



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**FRECUENCIA DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS
DE MEMBRANA EXTERNA, Y MALATO DESHIDROGENASA
ASOCIADOS AL INTEGRÓN CLASE 2 EN CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa.**

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:

DANA CELIC TOLEDO ARANDA

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

Proyecto financiado por la DGAPA, PAPIIT 203723

Tlalnepantla, Edo. México Abril 2023



Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA



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.

DEDICATORIA

A mi padre que siempre me ha enseñado el valor de la disciplina, y la perseverancia en la vida. Llenarme de amor y protección, y sonrisas interminables. A mi madre que siempre me ha dado su amor incondicional, por escucharme, confiar y creer en mí. Gracias por ser mis más grandes maestros en esta vida, ser mi mayor soporte y darme los valores y enseñanzas que me ayudan para cumplir mis objetivos, ustedes son las personas que más admiro. No hay palabras suficientes para agradecer todo lo que han hecho por mí. Soy la mas afortunada por tenerlos a ustedes en mi vida.

A mi hermana que ha sido un gran ejemplo, una gran maestra para mi vida sobre lo que quiero hacer y a donde quiero llegar. Eres una inspiración para mí. Mi más grande compañera y cómplice. Gracias por cuidarme siempre. Me llena de orgullo verte cumplir cada meta manteniendo tus convicciones firmes. Soy y siempre seré tu fan #1.

A mis tías Blanca, Elia, Leonor y mi tío Pancho, que siempre están dispuestos para apoyarme en mi crecimiento y hacerme sentir muy amada desde que nací, admiro su fortaleza, templanza y astucia.

A mi abuela por ser un pilar importante en mi crecimiento y de la familia, que me ha enseñado sobre la fortaleza del espíritu.

A Mauricio y Rodrigo por ser personas que desde pequeños y a lo largo de la vida me han enseñado mucho, verlos crecer es un gran aprendizaje para mí.

A Carlos por llegar a mi vida, eres un gran compañero en mi vida, gracias por quererme, estar ahí en los momentos indicados y compartirme de tu conocimiento. Por transmitirme una bella tranquilidad sacando la mejor versión de mí.

A Snupy que ha sido de mis grandes sujetos de motivación y fuerza. A Alfa, Akira y Sajani por ser mis días más alegres.

Gracias a Dios y a cada uno me ha ayudado a forjarme como persona. Gracias por formar parte de mi vida, los amo mucho y los admiro, ustedes son mi luz.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras y al Dr. Eric Monrroy Pérez por fomentar mi crecimiento y aprendizaje, dentro y fuera del laboratorio.

A Paty y a Susy por apoyo en el procesamiento de los cultivos bacterianos durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigas del laboratorio por la convivencia tan increíble, además de por ser un gran equipo de trabajo.

A la FESI-UNAM y al programa PAPIIT por financiar los recursos que utilice en el laboratorio.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| Patogenicidad | 9 |
| Factores de virulencia | 9 |
| Detección de quórum | 10 |
| Biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> | 11 |
| Proteínas de membrana externa (OMP) | 12 |
| Sistemas de secreción | 13 |
| Resistencia a los antibióticos | 13 |
| Mecanismo de resistencia a los antibióticos | 15 |
| Bombas de eflujo | 16 |
| Cambios de la permeabilidad en la membrana externa | 16 |
| Enzimas β -lactamasas inactivadoras de los antibióticos | 17 |
| Integrones | 18 |
| JUSTIFICACIÓN | 19 |
| ANTECEDENTES | 20 |
| OBJETIVO GENERAL | 22 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 22 |
| METODOLOGÍA | 23 |
| Obtención de las cepas de pacientes con diferentes procesos infecciosos | 23 |
| Extracción de DNA bacteriano | 23 |
| Determinación de la Resistencia a los Antibióticos | 24 |
| Identificación de <i>P. aeruginosa</i> por PCR punto final | 25 |
| Detección de los genes de membrana externa por PCR de punto final | 25 |
| Detección por PCR de punto final del gen asociado a la resistencia en <i>P. aeruginosa</i> | 26 |
| Electroforesis en gel de agarosa y lectura de amplicones de genes | 26 |
| Detección del gen que codifica la enzima malato deshidrogenasa mediante PCR en tiempo real | 27 |
| Análisis Estadístico | 28 |
| RESULTADOS | 28 |
| Pacientes y diagnósticos clínicos | 28 |
| Identificación de <i>P. aeruginosa</i> mediante PCR de punto final | 30 |
| Resistencia a los antibióticos | 31 |

| | |
|--|----|
| Detección de los genes de virulencia y del integrón de clase 2 | 32 |
| Distribución de de los genes de virulencia e integrón clase 2 asociados a los diferentes diagnósticos clínicos | 35 |
| DISCUSIÓN | 37 |
| Pacientes estudiados | 37 |
| Multidrogo-resistencia | 38 |
| Frecuencia de genes de virulencia | 39 |
| Frecuencia del integrón de clase 2 | 40 |
| CONCLUSIONES | 41 |
| BIBLIOGRAFÍA | 42 |

RESUMEN

La emergencia de cepas hospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa* hipervirulentas y multidrogo-resistentes es un serio problema de salud que incrementa los índices de mortalidad, sobre todo en los pacientes inmunocomprometidos. Los objetivos de este estudio fueron determinar el fenotipo de resistencia a los antibióticos en cepas hospitalarias de *P. aeruginosa*, así como establecer molecularmente la frecuencia de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa (*oprL* y *oprI*), el gen malato deshidrogenasa (*mdh*), y su asociación con el integrón de clase 2 (*Int2*). Las cepas de *P. aeruginosa* fueron identificadas por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante amplificación del gen *16rRNA*. La determinación de la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en las cepas se realizó por el método de Kirby-Bauer. Los genes *oprL*, *oprI*, *mdh* e *int2* fueron identificadas por PCR. El 98% de las cepas fue resistente a carbenicilina, 97% a la ampicilina, cefalotina y trimetoprim/sulfametoxazol, en cada caso, 96% a nitrofurantoína, 91% a cloranfenicol, 89% a cefotaxima, 86% a netilmicina, 53% a la amikacina, 51 % a norfloxacin, 50% a gentamicina y 49% a ciprofloxacina. Los genes *oprL* y *oprI* fueron identificados en el 100% de las cepas, *mdh* en el 95% y el gen *int2* en el 12%.

La elevada multidrogo-resistencia detectada en las cepas hospitalarias de *P. aeruginosa*, asociada a la alta frecuencia de los marcadores de virulencia, son factores que favorecen la mortalidad de los pacientes infectados, por lo que es importante mejorar los esquemas de tratamiento médico contra este importante patógeno.

INTRODUCCIÓN

El género de *Pseudomonas* fue descrito por primera vez en el siglo XIX por Walter Migula, mientras que la especie *aeruginosa* fue descrito por Schrage en 1872, haciendo alusión al color cobre oxidado, verde-azulado en ciertos medios de cultivo (Paz *et al.*, 2019). *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, aerobia facultativa, no formadora de esporas, tiene forma de bacilo, con aproximadamente 0.5 μ de ancho y 1.5-5 μ de largo (Figura 1) y presenta un flagelo polar. *P. aeruginosa* presenta un gran número de vías metabólicas y genes reguladores que le permite adaptarse a diversas condiciones ambientales y carencias nutricionales (Wu *et al.*, 2015). Tiene la capacidad de crecer en temperaturas desde 20°C a 43°C. Se caracteriza por formar parte de un grupo no fermentador y poder utilizar fuentes de carbono, acetato y amoníaco, obteniendo energía mediante la oxidación de azúcares (Paz *et al.*, 2019; Callico *et al.*, 2004). Para la respiración celular y su sobrevivencia bacteriana *P. aeruginosa*, utiliza el enzima malato deshidrogenasa, favoreciendo su multiplicación (Minárik *et al.*, 2002). Produce un pigmento llamado piocianina, no fluorescente, azul-verdoso que tiene efectos citopáticos en células de mamíferos (Figura 2), además de producir otro pigmento llamado pioverdina el cual actúa como sideróforo, que presenta una afinidad por la captación de hierro (Fe^{4+}) (Ruiz, 2007).

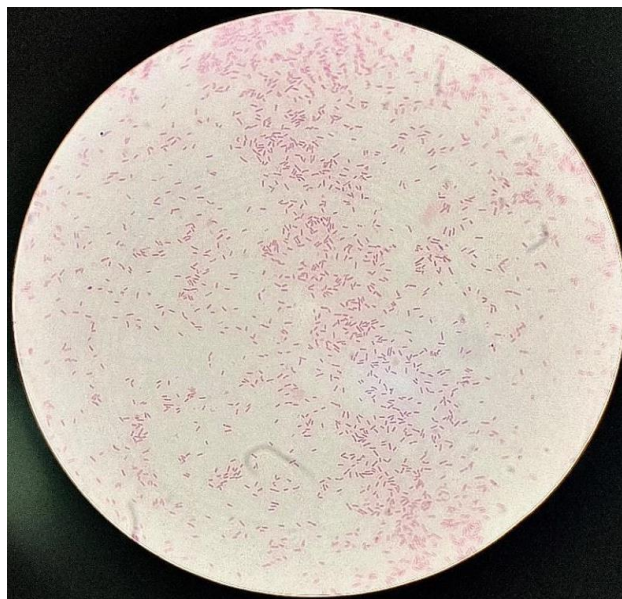


Figura 1. *P. aeruginosa* observada al microscopio óptico. Foto tomada en el laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI, FES Iztacala.

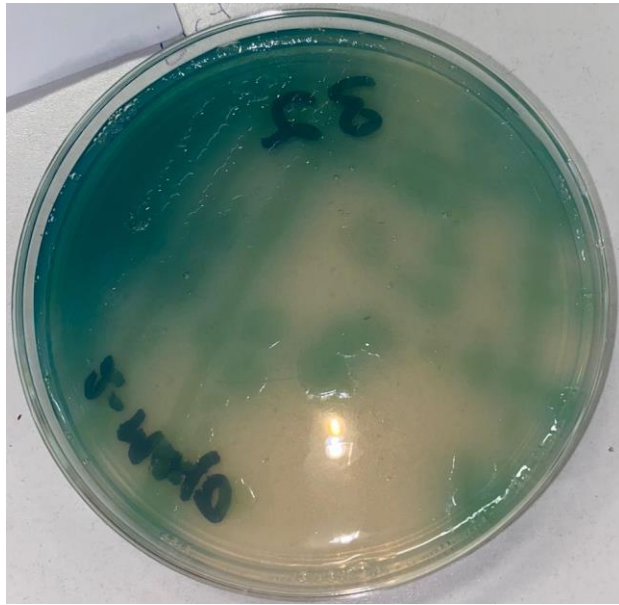


Figura 2. Cepa de *P. aeruginosa* aislada de un paciente del Hospital General Regional No. 72 (IMSS) en agar Cetrin. Foto tomada en el laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala.

El genoma de *P. aeruginosa* contiene 6,26 mbp (que codifican 5,567 genes) (Lambert, 2002) y su complemento genético incluye de 10,000 a 40,000 genes adicionales. El genoma de *P. aeruginosa* se recombina frecuentemente con genomas de cepas no relacionadas, favoreciendo su diversidad (Parkins *et al.*, 2018; Mielko *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* presenta numerosas modificaciones genéticas en su genoma en donde acumula una mediana de 3 SNP (polimorfismo de nucleótido único) por año, que varía entre 0.5 y 14 SNP por año y deleciones (indels) que oscilan entre 0.4 y 2.7 indels por año (0.1 a 0.28 indels por SNP) (Camus *et al.*, 2021). Su versatilidad adaptativa se ve beneficiada por las islas genómicas y profagos que posee, que les da la capacidad de establecerse *in vivo* (Camus *et al.*, 2021).

Patogenicidad

P. aeruginosa es considerada una bacteria oportunista, y un patógeno importante a nivel hospitalario, causantes de múltiples infecciones nosocomiales (Paz *et al.*, 2019), entre las que se encuentran bacteriemias, neumonías, infecciones del tracto urinario e infecciones quirúrgicas, principalmente en los pacientes inmunocomprometidos por quemaduras, VIH, cáncer, portadores de catéteres, nebulizadores, humidificadores, cirugías de hueso,

trasplantes de órganos, fibrosis quística (FQ) y/o enfermedades pulmonares (Panmanee *et al.*, 2008; Gross *et al.*, 2014; Paz *et al.*, 2019; Mielko *et al.*, 2019; Bush *et al.*, 2022). *P. aeruginosa* es considerado como el quinto patógeno más frecuente de las infecciones en general a nivel mundial, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitio quirúrgico y el séptimo responsable de septicemias (Paz *et al.*, 2019). También es la segunda bacteria aislada con mayor frecuencia de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) de la Red de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria (RHOVE), México (Dirección General de Epidemiología, 2023). Y es catalogada como una bacteria ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.), debido a su gran resistencia a los antibióticos de amplio espectro, complicando los tratamientos para combatir las infecciones por este patógeno (Pérez, 2020). *P. aeruginosa* ha sido descrita en la lista prioritaria de los patógenos bacterianos de situación "crítica" por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Jurado *et al.*, 2021).

Factores de virulencia

Tiene diversos factores de virulencia que le permiten invadir al hospedero y ayudarlo a protegerse de los mecanismos de acción de los antibióticos, a través del flagelo y pili tipo IV, que se encuentran en la superficie de la bacteria, las cuales son estructuras que le permiten invadir al hospedero, le proporciona motilidad, favorecen la adhesión dentro del organismo, lo que le permite colonizar diferentes superficies (Marqués, 2016; Jurado *et al.*, 2021). Además, posee genes de adhesión como, (*pilA*, *ndvB*) que codifican proteínas de adhesión, involucradas en la formación de biopelículas que protege a la comunidad de la fagocitosis y contra la acción de los antibióticos (Paz *et al.*, 2019; (Figura 3)).

Detección de quórum

La detección del quórum sensing (QS) es un sistema de comunicación entre las células, puede utilizar múltiples vías de traducción de señales para coordinar comportamientos colectivos para beneficio de las colonias bacterias y su supervivencia y adaptación (Thi *et*

al., 2020) El QS regula el ajuste metabólico, tolerancia al estrés y la regulación de expresión de genes específicos, mediante la producción secreción y acumulación de moléculas de señalización conocidas como (Als) (Thi *et al.*, 2020; Coutiño *et al.*, 2023; Hernandez, 2022). En *P. aeruginosa* existen cuatro vías diferentes en los circuitos de QS, *Las*, *Rhl*, *IQS* y *PQS*. El sistema LasR y LasI controla la producción de elastasas, las cuales generan daño tisular del hospedero. Además de que intervienen la formación de biopelículas mucoides y degradación de proteínas de la barrera defensiva del hospedero (Wei y Ma, 2013; López y Castañeda, 2022).

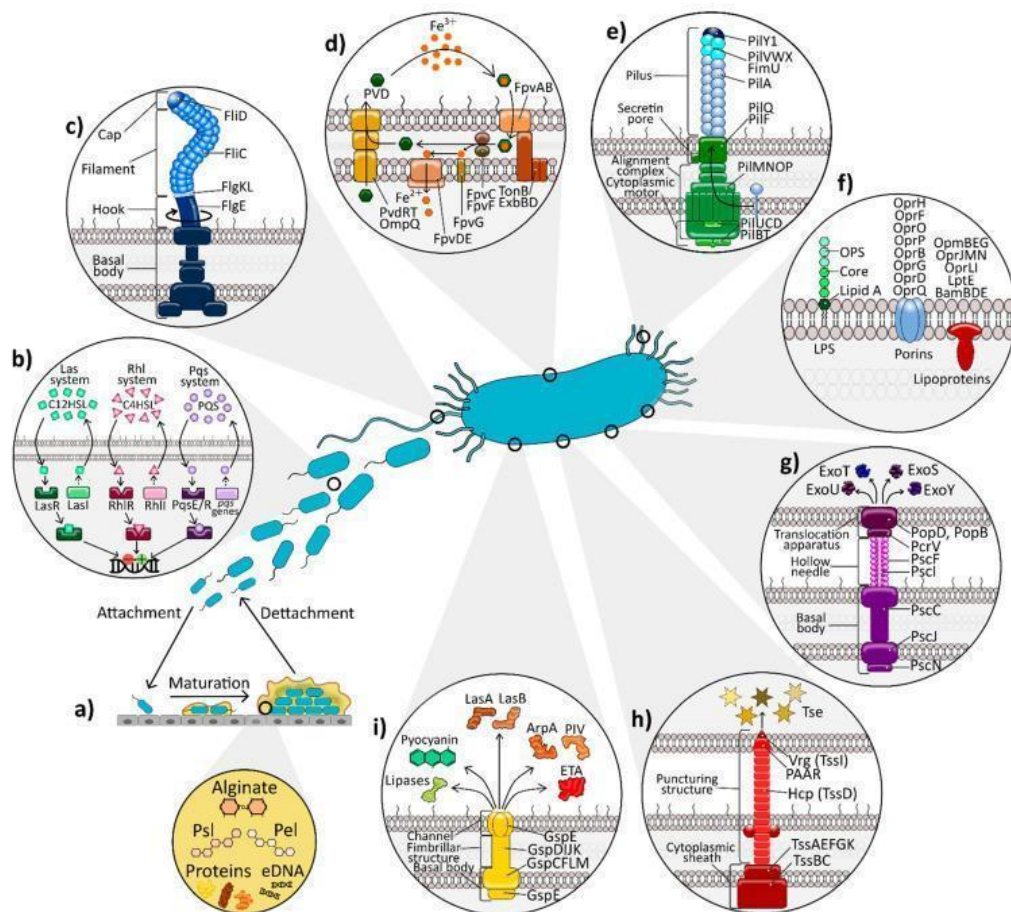


Figura 3. Esquema de factores de virulencia de *P. aeruginosa*. (**a**) Formación de biopelículas y la composición su matriz extracelular; (**b**) Los principales sistemas de detección de quórum (QS); (**c**) Flagelinas en la estructura flagelar; (**d**) Sideróforo de pioverdina como un sistema de absorción de hierro; (**e**) Pili tipo 4; (**f**) Lipopolisacárido y proteínas de la membrana externa; (**g**) El sistema de secreción tipo III (T3SS) y sus efectores principales; (**h**) El sistema de secreción tipo VI (T6SS); (**i**) el sistema de

secreción tipo II (T2SS) y los compuestos que libera al medio extracelular. (Jurado *et al.*, 2021).

Biopelícula de *P. aeruginosa*

Las biopelículas de *P. aeruginosa* tienen un papel muy importante en la patogénesis, las cuales se forman gracias al aumento de un compuesto “monofosfato de guanosina dimérico bis-(3'-5)-cíclico (c-di-GMP)” que actúa como segundo mensajero en la traducción de señales en las bacterias (Wei y Ma, 2013). Las biopelículas de *P. aeruginosa* son robustas y multifactoriales, resistentes a los antibióticos y a la respuesta del sistema inmune del hospedero ocasionando infecciones crónicas por la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos (EPS), y pueda pasar de crecimiento móvil a vida sésil asociada (Jurado *et al.*, 2021). La formación de biopelículas le permite adherirse a la superficie del hospedero. Las cepas compuestas por una matriz de polisacárido codificada por los operones *pel*, *psl* y *alg* son los encargados de la biosíntesis de polisacárido extracelular importantes en las interacciones de célula-célula y superficie-celular durante la formación y el mantenimiento de la estructura de la biopelícula. Las bacterias que se encuentran dentro de una biopelícula tienen la capacidad de escapar de las respuestas inmunes del hospedero y resistir los tratamientos antimicrobianos hasta 1000 veces más (Thi *et al.*, 2020).

Proteínas de membrana externa (OMP)

P. aeruginosa tiene una membrana externa de tipo bicapa asimétrica que le confiere la capacidad de restringir la entrada de compuestos perjudiciales con una cara externa de lipopolisacáridos con 300 proteínas (OMP) y una cara interna de fosfolípidos (Jurado *et al.*, 2021). Esta bacteria posee lipopolisacáridos (LPS) involucrados en el daño tisular del hospedero, ayudándole a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la formación de geles en las células epiteliales en vías respiratorias, aumentando la permeabilidad paracelular epitelial de vías respiratorias, activando una cascada de transducción de señales que inicia la expresión de citocinas proinflamatorias: como: TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa), IL-1 (Interleucina 1) y el IFN- γ (Interferón gamma) (Remans *et al.*, 2010).

Los genes *oprL* y *oprI* que codifican para las proteínas de membrana externa, los cuales tienen un papel importante en la invaginación de la membrana externa durante la división celular, le ayudan a mantener la integridad y estabilidad de la membrana externa de la bacteria (Fajardi *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017; Elmouaden *et al.*, 2019). El gen *oprI* codifica la lipoproteína I de la membrana externa, mientras que el gen *oprL* codifica para la proteína asociada a peptidoglucano y que se ha asociado específicamente para la identificación filogenética de las cepas de *P. aeruginosa*, además de que el gen *oprL* contribuye a la protección de la bacteria frente al estrés oxidativo (Panmanee *et al.*, 2008; Remans *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2017; Panmanee *et al.*, 2008).

Sistemas de secreción

Tiene cinco sistemas de secreción de proteínas, las cuales secretan toxinas y enzimas hidrolíticas, afectando al hospedero. Los sistemas de secreción tipo I y V (T1SS y T5SS) son las vías simples y liberan productos al medio extracelular; el tipo I libera la alcalina proteasa (*apr*) que interfiere con la activación del complemento, el tipo II (T2SS), libera una amplia diversidad de hemoproteínas. Y el más virulento, ya que aumenta la gravedad de la infección, es el tipo de secreción tipo III (T3SS) el cual es usado para desactivar y destruir el sistema inmunológico del hospedero conformado por cuatro genes de exoenzimas; los genes efectores (*exoT*, *exoY*, *exoS* y *exoU*), la exotoxina A (*toxA*) y la neuraminidasa (*nanI*) (Jurado *et al.*, 2021). El gen *exoU* es una citotoxina que está asociada a lesiones pulmonares, sepsis y la mortalidad. La actividad de los genes que codifican para las fosfolipasas (*plcH* y *plcN*) con actividad hemolítica y no hemolítica provocan lisis de eritrocitos respectivamente, y fosfolipasa A2 que destruye la membrana de la célula hospedero, ocasionando muerte celular (apoptosis) (Peña *et al.*, 2015).

Resistencia a los antibióticos

El primer antibiótico fue descrito por Alexander Fleming en 1928, por casualidad al cultivar un hongo (*Penicillium notatum*), que no permitía el crecimiento bacteriano de colonias de una bacteria patógena (*Staphylococcus aureus*), debido a que este hongo producía una sustancia que le permitía lisar a la bacteria, la cual llamó *penicilina*. Los

antibióticos a los largo de la historia han sido un tratamiento para diversas infecciones que causan gran mortalidad, por lo que desde los años 40 ha ayudado a disminuir la mortalidad y morbilidad de la gente, pensando que las enfermedades por microorganismos desaparecerían, sin embargo rápidamente comenzaron los reportes de resistencia de los antibióticos por parte de las bacterias, progresando de tal manera que la multidrogo-resistencia de bacterias ocurre en los antibióticos de fácil acceso (Tabla 1, Figura 4), hasta los antibióticos de uso restrictivo en hospitales (Balda, y Palacios, 2022).

| Familia | Antibióticos | Mecanismo de acción | Referencia |
|------------------|---|---|------------------------|
| β-lactámicos | Ampicilina, Cefalotina, Carbenicilina, Cefotaxima. | Inhibición de las fases finales de la síntesis del peptidoglucano. | Clavo y Martínez 2009. |
| Aminoglucósidos | Netilmicina, Amikacina Gentamicina. | Inhibición de la síntesis proteica en la subunidad 30S del ribosoma. | |
| Anfenicoles | Cloranfenicol | Inhibición de la síntesis proteica en la subunidad 50S. | |
| Fluoroquinolonas | Norfloxacin, Ciprofloxacina. | Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos | |
| Nitrofuranos | Nitrofurantoína | Interferir en la síntesis proteica del ribosoma 30S bloqueando el reconocimiento del codón-anticodón. | |
| Sulfanomidas | Trimetropim/Sulfa metoxazol | Bloqueo de la síntesis de ácido fólico. | |

Tabla 1. Antibióticos y su mecanismo de acción.



Figura 4. Antibiograma de *P. aeruginosa* por el método de Kirby- Bauer de 12 antibióticos. Tomada del laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI, FESI.

Mecanismo de resistencia a los antibióticos

P. aeruginosa posee sus mecanismos que le confieren resistencia a los antibióticos de forma intrínseca y la facultad de adquirir de manera exógena (adquirida) otros mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Mielko *et al*, 2019). Este patógeno puede desarrollar diferentes mecanismos de resistencia a los antimicrobianos gracias a su genoma compuesto por una parte conservada llamada “core genome”, encargada de la producción de los sistemas de transporte y la captación de nutrientes mediante enzimas, además de la gran cantidad de genes que codifican proteínas de la membrana externa, genes que codifican proteínas de adhesión, motilidad y expulsión de los antibióticos, así como otros factores de virulencia. Posee también un “genoma accesorio” compuesto por componentes extracromosómicos; como plásmidos y DNA insertado en el cromosoma por *locus*, encargados de la diversidad genética y codificar proteínas para su adaptación. Este genoma es adquirido mediante mecanismos genéticos de transferencia horizontal, conjuntamente con los genes que le confieren componentes extras en el desarrollo de resistencias a los antibióticos (Luchorro, 2020).

Entre los mecanismos de resistencia intrínsecos de *P. aeruginosa*, destacan los sistemas de bombas de eflujo a multi-drogas, la baja permeabilidad de la membrana externa y las enzimas AmpC que inactivan los antibióticos betalactámicos (Pang *et al.*, 2019), mientras que la resistencia adquirida ocurre por la transferencia horizontal de otros genes de resistencia a los antibióticos mediante plásmidos, transposones e integrones (Khosravi *et al.*, 2017), que incluyen genes de resistencia a los aminoglucósidos, betalactamasas de espectro extendido (ESBL), y las metalobetalactamasas (MBL) (Amirkamali *et al.*, 2017; Liew *et al.*, 2018). Las bacterias *P. aeruginosa* son consideradas como multidrogo-resistentes cuando son resistentes de 1 a 3 familias de antibióticos y pandrogo-resistentes (PDR) si son resistentes a todos los antibióticos listados (Jiménez *et al.*, 2019).

Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo, también conocidas como “bombas de expulsión de múltiples fármacos” son proteínas transmembranales, donde extraen los fármacos, y tienen diferentes tipos de acción (Carmona, 2022). Se clasifican en seis familias dependiendo de la homología de la secuencia de los aminoácidos y estructuras secundarias. La primera superfamilia (ABC), donde sus transportadores activos dependen de la captación de energía de hidrólisis de ATP; la familia de facilitadores principales (MFS); la familia encargada de la expulsión de toxinas y diversos fármacos (MATE); la superfamilia de resistencia de nodulación y la división celular (RND); la familia pequeña de resistencia a múltiples fármacos (SMR), que presenta una pequeña extensión de la familia de eflujo de compuestos proteobacterianos (PACE). Las bombas de eflujo pueden transportar toxinas y aumentar los factores de virulencia de la bacteria, además de facilitar la comunicación de una célula a otra célula la formación de biopelículas protectoras para la bacteria (Carmona, 2022; Marchetti, *et al.*, 2011).

Cambios de la permeabilidad en la membrana externa

Las bacterias llegan a generar cambios en su bicapa lipídica, provocando modificaciones en la permeabilidad de la membrana, esto ocurre por cambios mediados por las porinas que posee la bacteria (Hernández, 2020). Las porinas son canales

proteicos que regulan la entrada de moléculas hidrofílicas y transporte de agua a la membrana externa (Bolívar *et al.*, 2021). Estas modificaciones en la permeabilidad de la membrana restringen o retardan la entrada a los antibióticos, como betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas (Díaz, 2021). De las diferentes porinas que se encuentran en *P. aeruginosa* es la (OprF), esta porina es la más abundante las cuales se encargan de la difusión de moléculas hidrofílicas, además de que media la adhesión de las bacterias a las células del hospedero, puede participar en la formación de biopelículas anaerobias debido a una regulación de c-di-GMP (Jurado *et al.*, 2021). También posee la porina específica OprD que no permite la entrada de los carbapenems al espacio periplasmático. Así como otras porinas específicas (OprB, OprP, OprO) específicas de glucosa, fosfato, polifosfato. (Hernández, 2020; Díaz, 2021).

Enzimas β -lactamasas inactivadoras de los antibióticos

Las enzimas Amp-C son enzimas serin-betalactamasas producidas por bacterias Gram negativas no fermentadoras como *P. aeruginosa*, con espectro de acción hidrolítica las cuales tienen la capacidad de inhibir el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, evitando el rompimiento de la pared bacteriana (Rivera *et al.*, 2022). El gen *ampC* codifica para estas enzimas y además está relacionado con el reciclaje del peptidoglicano (Figura 5). Los betalactámicos inducen una producción de la enzima AmpC, ocasionando un incremento en la concentración citoplasmática de los productos 1,6 amp. Las cepas productoras de AmpC, con ayuda del sistema represor y las mutaciones asociadas al gen *ampR* y *ampD* dan origen a una hiperproducción, conocido como derrepresión. Esta derrepresión puede ser total o parcial, donde los que presentan una derrepresión parcial expresan un incremento moderado del AmpC, mientras que los que presentan una derrepresión total expresan niveles altos de AmpC, por tanto, cepas con AmpC natural cromosómico inducible como *P. aeruginosa* pierden el fenotipo de inducción y la producen constitutivamente (Rojas y Del Valle, 2009). Las cepas con derrepresión o hiperproductoras de AmpC presentan resistencia a todas las penicilinas, las combinaciones inhibitorias de β -lactamasas, cefalosporinas de 1ra, 2da y 3ra

generación, cefamicinas y monobactámicos (Rojas y Del Valle, 2009; Lepe y Martínez 2022). Mientras que las cepas con mecanismos de pérdidas de porinas, beta lactamasas de espectro extendido (BLEE), y carbapenemasas, entre otros, pueden presentar resistencia a las cefalosporinas de 4ta generación y a los carbapenémicos. (Rojas y Del Valle, 2009).

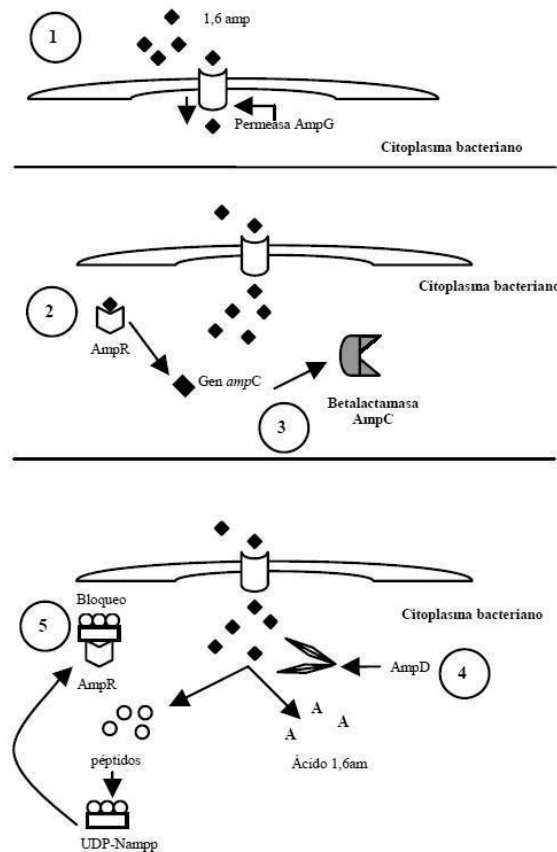


Figura 5. Sistema de expresión y represión del gen *ampC* (Rojas y Del Valle, 2009).

Integrones

Los integrones son genes ubicados en los plásmidos y transposones, responsables de la captura y expresión de genes exógenos; estos plásmidos adquiridos por transferencia horizontal de genes, por medio de los mecanismos de transformación, transducción y/o conjugación (Sabbagh *et al.*, 2021) asociados a la resistencia de los antibióticos, permitiéndoles ir evolucionando (Menacho, 2022). Existen varios tipos de integrones *int* que están asociados a cassettes de los genes de resistencia a los antibióticos, entre ellos están genes (*intI1*, *intI2* e *intI3*) estos elementos constan de tres componentes esenciales, el *intI* que codifica para el gen de la integrasa (Figura 6), y le permite la expresión de

casetes génicos insertados, como *attI* que codifica para el sitio de unión y la región promotora, que le ayuda a la integración de los casetes (Ruiz, 2007; Yalda *et al.*, 2021). Poseen dos segmentos conservados, 5°-CS y 3°-CS separados por una región variable donde se encuentran los sitios de casetes de genes. Los integrones clase 2 están incluidos en la familia de transposones Tn7 y sus derivados (Tn1825, Tn1826 y Tn4132). Se han identificado sesenta casetes génicos asociados a la resistencia de antibióticos (Ruiz, 2007). El integrón clase 2 (*int2*) codifica una resistencia a Trimetoprim/Sulfametoxazol, Estreptomicina, Betalactámicos Aminoglucósidos y Cloranfenicol (Sabaté y Prats, 2002; Ruiz, 2007).

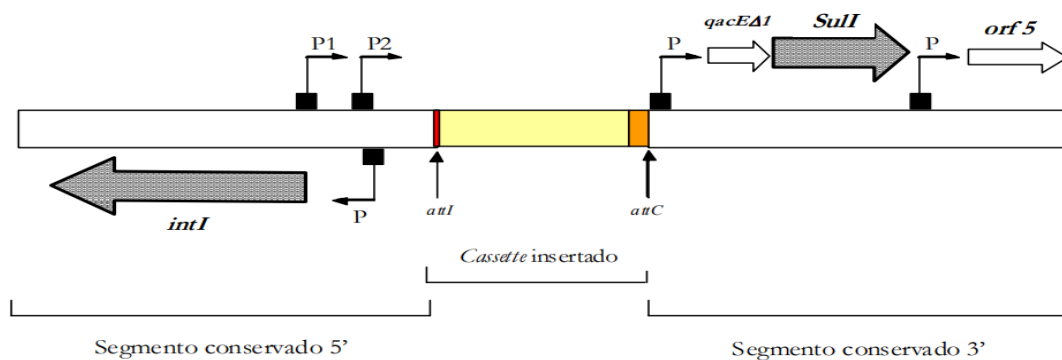


Figura 6. Estructura general de los integrones clase 1. Las flechas indican la orientación de la transcripción de P, P1, P2 y la orientación y posición de los promotores (Ruiz, 2007).

JUSTIFICACIÓN

En México ha sido muy escasa la investigación del análisis molecular de la virulencia y de la resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que el presente estudio transversal contribuirá en establecer la frecuencia de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa, y el gen del enzima malato deshidrogenasa asociados al integrón clase 2 en *P. aeruginosa* de origen hospitalario.

ANTECEDENTES

Alcántar y colaboradores en el 2023 analizaron 115 cepas aisladas de pacientes con diferentes diagnósticos, como bacteriemias nosocomiales, enfermedades respiratorias, diferentes infecciones causadas por bacterias del grupo ESKAPE (como *P. aeruginosa*) en el Hospital General de México (HGM) Dr. Eduardo Liceaga desde 2020 hasta enero del 2021, con una incidencia del 23% de *P. aeruginosa*, y con una tasa de mortalidad del 42% (11/26) en pacientes sin COVID-19 y 44% (8/18) en pacientes con COVID-19.

En el 2018 Castañeda describió que los porcentajes más elevados de resistencia a los antibióticos encontrados en un grupo de 158 cepas de *P. aeruginosa* relacionados al grupo ST309, procedentes de tres hospitales de la Ciudad de México, y asociados a septicemias neonatales, fibrosis quística y enfermedades nosocomiales, fueron para Piperacilina /tazobactam (AUG) 90%, ceftriaxona (CRO) 88% y tigeciclina (TGC) 88.6% y Trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) 89.2%.

Chand y cols. en el año 2021 analizaron 87 cepas aisladas de pacientes del Hospital Público del Nepal procedentes de muestras de orina, pacientes ambulatorios, de edades de 60 a 79 años (n=36; 41.3%), con mayor incidencia en hombres (n=56; 64.3%) que en mujeres (n=31; 35.6%); de los cuales el 43.6% (n=38) de las cepas fueron multidrogo-resistentes (MDR), con una frecuencia para *oprL* del 100%, mientras que el 95.4% de las cepas fue portadora del gen *toxA*.

Yalda y colaboradores en el 2021 estudiaron en el Hospital Nemazee del Suroeste de Irán 75 cepas de *P. aeruginosa* pertenecientes a pacientes con infecciones del tracto urinario, infección del tracto respiratorio, infección ocular, infección del torrente sanguíneo, infección de piel, infección abdominal y tejidos blandos de los cuales el 20% (15/75) de las cepas fue positiva para los integrones de clase 2, 64% de frecuencia del integron clase 1.

En el año 2017, Ullah y cols. analizaron 54 cepas de *P. aeruginosa* productores de β -lactamasas aisladas en Pakistán, en muestras de pus, sangre, orina, esputo y heridas.

Estos autores detectaron en las cepas una frecuencia del 40.7% (n= 22) del gen *oprI* y el 29.6% (n= 16) del gen *oprL*.

En diferentes hospitales de Teherán, Irán en el año 2016 Goudarzi y cols. aislaron 140 cepas de *P. aeruginosa*, de las cuales el 59.3% (n=83) fueron hombres y el 40.7% (n=57) mujeres. La edad media fue de 48.9 años. Entre las 140 cepas aisladas, el 65% (n=91) fueron multidrogo-resistentes, y los integrones de clase 1 y 2 fueron detectados en el 70% de las cepas (n=98). El gen dominante fue el integrón de clase 1 con el 67.3% (n=66) de las cepas, seguido del integrón de clase 2 (*int-2*) con el 32.7% (n=32), mientras que la coexistencia de los integrones de clase 1 y 2 fue detectada en el 12.2% (n=12) aislamientos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la frecuencia de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa, y el gen de malato deshidrogenasa, asociados al integrón clase 2 en cepas de *P. aeruginosa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la frecuencia de *P. aeruginosa* asociada con el origen clínico de los pacientes estudiados.
- Determinar la resistencia a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer.
- Identificar la prevalencia de los genes *oprL*, *oprI* y *mdh*.
- Determinar la frecuencia del integrón clase 2 (*Int-2*) en las cepas.

METODOLOGÍA

Obtención de las cepas de pacientes con diferentes procesos infecciosos

Se analizaron 100 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 (IMSS) con diversos diagnósticos y de distintos procesos infecciosos, como urocultivos, heridas quirúrgicas, hemocultivos, secreción bronquial, etc. Las cepas se sembraron en el medio agar ceftrimida para el aislamiento selectivo de *P. aeruginosa* y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Extracción de DNA bacteriano

A partir del crecimiento de cada una de las cepas en agar ceftrimida por 24 h, se tomaron por medio de un asa estéril varias colonias y se depositaron en un tubo de rosca de 16 x 150 con 2 mL de agua desionizada estéril, las bacterias se resuspendieron mediante la agitación en un vortex durante 20 seg, posteriormente los tubos se llevarán a ebullición durante 20 min, e inmediatamente se incubaron en hielo por 10 minutos. El sobrenadante se depositó en un tubo Eppendorf nuevo y estéril y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contiene el DNA bacteriano se depositó en un tubo Eppendorf, se etiquetaron y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización para realizar la PCR (Paniagua *et al.*, 2020).

Determinación de la Resistencia a los Antibióticos

La resistencia a los antibióticos en las cepas de *P. aeruginosa* se realizó por el método de Kirby-Bauer. Para lo cual cada una de las cepas fueron sembradas mediante hisopos estériles en la totalidad del Agar Mueller-Hinton (MH) y se les colocó un sensidisco con los 12 antibióticos para evaluar; Ampicilina, Carbenicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Nitrofurantoína, Amikacina, Gentamicina, Netilmicina, Norfloxacina y Trimetoprim/Sulfametoxazol; las cajas se incubaron a 37°C por 24 h. Finalmente se determinó la sensibilidad del antibiótico midiendo los halos de inhibición con un vernier. Las cepas se clasificaron como susceptibles y/o resistentes de acuerdo con los criterios establecidos por el fabricante (Multibac I.D., México; Tabla 2).

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

Tabla 2. Criterios de susceptibilidad de los antibióticos.

Identificación de *P. aeruginosa* por PCR punto final

Las cepas de *P. aeruginosa* fueron identificadas por PCR de punto final mediante la amplificación del gen *16S rDNA* (Tabla 7; Kaszab *et al.*, 2011). El volumen final por mezcla de reacción fue de 15 μ l; 6 μ L de Master Mix RED (AMPLIQON); 1 μ L del oligonucleótido forward (10 pmol); 1 μ L del oligonucleótido reverse (10 pmol; Tabla 1)), 4 μ L de H₂O libre de nucleasas; y 3 μ L de DNA molde. Como control positivo se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las condiciones de amplificación se observan en la (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones para la ampliación del gen *16S rDNA*.

| | A1 | B | A2 | C | D | E |
|-----|----------------|-----------|------------|------------|------------|----------------|
| PCR | 95°C; 2:00 min | 25 ciclos | 94°C; 25 s | 58°C; 40 s | 72°C; 40 s | 72°C; 1:00 min |

A1: Desnaturalización inicial; **B:** Ciclos; **A1:** Segunda desnaturalización; **C:** Alineación; **D:** Extensión; **E:** Extensión final (Kaszab *et al.*, 2011).

Detección de los genes de membrana externa por PCR de punto final

La detección de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa; *oprI* y *oprL* (Tabla 7) se realizó por PCR de punto final (Gholami *et al.*, 2016). El volumen final por mezcla de reacción fue de 15 μ L; 6 μ L de Master Mix RED (AMPLIQON); 1 μ L del oligonucleótido forward (10 pmol); 1 μ L del oligonucleótido reverse (específicos en cada gen), 4 μ L de H₂O libre de nucleasas; y 3 μ L de DNA molde. Las condiciones de amplificación se observan en la (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones para la ampliación de los genes *oprL* y *oprI*.

| | A1 | B | A2 | C | D | E |
|-----|----------------|-----------|------------|----------------|----------------|------------|
| PCR | 94°C; 4:00 min | 35 ciclos | 94°C; 45 s | 57°C; 1:00 min | 72°C; 1:00 min | 72°C; 30 s |

A1: Desnaturalización inicial; **B:** Ciclos; **A1:** Segunda desnaturalización; **C:** Alineación; **D:** Extensión; **E:** Extensión final (Gholami *et al.*, 2016).

Detección por PCR de punto final del gen asociado a la resistencia en *P. aeruginosa*

La detección del gen de resistencia (integrón de clase 2; Tabla 7) de *P. aeruginosa* fue identificado por PCR de punto final conforme a lo descrito previamente (Yalda *et al.*, 2021). El volumen final por mezcla de reacción fue de 15 μ L; 6 μ L de Master Mix RED (AMPLIQON); 1 μ L del oligonucleótido forward (10 pmol); 1 μ L del oligonucleótido reverse (específicos en cada gen), 4 μ L de H₂O libre de nucleasas; y 3 μ L de DNA molde. Las condiciones de amplificación se observan en las (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones para la ampliación del gen *Int2*.

| | A1 | B | A2 | C | D | E |
|-----|----------------|-----------|------------|----------------|----------------|-----------------|
| PCR | 94°C; 5:00 min | 30 ciclos | 94°C; 60 s | 57°C; 1:00 min | 72°C; 2:00 min | 72°C; 10:00 min |

A1: Desnaturalización inicial; **B:** Ciclos; **A1:** Segunda desnaturalización; **C:** Alineación; **D:** Extensión; **E:** Extensión final (Yalda *et al.*, 2021).

Electroforesis en gel de agarosa y lectura de amplicones de genes

Después de la amplificación del DNA se realizó la electroforesis en geles de agarosa. Para lo cual se colocaron 5 μ L de los amplicones en cada pozo del gel de agarosa al 2%, teñido con 4 μ L de colorante fluorescente ‘Midori Green Green Advance DNA Stain’ que permite la observación de las bandas con luz ultravioleta. Los geles se colocaron dentro de la cámara de electroforesis en buffer Tris-borato (TBE) 1X que conduce la corriente eléctrica desde la carga negativa a la positiva. Las condiciones fueron de 120 volts, 94 miliampers, durante 40 min. Posteriormente, los geles se visualizaron en el sistema de fotodocumentación Kodak.

Detección del gen que codifica la enzima malato deshidrogenasa mediante PCR en tiempo real

El gen del enzima malato deshidrogenasa (*mdh*; Tabla 8) en las cepas se identificó por PCR en tiempo real utilizando el equipo Corvete (Rotor Gene). El volumen final por mezcla de reacción fue de 13 μ L; 6 μ L de Master SYBR GREEN (Qiagen); 1 μ L del oligonucleótido forward (10 pmol); 1 μ L del oligonucleótido reverse (específicos en cada gen), 4 μ L de H₂O libre de nucleasas; y 1 μ L de DNA molde. Las condiciones de amplificación se observan en la (Tabla 6).

| Tabla 6. Condiciones para la ampliación del gen <i>mdh</i>. | | | | |
|--|----------------|-----------|-----------|------------|
| | A1 | B | A2 | C |
| RT-PCR | 95°C; 2:00 min | 40 ciclos | 95°C; 5 s | 60°C; 10 s |

A1: Activación de la Hot Start; **B:** Ciclos; **A1:** Segunda desnaturalización; **C:** Alineación/Extensión final.

| Secuencia del gen 5' - 3' | Gen | Tamaño de amplicón (bp) |
|--|-------------|----------------------------|
| 16S rDNA-F GGGGGATCTTCGGACCTCA 16S rDNA-R TCCTTAGAGTGCCCACCCG | <i>rDNA</i> | 956 |
| <i>oprL</i> -F ATGGAAATGCTGAAATTCGGC <i>oprL</i> -R CTTCTTCAGCTCGACGCGACG | <i>oprL</i> | 504 |
| <i>oprI</i> -F ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCTGCT <i>oprI</i> -R CTTGCGGCTGGCTTTTTCCAG | <i>oprI</i> | 204 |
| <i>Int2</i> -F CACGGATATGCGACAAAAAGGT <i>Int2</i> -R GTAGCAAACGAGTGACGAAATG | <i>Int2</i> | 789 |

Tabla 7. Secuencia de genes de virulencia y del integrón clase 2 en las cepas.

| Secuencia del gen 5' - 3' | Gen |
|--|------------|
| <i>mdh</i> -F AATGACGCTGGACGAGGTCC <i>mdh</i> -R CCTGTTCGATGCCTTC | <i>mdh</i> |

Tabla 8. Secuencia del gen malato deshidrogenasa (*mdh*).

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se hizo mediante el programa de Microsoft Office Versión 10.0. Se estimó la prueba de chi cuadrado (χ^2) para analizar asociación significativa entre el integrón clase 2 (*Int2*) y niveles de multidrogo-resistencia ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Pacientes y diagnósticos clínicos

Se analizaron 100 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 (IMSS) con diversos diagnósticos y de distintos procesos infecciosos, dentro de los cuales el más frecuente fueron las infecciones de vías urinarias (IVU) con el 16%, sepsis (10%), neumonía (7%) y absceso con el (5%) (Figura 7). Se encontró que el 47% de los pacientes fueron hombres, 46% mujeres, y el 7% fueron pacientes sin identificar (Figura 8). Por otro lado, el rango de edad con mayor frecuencia fue de 51-60 años (23%) y 71-70 años (13 %) ; (Figura 9).

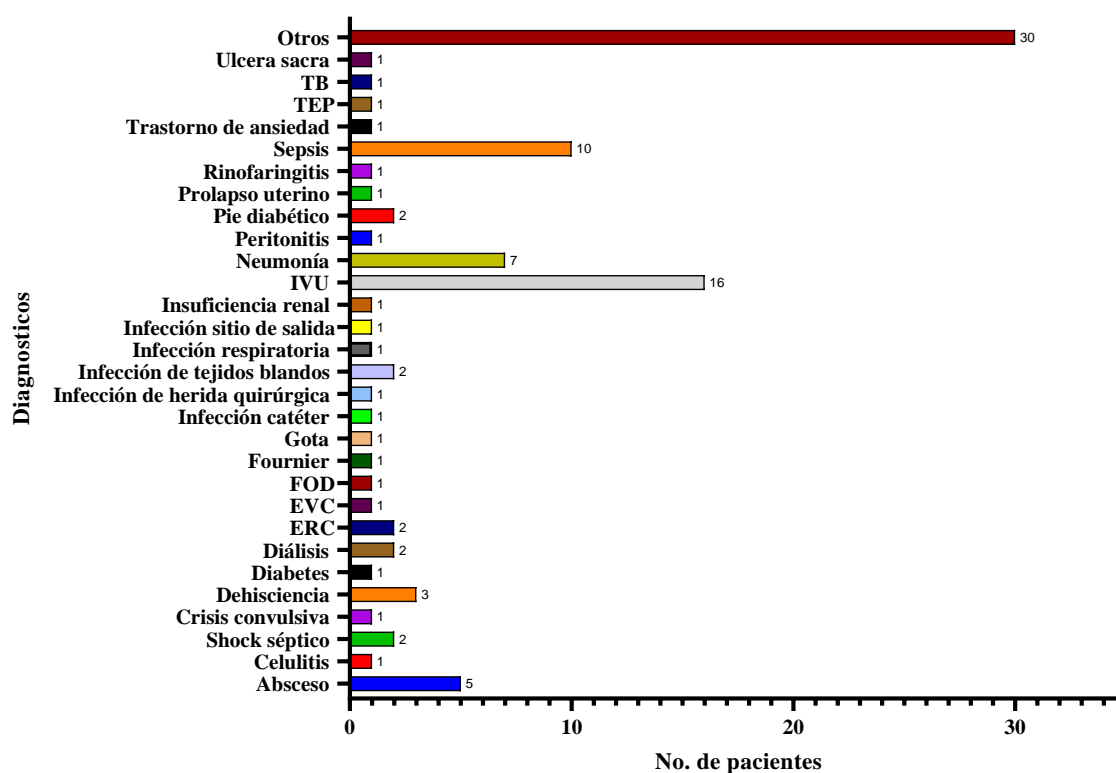


Figura 7. Distribución de los diagnósticos de los pacientes analizados.

IVU= Infección de vías urinarias, EVC= Enfermedad Vascul ar Cerebral, ERC= Enfermedad Crónica Renal, FOD= Fiebre de origen desconocido, TEP=Tromboembolismo pulmonar, TB= Tuberculosis.

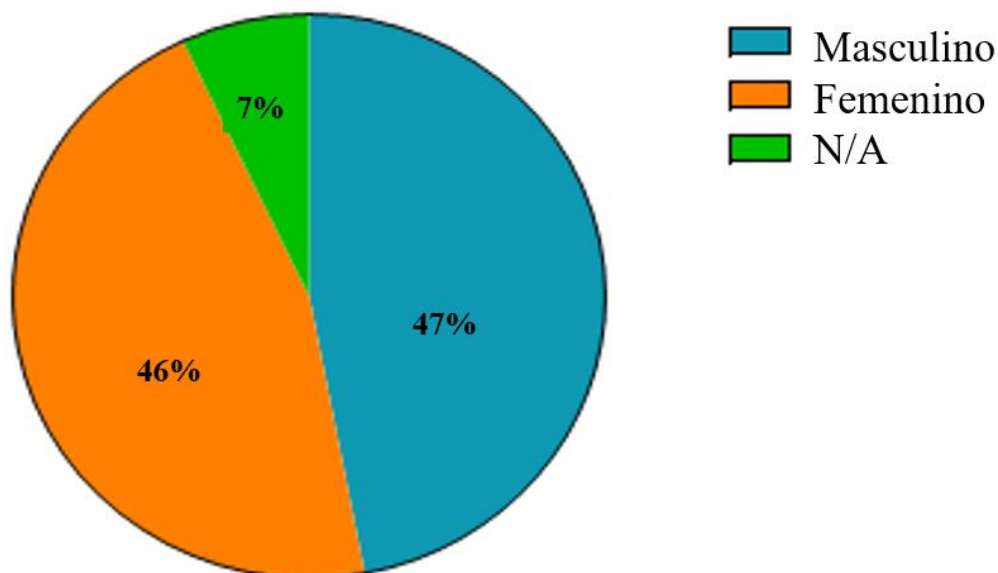


Figura 8. Distribución de los pacientes analizados por género.

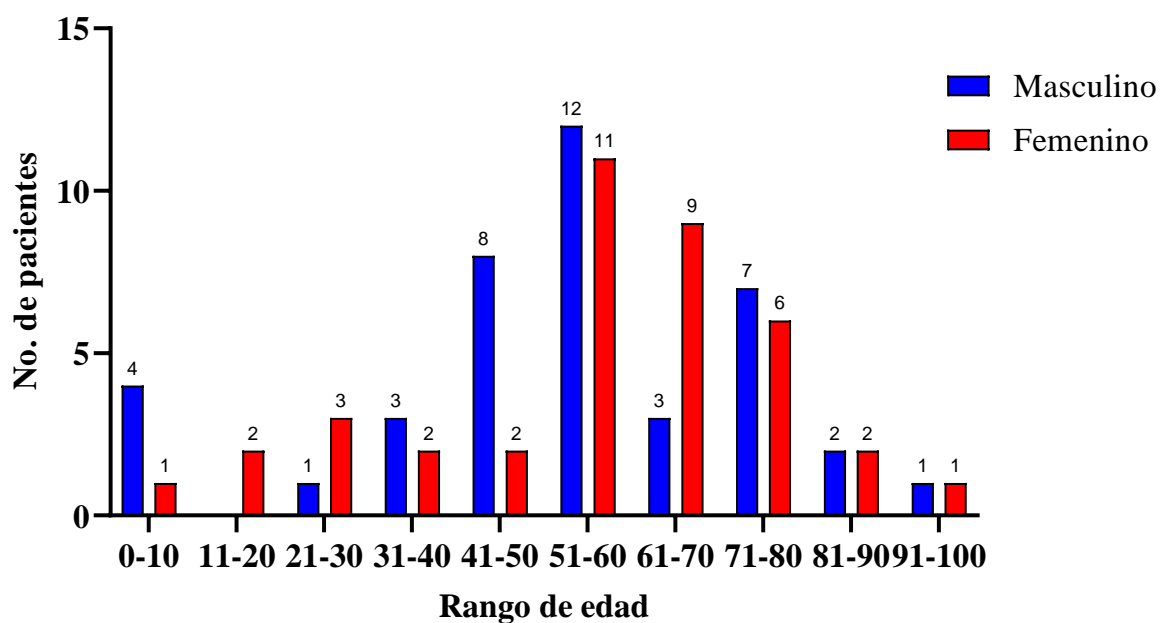


Figura 9. Distribución del número de pacientes por rango de edad y género.

Identificación de *P. aeruginosa* mediante PCR de punto final

Las 100 cepas analizadas fueron identificadas molecularmente por PCR punto final mediante la amplificación de gen 16S *rRNA* (956 pb; Figura 10).

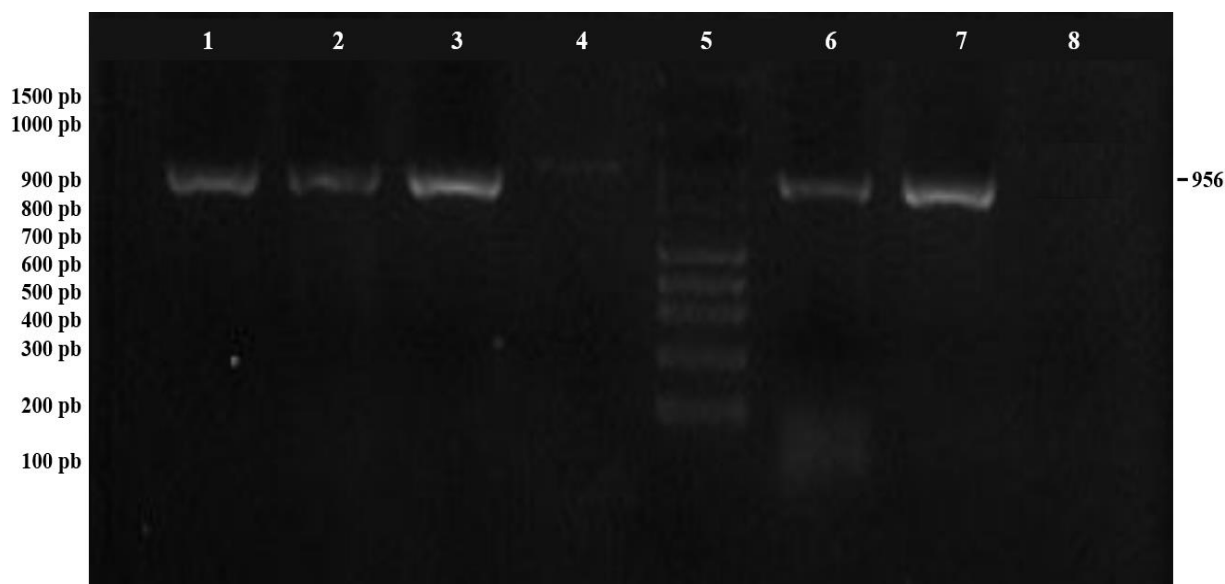


Figura 10. Detección de *P. aeruginosa* mediante la amplificación del gen *rRNA* (956 pb) por PCR. Carril 1, control positivo (*P. aeruginosa* ATCC 27853); Carriles 2- 4 y 6-7 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes; carril 5 marcador de peso molecular (100 bp); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

Resistencia a los antibióticos

El 98% de las cepas fue resistente a carbenicilina, 97% a la ampicilina, cefalotina y trimetoprim/sulfametoxazol, en cada caso, 96% a nitrofurantoína, 91% a cloranfenicol, 89% a cefotaxima, 86% a netilmicina, 53% a la amikacina, 51 % a norfloxacin, 50% a gentamicina y 49% a ciprofloxacina (Figura 11). En cuanto a la susceptibilidad a los antibióticos, se observó mayor frecuencia de sensibilidad a ciprofloxacina con 51% y Gentamicina con 50%.

Se detectó que el 97% de las cepas fue multidrogo-resistente (MDR; resistentes a más de tres antibióticos de familias distintas), y 3% no MDR (Figura 12).

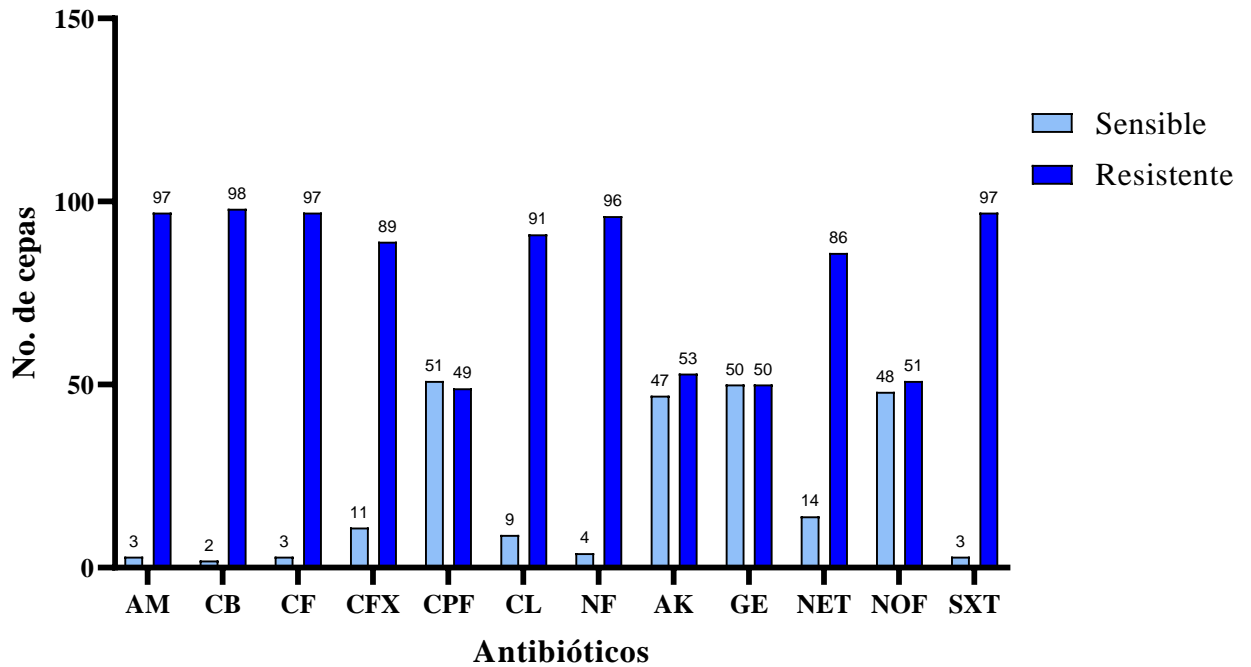


Figura 11. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de las cepas analizadas a los antibióticos.

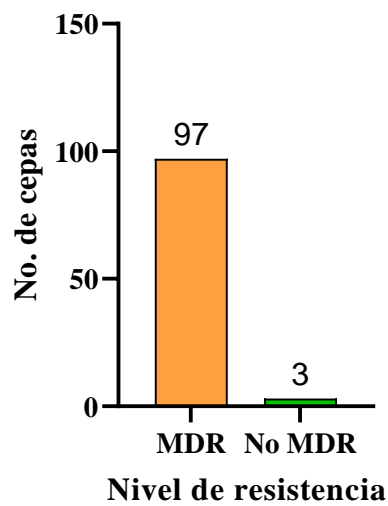


Figura 12. Distribución de las cepas por nivel de multirresistencia.

Detección de los genes de virulencia y del integrón de clase 2

El cien por ciento de las cepas fue portador de los genes *oprL* (Tabla 9; Figura 13) y *oprI* (Figura 14), el 95% (n=95) del gen *mdh* (Figura 16) y el 12% de de *int2* (Figura 15).

| Función del gen | Gen | Frecuencia (%) |
|---|-------------|----------------|
| Identificación a nivel especie | <i>rDNA</i> | 100 |
| Proteínas de membrana externa | <i>oprL</i> | 100 |
| | <i>oprI</i> | 100 |
| Captura de sitios de cassetes de genes asociados a la resistencia a los antibióticos | <i>int2</i> | 12 |
| Respiración celular. Favorece la multiplicación bacteriana. | <i>mdh</i> | 95 |

Tabla 9. Prevalencia de los genes estudiados.

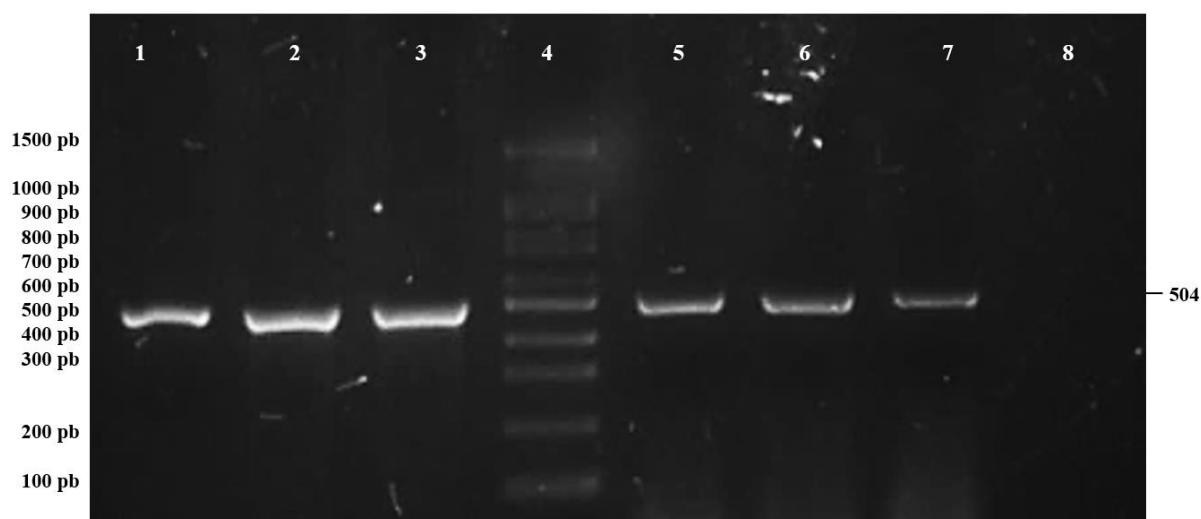


Figura 13. Detección del gen *oprL* (504 pb) por PCR. Carriles 1-3 y 5-6 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes infectados; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 7, control positivo (cepa 4 del cepario del laboratorio); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

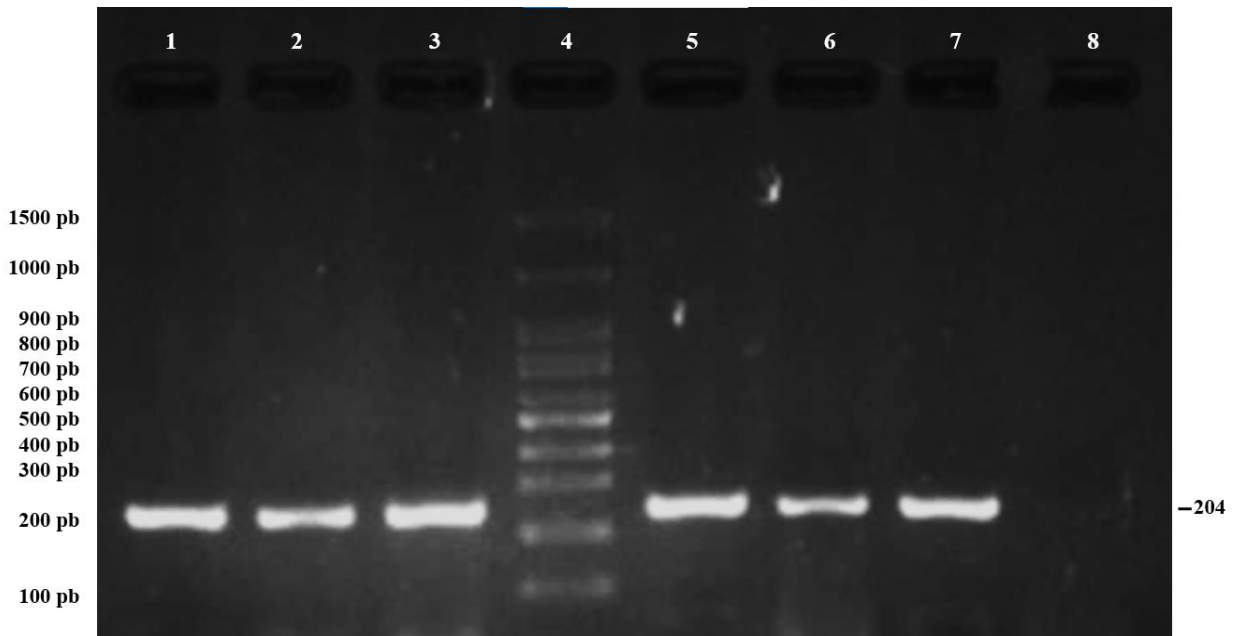


Figura 14. Detección del gen *oprI* (204 pb) por PCR. Carriles 1-3 y 5-6 cepas de *P. aeruginosa*; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 7, control positivo (cepa 4 del cepario del laboratorio); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

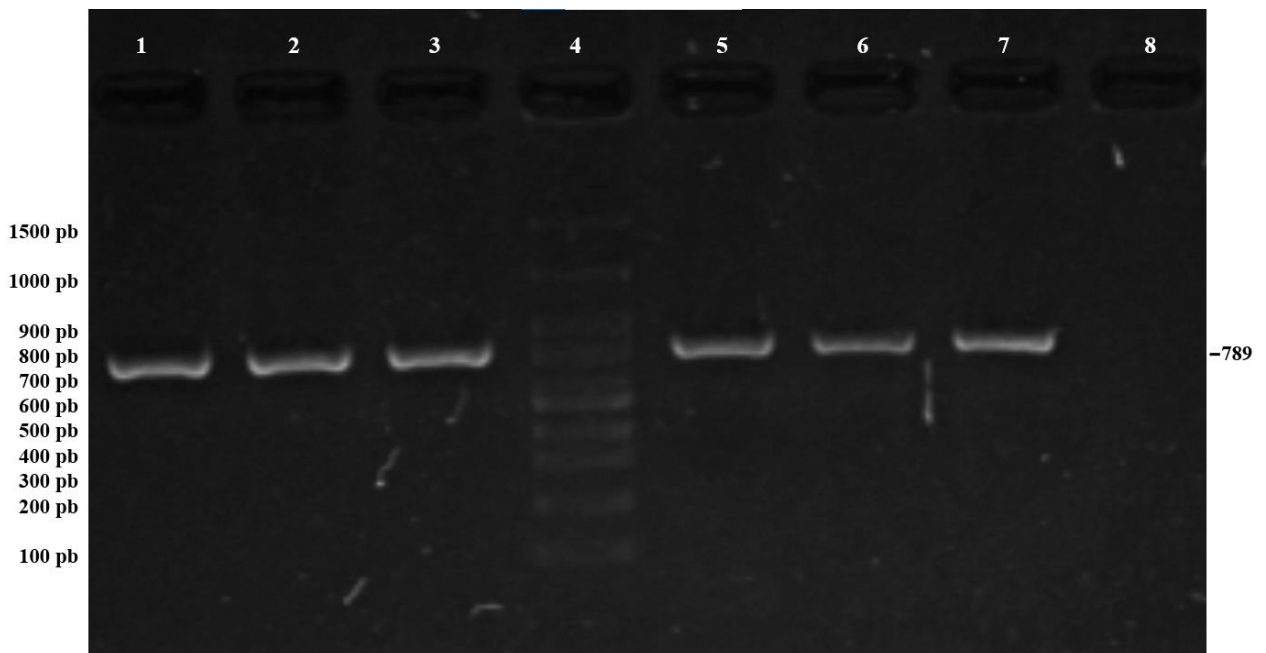


Figura 15. Detección del gen *int2* (789 pb) por PCR. Carriles 1-3 y 5-6 cepas positivas de *P. aeruginosa*; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 7, control positivo (cepa 4 del cepario del laboratorio); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

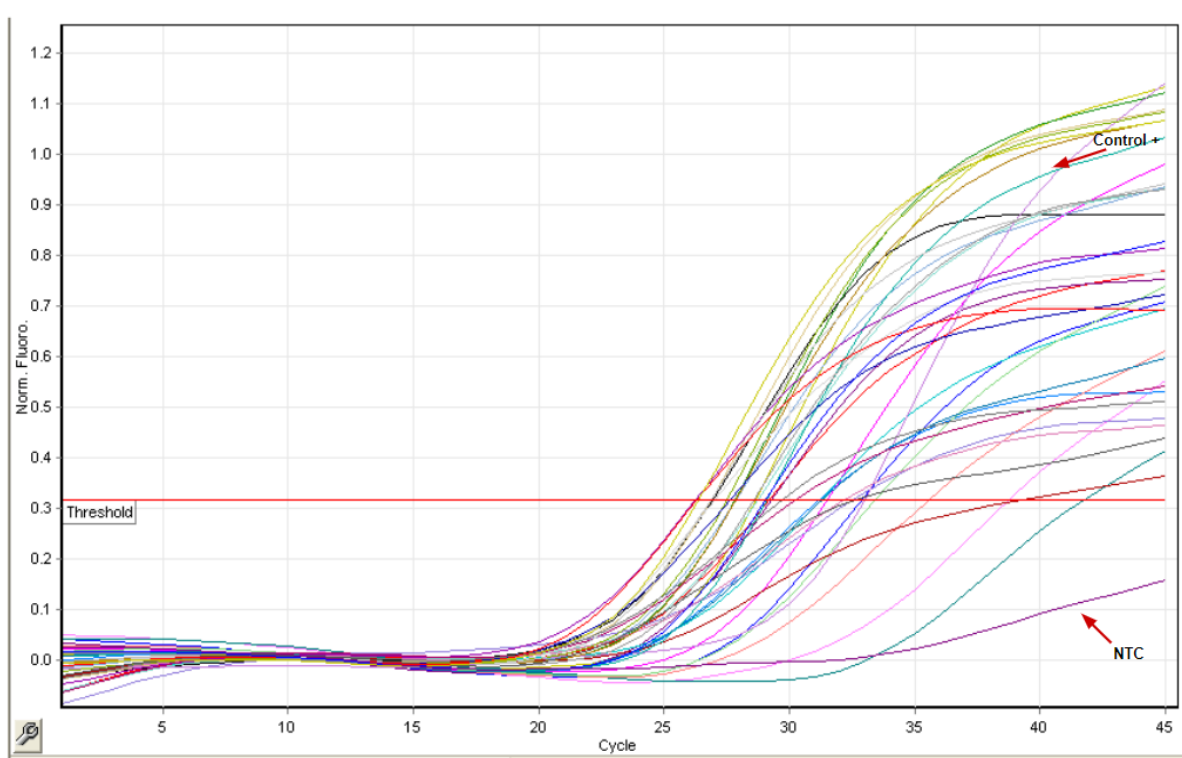


Figura 16. Detección del gen *mdh* por PCR en tiempo real. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo; *P. aeruginosa* ATCC 27853, NTC; control no templado.

Distribución de de los genes de virulencia e integrón clase 2 asociados a los diferentes diagnósticos clínicos

Los genes que codifican proteínas de membrana externa *oprL* y *oprI* se encontraron asociados a todos los diagnósticos (Tabla 10), mientras que el gen de la enzima malato deshidrogenasa no se asoció con el diagnóstico de celulitis. En el caso del gen del integrón clase 2 no se encontró diferencias significativas asociadas a los diagnósticos.

| Diagnostico | Frecuencia de los genes | | | |
|---|-------------------------|-------------|------------|-------------|
| | <i>oprL</i> | <i>oprI</i> | <i>mdh</i> | <i>int2</i> |
| Absceso | 5 (100) | 5 (100) | 4 (80) | 2 (20) |
| Celulitis | 1 (100) | 1 (100) | 0 | 0 |
| Shock séptico | 2 (100) | 2 (100) | 2 (100) | 0 |
| Crisis convulsiva | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Dehiscencia | 3 (100) | 3 (100) | 3 (100) | 2 (66.6) |
| Diabetes | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Diálisis | 2 (100) | 2 (100) | 1 (50) | 1 (50) |
| Enfermedad Renal Crónica | 2 (100) | 2 (100) | 1 (100) | 0 |
| Enfermedad Vascular Cerebral | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Fiebre de origen desconocido (FOD) | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Fournier | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Gota | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) |
| Infección catéter | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Infección de herida quirúrgica | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Infección de tejidos blandos | 2 (100) | 2 (100) | 2 (100) | 1 (50) |
| Infección respiratoria | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Infección sitio de salida | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Insuficiencia renal | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| IVU | 16 (100) | 16 (100) | 16 (100) | 3 (18.7) |
| Neumonía | 7 (100) | 7 (100) | 7 (100) | 0 |
| Peritonitis | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Pie diabético | 2 (100) | 2 (100) | 2 (100) | 0 |
| Prolapso uterino | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Rinofaringitis | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Sepsis | 10 (100) | 10 (100) | 10 (100) | 1 (10) |
| Trastorno de ansiedad | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) |

| | | | | |
|---------------------------------------|----------|----------|-----------|---------|
| Tromboembolismo pulmonar (TEP) | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Tuberculosis (TB) | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Úlcera sacra | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 0 |
| Otros | 30 (100) | 30 (100) | 28 (93.3) | 1(3.33) |

Tabla 10. Frecuencia de genes de virulencia e integrón clase 2 en las cepas de *P. aeruginosa* asociados a los diagnósticos.

DISCUSIÓN

Pacientes estudiados

En este estudio se analizaron 100 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 (IMSS) con distintos diagnósticos y procesos infecciosos, como infecciones de vías urinarias (16%), sepsis (10%), neumonía (7%), absceso (5%), entre otros, siendo el porcentaje entre hombres (47%) y mujeres (46%) muy semejante, principalmente en el rango de edad de 51-60 años. En México se ha descrito que entre las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) ocasionadas principalmente por *P. aeruginosa* se encuentran la neumonía, infección de vías urinarias, infección incisional profunda e infecciones del torrente sanguíneo (RHOVE, 2023). La frecuencia de las infecciones asociadas a *P. aeruginosa* encontradas en este estudio entre hombres y mujeres coincide con el estudio realizado en Nepal, donde se presentó una mayor incidencia en hombres (n=56; 64.3%), que en mujeres (n=31; 35.6%), con mayor prevalencia en el rango de edad de 60 a 79 años (n=36; 41.3%) (Yamuna *et al.*, 2021). Sin embargo, en otro estudio realizado en Marruecos, se describió una mayor prevalencia en mujeres (145/225), que en hombres (110 /255), con un rango de edad más alto en el grupo de 40 a 49 (n=65) y 50 a 59 años (n=63), mientras que el grupo de 60 a 69 años tuvo una frecuencia menor (n= 42); Muddassir *et al.*, 2021). Los resultados también coinciden con lo reportado por Vereza y cols, donde el 60% (n=115) de las infecciones nosocomiales fueron en mayores de 60 años (Vereza *et al.*, 2019).

La elevada frecuencia de *P. aeruginosa* encontrada en este estudio coincide con la descrita recientemente en México en un estudio realizado en el Hospital de Traumatología y Ortopedia, del IMSS de la Ciudad de Puebla (Alejandro *et al.*, 2021), donde *P. aeruginosa* fue el cuarto patógeno más frecuente, con una frecuencia del 10% de un total de 844 muestras de pacientes infectados, principalmente en pacientes de edad avanzada, lo cual puede deberse a la comorbilidad añadida, como diabetes mellitus, vejiga neurogénica, entre otras.

Multidrogo-resistencia

La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* (97%) estudiadas fue multidrogo-resistentes (MDR), principalmente a carbenicilina (98%), ampicilina (97%), cefalotina (97%), trimetoprim-sulfametoxazol (97%) y nitrofurantoína (96%). Mientras que a los fármacos donde se presentó mayor sensibilidad fue a ciprofloxacina con 51% y gentamicina con 50%. Estos porcentajes son semejantes con lo descrito previamente en un estudio sobre la evolución de la resistencia a los antibióticos durante los años 2015-2019 (Solórzano y Parrales, 2021), donde se encontró que el 40% de las cepas fue multidrogo-resistente y también coincide con un estudio realizado en 8 cepas provenientes de pacientes con infecciones en el tracto urinario, donde todas las cepas fueron resistentes (100%) a trimetoprim-sulfametaxazol, un 87.5% a ciprofloxacino y cefepime, en cada caso, un 75% a amikacina y un 62.5% a ceftazidima, (Cansaya, 2023). Recientemente Ghazaei (2022) realizó otro estudio donde mostró elevada resistencia de las cepas para ampicilina (99.4%), nitrofurantoína (92.8%) y trimetoprim-sulfametaxazol (96.2%). Mientras que Abdulla y Almuttairi observaron en 131 cepas nosocomiales de *P. aeruginosa* una resistencia del 100% para ampicilina y cefotaxima, en cada caso, del 83.9% para gentamicina, 79.3% para amikacina y 73.2% para ciprofloxacina (Abdulla y Almuttairi, 2023). La elevada multidrogo-resistencia encontrada en las cepas puede deberse a que *P. aeruginosa* posee mecanismos de resistencia intrínseca a fármacos de tipo betalactámicos, además de que son de los antibióticos más recetados y de fácil acceso, mientras que ciprofloxacina y gentamicina, que pertenecen a la familia de fluoroquinolonas y aminoglucósidos, respectivamente, son de acceso restringido y prescrito únicamente en un entorno intrahospitalario. La elevada multidrogo-resistencia a los antibióticos encontrada en este estudio es superior a la descrita en un hospital de tercer nivel en España, donde del total de cepas de *P. aeruginosa* (n=78) analizadas, el 33.3% fue resistente a las cefalosporinas, 50% a quinolonas, 24.4% a carbapenémicos y 23.1% a amikacina (González *et al.*, 2020).

Frecuencia de genes de virulencia

En este estudio se analizaron cuatro genes asociados a la virulencia de *P. aeruginosa*, dentro de los cuales se detectó una frecuencia del 100% (n=100) para los genes que codifican proteínas de la membrana externa (*oprL* y *oprI*), lo cual coincide con un estudio realizado sobre la detección de genes de resistencia a los antibióticos y de genes de virulencia en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, donde todas las cepas fueron portadoras de *oprL* y *oprI* (Nitz *et al.*, 2021). Los genes de lipoproteína *oprI* y *oprL* son frecuentemente utilizados para la detección de la especie de *Pseudomonas aeruginosa* (Barba *et al.*, 2012; Gholami *et al.*, 2016). Se ha descrito que OprL es la segunda lipoproteína en *P. aeruginosa* que ayuda a mantener la estructura de la célula y la protege el estrés oxidativo (Ghazaei, 2022). Recientemente se realizó un estudio en Ardabil, Irán, donde la prevalencia de *oprL* fue del 80.7% (52/60) en cepas de *P. aeruginosa* de origen sanguíneo y urinario (Ghazaei, 2022).

En este estudio se encontró que el porcentaje del gen malato deshidrogenasa (*mdh*) en las cepas de *P. aeruginosa* fue del 95% (n= 95), lo que evidencia la capacidad para la multiplicación y sobrevivencia de las cepas durante los procesos infecciosos, debido a que se ha descrito que la enzima malato deshidrogenasa participa en la respiración celular de la bacteria, participando en la última reacción del ciclo de Krebs, enlazada a la formación de ATP, donde la reacción de la enzima (MDH) es favorecida en la formación de malato y se piensa que impulsa el ciclo para la formación de oxalacetato al facilitar la transferencia de oxalacetato de la MDH a la citrato sintasa (Minárik *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de que el gen *mdh* es considerado un gen central en la respiración celular bacteriana, el hecho de no encontrarlo en el 5% de las cepas, puede deberse a que probablemente existe alguna mutación en algún nucleótido del gen o existe alguna degradación cromosómica donde se encontraba el gen, por lo que los oligonucleótidos utilizados en este ensayo de PCR no lograron amplificar el gen.

Frecuencia del integrón de clase 2

El gen *int2* fue detectado de manera global en el 12% (n=12) de las cepas, de las cuales el 8% (n=8) se asoció con cepas PDR y 4% (n=4) con cepas MDR, siendo 5 cepas relacionadas con IVU (n=3), absceso (n=1) y sepsis (n=1). El porcentaje del gen *int2* detectado en este trabajo es superior al descrito en cepas (n=103) aisladas de infecciones en Ardabil, Irán donde el porcentaje fue del 0% (Khademi *et al.*, 2021) y también al descrito en un estudio realizado en Egipto, donde se analizaron 192 cepas de *P. aeruginosa* (Abd-Elmonsef y Maxwell, 2022), sin embargo, se han descrito porcentajes del 25% para *int2* en cepas aisladas de pacientes en Irak (Raheem *et al.*, 2022). Recientemente en el año 2023 se encontró una prevalencia del 3.8% (n=5) del integrón de clase 2 en un grupo de cepas nosocomiales de *P. aeruginosa* (n=131) (Abdulla y Almuttairi, 2023).

La baja frecuencia del integrón de clase 2 detectada en las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas puede deberse a que probablemente a que en ocasiones es interrumpido el gen *int2* de forma prematura por los codones de terminación (TAA), desactivando la síntesis de proteínas de 178 aminoácidos. Por lo tanto, los integrones de clase 2 suelen no ser funcionales ya que la integración y escisión de los casetes génicos es dependiente de otro tipo de integrasa. A menudo el integrón clase 2 se encuentra en organismos con presencia también de un integrón de clase 1, la integrasa de estos genes puede realizar esa función. De igual forma las mutaciones en sus codones finales pueden provocar reactividad a los aminoácidos de los integrones de clase 2, provocando la activación del gen de la integrasa. (Ruiz, 2007; Di Conza y Gutkind, 2010; Sabbagh 2021) por lo que sería conveniente secuenciar el gen (*int2*) en todas las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas.

CONCLUSIONES

1. El diagnóstico con mayor frecuencia en los pacientes infectados por *P. aeruginosa* fue infección de vías urinarias (IVU), principalmente en hombres mayores de cincuenta años.
2. La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* fue multidrogo-resistente.
3. Los genes *oprL* y *oprI* fueron identificados en todas las cepas.
4. El gen *mdh* fue detectado en la mayoría de las cepas.
5. Se detectó una baja frecuencia del integrón de clase 2 en las cepas.
6. La elevada frecuencia de los genes de virulencia asociada a la multidrogo-resistencia en las cepas podría incrementar la agudeza y cronicidad de las infecciones de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abd-Elmonsef, M., Maxwell, S. (2022). Class 1, 2 and 3 integrons in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Tanta University Hospitals, Egypt. *Journal of Chemotherapy*, 34(4), 241-246.
2. Abdulla, A., Almuttairi, A. (2023). Aparición de integrones de clase 1, 2 y 3 entre *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en la provincia de Babilonia, Irak. *Revista Médica de Babilonia*, 20 (1), 181-187.
3. Alcántar, M., Huerta, M., Jarillo, M., Gayosso, C., Fernández, J., Hernández, M., Zavala, M., Morales, M., Hernández, V., Bolaños, M., Giono, S., Santos, J. (2023). Gram-negative ESKAPE bacteria bloodstream infections in patients during the COVID-19 pandemic. *Peer J*, 11.
4. Alejandro, G., Claudy, V., Patricia, S., Alejandro, R., Rodríguez I. (2021). Pathogenic microorganisms most frequently isolated from infections in patients hospitalized at the Hospital de Traumatología y Ortopedia IMSS in the city of Puebla. *South Florida Journal of Development*, 2 (2), 3299–3310.
5. Amirkamali, S., Naserpour-Farivar, T., Azarhoosh, K., Peymani, A. (2017). Distribution of the blaOXA, blaVEB-1, and blaGES-1 genes and resistance patterns of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 50, 315-320.
6. Barba, P., Paredes, D., Yauri, M., Riglos, M., Zurita, J., Alcocer, I. (2012). Detección de genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 33(1-2), 46-56.
7. Balda, H., Palacios, M. (2022). Resistencia antimicrobiana en el contexto actual. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*, 4(3), 610-621.
8. Belloso, W. (2009). Historia de los antibióticos. *Revista del Hospital de Buenos Aires*, 29(2), 102-11.

9. Bolívar, A., Torres, M., Sánchez, Y. (2021). Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca*, 23(2), 47-57.
10. Bush, L., Vazquez, M. (2022). Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados. Manual Merck versión para profesionales. <https://www.merckmanuals.com/es-us/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-pat%C3%B3genos-relacionados>.
11. Callicó, A., Cedré, B., Sifontes, S., Torres, V., Pino, Y., Callís, A., (2004). Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Vacci Monitor*, 13(3), 1-9.
12. Calvo, J., Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
13. Camus, L., Vandenesch, F., Moreau, K. (2021). From genotype to phenotype: adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis environment. *Microbial Genomics*. 7(3).
14. Cansaya, S. (2023). Incidencia y determinación de resistencia antimicrobiana de patógenos causantes de ITUAC, en urocultivos de pacientes de la UCI del hospital regional III Honorio Delgado, de enero del 2021 a marzo del 2022. [Tesis profesional para obtener el grado de bióloga, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]
15. Carmona, M. (2022). Inhibidores de bombas de eflujo: Nueva estrategia frente a la resistencia a los antibióticos. (Trabajo Fin de Grado Inédito). Universidad de Sevilla, Sevilla.
16. Castañeda, F. (2018). Genética de poblaciones y perfiles de resistencia a antibióticos de una colección clínica de *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional].
17. Chand, Y., Khadka, S., Sapkota, S., Sharma, S., Khanal, S., Thapa, A., Rayamajhee, B., Khadka, D., Panta, O., Shrestha, D., Poudel, P. (2021). Clinical Specimens are the Pool of Multidrug- resistant *Pseudomonas aeruginosa*

- Harbouring *oprL* and *toxA* Virulence Genes: Findings from a Tertiary Hospital of Nepal. *Emergency Medicine International*.
18. Coutiño, R., Hernández, A., Morales, M., Arias, D., Ahumado, M., Vivas, R. (2023). Quorum sensing in *Pseudomonas Aeruginosa* and its relationship with some pathologies in medicine. *Teknos Revista científica*, 23(2), 48–56.
 19. Di Conza, J., Gutkind, G. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(1), 63-78.
 20. Díaz, C. (2021). Caracterización del resistoma y viruloma de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística y bronquiectasias. [Tesis doctoral, Universidad de Cantabria].
 21. Dirección General de Epidemiología (2023, de 1ro al 31 de Enero). Panorama Epidemiológico de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS), MÉXICO, ENERO 2023. URI: www.gob.mx/salud
 22. Elmouaden, C., Laglaoui, A., Ennane, L., Bakkali, M., Abid, M. (2019). Virulence genes and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(10), 892-898.
 23. Faraji, F., Mahzounieh, M., Ebrahimi, A., Fallah, F., Teymournejad, O., Lajevardi, B. (2016). Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. *Microbial Pathogenesis*, 99, 1-4.
 24. Ghazaei, C. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Prevalence of Pathogenic Genes, OprL and ToxA in Human and Veterinary Clinical Samples in Ardabil, Iran, 2020. *Journal of Advanced Biomedical Sciences*, 12(4).
 25. Gholami, A., Majidpour, A., Talebi-Taher, M., Boustanshenas, M. y Adabi, M. (2016). PCR-based assay for the rapid and precise distinction of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from burns patients. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(2).
 26. González, A., Medina, J., Abad, P., González, D., García, E., Santos de la Blanca, R., Hernández-Arroyo, M., Tejido-Sánchez, Á. (2020). The challenge of *Pseudomonas aeruginosa* related infections in a Urology Ward: Epidemiology,

- risk factors and patterns of antibiotic resistance. El reto de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en un Servicio de Urología: epidemiología, factores de riesgo y patrones de resistencia a antibióticos. *Archivos Españoles de Urología*, 73(4), 299–306.
27. Goudarzi, M., Fazeli, M., Azad, M., Seyedjavadi, S. S., Mousavi, R., Rashidan, M., Azargashb, E. (2016). Carriage of class 1 and class 2 integron in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Tehran hospitals, Iran. *West Indian Medical Journal*, 65(1).
 28. Grosso, M., Santos, C., González, A., Méndez, J. L., Delgado, G., Morales, R., Soberón, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BioMed Central Genomics*, 15(1), 1-14.
 29. Hernández, D. (2020). Evaluación de la susceptibilidad de ceftolozane/tazobactam una cefalosporina de 5^o generación en cepas de Enterobacterias multirresistentes (*Klebsiella* spp, *Escherichia coli*) y *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis para obtener el grado de licenciado en bioquímica diagnóstica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM].
 30. Hernández, L. (2022). Efecto inhibitor de sustancias provenientes de especies del género Piper sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].
 31. Jiménez, M., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J., Duarte, C., Salgado, N., Ramón, P., Melano, R. (2019). Latin American consensus to define, categorize, and report multidrug-resistant, extensively drug-resistant, or pandrug-resistant pathogens. *Pan American Journal of Public Health*, 43.
 32. Jurado, I., Sainz, M., McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6).
 33. Kaszab, E., Szoboszlai, 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.

34. Khademi, F., Ashrafi, S., Neyestani, Z., Vaez, H., Sahebkar, A. (2021). Prevalence of class I, II and III integrons in multidrug-resistant and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Gene Reports*, 25.
35. Khosravi, A., Motahar, M., Abbasi, E. (2017). The frequency of class1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. *PLOS ONE*, 12(8).
36. Lambert, P. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95, 22–26.
37. Lepe, J., Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392-402.
38. Liew, S., Rajasekaram, G., Puthuchery, S., Chua, K. (2018). Detection of VIM-2-, IMP-1- and NDM-1-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 271–273.
39. López L., Castañeda, M. (2022). Los sistemas de detección de quorum (quorum sensing) o cómo “socializan” las bacterias. *RD-ICUAP*, 8(23), 177-186. Recuperado a partir de <http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/817>
40. Luchorro, J. (2020). Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes en el Hospital General Universitario de Alicante. [Memoria de Trabajo Fin de Grado en Farmacia, Universidad Miguel Hernández de Elche].
41. Marchetti, M., Errecalde, J., Mestorino, N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multiresistencia. *Analecta Veterinaria*, 31(2), 40–53
42. Marqués, A. (2016). Determinación de la respuesta de IL-6 en células epiteliales infectadas por secuencias crónicas de *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis para obtener el grado de Bióloga, Universitat de les Illes Balears]
43. Menacho, A. (2022). Asociación de la multiresistencia antimicrobiana con la presencia de integrones de clase 1 y 2 en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis para obtener el título de Médico Cirujano, Universidad Privada Antenor Orrego.]

44. Mielko, K., Jabłoński, S., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., Młynarz, P. (2019). Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7;35(11):178.
45. Minárik P, Tomásková N, Kollárová M, Antalík M. (2002). Malate dehydrogenases- structure and function. *General Physiology and Biophysics*, 21(3): 257-65.
46. Muddassir, M., Munir, S., Raza, A., Basirat, A., Ahmed, M., Farooq, U., Ahmed, S., Naqvi, S. (2021). Epidemiology and high incidence of metallo- β -lactamase and AmpC- β -lactamases in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(10), 1373–1379.
47. Newman, J., Floyd, R., Fothergill, J. (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiology Letters*, 364(15).
48. Nitz, F., de Melo, B., da Silva, L., de Souza Monteiro, A., Marques, S., Monteiro, V., de Jesus Gomes Turri, R., Junior, A., Conceição, P., Magalhães, H., Zagmignan, A., Ferro, T., Bomfim, M. (2021). Molecular Detection of Drug-Resistance Genes of *bla*OXA-23-*bla*OXA-51 and *mcr-1* in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*, 9(4), 786.
49. Ocampo, A., Cabot, G., Rodríguez, C., Roman, E., Tubau, F., Macia, M., Red Española de Investigación en Enfermedades Infecciosas (REIPI). (2012). Alterations of *OprD* in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1703–1713.
50. Pachori, P., Gothwal, R., Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & Diseases*, 6(2), 109–119.
51. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B., Lin, T., Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192.

52. Paniagua, G., Monroy, Eric., Vaca, Sergio. (2020). PCR Manual de identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en materia fecal. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Ed. 2°.
53. Panmanee, W., Gomez, F., Witte, D., Pancholi, V., Britigan, B., Hassett, D. (2008). The peptidoglycan-associated lipoprotein *OprL* helps protect a *Pseudomonas aeruginosa* mutant devoid of the transactivator *OxyR* from hydrogen peroxide-mediated killing during planktonic and biofilm culture. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3658-3669.
54. Park, M., Kim, SY., Roh, E., Lee, H. (2017). Diferencia de los genotipos del gen efector del sistema de secreción tipo 3 (T3SS) (*exoU* y *exoS*) y su implicación en las resistencias a los antibióticos en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de otitis media crónica. *Auris Nasus Laringe*, 44 (3), 258-265.
55. Parkins, M., Somayaji, R., Waters, V. J. (2018). Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4).
56. Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180-189.
57. Peña, C., Cabot, G., Gómez, S., Zamorano, L., Ocampo, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez, J., Rodríguez, F., Tubau, F., Martínez, L., Oliver, A., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) (2015). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(4), 539–548.
58. Pérez, M. (2020). Bacterias ESKAPE y nuevas estrategias de combate. [Grado en Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid].
59. Raheem, H., Hussein, E., Rasheed, A. (2022). Class 1, 2 integron genes distribution in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(7), 3165-3168.

60. Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J., Cornelis, P. (2010). Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 156, 2597–2607.
61. RHOVE. (2023). Informe Anual.
62. Rivera, C., Imbachi, R., Tobar, J., Dueñas, R. (2022). Aspectos generales sobre la resistencia bacteriana de gérmenes productores de β -lactamasas tipo AMPC: una revisión narrativa. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca*, 24(2), 15-23.
63. Rojas, M., Del Valle, D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 78-83.
64. Ruiz, L. (2007) *Pseudomonas aeruginosa*. Aportación al conocimiento de sus estructuras y de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos [Tesis doctoral, Universidad de Barcelona]
65. Sabaté, M., Prats, G. (2002). Structure and function of integrons. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(7), 341-345.
66. Sabbagh, P., Rajabnia, M., Maali, A., Ferdosi, 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.
67. Solórzano, J., Parrales, V. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* y su evolución de resistencia a los antibióticos en un hospital de segundo nivel en Portoviejo, Ecuador. *QhaliKay. Revista de Ciencias de la Salud*, 5(2), 50-56.
68. Thi, M., Wibowo, D., Rehm, B. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22).
69. Ullah, W., Qasim, M., Rahman, H., Jie, Y., Muhammad, N. (2017). Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Phenotypic characteristics and molecular identification of virulence genes. *Journal of the Chinese Medical Association*, 80(3), 173-177.
70. Vereá, L., Ferrer, A., Reyes, Y., Miranda, Y., Méndez, A. (2019). Infecciones nosocomiales y resistencia antimicrobiana. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*, 18(1), 1-17.

71. Wei, Q., Ma, L. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20983-21005.
72. Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology*, 2(41), 753-767.
73. Yalda, M., Sadat, T., Elham, R., Mohammad, T., Neda, M., 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).