin. 2017;35(3):137–138
12. Mensa J, Barberán J. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. Rev Esp Quimioter. 2018 1(1): 78 -100
13. Pérez-Cano H, Robles-Contreras. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia. Rev Med 2013 4(3):186 -191
14. Cejas D., Almuzara M., Santella G., Tuduri A., Palombarani S., Figueroa S. et al . Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem

- en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Rev. argent. microbiol.* 2008; 40( 4 ): 238-245.
15. Ford N, *Medical Microbiology*. 2ed. United Kingdom: Oxford; 2014. Pp 63-67
  16. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Jan;13(1):42-51.
  17. Abarca Gabriela, Herrera Marco Luis. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* . 2001 ; 36( 1-2 ): 77-104.
  18. Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes *Rev Panam Salud Publica.* 2019;43:e65.
  19. Labuschagné CJ, Weldhagen GF, Ehlers MM, Dove MG, Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents* 2008;527 -530 doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.020
  20. Nicolau C y Oliver A. Carbapenemasas en el género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(Supl 1):19-28
  21. Hishinuma T, Tade T, Kuwahara K, Tumamoto N, Shimojima M, Kirikae T. Spread of GES-5 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan due to clonal expansion of ST235. *PLOS ONE* 13 (11):2018
  22. Tato M, Valverde A, Coque TM, Cantón R. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de PER-1 en España. 2006 Elsevier Vol 24, 411-478 doi:10.1157/13091791
  23. Empel J, Filczal K, Mrówka A, Hryniewicz W, Livermore D, Ganiadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with PER-1 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in Warsaw, Poland: Further Evidence for an International Clonal Complex. *Journal of Clinical Microbiology* Sep 2007, 45 (9) 2829-2834; **DOI:** 10.1128/JCM.00997-07
  24. Busdak F, Kasap M, Kolali F, Karadenizli A, Vahaboglu M. Integron-associated resistance genes among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens 2012; 42 (1): 149 - 156. *Turk J Med Sci*
  25. Giuseppe Celenza, Cristina Pellegrini, Marisa Caccamo, Bernardetta Segatore, Gianfranco Amicosante, Mariagrazia Perilli, Spread of *bla*CTX-M-type and *bla*PER-2  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 57, Issue 5, May 2006, Pages 975–978

26. A. PEYMANI, T. NASERPOUR-FARIVAR, E. ZARE, KH. AZARHOOSH. Distribution of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes among ESBL-producing *P.aeruginosa* isolated from Qazvin and Theran hospitals, Iran. *J prev med hyg*: 2017
27. Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Romo-Rodríguez P, Pérez-Gallardo RV, Campos-García J, Gutiérrez-Corona JF, García-Merinos JP, Meza-Carmen V, Silva- Sánchez J, Ramírez-Díaz MI. 2018. CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e02629-17.
28. Ventola, C Lee. "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats." *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* vol. 40,4 (2015): 277-83.
29. Galván-Meléndez MF, Castañeda-Martínez LY, Galindo-Burciaga M, Morales-Castro ME. Infecciones asociadas con la atención de la salud y su resistencia antimicrobiana. *Rev Esp Med Quir [Internet]* 2017 [Citado el 28 de enero de 2019] Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2017/rmq171a.pdf>
30. Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades nosocomiales. México 20 de noviembre de 2009
31. Kanayama A, Kawahara R, Yamagishi T, Goto K, Kobaru Y, Takano M, Morisada K, Ukimura A, Kawanishi F, Tabuchi A, Matsui T, Oishi K. Successful control of an outbreak of GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a long-term care facility in Japan. *J Hosp Infect.* 2016 May;93(1):35-41.
32. Telling K, Laht M, Brauer A, Remm M, Kisand V, Maimets M, Tenson T, Lutsar I. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Estonian hospitals. *BMC Infect Dis.* 2018 Oct 11;18(1):513.
33. Schäfer, E., Malecki, M., Tellez-Castillo, CJ *et al.* Molecular surveillance of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* at three medical centres in Cologne, Germany. *Antimicrob Resist Infect Control* 8, 208 (2019)
34. Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Sep;53(9):3908-13
35. Juan P. Horcajada, Milagro Montero, Antonio Oliver, Luisa Sorlí, Sònia Luque, Silvia Gómez-Zorrilla, Natividad Benito, Santiago Grau. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Microbiology Reviews* Aug 2019, 32 (4) e00031-19
36. Elhariri, M., Hamza, D., Elhelw, R. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in camel in Egypt: potential human hazard. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16, 21 (2017).
37. Polotto, M., Casella, T., de Lucca Oliveira, M.G. *et al.* Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis* 12, 176 (2012).

38. Rafiee R, Eftekhari F, Tabatabaei SA, Minaee Tehrani D. Prevalence of Extended-Spectrum and Metallo  $\beta$ -Lactamase Production in AmpC  $\beta$ -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Burns. *Jundishapur J Microbiol.* 2014 Sep;7(9):e16436.
39. Telling, K., Laht, M., Brauer, A. *et al.* Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Estonian hospitals. *BMC Infect Dis* 18, 513 (2018)
40. Chen Z, Niu H, Chen G, Li M, Li M, Zhou Y. Prevalence of ESBLs-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different wards in a Chinese teaching hospital. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Oct 15;8(10):19400-5.
41. Shahbazzadeh M, Moazamian E, Rafati A, Fardin M. Antimicrobial resistance pattern, genetic distribution of ESBL genes, biofilm-forming potential, and virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the burn patients in Tehran Hospitals, Iran. *Pan Afr Med J.* 2020 Jul 30;36:233.
42. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.* 2015;47(2):81-97
43. Founou RC, Founou LL, Allam M, Ismail A, Essack SY. First report of a clinical multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST532 isolate harbouring a ciprofloxacin-modifying enzyme (CrpP) in South Africa. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020 Sep;22:145-146.
44. Khan, M.; Stapleton, F.; Summers, S.; Rice, S.A.; Willcox, M.D.P. Antibiotic Resistance Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Keratitis in Australia and India. *Antibiotics* **2020**, *9*, 600