



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas**

**Fenotipo y genotipo de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*  
causantes de infecciones nosocomiales**

Tesis que para obtener el grado de:

**Licenciado en Biología**

Presenta:

**Isabel Ramírez López**

Asesor de tesis:

**DC. Patricia Lozano Zaráin**

Septiembre 2016

### **Agradecimientos académicos**

A la D.C. Patricia Lozano Zaráin y a la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia por aceptarme y permitirme estar en su equipo de trabajo; por la confianza y apoyo que depositaron en mí para dirigir este trabajo.

A la D. C. Lorena Milflores Flores y al Q. F. B. Guillermo Rueda Luna por dedicar tiempo para la revisión y hacer observaciones sobre este proyecto.

La alumna fue apoyada con una beca otorgada por la VIEP con el proyecto “Papel del exopolisácarido en cepas multidrogoresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infección nosocomial y perfil genotípico de resistencia” **LOZP-NAT15-G**.

A la M.C. Alma López García por su asesoramiento, sus comentarios y consejos en cada paso para la elaboración de ésta tesis.

A carolina por brindarme las pautas para el comienzo de este trabajo.

A Emilio Pastor por su amistad, sus consejos, sugerencias y sobretodo por todo el conocimiento que me ha brindado en todo este camino.

### **Agradecimientos personales**

A mi familia que me impulsa a seguir en este arduo camino, por su apoyo que me exige más cada día; a perseverar con paciencia cada obstáculo y cada frustración que se me ha presentado en mi camino, cada esfuerzo y logro es por ustedes y para ustedes.

A mi mejor amiga Vero y compañera de carrera con la que compartí un pedacito de mi vida, con la que me desahogué tanto profesionalmente como personalmente venciendo muchas dificultades.

A ti que has caminado conmigo y que me has apoyado tanto haciendo lo imposible para que logre mis objetivos. Tus consejos, tu quietud me han servido de mucho.

*¡Gracias por todo!*

*“No quiero creer. Quiero  
saber”*

*Carl Sagan*

## Índice

<b>1.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1	Características e importancia clínica de la especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	2
1.2	Mecanismos de resistencia a los antibióticos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	3
<b>2.</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>5</b>
2.1	Antecedentes generales.....	5
2.1.1	$\beta$ -lactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
2.1.2	Resistencia a aminoglucósidos.....	8
2.2	Antecedentes particulares.....	10
<b>3.</b>	<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>12</b>
<b>4.</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>13</b>
<b>5.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>14</b>
5.1	objetivo general.....	14
5.2	objetivos específicos.....	14
<b>6.</b>	<b>Esquema general de trabajo.....</b>	<b>15</b>
<b>7.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>16</b>
7.1	Cepas de estudio.....	16
7.2	Ratificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
7.3	Determinación de la sensibilidad a antibióticos.....	17
7.4	Lisado bacteriano.....	18
7.5	Reacción de PCR.....	19
7.6	Visualización de productos de PCR.....	22
7.7	Secuenciación de la amplificación.....	22
7.8	Análisis de secuencias.....	22
<b>8.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>23</b>
8.1	Patrones de susceptibilidad microbiana de 14 cepas.....	23
8.2	Origen de 62 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
8.3	Patrones de susceptibilidad de 62 cepas.....	27
8.4	Amplificación de genes que codifican para $\beta$ -lactamasas .....	29

<b>8.4.1</b>	Secuenciación y análisis del producto de amplificación del gen <i>bla<sub>ges</sub></i> .....	<b>32</b>
<b>8.5</b>	Amplificación de N-acetiltransferasas.....	<b>35</b>
<b>8.5.1</b>	<i>aac(6')1b</i> .....	<b>35</b>
<b>8.5.2</b>	<i>aac(3)-IIa</i> .....	<b>36</b>
<b>9.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>38</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>43</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>44</b>

Índice de tablas		
Tabla	Nombre	Página
1	Puntos de corte para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CLSI, 2015).	18
2	Componentes para PCR.	19
3	Cepas control.	20
4	Oligonucleótidos y condiciones de amplificación.	20
5	Pruebas bioquímicas de 14 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	23
6	Pruebas fenotípicas de resistencia de 14 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	24
7	Patrones de susceptibilidad de 62 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	28
8	Perfiles genotípicos de resistencia de 9 cepas multirresistentes a $\beta$ -lactámicos.	32
9	Perfiles genotípicos de resistencia de 22 cepas resistentes a aminoglucósidos.	37

Índice de figuras		
Figura	Nombre	Página
1	Resistencia de 14 cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	25
2	Sitios anatómicos de que provienen 62 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	26
3	Áreas Hospitalarias de procedencia de 62 cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	27
4	Porcentajes de los patrones de susceptibilidad de 62 cepas.	29
5	Amplificación de <i>bla<sub>ges</sub></i> en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	30
6	Amplificación de <i>bla<sub>oxa-2</sub></i> en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	31
7	Secuencias nucleotídicas de la cepa NP62.	34
8	Secuencias aminoácidas de la cepa NP62.	34
9	Gel representativo de la amplificación de <i>aac (6')1b</i> de 22 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	35
10	Gel representativo de la amplificación de <i>aac (3) Ila</i> de 22 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	36

### Abreviaturas

AN	Amikacina
ATM	Aztreonam
BLEE	$\beta$ -Lactamasas de Espectro Extendido
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CL	Colistin
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FEP	Cefepime
GM	Gentamicina
HNP	Hospital para el Niño Poblano
IPM	Imipenem
M $\beta$ L	Metallo- $\beta$ -lactamasas
MEM	Meropenem
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
NOR	Norfloxacina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIP	Piperacilina
Pb	Pares de bases
Rpm	Revoluciones por minuto
TIC	Ticarcilina
TSA	Agar Soya Trypticasa
TZP	Piperacilina/Tazobactam
Mg	Microgramo
$\mu$ L	Microlitro

## Resumen

La manera en que las bacterias se adaptan a las presiones ambientales hace que exhiban numerosos mecanismos para evadir su erradicación. Los más importantes en el ambiente clínico, son los diversos mecanismos de resistencia que desarrollan los microorganismos, contra los antibióticos permitiendo que sean capaces de sobrevivir a cada barrera presentada por estos. *Pseudomonas aeruginosa* es una especie capaz de resistir a la antibioticoterapia recomendada debido a la adquisición y diseminación de genes, haciéndolo uno de los patógenos más importante dentro del ambiente hospitalario. El objetivo de este trabajo fue determinar el fenotipo y el genotipo de la resistencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales del Hospital para el Niño Poblano. A 14 cepas se les rectificó la especie por medio de pruebas bioquímicas y se estudió el fenotipo de resistencia. Los resultados de las 14 cepas fueron incorporados al cepario junto con 48 aislados a los cuales se les había realizado un perfil fenotípico de resistencia en estudios anteriores, sumando un total de 62 cepas. De este total solo 9 cepas presentaron multidrogorresistencia y resistencia a carbapenémicos a las cuales se les realizó la búsqueda de genes que les confieren resistencia a  $\beta$ -lactámicos como: *bla<sub>ges</sub>*, *bla<sub>oxa-1</sub>*, *bla<sub>oxa-2</sub>*, *bla<sub>pse</sub>*, *bla<sub>ndm</sub>*, *bla<sub>per</sub>*, *bla<sub>spm</sub>* y *bla<sub>veb</sub>* mediante amplificación por PCR. Se observó que estas cepas no fueron portadoras de los genes *bla<sub>oxa-1</sub>*, *bla<sub>pse</sub>*, *bla<sub>ndm</sub>*, *bla<sub>per</sub>*, *bla<sub>spm</sub>* y *bla<sub>veb</sub>*; sin embargo fueron portadoras de gen *bla<sub>ges</sub>* en un 56% (5 cepas) y *bla<sub>oxa-2</sub>* en un 11% (1 cepa). De los amplificadores positivos obtenidos para *bla<sub>ges</sub>* (864pb), se mandó a secuenciar la cepa NP62 de la cual se obtuvo 751pb secuenciadas, la cual tuvo una similitud del 95% con el gen tipo *bla<sub>ges-2</sub>* y en un 96% *bla<sub>ges-5</sub>*; por lo cual es necesario realizar una secuenciación del amplicón completo para determinar si se trata de una variante nueva del gen *bla<sub>ges</sub>* que pudiera tener actividad carbapemenasa. También se estudió la presencia de genes que codifican para N-acetiltransferasas: *aac3-II-a* y *aac(6')1-b*; del total de las 62 cepas se escogieron 22 que eran resistentes a aminoglucósidos. El 5% (1 cepa) fue portador del gen *aac3-II-a* y 27% (6 cepas) portó *aac(6')1-b*. Es importante dar seguimiento a la resistencia y a los mecanismos involucrados de esta especie bacteriana que nos

permita conocer lo que sucede a nivel hospitalario para mejorar las opciones terapéuticas.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia a antibióticos,  $\beta$ -lactamasas, N-acetiltransferasas.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades nosocomiales son aquellas que se adquieren dentro de cualquier ámbito hospitalario después de la causa principal del internamiento del paciente; representan un gran problema de salud pública que se traduce posteriormente en problemas económicos y sociales. Muchas de estas infecciones son provocadas por factores como: la variedad de procedimientos médicos y el instrumental necesarios para tratar éstas, la tendencia a internar en nosocomios a pacientes seriamente enfermos que crean posibles vías de infección, la reducción de la inmunidad de los pacientes y la transmisión de bacterias farmacorresistentes en poblaciones hacinadas en los hospitales, en donde las prácticas sobre el control de infecciones son deficientes y pueden facilitar la transmisión microbiana (WHO/CDS/CSR/EPH, 2002).

Las infecciones nosocomiales causadas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos son asociadas con el incremento de los costos de hospitalización y la alta morbilidad y mortalidad (Graf *et al.*, 2010; Avorn, 2000). Alrededor de 1.4 millones de personas en el mundo sufren complicaciones por infecciones adquiridas en el hospital. El control de las infecciones es indispensable para tener dominio de los brotes causados por microorganismos multidrogosresistentes (WHO/CDS/CSR/DRS, 2001). Sin embargo en la actualidad los antibióticos disponibles no tienen actividad específica para cada uno de los microorganismos resistentes, ya que el número de compuestos que tienen éstos antimicrobianos para tratar las infecciones causadas, no resulta efectivo (Bassetti *et al.*, 2013)..

Numerosas agencias y sociedades profesionales han intentado llamar la atención sobre la falta de nuevos antibióticos especialmente aquellos que actúan sobre patógenos Gram-negativos multidrogosresistentes (Bassetti *et al.*, 2013). La mayoría de las infecciones dentro del ambiente hospitalario, son causadas por microorganismos denominados “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*) por su capacidad para poder

“escapar” de la acción de los antimicrobianos presentando una gran resistencia (Pendleton *et al.*, 2013; Boucher *et al.*, 2009).

### **1.1 Características e importancia clínica de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.**

El nombre de la especie deriva del latín *Aerugo* “óxido de cobre” que refleja el color característico que presentan estas colonias debido a la producción de pigmentos (Morrison & Wenzel, 1984).

Es un bacilo Gram-negativo aerobio, catalasa y oxidasa positivo, no fermentador de lactosa, tiene la capacidad de metabolizar sustratos a una temperatura máxima de 42°C; es un microorganismo altamente adaptable pudiendo colonizar varios nichos ambientales como suelos, hábitats marinos y plantas (Seizen & Stark, 1943; Tashiro *et al.*, 2013). Cuenta con la facilidad para colonizar el instrumental médico, principalmente catéteres a los que se adhiere y adapta (Lanini *et al.*, 2011; Zhao & Hu, 2010). Así mismo se le ha encontrado en la mucosa pulmonar de pacientes con fibrosis quística, en pacientes con infecciones del tracto urinario, infecciones asociadas al catéter, infecciones de la córnea, eritema conjuntival y meningitis (Gomila *et al.*, 2013; Chatterjee *et al.* 2016). Sin embargo raramente causa infección en hospederos inmunocompetentes, pero puede causar una variedad de infecciones severas en hospederos inmunocomprometidos que pueden llevar a la muerte. De esta forma se le considera como un patógeno oportunista y uno de los mayores responsables de infecciones nosocomiales (Shimada & Matsumura, 2014).

El tratamiento contra las infecciones causadas por este microorganismo de acuerdo con la guía de Stanford para la terapia antimicrobiana, recomienda principalmente el uso de penicilinas antipseudomónicas (Piperacilina y Ticarcilina), cefalosporinas de tercera generación (Ceftazidime y Cefoperazone), carbapenémicos (Imipenem y Meropenem), monobactámicos (Aztreonam), Trobamicina y Ciprofloxacina como primera elección para el tratamiento (Gilbert *et al.*, 2005).

La resistencia de este microorganismo a los antimicrobianos tiene un gran efecto sobre la tasa de infección y de mortalidad en los pacientes y uno de los principales motivos es el uso indiscriminado de los antibióticos en los hospitales (Micek *et al.*, 2005). En Estados Unidos de un total de 6000 infecciones provocadas por cepas multidrogorresistentes de *P. aeruginosa* hay aproximadamente 400 muertes al año (Chatterjee *et al.*, 2016).

## **1.2 Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa***

Las bacterias son capaces de resistir a la acción de los antibióticos y a agentes desinfectantes de manera natural y este tipo de resistencia se le conoce como resistencia intrínseca. Otro tipo de resistencia es la adquirida en donde los microorganismos son capaces de desarrollar resistencia por mutaciones en distintas partes del cromosoma o bien por diseminar y adquirir genes de resistencia empleando elementos genéticos móviles como: plásmidos, transposones e integrones procedentes de material genético de la misma especie e incluso de diferente género (Poole, 2011; Van Hoek *et al.*, 2011; Sheldon, 2005).

Los mecanismos de resistencia que *P. aeruginosa* presenta son:

- La baja permeabilidad en la membrana externa y esto es por las propiedades que tienen las porinas de este microorganismo, en el análisis de secuencia del genoma de *P. aeruginosa* se han identificado 163 porinas de la membrana externa, estas permiten el paso de nutrientes y de antibióticos hidrofílicos, sin embargo la pérdida de porinas específicas pueden disminuir la susceptibilidad de este microorganismo a ciertos agentes antibacterianos (Chatterjee, 2016; Poole, 2011; Strateva & Yordanov, 2009).
- Una  $\beta$ -lactamasa AmpC cromosómica e inducible que le confiere resistencia a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, cefalosporinas de 1ra y 2da generación y resistencia con cefalosporinas de 3ra generación solo si hay una hiperproducción de esta AmpC cromosómica este último proceso es muy común en *P. aeruginosa* (Chatterjee, 2016; Poole, 2011; Strateva & Yordanov, 2009).

- Un sistema de bombas de expulsión activa de antibióticos como: MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexEF-OprN y MexCD-OprJ que pueden presentar mutaciones en los genes que se encargan de regular estas bombas y le que confieren resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Chatterjee, 2016; Poole, 2011; Strateva & Yordanov, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009; Nikaido & Hancock, 1986).
- Mutación en genes que codifican para DNA girasa y topoisomerasa IV que confieren resistencia a fluoroquinolonas, en particular las alteraciones de los aminoácidos de las subunidades de GyrA y ParC (Cho *et al.*, 2014).
- Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos que provocan la inactivación de aminoglucósidos entre las cuales se encuentran aminoglucósido acetiltransferasa, aminoglucósido nucleotidiltransferasas y aminoglucósido fosforiltransferasa (Chatterjee, 2016; Poole, 2011; Strateva & Yordanov, 2009).
- La metilación de 16rRNA de la subunidad 30s del ribosoma interfiriendo con la unión de los aminoglucósidos (Chatterjee, 2016; Strateva & Yordanov, 2009).
- $\beta$ -lactamasas en donde se incluyen las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) y las serin- $\beta$ -lactamasas. (Poole, 2011).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes generales

La resistencia que presenta *P. aeruginosa* a los antibióticos se debe a múltiples factores, uno de ellos es su habilidad para adquirir genes de resistencia de otros géneros, tales como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y especies de *Salmonella* que lo convierten en un patógeno de suma importancia (Odumosu *et al.*, 2013). *P. aeruginosa* es capaz de adquirir nuevos determinantes de resistencia por transferencia horizontal. Estudios describen que la resistencia de este microorganismo es debido a los genes de resistencia que son transferidos a él y se encuentran localizados principalmente en integrones de clase I que a su vez se encuentran en plásmidos o transposones. La principal resistencia a familias de antibióticos encontrados en *P. aeruginosa* es a  $\beta$ -lactámicos y a aminoglucósidos (Liakopoulos, 2013; Viedma, 2012; Zhao & Hu, 2010).

Actualmente se cuenta con muchos  $\beta$ -lactámicos y entre los clínicamente importantes incluyen: penicilinas y cefalosporinas que tienen una actividad amplia sobre Gram negativos y Gram positivos, monobactámicos que actúan contra patógenos Gram negativos aeróbicos y carbapenémicos que tienen un gran espectro de actividad contra Gram positivos y Gram negativos, este último grupo de antimicrobianos es esencial para el tratamiento causado por *P. aeruginosa* multidrogorresistente, sin embargo estos antimicrobianos están expuestos a ser degradados por enzimas llamadas  $\beta$ -lactamasas que son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos dando lugar a compuestos sin actividad (Palzkill, 2013).

Las  $\beta$ -lactamasas han sido clasificadas en muchas ocasiones y una de las primeras propuestas fue en 1981 por Mitsuhashi e Inoue, fue basada en los perfiles sobre los que las  $\beta$ -lactamasas actuaban, la clasificación fue en tres grupos: penicilinasas (PCase), cefalosporinasas (CSase) y cefuroximasas (CXase). Sin embargo fueron aceptadas dos nuevas propuestas que hasta la fecha siguen siendo utilizadas; la primera de Ambler (1980) en donde se clasifican en cuatro grupos, A, B, C y D y está dada de acuerdo a su función proteica. El

grupo A, C y D son serin- $\beta$ -lactamasas y el grupo B son metalo- $\beta$ -lactamasas (MLB).

La segunda propuesta de Bush & Jacoby (adaptación 2010) es de acuerdo a las características bioquímicas y funcionales, estableciendo tres grupos (1, 2 y 3) subdivididos a su vez de acuerdo a la función del sustrato y perfil de inhibición (se incluye ácido clavulánico, tazobactam y EDTA como inhibidores); el primer grupo de esta propuesta tiene a las cefalosporinas que incluye al grupo C clasificado por Ambler; el segundo grupo incluye a serin- $\beta$ -lactamasas y en este se encuentran el grupo A y D de Ambler y el tercer grupo posee a las MLB, este grupo tiene la capacidad de hidrolizar los carbapénemicos, tienen poca afinidad por los monobactámicos y no son inhibidos por ácido clavulánico y tazobactam.

### 2.1.1 $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*

La especie tiene dos clases de  $\beta$ -lactamasas: Amp-C y las BLEE ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido); Amp-C que codifica en el cromosoma de la bacteria y tiene la capacidad de ser inducida por los propios  $\beta$ -láctamicos, principalmente por cefalotina y ampicilina cuando esto sucede principalmente hay resistencia a penicilinas y cefalosporinas. Las BLEE son codificadas en plásmidos y también se manifiestan por la resistencia a penicilinas y a cefalosporinas. Dentro de las BLEE se encuentran dos grupos como son MLB y serin- $\beta$ -lactamasas.

Las MLB son enzimas capaces de hidrolizar todos los  $\beta$ -lactámicos y se les asocia con la presencia de enzimas relacionadas con resistencia a aminoglucósidos. Estas enzimas requieren zinc<sup>2+</sup> para realizar su actividad catalítica, sin embargo su actividad es suprimida por quelantes como el EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético). Son la principal causa de la resistencia a los carbapenémicos.

Dentro de las MLB, se encontró *bla<sub>imp-1</sub>*, el primer gen descubierto que codifica para la enzima IMP y se detectó en una cepa de *P. aeruginosa* en Japón en el año de 1990 (Watanabe *et al.*, 1991). Las variantes de este gen (*bla<sub>imp</sub>*) han sido encontradas en diversos lugares como Canadá (*bla<sub>imp-7</sub>*), China (*bla<sub>imp-9</sub>*), Italia (*bla<sub>imp-13</sub>*), Brazil (*bla<sub>imp-16</sub>*) y en USA (*bla<sub>imp-18</sub>*). La enzima IMP es una de las

principales carbapemenasas encontrada y cuenta con más de 51 variantes, 32 de estas variantes han sido reportadas para *P. aeruginosa* (Strateva & Yordanov, 2009).

Posterior a la aparición de algunas variantes de IMP le siguieron las enzimas VIM, detectadas en Verona (Italia) a mediados de la década de 1990. Ambos grupos de MBL se encuentran hoy ampliamente diseminadas por prácticamente todo el mundo y además, en múltiples especies bacterianas, incluida *P. aeruginosa*. (Oliver, 2009). Estas dos enzimas son codificadas dentro de cassettes génicos y los genes que codifican para éstas, residen con otros genes de resistencia en integrones que son asociados con transposones y pueden ser insertados en el cromosoma bacteriano o en plásmidos (Palzkill, 2013).

Recientemente, han aparecido otros grupos de MBL transferibles, las SPM, GIM o SIM, todavía restringidas a áreas geográficas concretas. Algunos de los genes que codifican para estas enzimas son *bla<sub>spm-1</sub>*, aislada en Brasil en 1997 y ahora ha sido reportada en Europa; en el 2002 se encontró *bla<sub>gim-1</sub>* en aislados de pacientes de un centro médico en Alemania (Potron, 2015; Poole, 2011; Strateva & Yordanov, 2009).

El gen *bla<sub>ndm-1</sub>* ha sido identificado recientemente y se ha encontrado en muchas especies bacterianas principalmente en enterobacterias sin embargo ha sido transferido a *P. aeruginosa* y en 2011 fue reportado por primera vez este gen en dos aislados en Serbia, también se le ha encontrado en países como Francia, India, Italia, Egipto y Eslovaquia (Potron, 2015)

Dentro de las serin-β-lactamasas de la clase A se encuentra *bla<sub>per-1</sub>*, que fue el primer gen de este grupo encontrado en un paciente proveniente de Turquía; se ha comprobado la diseminación de la enzima en muchos países de Europa y Asia; así mismo se han encontrado *bla<sub>per-2</sub>* en Bolivia. En esta misma clase se han encontrado raramente variantes de enzimas como TEM y de SHV en este microorganismo (Potron *et al.*, 2015).

Otras variantes de genes que se han encontrado en *P. aeruginosa* de la clase A con actividad carbapemenasa se incluyen *bla<sub>imi</sub>*, *bla<sub>nmc-a</sub>*, *bla<sub>kpc</sub>*, y algunas variantes de *bla<sub>ges</sub>* como *bla<sub>ges-2</sub>* y *bla<sub>ges-5</sub>*. Los genes *bla<sub>kpc</sub>* y *bla<sub>ges</sub>* han adquirido

gran relevancia debido a su posición plasmídica lo que les ha permitido adquirir una expansión muy rápida en hospitales (Hong *et al.*, 2012).

Dentro de este grupo también se encuentran variantes del gen VEB como *bla<sub>veb-1</sub>* localizado en Francia en 1998 y se ha encontrado la presencia de las variantes de este gen en aislados que presentan una alta resistencia a ceftazidime (Strateva & Yordanov, 2009).

En las serin- $\beta$ -lactamasas de clase D encontramos a la familia OXA conocidas como oxacilinasas, estas enzimas son capaces de hidrolizar amoxicilina y cloxacilina sin embargo no pueden ser inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam pero si son inhibidas por cloruro de sodio (Poirel *et al.*, 2010).

Genes han sido encontradas en *P. aeruginosa*, por ejemplo se ha encontrado la presencia de *bla<sub>oxa-2</sub>* y simultáneamente *bla<sub>per-1</sub>* en este microorganismo, en países como Serbia y Hungría. De la misma forma se han encontrado algunas otras asociaciones de variantes de oxa (*bla<sub>oxa-5</sub>*) con *bla<sub>ges-2</sub>* con propiedades carbapemenasa en aislados en Sudáfrica (Poirel *et al.* 2010).

La primera identificación de un tipo de OXA carbapemenasa en este microorganismo fue reportada en 2008, cuando se logró identificar como *bla<sub>oxa-40</sub>*; la misma previamente identificada en *A. baumannii* (Lister *et al.*, 2009; Ho, 2015).

### **2.1.2 Resistencia a aminoglucósidos**

Los aminoglucósidos son antibióticos que actúan sobre la superficie externa de la membrana celular de las bacterias y posteriormente atraviesan la membrana interna para unirse a la subunidad 30S ribosomal inhibiendo la síntesis proteica (Aliño *et al.* 2007). La indicación clínica más común para el uso aminoglucósidos, es para tratar infecciones graves causadas por bacilos aerobios Gram-negativos (Bassetti *et al.*, 2013). El uso de estos antibióticos se asocia con  $\beta$ -lactámicos o glucopéptidos; permitiendo este sinergismo antimicrobiano la difusión de los aminoglucósidos al interior celular (Molina *et al.*, 2009).

Los principales antibióticos aminoglucósidos antipseudomónicos incluyen amikacina, gentamicina y trobamicina (Young *et al.*, 2013).

La resistencia a este tipo de antibióticos puede resultar por las siguientes formas: alteración de la difusión (sobreexpresión de bombas de expulsión activa), modificación de las proteínas ribosomales que comprometen la unión entre el antibiótico a la diana, metilación del sitio de unión de los aminoglucósidos en el ribosoma y la modificación enzimática de aminoglucósidos habiendo diferentes tipos de enzimas modificadoras de éstos antibióticos, las principales son: N-acetiltransferasas (AAC), O-nucleótidiltransferasas y O-fosfotransferasas (APH); estas enzimas afectan el sinergismo bactericida entre los aminoglucósidos y los  $\beta$ -lactámicos, de ahí deriva la importancia clínica. La mayoría de estos genes pueden encontrarse en plásmidos, transposones o en cassettes génicos de integrones (Palzkill, 2013; Yao & Moellering, 2011; Molina *et al.*, 2009).

En aislados de *P. aeruginosa* la resistencia principal a aminoglucósidos es debido a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos; una de ellas son las aminoglucósido acetiltransferasas son enzimas que transfieren grupos acetilo a grupos amino de aminoglucósidos. Las AAC pueden ser agrupadas dentro de cuatro clases basado en los sitios de acetilación de los aminoglucósidos, *aac(1)*, *aac(2')*, *aac(3')* y *aac(6')* esta última es una de las variantes más encontrada en este microorganismo, un subtipo de ésta *aac(6')-I* le confiere resistencia a amikacina pero no a gentamicina; *aac(6')-II* determina la resistencia a gentamicina, trobamicina y netilmicina; a su vez en *aac(3)-I* confiere resistencia a gentamicina; *aac(3)-II* le confiere resistencia a gentamicina, netilmicina y amikacina y *ant(2')-I* que le confiere resistencia a gentamicina y trobamicina (Kitao *et al.*, 2009).

## 2.2 Antecedentes particulares.

En México se ha elevado el consumo de antibióticos así como su uso irracional provocando altas tasas de resistencia en bacterias causantes de enfermedades nosocomiales (Pacheco, 2006)

En hospitales mexicanos se ha estudiado la presencia de diferentes microorganismos causantes de infecciones nosocomiales, entre los cuales se incluyen *P. aeruginosa*, se encontró este microorganismo en aislados que fueron colectados desde el 2005 hasta el 2010. Se concluyó que este microorganismo fue la tercera especie más común en 404 cepas de un total de 2132 seguido de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, posteriormente se determinó que las cepas aisladas exhiben altas tasas de resistencia a carbapenémicos como Imipenem y Meropenem (Morfin *et al.*, 2012).

Los estudios realizados en México acerca de la resistencia de *P. aeruginosa* se han descrito desde 1986, estos reportes de resistencia genotípica han permitido conocer la presencia de algunos genes que le confieren resistencia a los antibióticos a este microorganismo; respecto a lo encontrado en el entorno hospitalario, en Morelia se hallaron genes como *bla<sub>imp-15</sub>* y *bla<sub>imp-18</sub>*, así como *bla<sub>ges-5</sub>* en asociación con *bla<sub>vim-2</sub>* y *bla<sub>vim-1</sub>*, siendo éstas las primeras MLB encontradas en el país (Noriega, 2014).

En el estado de Puebla se han realizado varios estudios con respecto a los mecanismos de resistencia que presenta *P. aeruginosa*. En el 2014 Bello realizó un análisis para la búsqueda de genes de resistencia a betalactámicos en el laboratorio de Microbiología hospitalaria y de la comunidad, éstas cepas provenían del Centro Médico 20 de Noviembre; se eligieron 21 cepas multidrogorresistentes para la búsqueda de algunos genes codificantes para serin-β-lactamasas como *bla<sub>shv</sub>*, *bla<sub>tem</sub>*, *bla<sub>ctx</sub>*, *bla<sub>per</sub>*, *bla<sub>bel</sub>* y *bla<sub>ges</sub>*, de igual forma, variantes de MLB como *bla<sub>vim</sub>*, *bla<sub>imp</sub>* y *bla<sub>ndm</sub>*; obteniendo solo resultado en la amplificación de *bla<sub>ges</sub>* en un 59%.

En el 2015 Morales realizó un estudio con cepas provenientes del Hospital para el Niño poblano en donde se estudió el perfil fenotípico de 32 cepas que fueron resistentes en un 27% a β-lactámicos, 39% para aminoglucósidos, 25%

para fluoroquinolonas y 28% para colistina posteriormente se realizó la búsqueda de genes de tipo MLB como *bla<sub>gim</sub>*, *bla<sub>imp</sub>* y *bla<sub>vim</sub>* en el cual no se obtuvieron resultados positivos para los tres genes.

Con respecto a aminoglucósidos se han encontrado diversas variantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en el mundo.

Estudios en diversos hospitales de Francia en los cuales se aislaron 226 cepas, se observó que un 23% de éstas presenta resistencia a cuatro tipos de aminoglucósidos (Trobamicina, Amikacina, Gentamicina y Netilmicina) y se observó que el 36.5% de las cepas resistentes a estos antibióticos presentan genes *aac(6)-I*, 21.2% expresa *ant(2)-I*, el 7.7% presenta *aac(3)-II*, el 5.8% *aac(3)-I* y el 1.9% expresa *aac(6)-II* (Dubois *et al.*, 2008).

En hospitales de Irán corroboran la prevalencia de genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos, en 250 aislados de *P. aeruginosa* los cuales fueron resistentes principalmente a gentamicina en un 43%, trobamicina 38% y amikacina en un 24% y los genes encontrados fueron *aac(6)-I* en 7%, *aac(6)-II* en un 36%, *ant(2)-I* en un 28% y *aph(3)-VI* en un 11%, el porcentaje sobrante se encontró en algunas otras variantes de estos genes (Vaziri *et al.*, 2011).

En el 2014, Michalska y colaboradores analizaron 25 aislados de pacientes de un hospital del noreste de Polonia en el cual se detectaron algunas enzimas como: *ant(2)-Ia* en un 36%, *aac(6)-Ib* en un 28% y *aph(3)-Ib* en un 8% de todos los aislados.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso indiscriminado de los antibióticos en México ha tenido un gran impacto en los casos clínicos, debido a las consecuencias, una de ellas y la más grave, la mortalidad de algunos pacientes. La presencia de *P. aeruginosa* ha aumentado en forma significativa en los aislados por infecciones nosocomiales elevando así la resistencia a la antibioticoterapia recomendada. La diseminación de genes de resistencia de este microorganismo ha permitido conocer cómo es que algunas cepas han evolucionado genéticamente por medio de la adquisición de genes.

Este estudio tiene como finalidad observar la presencia de genes de resistencia a antibióticos y su relación con el fenotipo de resistencia; por lo que se ha planteado la siguiente pregunta ¿la multiresistencia de este microorganismo, es debida a la presencia de genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas y de N-acetiltransferasas en aislados provenientes de pacientes del Hospital para el Niño Poblano?

#### **4. JUSTIFICACIÓN.**

En la actualidad el aumento de la resistencia a los antibióticos que presentan algunas especies bacterianas, constituye una gran problemática con relevancia en la salud pública, debido al bajo control que tienen las instituciones sobre ellas; lo que ha causado una multiresistencia de las bacterias a los antibióticos haciendo más difícil la erradicación por medio de los tratamientos terapéuticos establecidos.

Lo que muchos estudios han comprobado es que la multiresistencia a los antibióticos ha llevado a consecuencias preocupantes generando en muchos casos alta morbilidad, lo que a su vez ocasiona altos gastos de hospitalización traduciéndose en problemas económicos, pero sobretodo la consecuencia más alarmante es que cada año se presentan más casos de mortalidad.

El objetivo de la presente investigación está basado en la importancia de conocer el fenotipo de resistencia y posteriormente determinar así la relación de la presencia de genes con este fenotipo, de la misma forma darle seguimiento a los mecanismos de resistencia y la diseminación que presenta *Pseudomonas aeruginosa* a nivel hospitalario.

## 5. OBJETIVOS

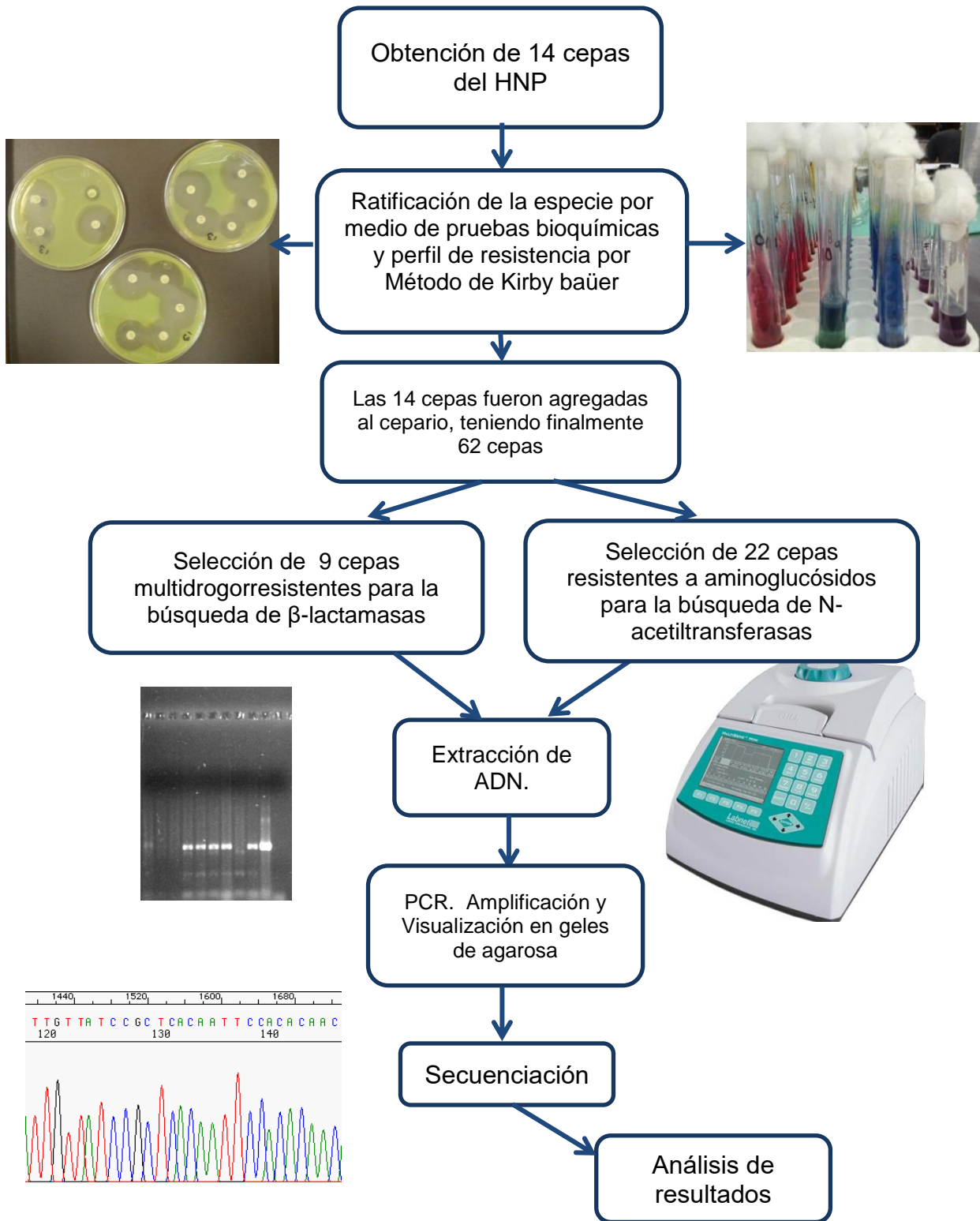
### 5.1 Objetivo general

Determinar el fenotipo y genotipo de la resistencia de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infección nosocomial en el Hospital para el Niño Poblano.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Ratificar aislados de *P. aeruginosa* por medio de pruebas bioquímicas
2. Determinar el fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *P. aeruginosa* mediante el método de Kirby Baüer.
3. Determinar la presencia de genes tipo metalo- $\beta$ -lactamasas (*bla<sub>spm-1</sub>* y *bla<sub>ndm-1</sub>*) por medio de PCR.
4. Determinar la presencia de genes tipo Serin- $\beta$ -lactamasas (*bla<sub>ges</sub>*, *bla<sub>veb-1</sub>*, *bla<sub>pse-1</sub>* y *bla<sub>per-1</sub>*) y de tipo oxacilinas (*bla<sub>oxa-1</sub>* y *bla<sub>oxa-2</sub>*) por medio de PCR y secuenciación.
5. Identificar la presencia de genes que codifican para N-acetiltransferasas (*aac(3)-IIa* y *aac(6')1b*) por medio de PCR.

## 6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## 7. METODOLOGÍA.

### 7.1 Cepas de estudio

Se estudiaron cepas procedentes de diferentes áreas hospitalarias (herida quirúrgica abdominal, secreciones quirúrgicas de líquido peritoneal, secreción de herida quirúrgica de mielomeningocele, peritonitis, infección renal crónica, material fecal, secreción de rodilla, secreción de herida en cráneo, líquido sinovial, pancreatitis, sepsis, apendicitis) y de diversas partes anatómicas (urología, cirugía, medicina interna, unidad de cuidados neonatales, unidad de cuidados intensivos, oncohematología, unidad de quemados y ortopedia) de pacientes del Hospital para el Niño Poblano del estado de Puebla.

Se analizaron 14 cepas por medio de pruebas bioquímicas y pruebas fenotípicas de resistencia. Posteriormente se incluyeron en el cepario del laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la comunidad que contaba con 48 cepas a las que se les había realizado un perfil fenotípico de resistencia contando finalmente con un total de 62 cepas.

Tomando en cuenta lo anterior del total de cepas procedentes de este hospital solo 9 cepas fueron multidrogoresistentes y resistentes a carbapenémicos, seleccionadas para realizar la búsqueda de genes que le confieren resistencia  $\beta$ -lactámicos. Estas cepas en su mayoría ya habían sido estudiadas para la búsqueda de otros genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas en estudios anteriores.

Para la búsqueda de genes de resistencia a aminoglucósidos solo 22 cepas presentaron un perfil de resistencia a este grupo de antibióticos. A estas cepas se les buscó genes que codifican para N-acetiltransferasas (*aac(3)-IIa* y *aac(6')1b*).

### 7.2 Ratificación de *Pseudomonas aeruginosa*

Las 14 cepas se encontraban preservadas en crioviales con caldo BHI/Glicerol (BIOXON®) e identificadas con un número de acuerdo a lo asignado dentro del hospital, se descongelaron y se sembró un inóculo de cada cepa en placas de agar TSA (BD Bioxon®) en forma de estría cruzada; las placas se incubaron por

24 horas a 37°C. Pasado este tiempo se tomó una colonia aislada y se sembró nuevamente en placas de agar TSA (Agar Soya Trypticase) en forma de césped por 24 horas a 37°C terminado el tiempo, se tomó inóculo para sembrar cada cepa en dos placas de agar Mc Conkey (BD Bioxon®) en el primer juego de placas de este agar se observaron los cambios morfológicos que presentaban las colonias y en el segundo juego de placas se observó el crecimiento a 42° C característico de este microorganismo; de la misma forma se sembró un inóculo en tubos que tenían agar TSI (Agar de hierro y triple azúcar), MIO (Movilidad, Indol, Ornitina), OF (Oxidador/Fermentador) y Citrato de Simmons para corroborar (identificadas previamente como *P. aeruginosa* mediante el equipo semiautomatizado Vitek2) del microorganismo de estudio.

### **7.3 Determinación de la sensibilidad a antibióticos (difusión por disco, método de Kirby baüer)**

Para determinar el perfil fenotípico de resistencia de las 14 cepas se estudió la sensibilidad a diferentes antibióticos mediante el método de difusión por disco siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

El método recomendado para *P. aeruginosa* consistió en sembrar las 14 cepas en placas de TSA en forma de césped y se incubaron durante 24h a 37°C, cumplidas estas condiciones se tomó un inóculo de la placa, se depositó en un tubo con solución salina teniendo una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland, posteriormente con ayuda de un hisopo estéril se tomó un inóculo de esta suspensión para sembrarlo en forma de césped sobre placas de Müller Hinton (BD Bioxon®).

Finalmente los discos de antibióticos se colocaron sobre las placas sembradas de Muller Hinton; las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Transcurrido este tiempo, se midieron los diámetros de los halos de inhibición producidos, siguiendo los puntos de corte propuestos por el CLSI, 2015 (**tabla 1**), se determinó así la resistencia o sensibilidad de las cepas a los antibióticos

**Tabla 1. Puntos de corte recomendados por el CLSI (2015) utilizados en este estudio.**

Familia de antibióticos	Antibiótico	Contenido por disco	Diámetro del halo de inhibición		
			Resistente	Intermedio	Sensible
Penicilinas	Piperacilina (PIP)	100 µg	≤14	15-20	≥29
	Ticarcilina (TIC)	75 µg	≤ 15	16-23	≥24
Inhibidor	Piperacilina-tazobactam (TZP)	100/10 µg	≤ 14	15-20	≥21
Cefalosporinas	Ceftazidime (CAZ)	30 µg	≤14	15-17	≥18
	Cefepime (FEP)	30 µg	≤14	15-17	≥18
Monobactams	Aztreonam (ATM)	30 µg	≤15	16-21	≥22
Carbapenémicos	Imipenem (IPM)	10 µg	≤ 15	16-18	≥19
	Meropenem (MEM)	10 µg	≤ 15	16-18	≥19
Lipopéptido	Colistina (CL)	10 µg	≤10	/	≥11
Aminoglucósidos	Gentamicina (GM)	10 µg	≤ 12	13-14	≥15
	Trobamicina (NN)	10 µg	≤ 12	13-14	≥15
	Amikacina (AN)	30 µg	≤14	15-16	≥17
Quinolonas	Ciprofloxacino (CIP)	5 µg	≤15	16-20	≥21
	Norfloxacina (NOR)	10 µg	≤12	13-16	≥17

Los resultados del perfil fenotípico de estas 14 cepas fueron agregados al cepario, teniendo finalmente 62 cepas.

#### 7.4 Lisado bacteriano.

Se realizaron lisados bacterianos de las cepas a partir de aislados de *P. aeruginosa* en TSA incubados por 18-24 horas a 37°C, posteriormente se depositaron de 2 a 3 asadas en un tubo “ependorf”, con 800 µL de solución salina isotónica y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos; se eliminó el

sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 800  $\mu\text{L}$  de solución salina isotónica, este paso se realizó 3 veces, la última pastilla se suspendió con 800  $\mu\text{L}$  de solución inyectable estéril y se colocó en baño maría por 10 minutos, se retiraron del baño, se agitaron y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf estéril y se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. A los lisados se les realizó la cuantificación de ADN en Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) y se ajustó la concentración de 200 a 250  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

### 7.5 Reacción de PCR.

Para amplificar los genes se utilizó la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific) los siguientes son los componentes (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Componentes para PCR con la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase.**

Componentes	Concentración inicial	Volumen por tubo	Concentración Final
Taq DNA Polymerase	5U/ $\mu\text{L}$	0.08 $\mu\text{l}$	0.4U
Buffer de reacción	10X	1 $\mu\text{l}$	1X
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1 $\mu\text{l}$	2.5mM
dNTP'S	10mM	0.4 $\mu\text{l}$	0.2mM
Primer Foward	25 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{l}$	1.25mM
Primer Reverse	25 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{l}$	1.25mM
DNA	---	0.5 $\mu\text{l}$	---
Agua libre de endonucleasas	---	Hasta 10 $\mu\text{l}$	---
Volumen total por tubo	---	10 $\mu\text{l}$	---

Al realizar la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron algunos controles positivos para 5 genes (*bla<sub>ges</sub>*, *bla<sub>oxa-1</sub>*, *bla<sub>pse-1</sub>*, *aac3 II a* y *aac6'-1b*) los cuales portan genes que ya están secuenciados. Estas cepas se conservan en el cepario del LMHC-CICM y se muestran en la **tabla 3**.

**Tabla 3. Cepas control.**

Especie	Nombre de la cepa	Genes secuenciados	Donada por:
<i>P. aeruginosa</i>	Ps36	<i>int11, sul1, qacEΔ1, ges-11, aac-(6')-Ib, oxa-2.</i>	M.C. María Elena Bello López, M.C. Elizabeth Valerio Calleja y M.C. Cristal Ayala Arias
<i>P. aeruginosa</i>	PSE-1	<i>Pse-1</i>	Dr. Jesús Silva Sánchez
<i>E. coli</i>	C7226	<i>Ctx-m-15, oxa-1, aac-(3')-IIa y aac-(6')-Ib-cr.</i>	Gerardo Cortés Cortés

Condiciones para la amplificación de genes por PCR se encuentran en la tabla 4

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados y condiciones para la amplificación de los genes de resistencia**

Gen	Tamaño del gen	Tamaño del amplificado	Primer	Secuencias	Condiciones	Referencias
<i>bla<sub>ges</sub></i>	864	864	Ges F Ges R	ATGCGCTTCATTCACGCAC T°:58 GATAAACAGGCACGAGTC C T°:58	96°c/5min 96°c/1min 61°c/1min 72°c/1min 72°c/10min 10°c/∞	30 ciclos Dubois <i>et al.</i> 2002.
<i>bla<sub>oxa-1</sub></i>	831	814	Oxa-1 F Oxa-1 R	ACACAATACATATCAACTT CGC 51°C AGTGTGTTTAGAATGGTGA TC 50.2°C	96°c/5min 96°c/1min 61°c/1min 72°c/2min 72°c/10min 4°c/∞	35 ciclos Steward, 2001.
<i>bla<sub>oxa-2</sub></i>	828	703	Oxa-2 F Oxa-2R	TTCAAGCCAAAGGCACGA TAG 55.6°C TCCGAGTTGACTGCCGGG T 62°C	96°c/5min 96°c/1min 61°c/1min 72°c/1min 72°c/10min 4°c/∞	30 ciclos Steward, 2001.

<i>bla<sub>spm</sub></i>	842	800	Spm F Spm R	ATGTCACTGTATCGCCGTC T 66°C TTACTGCCCGTTGACGCC CA 62°C	94°C/5min 94°C/1min 56°C/1min 68°C/1min 68°C/5min 4°C/∞	30 ciclos	Rodrigo <i>et al.</i> , 2008.
Gen	Tamaño del gen	Tamaño del amplificado	Primer	Secuencias	Condiciones	Referencias	
<i>bla<sub>pse</sub></i>	867	804	Pse-1 F Pse-1 R	TTATTGGCATTTCGCTTTT A 54°C CGCATCATTTGCTCTG 52°C	94°C/5min 94°C/1min 50°C/1min 72°C/1min 72°C/10min 4°C/∞	30 ciclos	Pai <i>et al.</i> , 2001.
<i>bla<sub>veb</sub></i>	900	643	Veb-1 F Veb-1 R	CGACTTCCATTTCGGATG C 62°C GGACTCTGCAACAAATAC GC 60°C	95°C/5min 95°C/1min 57°C/1min 72°C/1min 72°C/5min 4°C/∞	30 ciclos	Naas <i>et al.</i> , 1999.
<i>bla<sub>per</sub></i>	927	925	Per-1 F Per-1 R	AATTTGGGCTTAGGGCAG AA 58°C GCTTTTATAATGACATTCA T 50 °C	94°C/5min 94°C/1min 42°C/1min 72°C/5min 72°C/10min 4°C/∞	30 ciclos	Danel <i>et al.</i> , 1995.
<i>bla<sub>nmd</sub></i>	825	781	Nmd-1 F Nmd-1 R	CGGGCCGTATGAGTGATT GC 64°C GACCGGGTGCATAATATT GG 60°C	94°C/5min 94°C/1min 42°C/1min 72°C/5min 72°C/10min 4°C/∞	30 ciclos	Bello, 2014.
<i>aac3 IIa</i>	861	237	AAC3 F AAC3 R	ACTGTGATGGGATACGCG TC 64.9°C CTCCGTCAGCGTTTCAGCT A 65.5°C	94°C/5min 94°C/30Seg 60°C/45seg 72°C/2min 72°C/8min 4°C/∞	32 ciclos	Chun-Hsien <i>et al.</i> , 2012.
<i>aac6'- 1b</i>	612	481	AAC6' F AAC6' R	TTGCGATGCTCTATGAGTG GC 67.7°C CTCGAATGCCTGGCGTGT TTT 69.4°C	94°C/5min 94°C/30Seg 60°C/45seg 72°C/2min 72°C/8min 4°C/∞	20 ciclos	Park <i>et al.</i> , 2006.

## **7.6 Visualización de productos de PCR**

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% en cada uno de los pozos se colocó una mezcla con 3µl de DNA bacteriano con 1 µl de azul de bromofenol como tampón de carga. Para correr el gel con las muestras fue necesario un voltaje de 90v por 30 minutos.

Antes de visualizar cada uno de los geles se tiñeron en una solución acuosa de agua destilada con bromuro de etidio (200ml/10 µl) y posteriormente se destiñeron en agua destilada por 10 minutos. Para visualizar los fragmentos de ADN, los geles se fotografiaron en un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

## **7.7 Secuenciación de la amplificación.**

Los productos amplificados se purificarán a partir del gel de agarosa con ayuda de Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras serán enviadas para su secuenciación siguiendo los protocolos.

## **7.8 Análisis de secuencias**

Las secuencias se visualizaron a través del programa Finch Tv versión 1.4.0 Geospiza. El análisis comparativo de las secuencias se realizó con el programa BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information site ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)). Los alineamientos tanto nucleotídicos como aminoácidos se realizaron con el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y la conversión de la secuencia nucleotídica a aminoacídica se realizó en ExPASy-Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>).

## 8. RESULTADOS

En este estudio se ratificaron 14 aislados provenientes del Hospital para el Niño Poblano por medio de pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas bioquímicas de estas cepas se encuentran en la tabla 5.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas de 14 cepas de *P. aeruginosa*.

Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : pruebas bioquímicas						
Clave externa	Clave interna	O/F	TSI	MIO	Citra to	Crece 42°C
150646-2	NP49	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150715-2	NP50	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150722	NP51	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150724	NP52	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150731	NP53	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150737	NP54	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150746-1	NP55	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150747-1	NP56	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150747-2	NP57	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150750	NP58	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150801	NP59	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
150810	NP60	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
131221-1	NP61	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -
131222-1	NP62	oxidador	K/sc	Mov (+)	(+)	lac -

La clave externa es el número asignado por el hospital. La clave interna es un número asignado en el laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad y al que se le da continuación dependiendo del número de cepas que ya han sido estudiadas en trabajos anteriores provenientes del mismo hospital. **O/F**: Oxidador/ Fermentador, **k/sc**: alcalino/ sin cambio, **mov**: movilidad, **TSI**: Agar de Hierro y Triple azúcar, **MIO**: Movilidad Indol Ornitina, **lac**: lactosa.

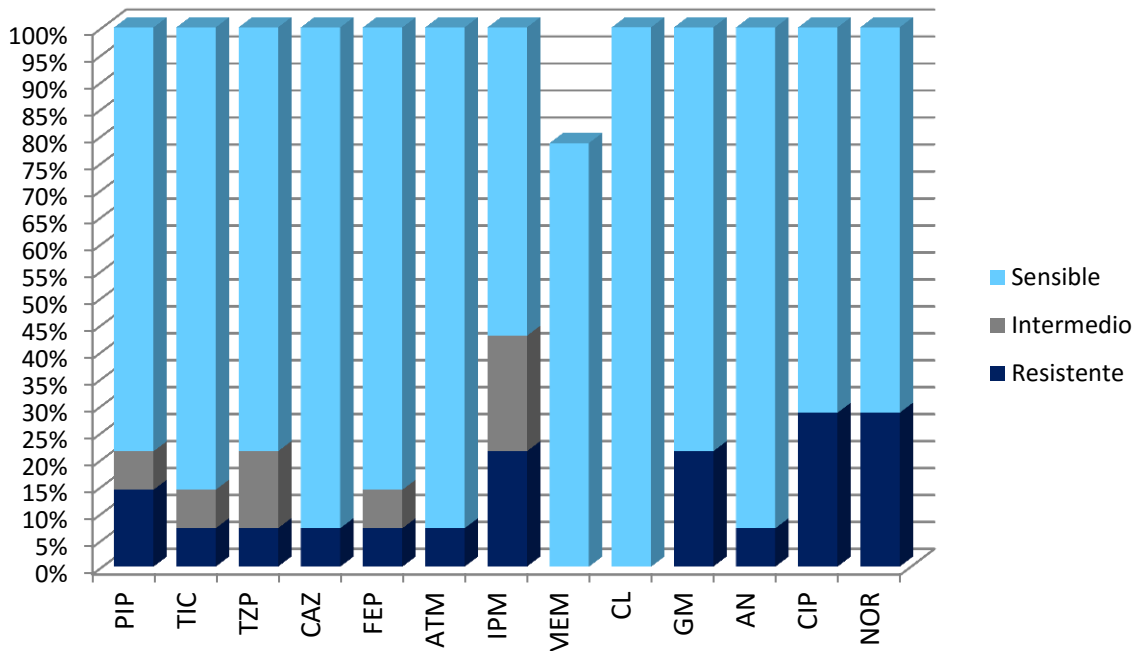
### 8.1 Patrones de susceptibilidad microbiana de 14 cepas.

Posteriormente se analizaron los perfiles fenotípicos de cada uno de los 14 aislados.

**Tabla 6. Pruebas fenotípicas de resistencia en 14 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.**

clave	β-lactámicos								Lipopéptido	Aminoglucósidos			Quinolonas		
	Penicilinas		Inhibidor	Cefalosporinas		Monobactams	Carbapenémicos			CL	GM	NN	AN	CIP	NOR
	PIP	TIC	TZP	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM							
NP49	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
NP50	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	
NP51	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
NP52	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
NP53	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	
NP54	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	
NP55	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	
NP56	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	
NP57	R	I	I	S	I	S	R	R	S	S	S	S	S	S	
NP58	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	
NP59	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
NP60	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
NP61	I	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	
NP62	I	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	

**S:** sensible, **R:** resistente, **I:** intermedio, **PIP:** piperacilina, **TIC:** ticarcilina, **TZP:** piperacilina/tazobactam, **CAZ:** ceftazidima, **FEP:** cefepime, **ATM:** aztreonam **IMP:** imipenem, **MEM:** meropenem, **CL:** colistina, **GM:** gentamicina, **AN:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacina y **NOR:** norfloxacina.



**Figura 1. Resistencia de 14 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas del Hospital para el Niño Poblano.** PIP: piperacilina, TIC: ticarcilina, TZP: piperacilina/tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam IMP: imipenem, MEM: meropenem, CL: colistina, GM: gentamicina, AN: amikacina, CIP: ciprofloxacina y NOR: norfloxacina.

En la figura 1 se muestra que la mayoría de las cepas son sensibles a los antibióticos incluso se muestra que el 100% de las cepas son sensibles a Meropenem y Colistina. Respecto a la resistencia que mostraron estas cepas, Ciprofloxacina y Norfloxacina fueron los antimicrobianos a los que las cepas resultaron ser más resistentes esto aproximadamente en un 30%, los demás antibióticos no superan valores de resistencia mayores al 22%.

### 8.2 Origen de 62 cepas *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados de las 14 cepas fueron agregados a resultados de 48 cepas que ya habían sido estudiadas; sumando un total de 62 cepas. Todas las cepas proceden de distintos sitios anatómicos de los pacientes del Hospital del Niño Poblano. Los orígenes de estas muestras fueron de secreciones de herida quirúrgica abdominal (18%), secreciones quirúrgicas de líquido peritoneal (16%), secreción de herida quirúrgica de mielomeningocele (6%), peritonitis (6%), infección renal crónica (5%), material fecal (5%) y otros (44%) en este último se

incluyen secreción de rodilla, secreción de herida en cráneo, líquido sinovial, pancreatitis, sepsis, apendicitis principalmente (Figura 2).

## Origen de muestras

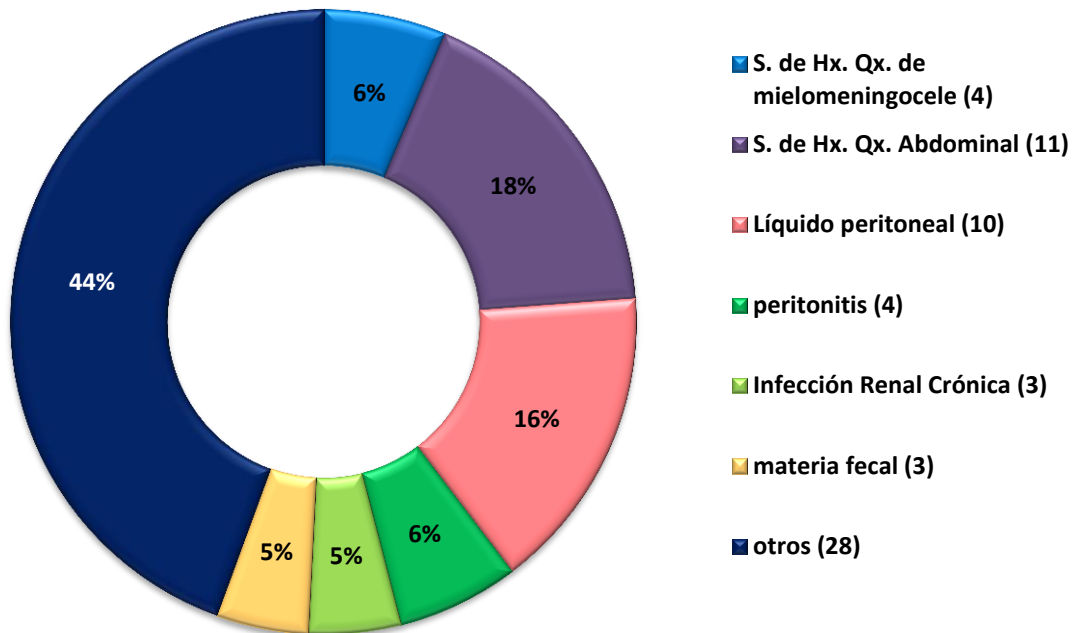
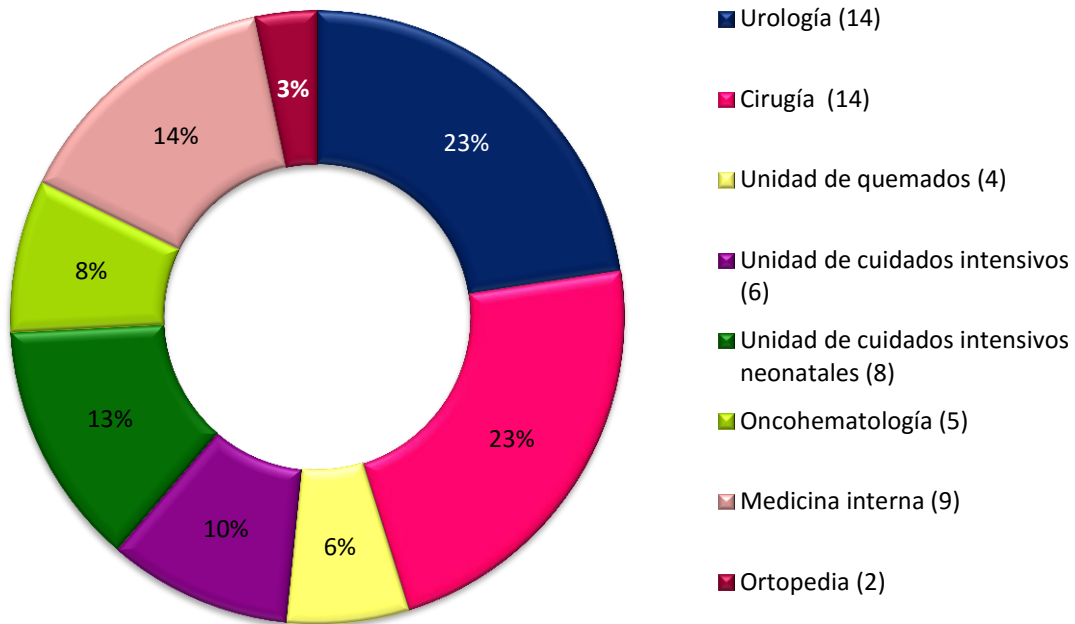


Figura 2. **Sitios anatómicos de procedencia de 62 cepas de *P. aeruginosa* del Hospital para el Niño Poblano.** Otros: secreción de rodilla, secreción de herida en cráneo, líquido sinovial, pancreatitis, sepsis, apendicitis

Estas cepas a su vez se distribuyen de los siguientes servicios hospitalarios: Urología 23%, cirugía 14%, medicina interna 14%, unidad de cuidados neonatales 13%, unidad de cuidados intensivos 10%, Oncohematología 8%, Unidad de quemados 6% y finalmente Ortopedia 3% (Figura 3).

## Servicios hospitalarios



**Figura 3. Áreas hospitalarias de procedencia de las 62 cepas de *P. aeruginosa*.** Los números en los paréntesis muestran cuantas cepas se aislaron en cada servicio.

### 8.3 Patrones de susceptibilidad microbiana 62 cepas

Los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de las 62 cepas se muestran en la tabla 7, en donde las cepas mostraron resistencia a Ticarcilina en un 33.87%, Gentamicina 30.64% Amikacina 29.03%, Meropenem 27.41%, Imipenem 24.19%, Ciprofloxacino 19.35%, Norfloxacina 19.35%, Colistina 14.51%, Ceftazidime 14.51%, Piperacilina-Tazobactam 14.51%, Piperacilina 12.9%, Cefepime 12.9% y Aztreonam 11.29%.

**Tabla 7. Patrones de susceptibilidad de 62 cepas *P. aeruginosa* a los antibióticos probados**

<b>Grupos de antibiótico</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Resistente (n° de cepas/ porcentaje)</b>	<b>Intermedio (n° de cepas/ porcentaje)</b>	<b>Sensible (n° de cepas/ porcentaje)</b>
<b>Penicilinas</b>	Piperacilina	8/12,9%	15/24,19%	39/62,9%
	Ticarcilina	21/33,87%	15/24,19%	26/41,93%
<b>Inhibidor</b>	Piperacilina/Tazobactam	9/14,51%	12/19,35%	41/66,12%
<b>Cefalosporinas</b>	Ceftazidima	9/14,51%	3/4,83%	50/80,64%
	Cefepime	8/12,9%	4/6,45%	50/80,64%
<b>Monobactams</b>	Aztreonam	7/11,29%	7/11,29%	48/77,41%
<b>Carbapenémicos</b>	Imipenem	15/24,19%	5/8,06%	42/67,74%
	Meropenem	17/27,41%	1/1,61%	44/70,96%
<b>Aminoglucósidos</b>	Gentamicina	19/30,64%	5/8,06%	39/62,9%
	Amikacina	18/29,03%	1/1,61%	43/69,35%
<b>Fluoroquinolonas</b>	Ciprofloxacino	12/19,35%	3/4,83%	47/75,98%
	Norfloxacino	12/19,35%	1/1,61%	49/79,03%
<b>Otros</b>	Colistina	9/14,51%	0	53/85,48%

## Patrones de susceptibilidad

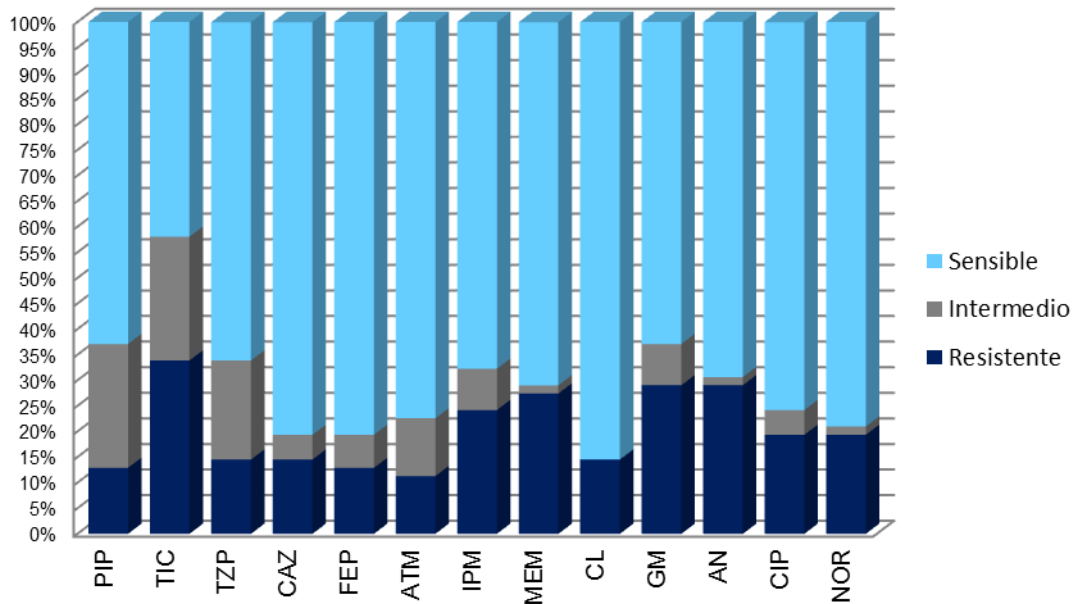
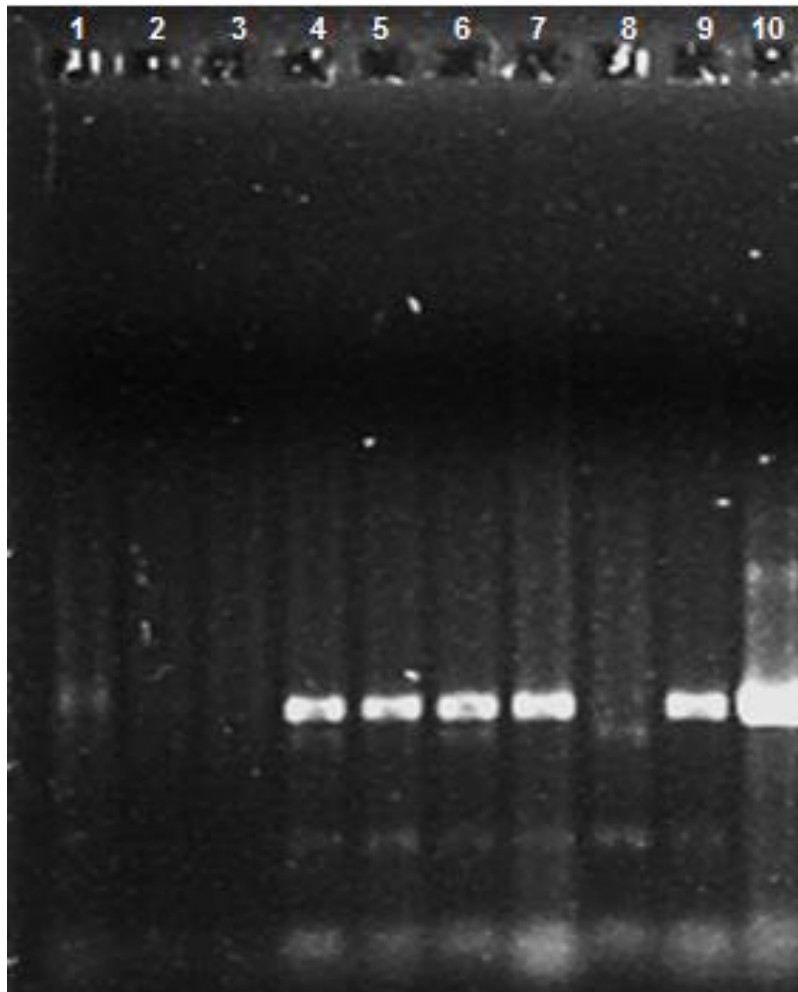


Figura 4. Porcentajes de los patrones de susceptibilidad de cada antibiótico probado para las 62 cepas de *P. aeruginosa*. PIP: piperacilina, TIC: ticarcilina, TZP: piperacilina/tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam IMP: imipenem, MEM: meropenem, CL: colistina, GM: gentamicina, AN: amikacina, CIP: ciprofloxacina y NOR: norfloxacin.

### 8.4 Amplificación de genes que codifican para $\beta$ -lactamasas

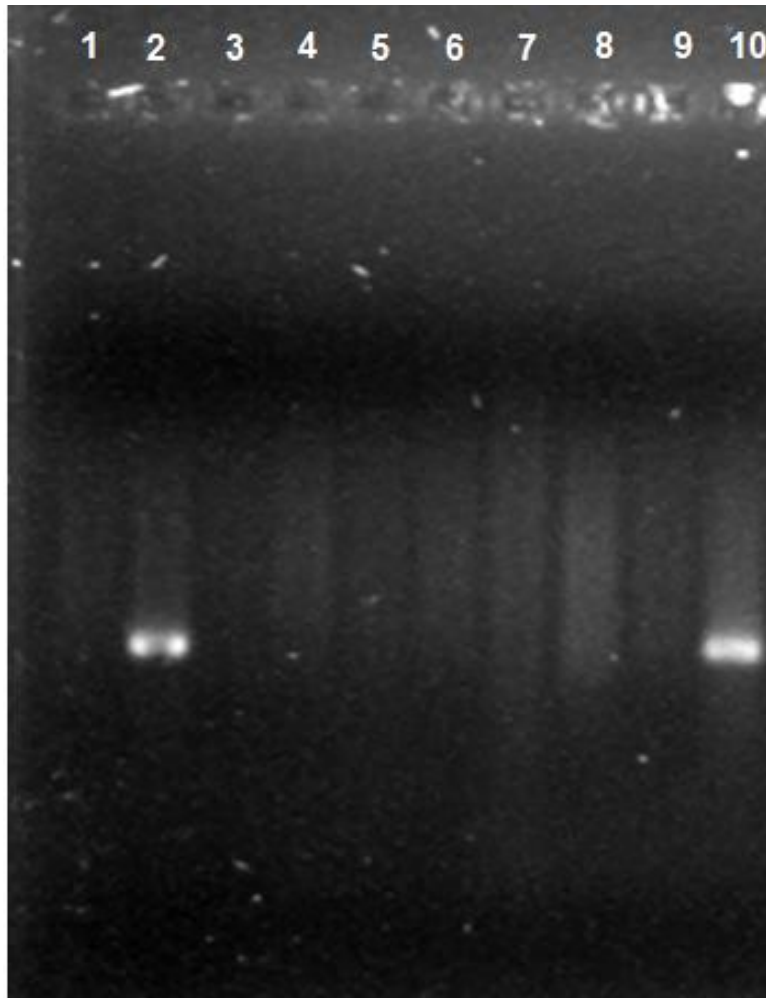
Las 62 cepas en su mayoría fueron sensibles a los antibióticos probados, en este estudio se seleccionaron 9 cepas que fueron multidrogorresistentes y resistentes a carbapenémicos para la búsqueda de genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas.

Se buscaron genes que codifican para metalo- $\beta$ -lactamasas como: *bla<sub>spm-1</sub>* y *bla<sub>ndm-1</sub>*; de tipo serin- $\beta$ -lactamasas: *bla<sub>ges</sub>*, *bla<sub>veb-1</sub>*, *bla<sub>pse-1</sub>* y *bla<sub>per-1</sub>* y de tipo oxacilinas: *bla<sub>oxa-1</sub>* y *bla<sub>oxa-2</sub>*. Anteriormente se habían buscado genes a algunas de estas cepas pero los resultados fueron negativos al 100% por lo que en este estudio se continuó a nivel genotípico debido al perfil fenotípico de cada una de estas cepas. Los resultados de la amplificación de los genes que fueron positivos en este estudio se muestran las figuras 5 y 6.



**Figura 5. Amplificación de *bla<sub>ges</sub>* (864 pb) en cepas de *P. aeruginosa* multidrogorresistentes**  
En el carril 1: **Np 02**, carril 2: **Np 06**, carril 3: **Np 08**, carril 4: **Np 11**, carril 5: **Np 15**, carril 6: **Np 17**,  
carril 7: **Np 21**, carril 8: **Np 32**, carril 9: **Np 62**, carril 10: **control positivo (PSE 36)**.

Las cepas que resultaron positivas en la amplificación de *bla<sub>ges</sub>* fueron **Np11**, **Np15**, **Np17**, **Np21** y **Np62** de la misma forma se muestra en la figura 5 el resultado positivo obtenido del control (**PSE36**).



**Figura 6.** Amplificación de *bla<sub>oxa-2</sub>* (703 pb) en cepas de *P. aeruginosa* multidrogorresistentes. En el carril 1: **Np 02**, carril 2: **Np 06**, carril 3: **Np 08**, carril 4: **Np 11**, carril 5: **Np 15**, carril 6: **Np 17**, carril 7: **Np 21**, carril 8: **Np 32**, carril 9: **Np 62**, carril 10: **control positivo (PSE 36)**.

Los resultados para *bla<sub>oxa-2</sub>* fueron positivos en un 11%, la cepa que obtuvo este resultado fue **Np06** (Figura 6)

En la siguiente tabla se encuentran los resultados de cada una de las cepas con respecto a la búsqueda de genes.

**Tabla 8. Perfiles genotípicos de resistencia de 9 cepas que presentan multirresistencia a  $\beta$ -lactámicos.**

Cepas	$\beta$ -lactamasas							
	Metallo		Serin				Oxacilinas	
	<i>bla<sub>spm</sub></i>	<i>bla<sub>ndm</sub></i>	<i>bla<sub>ges</sub></i>	<i>bla<sub>veb</sub></i>	<i>bla<sub>pse</sub></i>	<i>bla<sub>per</sub></i>	<i>bla<sub>oxa-1</sub></i>	<i>bla<sub>oxa-2</sub></i>
NP02	-	-	-	-	-	-	-	-
NP06	-	-	-	-	-	-	-	+
NP08	-	-	-	-	-	-	-	-
NP11	-	-	+	-	-	-	-	-
NP15	-	-	+	-	-	-	-	-
NP17	-	-	+	-	-	-	-	-
NP21	-	-	+	-	-	-	-	-
NP32	-	-	-	-	-	-	-	-
NP62	-	-	+	-	-	-	-	-

*bla<sub>spm</sub>*, *bla<sub>ndm</sub>*, *bla<sub>ges</sub>*, *bla<sub>veb</sub>*, *bla<sub>pse</sub>*, *bla<sub>per</sub>*, *bla<sub>oxa-1</sub>* y *bla<sub>oxa-2</sub>*: genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas

No se encontraron resultados positivos para los genes *bla<sub>spm</sub>*, *bla<sub>ndm</sub>*, *bla<sub>veb</sub>*, *bla<sub>pse</sub>*, *bla<sub>per</sub>* y *bla<sub>oxa-1</sub>* a excepción de los genes *bla<sub>ges</sub>* y de *bla<sub>oxa-2</sub>* (Tabla 8).

#### 8.4.1 Secuenciación y análisis de producto de amplificación del gen *blages*

La cepa Np62 se secuenció a partir del producto de PCR de *bla<sub>ges</sub>*, éstas secuencias se visualizaron en el programa Finch Tv versión 1.4.0 Geospiza; se procedió a hacer un análisis comparativo de la secuencia a través del programa BLAST 2.0 del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se utilizó en total 751 pb reportado por el IBT-UNAM de un total de 864 pb del amplificado.

Las secuencias obtenidas corresponden en un 95% de similitud con *bla<sub>ges-2</sub>* y un 96% con *bla<sub>ges-5</sub>* esto de acuerdo con BLASTn de la herramienta del NCBI, así mismo los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se elaboraron en el programa Clustal Omega (figura 7 y 8)

Fenotipo y Genotipo de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

NP62      -----
GES5      ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA
GES2      ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCGTCGGAA

NP62      AACTTAAACCTTCAGGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAGAAAGCAGCTGAGATCGGT
GES5      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
GES2      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT
          ** *****

NP62      GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGACGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATCGAGCAGCGTTTT
GES5      GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
GES2      GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT
          *****

NP62      GCAATGTGCTCTACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
GES5      GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
GES2      GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA
          *****

NP62      GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCGTACGGGCGGGACATGATCGTCGAATGGTCT
GES5      GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
GES2      GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGATCGTCGAATGGTCT
          *****

NP62      CCTGCCGCGGAGCGGTTTCCGCATCGGGACATATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCG
GES5      CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
GES2      CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT
          *****

NP62      GCGGTGCAGCTCAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
GES5      GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
GES2      GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT
          *****

NP62      GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
GES5      GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
GES2      GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA
          *****

NP62      GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATAACACACGCCTATTGCT
GES5      GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATAACACACGCCTATTGCT
GES2      GAGCCGGAGATGAACGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATAACACACGCCTATTGCT
          *****

NP62      ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGGCGCACTGACGCCACCTCGACCCAC
GES5      ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGGCGCACTGACGCCACCTCGACCCAC
GES2      ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGGCGCACTGACGCCACCTCGACCCAC
          *****

NP62      ACAAATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACAACGGGAGACGCGACATTACGAGCGGGTTTT
GES5      ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACAACGGGAGACGCGCACTACGAGCGGGTTTT
GES2      ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACAACGGGAGACGCGCACTACGAGCGGGTTTT
          ** *****

NP62      CCTAAAGATTGGGTTATTGGAGAGAAACGGGACCTGCGCCAACGGGGCCGGAACGAC
GES5      CCTAAAGATTGGGTTATTGGAGAGAAACGGGACCTGCGCCAACGGGGCCGGAACGAC
GES2      CCTAAAGATTGGGTTATTGGAGAGAAACGGGACCTGCGCCAACGGGGCCGGAACGAC
          *****

```

Fenotipo y Genotipo de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales.

```

NP62      ATTGGGTTTTTTTAAAGCCCAGGACAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
GES5      ATTGGTTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
GES2      ATTGGTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG
          *****

NP62      AACTATCGGCCGAAACAACGTGACGAATTAGT-----
GES5      AACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCGGTCAAGTTATTACACAA
GES2      AACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCGGTCAAGTTATTACACAA
          *****

NP62      -----
GES5      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
GES2      CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG
    
```

**Figura 7. Secuencias nucleotídicas de la cepa NP62 comparada con las secuencias de los genes *bla<sub>ges-2</sub>* y *bla<sub>ges-5</sub>*.** En amarillo se encuentran los nucleótidos diferentes que existen entre la cepa NP62, *bla<sub>ges-2</sub>* y *bla<sub>ges-5</sub>*

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

NP62      -----NLTFRDLEKLEREKAAEIGVAIVDPQGIIVAGHRIEQR
GES5      MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
GES2      MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
          :***:*****:*****:*****:***

NP62      AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGRDMIVEWSPAERFLASGHMTVLEAAQA
GES5      AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
GES2      AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
          *****:*****

NP62      AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRDRKEPEMNDNTPGDLRDTTPIA
GES5      AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRDRKEPEMSDNTPGDLRDTTPIA
GES2      AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSRDRKEPEMNDNTPGDLRDTTPIA
          *****

NP62      MARTVAKVLYGGALTPSTHTIERWLIGNQTGDATLRAGFPKDWVIGKGTGTCANGGRND
GES5      MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
GES2      MARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLIGNQTGDATLRAGFPKDWVVGKGTGTCANGGRND
          *****

NP62      IGFFKAQDRDYAVAVYTTAPKLSAEQRDEL-----
GES5      IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGQVITQLILSTDK
GES2      IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGQVITQLILSTDK
          *****:*****
    
```

**Figura 8. Secuencias aminoacídicas de la cepa NP62 comparándolo con el gen *bla<sub>ges-2</sub>* y *bla<sub>ges-5</sub>*.** En amarillo se encuentran los aminoácidos diferentes que existen entre la cepa NP62, *bla<sub>ges-2</sub>* y *bla<sub>ges-5</sub>*

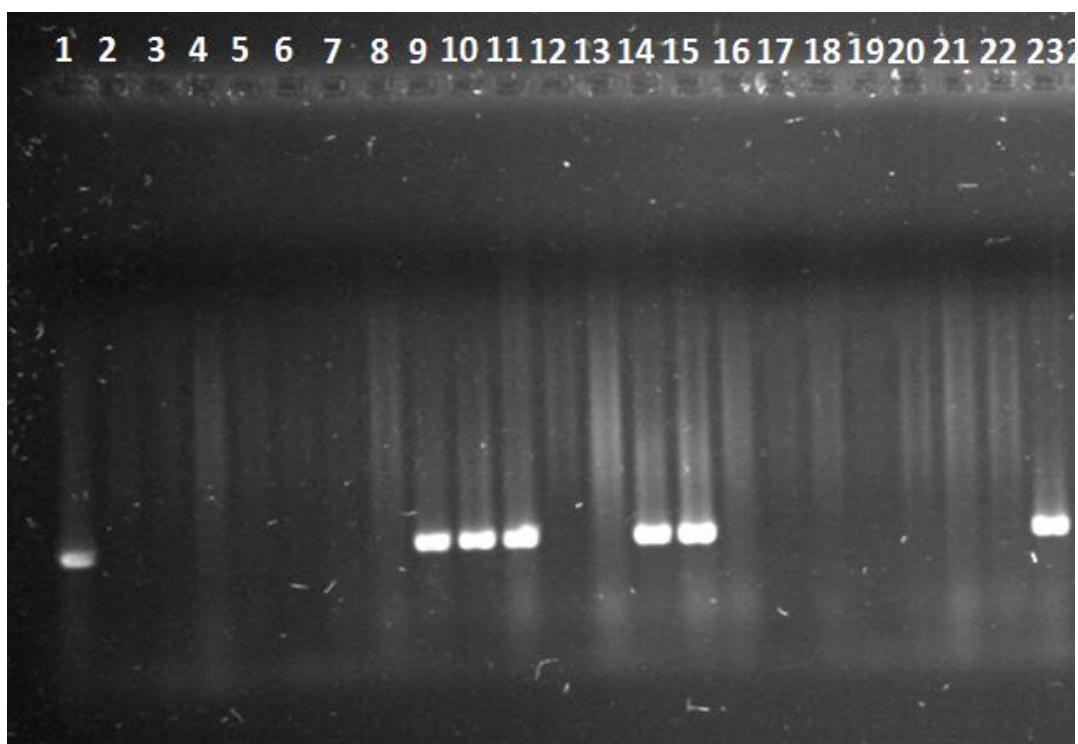
## 8.5 Amplificación de N-acetiltransferasas

Los perfiles de susceptibilidad del total de las 62 cepas estudiadas respecto a la resistencia a los antibióticos fueron muy variados; sin embargo solo 22 cepas, se eligieron debido a la resistencia a uno o dos aminoglucósidos probados en este trabajo

La mayoría de las cepas elegidas fueron resistentes a AN y GM y esto fue determinante para su selección en la búsqueda de genes que codifican para N-acetiltransferasas como *aac(3)-IIa* y *aac(6')1b*.

### 8.5.1 *aac(6')1b*

En la búsqueda de este gen se encontraron los siguientes resultados:

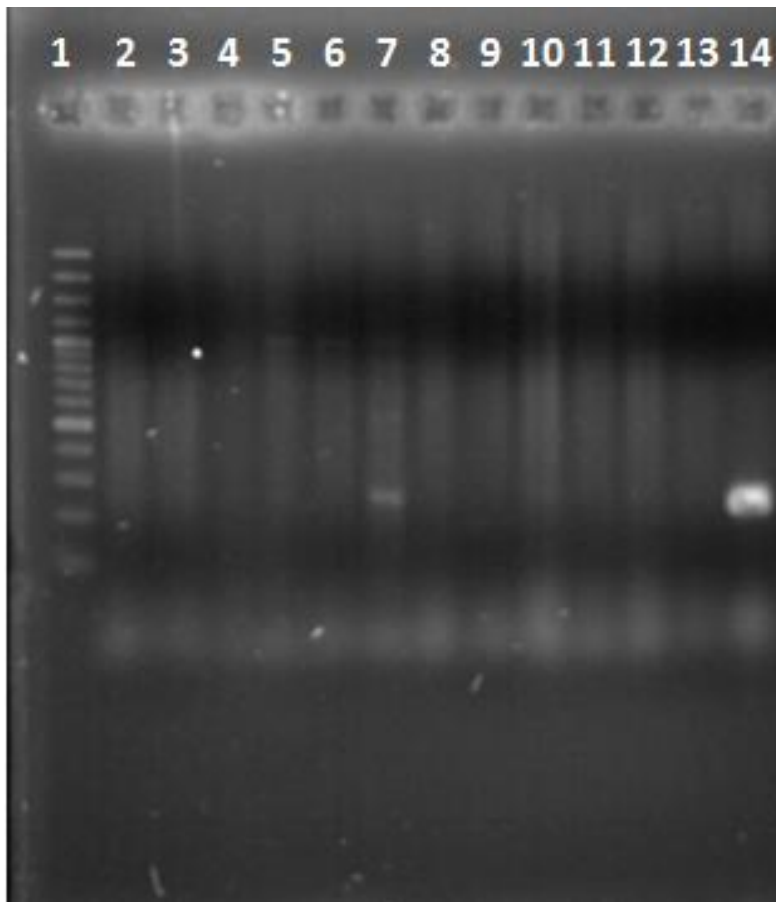


**Figura 9.** Gel representativo de la amplificación de *aac(6')1b* (481 pb) de 22 cepas de *P. aeruginosa*. En el carril 1: control Ps36ac, carril 2: Np 02, carril 3: Np 03, carril 4: Np 04, carril 5: Np 06, carril 6: Np 11, carril 7: Np 12, carril 8: Np 13, carril 9: Np 15, carril 10: Np 17, carril 11: Np 21, carril 12: Np 23, carril 13: Np 25, carril 14: Np 32, carril 15: Np 33, carril 16: Np 43, carril 17: Np 44, carril 18: Np 45, carril 19: Np 46, carril 20: Np 47, carril 21: Np 52, carril 22: Np 54, carril 23: Np 62.

Las cepas que fueron positivas para *aac(6')1b* fueron **Np15, Np17, Np21, Np32, Np33 y Np62**. Se utilizó un control positivo denominado Ps36ac.

### 8.5.2 *aac(3)-IIa*

En la búsqueda de este gen se encontraron los siguientes resultados:



**Figura 11. Gel representativo de la amplificación de *aac(3)IIa* (237 pb) de 22 cepas de *P. aeruginosa*.** En el carril 1: **marcador**, carril 2: **Np 23**, carril 3: **Np 25**, carril 4: **Np 32**, carril 5: **Np 33**, carril 6: **Np 43**, carril 7: **Np 44**, carril 8: **Np 45**, carril 9: **Np 46**, carril 10: **Np 47**, carril 11: **Np 52**, carril 12: **Np 54**, carril 13: **Np 62**, carril 14: **control c7226**.

El resultado de este gel de electroforesis para *aac(3)-IIa* fue positivo únicamente para la cepa Np44.

Las cepas que resultaron positivas de cada uno de los geles se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9. Perfiles genotípicos de resistencia 22 cepas resistentes a aminoglucósidos**

<b>N-acetiltransferasas</b>		
<b>Cepa</b>	<b><i>aac(6)'1b</i></b>	<b><i>aac(3)IIa</i></b>
NP02	-	-
NP03	-	-
NP04	-	-
NP06	-	-
NP11	-	-
NP12	-	-
NP13	-	-
NP15	+	-
NP17	+	-
NP21	+	-
NP23	-	-
NP25	-	-
NP32	+	-
NP33	+	-
NP43	-	-
NP44	-	+
NP45	-	-
NP46	-	-
NP47	-	-
NP52	-	-
NP54	-	-
NP62	+	-

## 9. DISCUSIÓN

*P. aeruginosa* es un microorganismo capaz de desarrollar diversos mecanismos de resistencia contra los antibióticos teniendo incluso capacidad de adquirirlos durante el tratamiento antimicrobiano (Breidenstein *et al.*, 2011), la dificultad para contrarrestar cada uno de sus mecanismos, ha permitido buscar tratamientos alternativos como la combinación de antibióticos; sin embargo no resulta efectivo totalmente. El desarrollo de nuevos antibióticos que resulten más efectivos que los antibióticos disponibles en contra de este microorganismo es muy limitado (Chatterjee, 2016). En este trabajo se consideró estudiar la resistencia que *P. aeruginosa* presenta analizándola y encontrando la relación tanto fenotípicamente como genotípicamente.

Primero fue ratificar al microorganismo de estudio a partir de 14 aislados procedentes del Hospital para el Niño Poblano, esto fue realizado por medio de pruebas bioquímicas, principalmente: TSI, MIO, O/F, citrato de Simmons y crecimiento a 42°C. Efectivamente se comprobó que era la especie. Cabe mencionar que estos aislados ya habían sido identificados por el hospital mediante el equipo semiautomatizado Vitek 2, posteriormente se realizaron a estas cepas pruebas fenotípicas de resistencia por medio del método de Kirby Baüer, así se determinó la resistencia de estas 14 cepas. Finalmente estos aislados y sus resultados fueron agregados al cepario del laboratorio contando finalmente con un total de 62 cepas.

La mayoría de estas cepas provienen de servicios hospitalarios como urología, cirugía, unidad de cuidados intensivos y medicina interna lo que coincide con lo que se tiene reportado en estudios donde afirman que las infecciones nosocomiales causadas por este microorganismo afectan principalmente a pacientes con heridas quirúrgicas (Chatterjee *et al.* 2016; Mahfoud *et al.*, 2015; Gomila *et al.* 2013; Lombardo *et al.*, 2012; Díaz R. *et al.*, 1999).

Las cepas de este estudio resultaron ser sensibles a la mayoría de los antibióticos probados, sin embargo algunas cepas fueron multirresistentes a los

antimicrobianos y a los carbapenémicos probados, lo cual resulta importante y representa un problema hospitalario debido a que dificulta la erradicación de estas cepas resistentes dentro de este hospital en los pacientes menores de edad, permitiendo así la diseminación intrahospitalaria de estos microorganismos causantes de infección.

De las 62 estudiadas fenotípicamente, 9 fueron multidrogorresistentes a partir de ellas se procedió a la búsqueda de genes que codifican para  $\beta$ - lactamasas. Los resultados de los genes que se encontraron fueron solo positivos para *bla<sub>ges</sub>* en las cepas NP11, NP15, NP17, NP21 y NP62 y para *bla<sub>oxa-2</sub>* en la cepa NP06.

El gen *bla<sub>ges</sub>* en este trabajo se encontró en 5 (56%) de las cepas multidrogorresistentes. Cabe mencionar que estas cepas proceden de diferentes sitios anatómicos y fechas de recolección sin embargo provienen del mismo paciente, teniendo un perfil fenotípico similar por lo que podría tratarse de la misma cepa pero no se tiene la certeza hasta realizar una tipificación.

Para determinar la variante de *bla<sub>ges</sub>*, se secuenció la cepa NP62 y se hicieron comparaciones con variantes de *bla<sub>ges</sub>*. Se encontró una similitud del 95% con *bla<sub>ges-2</sub>* y en un 96% con *bla<sub>ges-5</sub>* esto es debido a la cantidad de nucleótidos que se obtuvieron en la secuencia que fue un total de 751pb.

En muchos países se han encontrado variantes de *bla<sub>ges</sub>* en *P. aeruginosa*; *bla<sub>ges-1</sub>* fue identificada en Francia y Sudamérica (Potron *et al.*, 2015). La primera GES tipo carbapemenasa encontrada en *P. aeruginosa* fue *bla<sub>ges-2</sub>* y fue encontrada por primera vez en una mujer con neumonía nosocomial. (Poirel *et al.*, 2001).

Respecto a los estudios realizados en algunos hospitales de México sobre *bla<sub>ges</sub>* han confirmado la presencia de las variantes *bla<sub>ges-1</sub>*, *bla<sub>ges-19</sub>* y *bla<sub>ges-20</sub>* en 84.4% de 45 aislados, la mayoría resultó positiva para *bla<sub>ges-19</sub>* y *bla<sub>ges-20</sub>* (Garza *et al.*, 2014). Respecto a *bla<sub>ges-5</sub>* en México se encontró que esta variante se encuentra formando parte de los cassettes génicos en integrones de clase 1 (Castillo *et al.*, 2012).

Dicho lo anterior es necesario contar con todas las pb de la secuencia para hacer estudios comparativos precisos, que determinen completamente el tipo de variante de *bla<sub>ges</sub>*; debido a las similitudes encontradas con *bla<sub>ges-2</sub>* y *bla<sub>ges-5</sub>* y podría tratarse de alguna variante mencionada que coincida con lo reportado en México aunque no se descarta la posibilidad de tratarse de alguna nueva variante.

La oxacilina *bla<sub>oxa-2</sub>* determina la resistencia a TIC y PIP (Strateva & Yordanov, 2009); en México se ha encontrado este gen formando parte de cassettes génicos en integrones de clase 1 (Castillo *et al.*, 2012). Los reportes en el país acerca de la presencia *bla<sub>oxa-2</sub>* confirman la presencia de este gen en 7 aislados y a su vez se reporta una relación de la resistencia a CAZ con la presencia de este gen en los aislados (González *et al* 2012). Con los resultados de las nueve cepas, el 56% tuvo resistencia a este antimicrobiano sin embargo la única cepa que amplificó para este gen no presentaba resistencia a este antibiótico por lo que no se tiene una relación con lo reportado por González.. De los reportes obtenidos del laboratorio de MHyC se encontró la presencia de este gen en el 85.7% de 7 aislados (Juárez, 2016).

En la búsqueda de genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos particularmente de N-acetiltransferasas se eligieron 22 cepas que presentaban resistencia principalmente a AN y GM de acuerdo a lo obtenido en las pruebas fenotípicas de la difusión en disco.

El 86% de las 22 cepas fueron resistentes a GM, el 81% fue resistente a AN y de las cepas que presentaron resistencia a los dos antibióticos fueron un total 68%. Algunas de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos principalmente encontradas en *P. aeruginosa* son *aac(3)*, *aac(6')* y *ant(2')* que le proveen resistencia a este grupo de antibióticos (Poole, 2005).

Los resultados encontrados para *aac(3) //b* fue que la cepa NP44 resultó positiva para este gen y mostró resistencia solo a AN. Este subtipo es uno de los menos comunes localizado en *P. aeruginosa* y le confiere resistencia a gentamicina, trobamicina y netilmicina (Poole, 2005) lo que no coincide con los resultados que mostró la cepa que amplificó para este gen. Con lo reportado en

LMHyC de cepas provenientes del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE de la Cd. de México se encontró que de 21 cepas MDR el 52% amplificó para *aac-3'-IIa* y 57% para *aac-6'-Ib* (Martínez, 2011, Valerio, 2012 y Ayala, 2013).

Los resultados para *aac6-I' b* que se encontraron en este estudio en las 22 cepas a las cuales se les amplificó este gen, seis resultaron positivas (NP15, NP17, NP21, NP32, NP33 y NP62) y todas fueron resistentes a AN y GM. Lo que se ha encontrado en el mundo sobre ésta enzima es que suele presentarse en la mayoría de los aislados y se observa principalmente la resistencia de amikacina, trobamicina y gentamicina como los antibióticos más probados en estos reportes, algunas variantes de este gen muestran un espectro extendido de resistencia a Gentamicina (Dubois *et al.*, 2008; Vaziri *et al.*, 2011 & Michalska *et al.* 2014). En general esta enzima 6'N-acetiltransferasa tipo Ib tiene una gran importancia clínica ya que es una de las variantes más encontradas en un 70% en aislados de Gram negativos (Ramírez *et al.*, 2013).

En el LMHyC de 27 aislados provenientes del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre de la Ciudad de México ” se encontró el gen que codifica para esta enzima *aac(6')-Ib* en un 57% (Ayala, 2013; Martínez, 2011; Valerio, 2012). De la misma forma se estudió esta enzima en el hospital ISSSTE de la ciudad de Puebla y se obtuvo que de 7 aislados multidrogosresistentes el 71.4% presentó este gen (Juárez, 2016).

La forma en la que están distribuidas algunas de estas enzimas modificadoras de aminoglucósidos pueden derivar en los patrones de prescripción de esta familia de antibióticos, la selección de la población bacteriana y las diferencias geográficas (Vaziri, 2011).

Este estudio se enfocó en encontrar la relación fenotípica y genotípica de cepas provenientes de un hospital infantil, sin embargo los diversos mecanismos que *Pseudomonas aeruginosa* presenta, repercuten en la resistencia a los antimicrobianos que muestra esta especie en los aislados, permitiendo estos mecanismos, la generación de bacterias multidrogasresistentes de difícil erradicación.

## 10. CONCLUSIONES

- Urología, cirugía, medicina interna, unidad de cuidados neonatales fueron los servicios del HPN que tuvieron más aislados de *P. aeruginosa*.
- Los aislados presentaron resistencia principalmente a Ticarcilina, Gentamicina, Amikacina, Meropenem e Imipenem.
- Las 9 cepas a las cuales se les buscó  $\beta$ -lactamasas no portaron los genes *bla<sub>oxa-1</sub>*, *bla<sub>pse-1</sub>*, *bla<sub>ndm-1</sub>*, *bla<sub>per-1</sub>*, *bla<sub>spm-1</sub>* y *bla<sub>veb-1</sub>*; sin embargo el 56% porta *bla<sub>ges</sub>* y el 11% porta *bla<sub>oxa-2</sub>*.
- Todas las cepas que portaban *bla<sub>ges</sub>* procedían del mismo paciente, pero de diferentes sitios anatómicos.
- La cepa NP62 podría contener alguna variante de *bla<sub>ges</sub>*, la relación posible fue de un 95% con *bla<sub>ges-2</sub>* y un 96% con *bla<sub>ges-5</sub>*.
- Las 22 cepas a las que se les buscó N-acetiltransferasas portó *aac3 Ila* en un 5% y *aac6 Ib* en un 27%.

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

- Aliño M., López J., Navarro R. & Duperval P. 2007. Aminoglucósidos: mirada actual desde su historia; Rev Cubana Pediatr; 79 (2)
- Ambler R., 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases; Phil. Trans. R. Soc. Lond. 289, 321-331
- Avorn J, Solomon D. 2000 Cultural and economic factors that (mis) shape antibiotic use: the nonpharmacologic basis of therapeutics. Ann Intern Med; 133 (2): 128-135
- Ayala, A. C. 2013. Tesis de Maestría. Identificación de genes involucrados en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos en *Pseudomonas aeruginosa* causante de Infecciones Nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C. & Astilean, A. 2013. New antibiotics for bad bugs: where are we? Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 12:22-36.
- Boucher H., Talbot G., Bradley J., Edwards J., Gilbert D., Rice L., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J.; 2009; Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America Clinical Infectious Diseases ; 48:1–12
- Breidenstein E. B., De La Fuente-Nunez C., Hancock R. E. , 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 19, 419–426.
- Bush K. & Jacoby G.; 2010. Updated functional classification of betalactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54:969-976.
- Castillo-Vera, J., Ribas-Aparicio, R., Nicolau, C., Oliver, A., Osorio-Carranza, L., & Aparicio-Ozores, G. 2012. Unusual Diversity of Acquired  $\beta$ -lactamases in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Mexican Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 18(5), 471–478.
- Chatterjee M., Anju C., Biswas L., kumar A., Mohan G. & Biswas R. 2016; Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative

therapeutic options. International journal of medical microbiology; 306 pp 48-58.

- Cho H., Kwon K., Kim S. & Koo H., 2014; Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Ann Lab Med; 34: 286-292.
- Díaz R., Solórzano F., Padilla G., Miranda M., González R. & Trejo J. 1999. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. Salud publica Mex I: S12 - S17.
- Dubois V., Arpin C., Dupart V., Scavelli A., Coulange L., André C., Fischer I., Grobost F., Brochet JP., Lagrange I., Dutilh B., Jullin J., Noury P., Larribet G. & Quentin C. 2008. B-Lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice. Journal of antimicrobial Chemotherapy 62, 316-323.
- Garza U., Barrios H. Reyna F., Tamayo E., Catalan J., Morfin R., Rodríguez E., Volkow P., Cornejo P., González A., Gaytan J., González M., Vazquez M. & Silva J. 2014. Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. Vol. 81, pp. 135-137
- Gilbert D., Moellering R., Eliopoulos G. & Sande M., 2005. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2005, 35<sup>th</sup> ed: Antimicrobial therapy
- Gomila M., Gallegos M., Fernández V., Pareja A., Pascual M., Díaz A., García E., Lalucat J; 2013. Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. BMC Microbiology 2013 13:138.
- González M., Ribas R., Coria R., Donis J., Aparicio G. 2012. Detección de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido OXA-141 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística. Enferm Infecc Microbiol Clin. 30(9): 535-541
- Graf K, Ott E, Vonberg RP, Kuehn C, Haverich A, Chaberny 2010 IF: Economic aspects of deep sternal wound infections. Eur J Cardiothorac Surg; 37: 893–6.

- Ho J., Hun L., Jin L., Seung P., Mustafa K., Lee C., Chul J. & Hee L., 2015. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 9654-9692
- Hong, S.S., Kim, K., Huh, J.Y., Jung, B., Kang, M.S. & Hong, S.G. 2012. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. *Annals of Laboratory Medicine*, 32:359-361.
- Juárez C. 2016. Tesis de maestría. Estudio de la resistencia, genotipificación y relación clonal de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales. Centro de investigaciones en ciencias microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Kitao T., Miyoshi- Akiyama T. & Kirikae T. 2009; AAC (6')-Iaf, a novel Aminoglycoside 6'-N- Acetyltransferase from Multidrug- Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53 n°6, p. 2327-2334
- Lanini S., D'Arezzo S., Puro V., Martini L., Imperi, F., Piselli P., Montanaro M., Paoletti S., Visca P. & Ippolito G. 2011. Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant soap dispenser. *PLoS ONE* 6(2):e17064.
- Liakopoulos A., Mavroidi A., Katsifa E., Theodosiou A., Karagouni A., Miriagou V., & Petinaki, E. 2013. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infectious Diseases*, 13:505.
- Lister P., Wolter D. & Hanson N.; 2009. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* Oct. 582–610 Vol. 22, No. 4
- Lombardo A., Hernández O., Pérez V., Orozco H., Soto E., Haro A. & Caniza M., 2012. Estudio de prevalencia puntual en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Acta Pediatr Mex.* 33(2):76-79

- Martínez, P. L. (2011). Tesis de Maestría. Detección de los genes que codifican para bombas de expulsión y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de Infecciones Nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Mahfoud M., Al Najjar M., Rezzak A. 2015, Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from nosocomial respiratory and urinary in Aleppo, Syria. J infect Dev Ctries, 9(2): 210-213.
- Micek S, Lloyd A, Ritchie D, Reichley R, Fraser V, Kollef M; 2005, *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother; 49: 1306-11.
- Michalska A., Tomasz S., Ojdana D. & Wieczorek A. 2014. Prevalence of resistance to aminoglycosides and fluroquinolones among *Pseudomonas aeruginosa* strains in a University Hospital in Northeastern Poland. Brazilian Journal of Microbiology, 45,4, 1455-1458.
- Molina J., Cordero E., Palomino J. & Pachón J. 2009. Aminoglucósidos y polimixinas; Enferm Infec Microbiol Clin. 27 (3): 178-188
- Morfin O., Tinoco F., Sader H., Salcido G., Pérez G., González D., Petersen L. & Rodríguez N., 2012. Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010. BMC Research Notes. 5:277.
- Morrison A., Wenzel R., 1984; Epidemiology infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis; 6: S627-S642.
- Naas P., Poirel L., Karim A., Nordmann P., 1999, Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa* FEMS Microbiol Lett, 176, pp. 411–41.
- Nicolle L. Infection control Programmes to contain antimicrobial resistance 2001 WHO/CDS/CSR/DRS.

- Noriega E., León G., Petersen S., Pérez H., González E. & Morfín R., 2014, La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013; biomédica: 34, 181-90.
- Odumosu B., Adeniyi B., & Chandra R., 2013. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12:29.
- Pacheco R., Camacho V., Jiménez G., Peregrino B., Miranda N., 2006. perfil de susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos aislados en hemocultivos; *Enf Infec Microbiol*; 26; s61.
- Palzkill T., 2013. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277:91-104.
- Pendleton J, Gorman S, Gilmore B; 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 11:297–308.
- Poirel L., Weldhagen G., Naas T., Champs C., Dove M. & Nordmann P. 2001. GES-2, a class A  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; p. 2598-2603.
- Poirel L., Naas T. & Nordmann P. 2010. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; p. 24-38.
- Poole K. 2005. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Pp. 479-487.
- Poole K. 2011; *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontier in Microbiology*, 2:65
- Potron A., Laurent P., Nordmann P., 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology, vol. 45, 6 p.p 568-585.
- Ramirez M., Nikolaidis N. & Tolmasky M. 2013. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigm. *Frontiers in microbiology*. Vol 4.

- Rodríguez J., Poirel L. & Nordmann P; 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 53:4783-4788.
- Seizen W. & Stark C. 1943; Some characteristics of green fluorescent pigment-producing bacteria. *J. Bact.* 46, 491
- Sheldon A. 2005 Antiseptic "Resistance": real or perceived threat. *Clin Infect Dis*; 40:1650-6
- Shimada T. & Matsumura I. 2014. Immune evasion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Japanese Journal of Clinical Immunology*, 37:33-41.
- Strateva, T. & Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58:1133-1148.
- Tashiro Y., Yawata Y., Toyofuku M., Uchiyama H., & Nomura N., 2013; interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes and Enviroments*, 28:13-24
- Valerio, C. E. (2012). Tesis de Maestria. Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de Infecciones Nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., & Aarts, H.J. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 2:203.
- Vaziri, F., Peerayeh, S., Nejad, Q. & Farhadian, A. 2011. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (*aac (6')-I*, *aac (6')-II*, *ant (2'')-I*, *aph (3')-VI*) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics (Sao Paulo)*, 66: 1519–1522. PMID: 22179152.
- Viedma E., Juan C., Acosta J., Zamorano L., Otero J., Sanz F., Chaves F., & Oliver A., 2009; Nosocomial spread of colistin-only- sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum betalactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53: 4930-4933.

- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M. & Mitsuhashi, S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35:147-151.
- WHO/CDS/CSR/EPH. 2002. Prevención de las infecciones nosocomiales.
- Yao, J.D.C. & Moellering, R.C. Jr. 2011. Antibacterial agents. In J. Versalovic *et al.* (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. (10th ed, pp.1043-1081) Washington, ASM Press.
- Young, D.C., Zobell, J.T., Stockmann, C., Waters, C.D., Ampofo, K., Sherwin, C.M. & Spigarelli, M.G. 2013. Optimization of anti-pseudomonal antibiotics for cystic fibrosis pulmonary exacerbations: aminoglycosides. *Pediatric Pulmonology*, 48:1047-1061.
- Zhao W. & Hu Z., 2010. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol*; 36(3):245–58.