



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**



**PARTICIPACIÓN DE BOMBAS DE EXPULSIÓN,  
BIOFILM, ALGINATO Y EXPRESIÓN DE LA  
PROTEÍNA OPRD EN LA RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS EN *Pseudomonas aeruginosa***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

Q.B.C. FLOR MARÍA SOTO ACOSTA

**ASESORA DE TESIS:**

D.C. PATRICIA LOZANO ZARAÍN

**PUEBLA, PUE.**

**Noviembre 2019**

Time is an illusion that helps things makes sense  
So we're always living in the present tense  
It seems unforgiven when a good thing ends [...]  
If there was some amazing force outside of time  
To take us back to where we were  
And hang each moment up like pictures on the wall  
Inside a billion tiny frames so that we could see it all, all, all  
It would look like  
Will happen, happening, happened  
Will happen, happening, happened  
And will happen again and again  
Cause you and I will always be back then  
- Rebecca Sugar, Time adventure -

Time passes, people move.... Like a rivers flow, it never ends.  
A childish mind will turn to noble ambition.  
Young love will become deep affection.  
The clear water's surface reflects growth.  
Now listen to the Serenade of Water to reflect upon yourself.  
- Sheik, The Legend of Zelda: Ocarina of Time -



**BUAP**

Puebla, Pue. a 8 de noviembre 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Flor María Soto Acosta**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

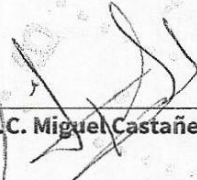
**“Participación de bombas de expulsión, biofilm alginato y expresión de la proteína OprD en la resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*”**

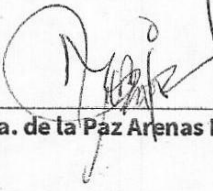
A nuestro juicio, la alumna **Flor María Soto Acosta** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

  
D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

  
D.C. Miguel Castañeda Lucio

  
D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández

  
D.C. Maria Cristina González Vázquez

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

## RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad** del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Posgrado en Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección de la **D.C. Patricia Lozano Zarain**.

Al **Posgrado de Microbiología** del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en este posgrado.

Este trabajo recibió fondos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a través de la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** proyectos 1031833-VIEP-2018 y 1031833-VIEP-2019.

Se reconoce el apoyo brindando para financiar la asistencia a congresos de la **Coordinación del Posgrado en Microbiología**, de la Dirección del Instituto de Ciencias (ICUAP), así como de la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría, con el número de becario 628773.

Al **Hospital I.S.S.S.T.E. de Puebla**, que a través de la **Q.F.B. Guadalupe Jiménez Flores** y el **M.C.M.I. José Luis Gálvez Romero** facilitaron las cepas y la autorización para llevar a cabo este trabajo de investigación (Proyecto No. 188.2018).

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la **D. C. Patricia Lozano Zarain** por todo su apoyo y esfuerzo para dirigir este proyecto. Muchas gracias por permitirme formar parte de su equipo de laboratorio, por todas las enseñanzas y consejos que me dió durante mi estancia. Me llevo muchos bonitos recuerdos, momentos y sentimientos de trabajar en este laboratorio, además de trabajar con las *Pseudomonas*. Agradezco todos los conocimientos que obtuve con usted; despertó en mi la curiosidad científica. Gracias por todo, doctora.

A la **D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por su apoyo y los consejos que me dió durante mi estancia en este laboratorio, por enseñarme una parte importante de las bacterias, la cual yo desconocía. Gracias por sus enseñanzas en inmunología y por dedicarle tiempo a la revisión de mi tesis, y por sus comentarios que me ayudaron a mejorar académicamente.

Al **D. C. Miguel Castañeda Lucio**, por su asesoría y enseñanzas sobre el *biofilm* y el alginato en la bacteria *Pseudomonas*, además de asesorarme con las metodologías de la cuantificación de *biofilm* mediante cristal violeta y la extracción y cuantificación de alginato, las cuales formaron parte de este proyecto, y gracias por su tiempo en la revisión de mi tesis.

A la **D. C. Margarita María de la Paz Arenas**, por su tiempo para la revisión de mi tesis; sus observaciones y comentarios permitieron enriquecer mi tesis. Gracias por sus enseñanzas durante mi curso de maestría, sobre todo en las materias de Microbiología Médica y Bases Moleculares de la patogenicidad.

A la **D. C. María Cristina González Vázquez**, por dedicarle tiempo a mi revisión de tesis y por todas sus enseñanzas en las metodologías de extracción de proteínas y Western Blot. Gracias por tu amistad, por las risas y todo el apoyo que me brindaste.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papás, **Malú** y **Julián**, por ser tan maravillosos padres y por apoyarme en esta loca aventura que decidí empezar para ayudarme a crecer. Por todo el amor con el que nos criaron a mi y a mi hermano, por guiarme con sus consejos y por su esfuerzo por estar siempre presentes en todo lo que hago. Los quiero muchisisisimo. Gracias por todo y más.

A mi hermanito **Julián**, por ser justo como eres, lleno de imaginación y con todas tus ocurrencias, por las videollamadas para platicarme y mostrarme tus pinturas, dibujos, y figuras que me hacen sonreír. Yo estoy muy orgullosa de ti, eres una gran persona, un gran artista, y te quiero mucho, hermano.

A mis abuelos, **Celia** y **Juan de Dios**, por todo su cariño y su esfuerzo por estar siempre presentes apoyándome. Gracias por todas las pláticas y consejos que me dan. Siempre sé que puedo contar con ustedes cuando los necesito, los quiero muchísimo.

Mis tios **Juan de Dios “Buqui”** y **Mónica**, y a mi tía **Chumay**, a mis primas **Yazmin**, **Harumi**, **Carol** y **Perla**, por todas las palabras de ánimo, por todo su apoyo. Sé que puedo contar con ustedes para lo que sea, así como ustedes pueden contar conmigo.

A **Ramón**, a pesar de la distancia, todo fue superado. Gracias por tu amor y por estar siempre apoyandome en cada locura que se me ocurre. No tengo palabras para expresar todo lo que siento por ti, quiero que sepas que siempre estuviste presente. Gracias por las llamadas y todos los mensajes, los regalos sorpresa que me enviabas, llenos de amor y cariño, eres asombroso y te amo. <sup>Hurr</sup> Durr.

**Turi**, **Tefy**, **Nax** y **Star**, por ser las hermosas personas que son, siempre dándome apoyo y echándome porras desde donde quiera que estén. Gracias por ser mis amigos y por ayudarme en todo lo posible. Por todas los momentos y las risas que seguimos pasando desde que iniciamos la universidad, no pude escoger a un grupo de personas más locas y ocurrentes. Entonces que ya se arme la carnita asada.

A **Paty, Leslie y Edna**, por ser las maravillosas personas que son, siempre apoyándome desde tan lejos. Por todo su cariño, amistad y las ganas que teníamos de salir siempre que regresaba a mi ciudad. Aunque al final cada una tomó su camino, siempre volvemos a nuestra ciudad para vernos y seguiremos así, siempre juntas. Siempre amigas, nunca inamigas. A **Daniel Beltrán**, gracias por los mensajes de apoyo cuando más lo necesitaba, esos momentos que estuviste allí para escucharme (aunque fueran audios de 10 minutos). Gracias por ser mi amigo todos estos años, eres una maravillosa persona. Tal y como siempre me dices: todo sale bien al final, mi deporte favorito siempre ha sido estresarme. Thank you, b.

A “**Los Bois**” (**David, Jorge, Charlie, Adrián y Miguel**) por todas las porras que me echaban desde Hermosillo, Sonora. Gracias por estar allí y ayudarme en el tiempo de relax con unas partidas de League of Legends.

**René Navarro y Daniela Gastelum** por estar allí siempre que los necesité, por ser excelentes personas y ayudarme en las buenas y en las malas. Gracias por los momentos donde solo nos juntábamos a platicar, para después ir por algo de comer y seguir disfrutando de lo hermoso que es Puebla.

A **Alma, Edwin y Elena**, por ser mis maestros en el laboratorio. Gracias por la paciencia y por sus enseñanzas en la microbiología, pero sobre todo gracias por su amistad. A **Deisy, Jessica, Yessenia, Eder, Valeria, Pato, Cecy, Marco, René, Miranda, Midory, Mariela y Diana** por su compañerismo y amistad, a todos, gracias por ayudarme siempre que lo necesitaba. Jamás olvidaré todos los momentos, convivios y risas que pasamos en el laboratorio. A **Cesar y Charls**, aunque estuvimos juntos poco tiempo no olvidaré todas las risas y nuestras platicas de Pokemon y otros videojuegos. A **Elsy y Dennise** por hacer el curso tan divertido y por todas las pláticas y momentos que nos apoyabamos con las tareas, exposiciones y papeleo para la titulación 😊, muchas gracias por su amistad. Voy a extrañarlos mucho a todos, son maravillosas personas, llenas de conocimientos e ideas extraordinarias. Espero jamás se olviden de “la Flors”, su amiga Sonorense.

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tratamiento.....	2
1.2 Mecanismos de resistencia.....	2
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Antecedentes generales.....	14
2.2 Antecedentes directos.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1.1 Objetivo general.....	18
4.1.2. Objetivos particulares.....	18
5. ESQUEMA DE TRABAJO.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Cepas de estudio.....	20
6.1.1 Cepas control.....	20
6.2 Determinar el fenotipo de resistencia por difusión en disco (Kirby-Baüer)...	21
6.3 Concentración mínima inhibitoria.....	22
6.4 Extracción de ADN por ebullición.....	23
6.5 Amplificación de genes en cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	24
6.5.1 Amplificación de genes de resistencia a carbapenémicos.....	24
6.5.2 Amplificación de genes reguladores de bombas de expulsión.....	24
6.6 Determinación de mutaciones en la proteína OprD.....	24
6.7 Determinación de la expresión de la proteína OprD.....	30
6.7.1 Extracción de proteínas.....	30
6.7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS).....	30
6.7.3 Western Blot.....	31
6.8 Determinación de la participación de bombas de expulsión en presencia de inhibidor de bombas de expulsión.....	32
6.9 Extracción de alginato.....	33
6.10 Cuantificación de alginato.....	33
6.11 Cuantificación de proteínas por Bradford.....	34
6.12 Cuantificación de <i>biofilm</i> por el método de cristal violeta.....	35
7. RESULTADOS.....	37
8. DISCUSIONES DE RESULTADOS.....	53
9. CONCLUSIÓN.....	61
10. PERSPECTIVAS.....	62
11. REFERENCIAS.....	63
12. ANEXOS.....	76

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
<b>1</b>	Antibióticos para realizar el fenotipo de resistencia por difusión en disco.	22
<b>2</b>	Puntos de corte para la CMI los antibióticos meropenem e imipenem.	23
<b>3</b>	Componentes de una reacción de PCR.	25
<b>4</b>	Características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de $\beta$ -lactamasas.	26
<b>5</b>	Características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes reguladores de bombas de expulsión de la familia RND.	28
<b>6</b>	Características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>oprD</i> .	29
<b>7</b>	Preparación de gel PAGE-SDS	31
<b>8</b>	Preparación de la curva de alginato	34
<b>9</b>	Preparación para la curva de albúmina	35
<b>10</b>	Secuenciación parcial del gen <i>oprD</i>	43
<b>11</b>	Detección de la proteína OprD, amplificación de genes reguladores de bombas de expulsión y la participación de bombas de expulsión en cepas de <i>P. aeruginosa</i>	45
<b>12</b>	Características generales de cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> (n=10)	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Estructura de la porina OprD.	5
<b>2</b>	Estructura y función de las bombas de expulsión RND en <i>P. aeruginosa</i> .	8
<b>3</b>	Estrategias de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> propuestas durante el proceso infeccioso y potencial estrategias terapéuticas	10
<b>4 (A y B)</b>	Esquema de la síntesis de alginato, Psl y LPS en la cepa PAO1	12
<b>5</b>	Cascada de señalización de MucA	13
<b>6 (A)</b>	Distribución de las 83 cepas en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. Área hospitalaria.	37
<b>6 (B)</b>	Distribución de las 83 cepas en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. Sitio anatómico de aislamiento de las cepas.	37
<b>7</b>	Perfil de resistencia de 83 cepas de <i>P. aeruginosa</i>	38
<b>8</b>	Resumen de la determinación de genes de $\beta$ -lactamasas (n=54).	39
<b>9</b>	Gel de electroforesis representativo con productos de PCR para la <i>bla</i> <sub>GES</sub>	39
<b>10</b>	Geles representativos de la expresión de la proteína OprD por Western Blot de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	40
<b>11</b>	Resumen de la expresión de la proteína OprD (n=44)	41
<b>12 (A y B)</b>	Gel de electroforesis con productos de PCR para <i>oprD</i>	43
<b>13</b>	Genes reguladores de bombas de expulsión de la familia RND (n=44).	47
<b>14</b>	Representación gráfica de la cuantificación <i>biofilm</i> aéreo en las 10 cepas de <i>P. aeruginosa</i>	49
<b>15</b>	Representación gráfica de la cuantificación de la biopelícula estática en 10 cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	49
<b>16</b>	Representación gráfica de la cuantificación del <i>biofilm</i> total formado (suma de <i>biofilm</i> aéreo y estático) en ausencia y presencia de meropenem, a distintas concentraciones del antibiótico (n=10).	50
<b>17</b>	Representación gráfica de la cuantificación de alginato a diferentes concentraciones de meropenem, en base a la CMI que mostró la cepa (n=10).	51

## ABREVIATURAS

<b>AN</b>	Amikacina
<b>ATM</b>	Aztreonam
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DPCA</b>	Diálisis peritoneal continua ambulatoria
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>GM</b>	Gentamicina
<b>IPM</b>	Imipenem
<b>ISSSTE</b>	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
<b>MDR</b>	Multidrogorresistente
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>Mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NN</b>	Tobramicina
<b>NOR</b>	Norfloxacin
<b>PIP</b>	Piperacilina
<b>RC</b>	Resistente a carbapenémicos
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TIM</b>	Ticarcilina/clavulanato
<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonia
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria oportunista que representa un gran desafío terapéutico en hospitales debido a la gran capacidad para desarrollar o adquirir mecanismos de resistencia a los antibióticos. El **objetivo** de este estudio fue determinar la participación de la expresión de la proteína OprD, bombas de expulsión, *biofilm* y alginato en la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*. **Material y Métodos:** Se estudiaron 83 cepas de *P. aeruginosa* provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, de las cuales se seleccionaron 44 cepas por ser multidrogoresistentes y resistentes a carbapenémicos (MDR-RC), y que además no portaron carbapenemasas (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, y *bla*<sub>OXA-40</sub>). A estas cepas se les determinó expresión de la porina OprD mediante Western Blot, la participación de bombas de expulsión determinando la CMI para meropenem e imipenem en ausencia y presencia de PAβN y se determinó la presencia de los genes reguladores de bombas de expulsión *mexR*, *nfxB*, *mexT* y *mexZ* por PCR. Se cuantificó la formación de *biofilm* por el método de cristal violeta y la producción de alginato por el método de carbazol, a diferentes concentraciones de meropenem. Los **resultados** obtenidos fueron: El 65% de las cepas fueron MDR-RC, el 41% resistente a piperacilina, 65.1% a ticarcilina/clavulanato, 30.1% a piperacilina/tazobactam, 50.6% a ceftazidime, 48.2% a cefepime, 44.6% a azitromicina, 65.1% a gentamicina, 63.9% a tobramicina, 51.8% a amikacina, 65.1% a ciprofloxacina, 63.9% a norfloxacino, 65.1 para meropenem y 66.3% para imipenem. Los genes de resistencia encontrados fueron: 36 cepas *bla*<sub>GES</sub>, y 37 *bla*<sub>OXA-2</sub>, ninguna cepa portó genes de carbapenemasas. 27 cepas no expresaron porina OprD y mostraron una CMI para imipenem de 64 a >512 µg/mL. Por otro lado, 17 cepas expresaron a la proteína OprD y mostraron una CMI para imipenem de 64 a >512 µg/mL, de las cuales en 11 cepas se observó una banda de un peso de 50 kDa, que correspondía al peso esperado de los controles de la proteína recombinante OprD y la proteína OprD de PAO1 y en 6 cepas se observó una banda de un peso mayor al esperado (70 kDa aproximadamente). Se mandó a secuenciar el gen *oprD* de 4 cepas: PE47 no expresó a OprD y se encontró el gen truncado por una IS*Pa61*, PE30 expresó a OprD (50kDa) y no se encontraron cambios, PE213 expresó a OprD (50 kDa), presentó dos bandas en la amplificación del gen *oprD*, de la cual se mandó a secuenciar la banda de mayor tamaño y esta albergó a IS*Pa1328*, y la cepa PE19 expresó a OprD (mayor a 50 kDa), en la amplificación del gen *oprD* se mostraron dos bandas y se mandó a secuenciar la banda de mayor tamaño, en la cual se encontró a IS*1394*. En 31 cepas hubo participación de bombas de expulsión con disminución de 2 a 64 veces en la CMI para meropenem y 21 cepas de 2 a 8 veces en la CMI para imipenem en presencia de PAβN. 44 cepas portaron el gen *mexR*, 23 *mexT*, 19 *mexZ* y 8 *nfxB*. 18 cepas portaron MexAB-OprM únicamente y 26 cepas portaron más de dos sistemas de bombas de expulsión. En las cepas PE29, PE58, PE60 y PE68 se observó el aumento de la formación de *biofilm* a diferentes concentraciones de meropenem. Solo se observó el aumento de la producción alginato en la cepa PE19 en la presencia de MEM a 16 µg/mL. **Conclusión.** Cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos no portadoras de carbapenemasas presentaron la pérdida de porina OprD y la participación de bombas de expulsión que pudieran estar relacionadas a la resistencia a meropenem e imipenem. Además, en dos cepas se observó la probable participación de mecanismos estructurales (*biofilm* y alginato) que pudieran estar contribuyendo en la resistencia a meropenem. Este estudio muestra la importancia de investigar diferentes mecanismos de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* no portadoras de carbapenemasas, debido a que los antibióticos carbapenémicos son utilizados como último recurso terapéutico contra estas infecciones, por lo que el uso irracional de este tipo de antimicrobianos contribuye a la baja efectividad del tratamiento y la persistencia de la bacteria en el ambiente hospitalario.

**Palabras claves:** *Pseudomonas aeruginosa*, Porina OprD, Bombas de expulsión.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha observado un incremento en la resistencia antimicrobiana siendo de principal interés las bacterias que se encuentran dentro de los hospitales, donde comúnmente se presentan infecciones causadas por patógenos multidrogosresistentes (MDR) (Bassetti *et al.*, 2011; Garza *et al.*, 2019) Existe un grupo de patógenos llamado ESCAPE que agrupa a las bacterias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y las Enterobacterias, debido a la multidrogosresistencia y pandrogosresistencia que presentan. Estos patógenos están asociados a una alta morbilidad y mortalidad principalmente en las infecciones asociadas a la atención a la salud (IAAS), las cuales continúan siendo una constante preocupación para la salud, tanto para pacientes en estado crítico como en pacientes que requieren dispositivos invasivos o procedimientos quirúrgicos. Frecuentemente, los patógenos ESCAPE causan dificultades para la recuperación de los pacientes debido a la gran resistencia a los antibióticos que presentan, siendo esta resistencia muchas veces adquirida en el ambiente hospitalario (Peterson, 2009; Karlowsky *et al.*, 2017).

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, no fermentador y móvil, es considerada una bacteria oportunista, ya que se presenta principalmente en pacientes inmunocomprometidos y/o hospitalizados. Actualmente es uno de los principales patógenos asociados a las IAAS y en los hospitales se encuentra una alta prevalencia de cepas resistentes a antibióticos. Los pacientes pueden llegar a ser colonizados por este patógeno al momento de ingresar al hospital y durante su estancia. Esta bacteria principalmente causa neumonía nosocomial, sepsis, infecciones del tracto urinario e infecciones de la piel. *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a diversos antibióticos y posee una gran capacidad para desarrollar o adquirir resistencia a los antibióticos mediante mutaciones en su cromosoma o transferencia horizontal de genes. Por ello, representa un gran desafío terapéutico y es de suma importancia el inicio oportuno de un tratamiento eficaz contra esta bacteria para un resultado clínico adecuado, aunque la

selección de la terapia correcta llega a ser complicada (Driscoll *et al.*, 2007; Nicolau & Oliver, 2010; Ruiz & Cantón, 2017; Sader *et al.*, 2017).

## **1.1 Tratamiento**

Como se mencionó anteriormente, *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a varios antibióticos, como son algunos  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, trimetoprim/sulfametoxazole y la mayoría de las fluoroquinolonas. Por lo que, actualmente, se cuenta con diversos antibióticos que son conocidos como anti-pseudomonales, los cuales son: carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aminoglucósidos, monobactámicos y algunas fluoroquinolonas (levofloxacin y ciprofloxacina), carbapenémicos y polimixinas. Sin embargo, se sabe que, en la actualidad, esta bacteria ha adquirido mecanismos de resistencia hacia estos antibióticos mediante mutaciones en genes cromosomales debido a la previa exposición o uso inadecuado de antibióticos, o por transferencia horizontal de genes. Cabe resaltar que algunos de estos son utilizados como última opción terapéutica, como es en el caso de los carbapenémicos (meropenem e imipenem) y se conoce que actualmente presentan resistencia hacia estos antibióticos (Driscoll *et al.*, 2007; Ruiz & Cantón, 2017)

## **1.2 Mecanismos de resistencia**

Se conocen diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos, pero a continuación se abordarán algunos presentes en *P. aeruginosa*, resaltando aquellos que participan en la resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos.

### 1.2.1 Producción de $\beta$ -lactamasas

Una de las familias de antibióticos más comúnmente utilizadas son los  $\beta$ -lactámicos, los cuales tienen un anillo  $\beta$ -lactámico que los define químicamente. La función de estos es inhibir la pared celular de las bacterias (Suárez & Gudiol, 2009; Miller *et al.*, 2019). Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas con la capacidad de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico de estos antibióticos, impidiendo su actividad. Están clasificadas, según su análisis de secuencia de aminoácidos, en cuatro clases moleculares A, B, C y D. Las clases A, C y D se distinguen por tener un residuo de serina en su sitio activo mientras que la clase B tienen zinc (Livermoore, 1995; Bontron *et al.*, 2015).

Las  $\beta$ -lactamasas de clase A confieren resistencia a cefalosporinas, aztreonam y penicilinas, excepto a cefamicinas. Algunas de estas pueden presentar actividad de carbapenemasa, como son *bla*<sub>KPC</sub> y algunas variantes de *bla*<sub>GES</sub>. Algunas de estas que han sido reportadas en *P. aeruginosa* son *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>GES-2</sub> y *bla*<sub>GES-20</sub> (Paterson & Bonomo, 2005; Garza-Ramos *et al.*, 2014; Carrara-Marroni *et al.*, 2015; Jeong *et al.*, 2015; Lopez-García *et al.*, 2018).

En la clase B, también llamadas metalo- $\beta$ -lactamasas o carbapenemasas, se encuentran aquellas que tienen afinidad por penicilinas, cefalosporinas y por los antibióticos carbapenémicos. En estas enzimas los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas no tienen efecto, pero, al ser dependientes de zinc pueden inactivarse con EDTA (Patel & Bonomo, 2013). *P. aeruginosa* puede adquirir metalo- $\beta$ -lactamasas mediante plásmidos, como son aquellas de las familias *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> y *bla*<sub>NDM</sub>, que son de importancia por su relevancia clínica y por su diseminación epidemiológica. Algunas variantes de la familia *bla*<sub>IMP</sub> más reportadas son *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-2</sub> e *bla*<sub>IMP-18</sub>; en la familia *bla*<sub>VIM</sub> se han reportado *bla*<sub>VIM-1</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>, siendo esta la más reconocida a nivel mundial. Para las familias *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> y *bla*<sub>NDM</sub> se ha encontrado solamente una variante de cada una presente en *P. aeruginosa*: *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>GIM-1</sub> y *bla*<sub>NDM-1</sub> (Rojo-Bezares, 2014; Hong *et al.*, 2015; Escandón-Vargas *et al.*, 2016).

En la clase C encontramos a AmpC, también llamada cefalosporinasa, ésta puede ser de origen cromosómico o plasmídico y confiere la resistencia a cefalosporinas de 1ra generación, cefamicinas (como cefoxitina), aminopenicilinas y a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, tales como amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam. Esta puede presentar mutaciones en el gen o sus reguladores, como *ampR* o *ampD* y al sobreexpresarse presenta resistencia a todas las penicilinas, incluyendo combinaciones con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas de tercera generación y también a los antibióticos carbapenémicos, volviendo a *P. aeruginosa* resistente a estos antibióticos (Paterson & Bonomo, 2005; Lister, 2009; Martinez, 2009; Nicolau & Oliver, 2010).

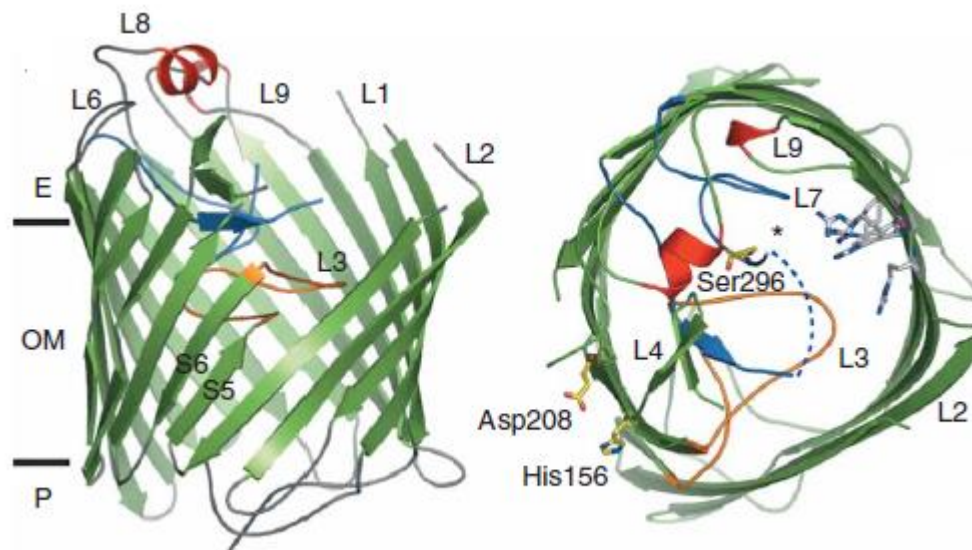
En la clase D se encuentra la familia *bla*<sub>OXA</sub>, las cuales tienen efecto sobre los antibióticos carboxipenicilinas y aminopenicilinas. La mayoría de éstas no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido, aunque se ha encontrado a *bla*<sub>OXA-10</sub> que puede tener un efecto débil sobre cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, logrando así que en las bacterias que la porten, incluida *P. aeruginosa*, se reduzca su susceptibilidad a estos antibióticos (Paterson & Bonomo, 2005; Ullah *et al.*, 2017). *P. aeruginosa* porta en su cromosoma a la *bla*<sub>OXA-50</sub>, formando parte de su resistencia intrínseca, pero a su vez puede adquirir otros tipos de OXA mediante la adquisición de plásmidos como lo es *bla*<sub>OXA-40</sub>, la cual tiene actividad de carbapenemasa (Girlich *et al.*, 2004; Sevillano *et al.*, 2009).

### **1.2.2 Modificación o pérdida de la porina OprD**

Las porinas son proteínas de membrana que permiten la entrada de nutrientes al interior de la bacteria. En *P. aeruginosa* se han estudiado diversas porinas como OprF que juega un papel importante en mantener la forma estructural de la bacteria, OprB, que permite la entrada de glucosa, OprG que tiene la función de transportar hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en condiciones micro aeróbicas, entre otras (Chevalier *et al.*, 2017).

Una de las porinas más estudiadas es la porina OprD, una proteína de 443 aminoácidos compuesta por 16 láminas  $\beta$ -paralelas y conectada con 7 *loops* cortos y 8 *loops* de tamaño variable (**Figura 1**). Esta facilita la entrada de aminoácidos, péptidos pequeños y permite el paso de antibióticos carbapenémicos, como imipenem. Se conoce que las alteraciones en el gen *oprD*, como mutaciones, deleciones y presencia de secuencias de inserción disminuyen la susceptibilidad hacia imipenem, volviendo a la bacteria resistente (Zeng *et al.*, 2013; Rojo-Bezares *et al.*, 2014; López-García *et al.*, 2018).

Diversos estudios muestran que los loops L2 y L3 están implicados en la unión específica hacia aminoácidos básicos e imipenem, por lo que al encontrarse mutaciones en ellos afectan el paso de este antibiótico hacia el interior de la bacteria; también se conoce que en el loop L7 al presentar deleciones o sustituciones de aminoácidos vuelve al espacio de la porina lo suficientemente ancho para permitir la entrada de meropenem, por lo que en este caso la bacteria se vuelve sensible hacia este antibiótico (Wang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Dreier & Roggerone, 2015).



**Figura 1. Estructura de la porina OprD.** Verde: láminas  $\beta$ -paralelas, gris: loops y ángulos de torsión, rojo:  $\alpha$ -hélices, naranja y azul: loops que restringen al poro L3 y L7 respectivamente. Imagen modificada de Biswas *et al.*, 2007.

### 1.2.3 Bombas de expulsión

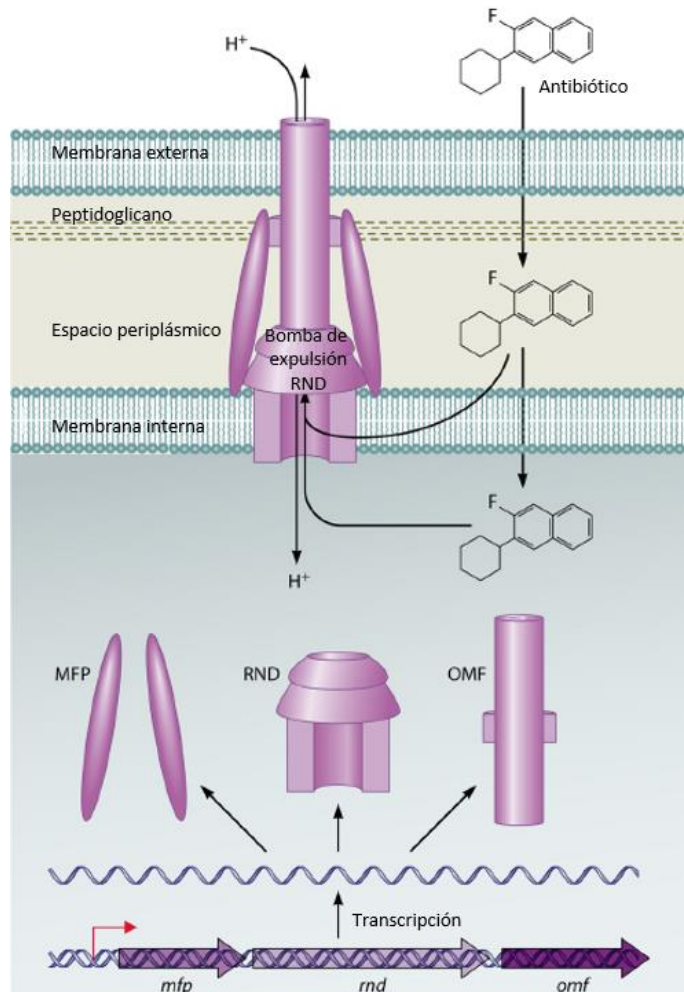
Las bombas de expulsión son complejos proteicos anclados a la membrana externa e interna, formadas de 3 proteínas estructurales: un canal o porina en la membrana externa, una proteína adaptadora situada en el periplasma y una proteína transportadora en la membrana interna, encargadas de expulsar moléculas que al pasar hacia citoplasma afecten la integridad de la bacteria como biocidas, metales pesados y toxinas presentes en el ambiente. Están clasificadas en cinco superfamilias, las cuales son por sus siglas en inglés: *ATP-binding cassette (ABC) family*, *small multidrug resistance (SMR) family*, *major facilitator superfamily (MFS)*, *multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family* y *resistance-nodulation-division (RND) family*, siendo esta última la más comúnmente encontrada y que juega un papel importante en la resistencia a los antibióticos. La familia RND generalmente está compuesta por un sistema de tres proteínas: una proteína transportadora RND ubicada en la membrana interna, una proteína de fusión de membrana periplasmática (MFP) y una proteína de membrana externa o porina (OMF) (**Figura 2**). En *P. aeruginosa*, podemos encontrar distintos sistemas de bombas de expulsión, resaltando su importancia MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM que al sobreexpresarse son capaces de expulsar a diferentes antibióticos. Esta sobreexpresión está dada por mutaciones en sus genes reguladores y promotores, pero también se ha observado que otros sistemas tienen efecto sobre la expresión de estos genes (como menciona Muller *et al.*, 2011, el sistema ParRS puede tener influencia sobre la bomba de expulsión MexXY-OprM) (Lister *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2011; Lamut *et al.*, 2019).

- MexAB-OprM: esta se expresa constitutivamente en *P. aeruginosa*, formando parte de su resistencia intrínseca. Es regulada negativamente por *mexR* y su sustrato son los antibióticos de las familias  $\beta$ -lactámicos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, novobiocina, trimetoprim y sulfonamidas. Se conoce que esta bomba puede expulsar a

meropenem, pero no a imipenem (Lister et al., 2009; Wang et al., 2010).

- MexCD-OprJ: este sistema es regulado negativamente por *nfxB*, es capaz de expulsar  $\beta$ -lactámicos como piperacilina, cefepime, meropenem y fluoroquinolonas, cloranfenicol, macrólidos, trimetoprim, tetraciclinas y novobiocina, pero no son sustratos otros antibióticos como aztreonam, ceftazidima e imipenem (Quale et al., 2006; Jeannot et al., 2008; Lister et al., 2009).
- MexEF-OprN: esta bomba de expulsión es regulada positivamente por *mexT*, es capaz de expulsar a las familias de antibióticos de fluoroquinolonas, trimetoprim y cloranfenicol. El regulador *mexT* está involucrado en la regulación negativa del gen *oprD*, esto sucede como consecuencia de mutaciones presentes en el regulador *mexT*, como resultado, la porina OprD no se expresa y la bacteria es resistente a imipenem por este mecanismo (Lister et al., 2009).
- MexXY-OprM: este sistema está regulado negativamente por *mexZ*, contribuye a la expulsión de fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclina y algunos  $\beta$ -lactámicos como piperacilina, cefepime y meropenem. Actualmente, se conoce que este sistema también puede expulsar al antibiótico imipenem (Terzi et al., 2014; Su et al., 2017). Por otra parte, Muller et al., en 2011, realizaron estudios en cepas de *P. aeruginosa* sobre esta bomba de expulsión. El gen *mexZ* no presentó mutaciones, sin embargo, el sistema MexXY se sobreexpresaba debido al sistema de regulación ParRS; este sistema de doble componente se ubica en la membrana de *P. aeruginosa*, al sensor moléculas que causen estrés a la bacteria (ej. péptidos policatiónicos y antibióticos), se activa y por medio de una cascada de

señalización e incrementa la expresión del gen *mexY* y reprime al gen *oprD* evitando la expresión de esta proteína.



**Figura 2. Estructura y función de las bombas de expulsión RND en *P. aeruginosa*.** Este complejo forma un canal que abarca toda la membrana, permitiendo el transporte, impulsado por protones, de antibióticos desde el citoplasma de la célula a través de la membrana interna, el espacio periplásmico, peptidoglucano, y finalmente, por la membrana externa. Imagen modificada de Lister *et al.*, 2009.

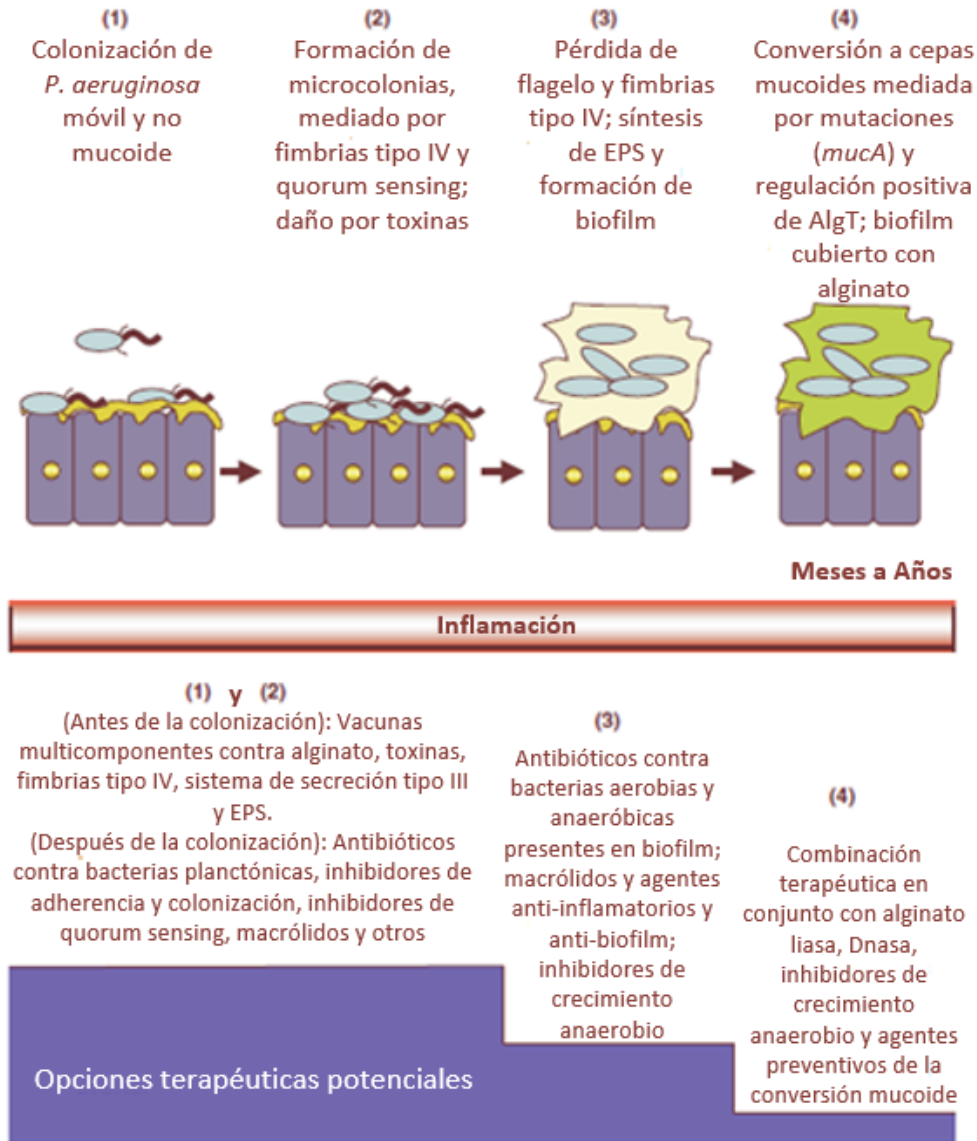
#### 1.2.4 Producción de *biofilm* y alginato

El *biofilm* se define como una agrupación de bacterias que colonizan y se adhieren a las superficies, está formado por sustancias producidas por las bacterias integradas en una matriz de biopolímeros, el cual contiene ADN, proteínas y polisacáridos. Su función es permitir que las bacterias sobrevivan en el

ambiente hostil del hospedero, diseminarse para la formación de nuevas colonias y le confiere una gran ventaja para protección contra la humedad, temperatura, pH, concentración de nutrientes y eliminación de desechos. Incluso se conoce que, debido a este mecanismo, se vuelven menos susceptibles a la respuesta inflamatoria e inmunológica del paciente y contribuye a la resistencia a antibióticos. La formación de *biofilm* está relacionada con el “quorum sensing”, que es un mecanismo por el cual las bacterias producen, reconocen y responden a pequeñas moléculas llamadas autoinductores, las cuales les permite la comunicación entre ellas, logrando así la coordinación de poblaciones bacterianas a cambios ambientales. Las bacterias productoras de *biofilm* están asociadas a la complicación de distintas enfermedades, como son endocarditis, otitis media, prostatitis crónica, fibrosis quística, periodontitis, infecciones causadas por dispositivos médicos inclusive e IAAS (Bjarnsholt *et al.*, 2010; Palanisamy *et al.*, 2014; Vital-López *et al.*, 2015; Alav *et al.*, 2018).

Se ha observado la formación de *biofilm* en distintos patógenos, entre ellos en *P. aeruginosa*, lo que que dificulta su eliminación, participa en la evasión al complemento del sistema inmune y promueve su persistencia en infecciones de pacientes hospitalizados. También al *biofilm* se le ha atribuido la participación en la resistencia a los antibióticos, debido a que su formación en cepas de *P. aeruginosa* las vuelven más persistentes frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, quinolonas y tetraciclinas (Gupta *et al.*, 2016; Alav *et al.*, 2018). Este *biofilm* está formado por tres exopolisacáridos: el Pel, que tiene función estructural y de protección al *biofilm*, el Psl que es esencial en la formación del *biofilm* tanto en cepas mucoides como en no mucoides y el alginato, que es importante para la maduración del *biofilm* en cepas mucoides pero no es esencial en cepas no mucoides, se conoce que este puede jugar un papel importante en la resistencia a los antibióticos y contribuye a la evasión del sistema inmune del hospedero (**Figura 3**) (Ma *et al.*, 2012).

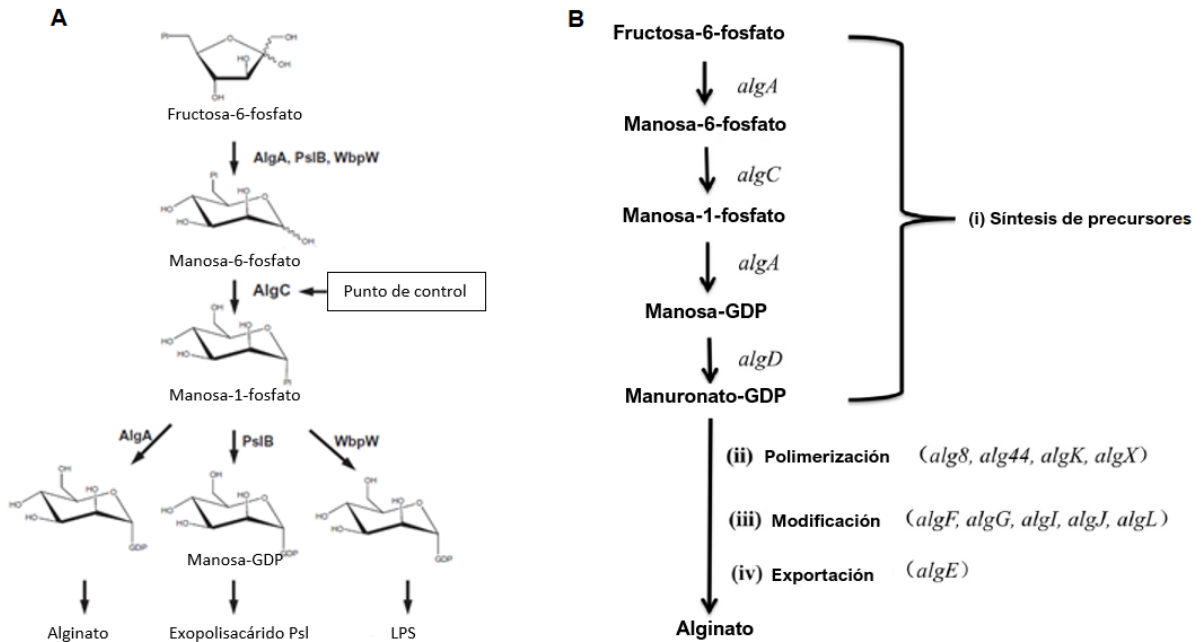
**Estrategias de virulencia de *P. aeruginosa* durante el proceso infeccioso**



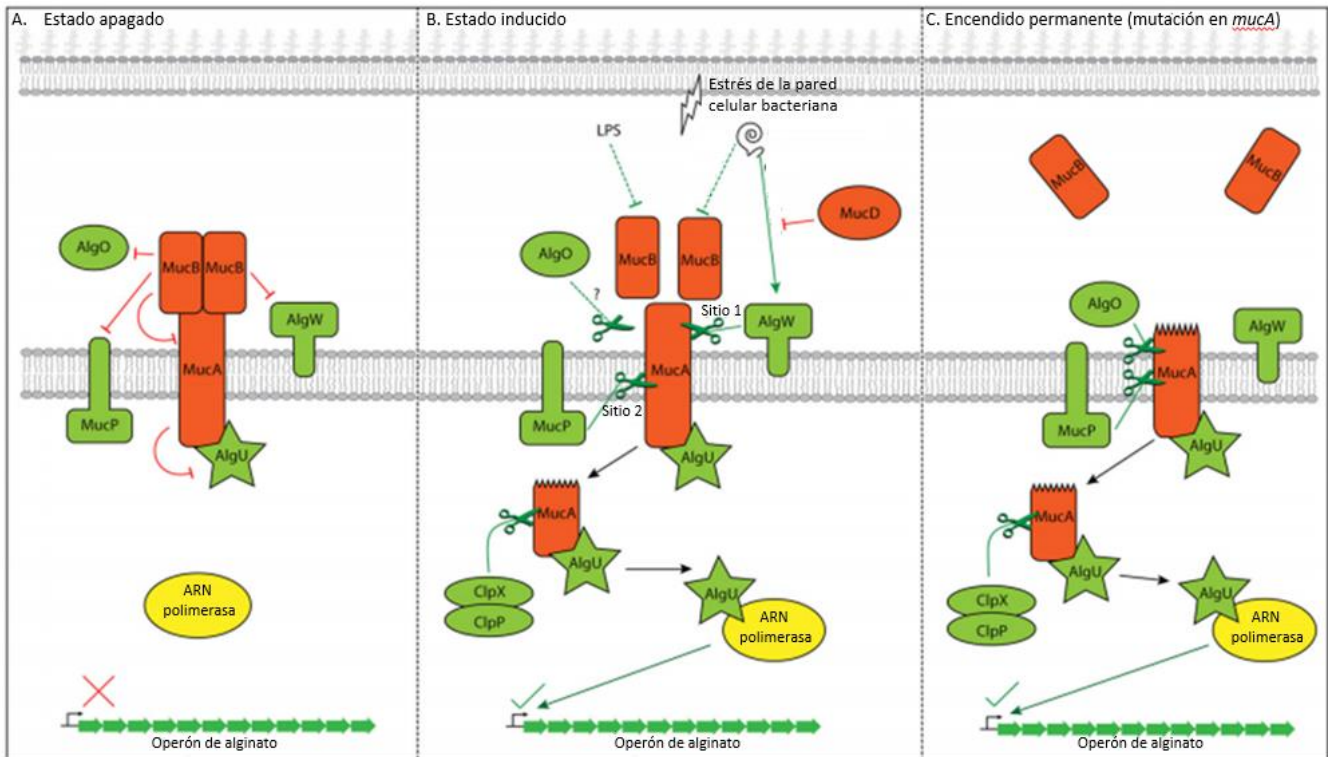
**Figura 3. Estrategias de virulencia de *P. aeruginosa* propuestas durante el proceso infeccioso y estrategias terapéuticas potenciales.** En el pulmón con fibrosis quística, la mucosidad presente atrapa a bacterias como *P. aeruginosa*, permitiendo su persistencia. Los pacientes inicialmente son colonizados por bacterias planctónicas que se adhieren al tejido (Paso 1). Después, estas bacterias secretan moléculas como homoserin-lactonas para la comunicación célula a célula (quorum sensing) y forman colonias bacterianas (Paso 2). Secreción de toxinas, proteasas y pigmentos (piocianina), con el tiempo, las colonias forman *biofilm* albergando bacterias aerobias y anaerobias (Paso 3). Células del sistema inmune presentes en el pulmón liberan especies reactivas de oxígeno, aplicando una presión selectiva a las bacterias e induciendo la producción de alginato mediada por mutaciones en el gen *mucA*, desregulación de AlgT y la conversión de colonias no mucoides a mucoides. Imagen modificada de Ramsey & Wozniak, 2005.

El alginato es un polímero conformado por residuos de D-manuronato y L-glucoronato. Actúa como una barrera de protección para *P. aeruginosa*, ya que protege a la bacteria de la respuesta inflamatoria del sistema inmune del paciente y a su vez le otorga propiedades de formar una estructura mucoide, contribuyendo a la complicación de infecciones respiratorias. Aunque el alginato no es esencial en el *biofilm* de colonias no mucoides, tiene gran impacto en la estructura y la persistencia de las cepas mucoides (Ramsey & Wozniak, 2005; Ma *et al.*, 2012; Ghadam *et al.*, 2017).

La biosíntesis del alginato está regulada por el factor sigma AlgT (también conocido como AlgU o  $\sigma^{22}$ ) que induce la expresión del gen *algD*, una enzima importante para la conversión de manosa-GDP a manuronato-GDP donde inicia la producción de alginato. Los genes *mucA* y *mucB* inhiben a AlgT, inversamente, la ausencia de *mucA* y *mucB* permite la expresión de AlgT, proteína que inicia la producción de alginato y fenotípicamente la cepa se vuelve mucoide. Cuando el gen *mucA* presenta mutaciones, su expresión es inactivada y pierde su capacidad de interaccionar con AlgT. Como consecuencia, este se une al promotor del gen *algD* llevando a la sobreproducción de alginato (**Figura 4 A y B y Figura 5**). En diversos estudios se ha observado que en pacientes con fibrosis quística se presentan complicaciones causada por cepas de *P. aeruginosa* no mucoides, que con el paso del tiempo estas cepas se vuelven mucoides, debido a la sobreproducción de alginato, atribuyendo este cambio de fenotipo en la bacteria a las mutaciones en el gen *mucA* (**Figura 5**) (Ramsey & Wozniak, 2005; Høiby *et al.*, 2017; Jones & Wozniak, 2017).



**Figura 4 A y B. Esquema de la síntesis de alginato, Psl y LPS en la cepa PAO1.** La proteína fosfomanomutasa AlgC es necesaria para la biosíntesis de 3 exopolisacáridos: Psl, Pel y alginato. La sobreproducción de un exopolisacárido reducirá la síntesis de otro y se sugiere que AlgC es un punto de control para la producción de los exopolisacáridos. Una vez que AlgC dirige hacia la síntesis para la producción de alginato, otros genes se encuentran involucrados en la (ii) polimerización y transferencia a la membrana citoplasmática, (iii) transferencia al espacio periplásmico y modificación y (iv) exportación a la membrana externa. Imágenes modificadas de (A) Ma *et al.* 2012 y (B) Wu *et al.*, 2015.



**Figura 5. Cascada de señalización de MucA.** Las líneas verdes significan un efecto positivo en la producción de alginato, mientras que las líneas rojas es la inhibición de la producción. Líneas punteadas significa un mecanismo desconocido. A) En ausencia de una presión selectiva, el sistema se encuentra apagado. AlgU (AlgT) se encuentra secuestrado por MucA-MucB. B) En condiciones de estrés, el sistema se enciende y se activa esta cascada de señalización dirigida por la proteólisis realizada por AlgW y MucP sobre MucA-AlgU; este complejo se dirige hacia la RNA polimerasa que inicia la expresión del operón de alginato. MucD puede reparar posibles daños causados por el estrés. C) Mutaciones en MucA causan que este sistema se encuentre encendido permanentemente. MucA no puede interaccionar con MucB, por lo que AlgU (AlgT) se encuentra libre para interaccionar con la RNA polimerasa. Imagen modificada de Hay *et al.*, 2014.

Cabe destacar que en las cepas de *P. aeruginosa* causantes de IAAS no se ha observado como estos mecanismos estructurales, como son la formación de *biofilm* y la presencia de alginato, contribuyen a la resistencia a los antibióticos.

Actualmente, poco se conoce sobre la función de los mecanismos estructurales en la resistencia hacia los antibióticos, por lo cual se han propuesto el uso de diversos antibióticos durante las diferentes etapas de la formación de *biofilm*, las cuales son 1) colonización de *P. aeruginosa*, 2) formación de microcolonias, 3) síntesis de EPS y formación de *biofilm* y 4) producción de alginato (**Figura 3**) (Ramsey & Wozniak, 2005).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes generales

La resistencia a los antibióticos se origina de la evolución natural de las bacterias para adaptarse a su ambiente; sin embargo, el uso excesivo e inapropiado de los antibióticos ha contribuido a generar una era de emergencia y propagación de bacterias multidrogoresistentes, debido a mutaciones y adquisición de diferentes mecanismos de resistencia (Alav *et al.*, 2018). En el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó un boletín donde se destacaban a los microorganismos para los cuales se necesitaban urgentemente la creación de nuevos antibióticos, estos relacionados a las IAAS, en dicha lista se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos en la categoría de Prioridad 1: crítico (OMS, 2017).

El mecanismo de resistencia antimicrobiana más estudiado en cepas de *P. aeruginosa* ha sido la producción de  $\beta$ -lactamasas, pero se ha observado que existen cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos en especial a carbapenémicos, que no son portadoras de estas enzimas y se han buscado otros mecanismos involucrados en la resistencia, como son la pérdida o modificación de la porina OprD y la participación de bombas de expulsión (Lee & Ko, 2012; Rojo-Bezares *et al.*, 2014).

Diversos estudios en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, enfocados en la resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos, han evidenciado que la influencia de bombas de expulsión de la familia RND (MexAB, MexCD, MexEF y MexXY) es uno de los mecanismos más involucrados. Se ha realizado PCR en tiempo real y secuenciación de los genes reguladores de bombas de expulsión *mexR*, *nfxB*, *mexT* y *mexZ*, donde encontraron mutaciones en estos y como consecuencia, se observó la sobreexpresión de las bombas de expulsión confiriendo resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos (Quale *et al.*, 2006; Castanheira *et al.*, 2014; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha utilizado RT-PCR cuantitativa de los genes estructurales de las bombas de expulsión *mexB*, *mexY* y *mexD* y se observó la sobreexpresión de estos genes, poniendo en evidencia que sus respectivas bombas de expulsión se encontraban activas frente a la expulsión de antibióticos. En otro estudio, únicamente se encontró la sobreexpresión de la bomba de expulsión MexAB-OprM, atribuyendo a este sistema la resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos (Lee & Ko, 2012; Muderris *et al.*, 2018).

En otros estudios relacionados con la presencia de la proteína OprD en cepas clínicas de *P. aeruginosa* no portadoras de carbapenemasas, se realizó la secuenciación del gen *oprD* y se encontraron secuencias de inserción en el gen que interrumpían la expresión de la proteína. Además, en el gen *oprD* se han encontrado mutaciones como: sustituciones aminoacídicas que codifican un codón de paro, por lo que posiblemente no se exprese la proteína; también se encontraron deleciones de 2 o más nucleótidos los cuales pudieran interrumpir la expresión. Debido a esto, se le atribuyó la pérdida o modificación de la proteína OprD a la resistencia a los antibióticos carbapenémicos (Lee & Ko, 2012; Rojo-bezares *et al.*, 2014; Kao *et al.*, 2016; Shariari *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que se han realizado estudios de otros mecanismos que pudieran estar involucrados en la resistencia como son factores estructurales como la formación de *biofilm* y la producción de alginato en pacientes con fibrosis quística, con el consecuente agravamiento de la enfermedad. El *biofilm* no es un mecanismo de resistencia; sin embargo, se ha observado que la presencia del *biofilm* interfiere en el paso de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos hacia la bacteria, como consecuencia, el antibiótico no tiene efecto (Abdi-Ali *et al.*, 2006). Además, se realizó la cuantificación del *biofilm* mediante la metodología de cristal violeta, en presencia y ausencia de distintas familias de antibióticos y se observó que en presencia del antibiótico hubo un aumento en la producción de *biofilm* (Kaplan, 2011; Aka & Haji, 2015; Cepas *et al.*, 2019).

Por otro lado, el estudio realizado por Wasserman *et al.*, en 2016, con la cepa *P. aeruginosa* PAO1 al hacerla crecer en presencia de ciprofloxacina a una concentración de 0.05 µg/mL las colonias bacterianas cambiaron su fenotipo, volviéndose mucoides, por lo que los autores relacionan la producción de alginato con la resistencia hacia este antibiótico. Resultados similares fueron observados en otros estudios realizados con cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística, las cuales fueron probadas en presencia de imipenem y aminoglucósidos (Hentzer *et al.*, 2001; Bagge *et al.*, 2004; Wasserman *et al.*, 2016).

Se sugiere que el antibiótico ejerce una presión sobre las cepas de *P. aeruginosa* induciendo la formación de *biofilm* y alginato, por lo que además de una protección en respuesta al estrés, también influyen como factores de resistencia hacia diversos antibióticos, por lo que es de importancia continuar estudiando estos mecanismos estructurales en la bacteria.

## 2.2 Antecedentes directos

En Puebla, en el laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad, se realizaron estudios con cepas obtenidas del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE de la Ciudad de México y del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.

En el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, se aislaron 11 cepas MDR-RC que no portaban carbapenemasas y se realizó la búsqueda de otros mecanismos involucrados en esta resistencia, como modificaciones en el gen *oprD* que interrumpían la expresión de la proteína. Además, se observó que 6 cepas mostraban una CMI >512 µg/mL para meropenem y fueron seleccionadas para realizar la cuantificación de la producción de alginato en ausencia y presencia del meropenem, donde se observó que había una mayor producción del exopolisacárido en presencia de meropenem, concluyendo que en estas cepas la presencia de alginato podría estar participando en la resistencia hacia los carbapenémicos (Nepomuceno, 2015).

En el Hospital Regional ISSSTE se obtuvieron 59 cepas de *P. aeruginosa* a las cuales se les realizó perfil de resistencia a antibióticos, donde 41 cepas resultaron MDR-RC que fueron seleccionadas para estudiar los mecanismos de resistencia involucrados. Se determinó el genotipo de estas cepas y se encontró que 24 cepas eran portadoras de  $\beta$ -lactamasas con actividad de carbapenemasa, las cuales portaban *bla*<sub>IMP</sub> y/o *bla*<sub>GES</sub> y 17 cepas no portaron carbapenemasas.

En 17 cepas portadoras de *bla*<sub>IMP</sub> se estudiaron otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos, encontrando mutaciones en el gen *oprD*, las cuales interrumpían la expresión de la porina OprD; su expresión fue determinada mediante Western Blot. Por otra parte, se estudió la presencia de los genes de carbapenemasas que pudieran estar en integrones y plásmidos (López *et al.*, 2018).

Para el caso de las 17 cepas MDR-RC no portadoras de carbapenemasas es necesario continuar con el estudio de otros mecanismos de resistencia que expliquen los niveles de concentración mínima inhibitoria que presentan. A su vez, es importante estudiar las 7 cepas portadoras de *bla*<sub>GES-2</sub> y *bla*<sub>GES-20</sub> y que no portaron *bla*<sub>IMP</sub> dado que la presencia de este tipo de enzimas no explica los niveles altos de resistencia presentados por estas cepas (López, 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se aislaron cepas de *P. aeruginosa* causantes de infecciones asociadas a la atención de la salud en hospitales de Puebla, que presentan multidrogorresistencia y resistencia a carbapenémicos, que no son portadoras de carbapenemasas por lo que es de importancia el estudio de otros mecanismos de resistencia que pudieran estar involucrados en la resistencia a carbapenémicos como son la pérdida de la expresión de la proteína OprD, la participación de bombas de expulsión y determinar si los cambios estructurales de las cepas (producción de *biofilm* y alginato) pudieran estar participando en la resistencia a carbapenémicos.

## 4. OBJETIVOS

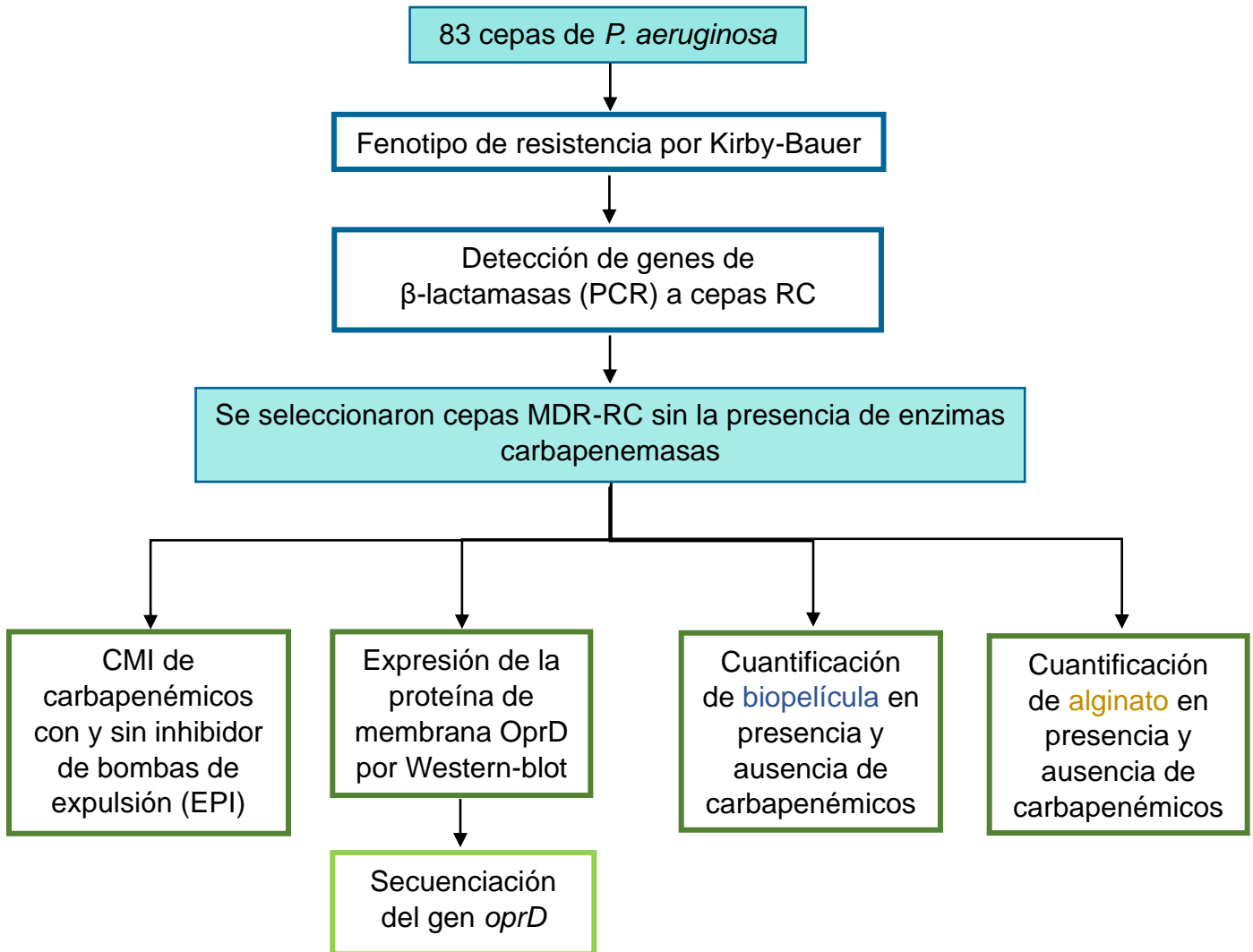
### 4.1 Objetivo general

Determinar la participación de la expresión de la proteína OprD, bombas de expulsión, *biofilm* y alginato en la resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

### 4.2 Objetivos particulares

- Determinar el fenotipo de resistencia en algunas cepas de *P. aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales.
- Detectar genes de resistencia a carbapenémicos en algunas cepas de *P. aeruginosa*.
- Identificar el gen *oprD* y determinar la expresión de la proteína OprD.
- Determinar la participación de bombas de expulsión mediante inhibición con EPI en la resistencia a carbapenémicos.
- Determinar la producción de *biofilm* en presencia y ausencia de carbapenémicos a diferentes concentraciones.
- Determinar la producción de alginato en ausencia y presencia de carbapenémicos a diferentes concentraciones.

## 5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas de estudio

En este estudio, se trabajaron 83 cepas de *P. aeruginosa*, obtenidas del Hospital Regional ISSSTE de Puebla. Las cepas fueron recolectadas durante el período de junio 2013 a marzo 2017. Estas fueron identificadas por el sistema semiautomatizado VITEK-2. Dentro de estas cepas, se seleccionaron 21 cepas de *P. aeruginosa* MDR-RC que no son portadoras de carbapenemasas previamente estudiadas por López en 2019 (**Anexo 1**).

Las cepas fueron conservadas en crioviales con caldo BHI (Brain-Heart Infusion) y glicerol 10%, almacenadas en un ultracongelador a -70°C. Antes de realizar los experimentos, se sembraron por estría cruzada en una placa de agar tripticasa soya (TSA) e incubaron por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se realizó una resiembra a una nueva placa de TSA, con el fin de evitar posibles cambios fenotípicos causados por el estrés de la ultracongelación. De este segundo inóculo se procedió a realizar los experimentos.

### Condiciones de ética

Los aislados clínicos fueron recolectados durante el muestreo de rutina del hospital y los datos de los pacientes se mantuvieron bajo anonimato. El Comité de Ética del Hospital Regional ISSSTE de Puebla aprobó el protocolo para este estudio con el número de registro 188.2018.

#### 6.1.1 Cepas control

Se utilizó a la cepa *P. aeruginosa* PAO1, donada por la Dra. Gloria Soberón y el Dr. Miguel Castañeda, como control para la amplificación del gen *oprD* y como control negativo para la CMI; la cepa de *P. aeruginosa* PE21, obtenida del estudio realizado por López-García *et al.*, 2018, como control positivo para la amplificación

de los genes *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> y *bla*<sub>OXA-50</sub>, también se utilizó como control para realizar la CMI en presencia y ausencia del inhibidor de bombas de expulsión PAβN, *P. aeruginosa* PE52, obtenida del estudio realizado por López *et al.*, 2018, se usó como control para la amplificación del gen *bla*<sub>OXA-2</sub>; la cepa de *Acinetobacter baumannii* AN54, obtenida del estudio realizado por Bello-López *et al.*, 2019, se usó como control para la presencia del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> y la cepa control *P. aeruginosa* portadora de *bla*<sub>VIM-2</sub>, donada por el Dr. Jesús Silva Sánchez, para la amplificación de este gen.

## **6.2 Determinación del fenotipo de resistencia por difusión en disco (Kirby-Baüer)**

A partir de un cultivo puro en TSA, se tomó con asa bacteriológica una colonia que fue suspendida en un tubo con 2 mL de solución salina isotónica (SSI 0.85%) y se ajustó la turbidez al tubo de 0.5 de MacFarland. Una vez estandarizado, se sumergió un hisopo estéril y se inoculó masivamente una placa de agar Mueller-Hinton (MH), inoculando por rayado toda la superficie de la placa: esto se repitió 3 veces, girando la placa 90° para asegurar la distribución homogénea del inóculo, y al finalizar, se pasó el hisopo por los bordes internos de la placa. Con la ayuda de unas pinzas esterilizadas en el mechero, se colocaron los sensidiscos (BD BBL™) con los antibióticos sugeridos por el manual CLSI 2018 y se incubaron de 16 a 18 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a la lectura de los halos de inhibición de crecimiento obtenidos y se compararon con la zona de diámetro del CLSI 2018 para su interpretación (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Antibióticos para realizar el fenotipo de resistencia por difusión en disco.**

Antibiótico	Zona de diámetro (mm)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Piperacilina	≥ 21	15 – 20	≤ 14
Piperacilina/Tazobactam	≥ 21	15 – 20	≤ 14
Ticarcilina/Clavulanato	≥ 24	16 – 23	≤ 15
Ceftazidima	≥ 18	15 – 17	≤ 14
Cefepime	≥ 18	15 – 17	≤ 14
Aztreonam	≥ 22	15 – 21	≤ 15
Meropenem	≥ 19	16 – 18	≤ 15
Imipenem	≥ 19	16 – 18	≤ 15
Gentamicina	≥ 15	13 – 14	≤ 12
Amikacina	≥ 17	15 – 16	≤ 14
Tobramicina	≥ 15	13 – 14	≤ 12
Ciprofloxacino	≥ 21	16 – 20	≤ 15
Norfloxacino	≥ 17	13 – 16	≤ 12

S: sensible, I: intermedio, R: resistente. CLSI, 2018

### 6.3 Concentración mínima inhibitoria

Para determinar la concentración mínima inhibitoria, se utilizó la técnica de dilución en agar, para lo cual se prepararon placas de agar MH suplementadas con los antibióticos meropenem e imipenem. Estas fueron preparadas con 20 mL de agar por placa, con la concentración del antibiótico correspondiente para cada dilución.

A partir de un cultivo puro en agar TSA, se preparó una suspensión al 0.5 de MacFarland, del mismo modo que se hizo para realizar el fenotipo de resistencia. Después, se realizó una dilución 1:10 de la suspensión: de manera que para 1000 µL se agregaron 900 µL de SSI y 100 µL de la suspensión. Posteriormente, se

distribuyeron 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra en las placas; cada una con las concentraciones de 2  $\mu\text{g/mL}$  a 512  $\mu\text{g/mL}$  del antibiótico. Se utilizó como control negativo a PAO1 y a la cepa PE21 como control positivo, debido a que ya se conocen sus valores de CMI para ambos antibióticos. Las placas fueron incubadas 16 a 18 horas a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a la lectura de estas para conocer la CMI de la cepa, es decir, a la concentración en la que ya no se observó crecimiento de la bacteria.

**Tabla 2. Puntos de corte para la CMI los antibióticos meropenem e imipenem.**

Antibiótico	Punto de corte de CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Meropenem	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Imipenem	$\leq 2$	4	$\geq 8$

S: sensible, I: intermedio, R: resistente. **CLSI 2018.**

#### **6.4 Extracción de ADN por ebullición**

A partir de un inóculo masivo en placa de TSA e incubada por 24 horas, se tomaron de 2 a 3 asadas bacterianas y se colocaron en un tubo eppendorf que contenía 800  $\mu\text{L}$  de solución salina isotónica (SSI). Se homogenizó completamente por vortex y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos; se descartó el sobrenadante y se agregó nuevamente SSI: el lavado fue repetido 2 veces más, se descartó el último lavado y se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de agua inyectable estéril (PISA). Se homogenizó con un vortex y se colocó en baño maría por 10 minutos, se homogenizó con vortex, se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante obtenido fue colocado en un tubo eppendorf estéril.

Se cuantificó la concentración de ADN en un Nanodrop 2000® (Thermo Scientific). Cada muestra se ajustó a una concentración de 200 ng/μL. Se guardaron a -20°C hasta su uso.

## **6.5 Amplificación de genes en cepas clínicas de *P. aeruginosa*.**

### **6.5.1 Amplificación de genes de resistencia a carbapenémicos**

La detección de genes de resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos: *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub> y *bla*<sub>OXA-50</sub> se realizó mediante PCR. Las condiciones para la amplificación de los genes de resistencia se encuentran en la **Tabla 4**.

Los productos de PCR obtenidos se cargaron en geles de agarosa al 1% con buffer de carga y se corrieron a 100V. Estos fueron teñidos con bromuro de etidio (Sigma® Life Science) durante 15 segundos y lavados por 30 minutos en agua tridestilada. Para visualizar los geles se utilizó el equipo digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

### **6.5.2 Amplificación de genes reguladores de bombas de expulsión**

Con el objetivo de conocer la presencia de los genes que codifican para las bombas de expulsión de la familia RND en las cepas de *P. aeruginosa*, se amplificaron los genes reguladores *mexR*, *nfxB*, *mexT* y *mexZ*. Las condiciones para la amplificación de estos se encuentran en la **Tabla 5**.

## **6.6. Determinación de mutaciones en la proteína OprD**

El gen *oprD* se amplificó para posteriormente purificar el producto de la PCR y secuenciarlo. Las condiciones de la PCR se encuentran en la **Tabla 6**. Se utilizaron los controles correspondientes mencionados en el apartado 6.1.1. Cada reacción contenía un volumen final de 10μL, sus respectivos componentes se muestran en la **Tabla 3**.

La purificación del gen *oprD* se realizó mediante el kit Zymoclean™ DNA Recovery kit, siguiendo los pasos del fabricante. Los productos de PCR purificados fueron enviados al laboratorio LANGEVIO en Irapuato, Guanajuato para su secuenciación.

Para determinar las mutaciones en el gen *oprD*, las secuencias fueron visualizadas utilizando el programa Flinch Tv v1.4.0 Geospiza y editadas en el programa Nucleic Acid Sequence Massanger. Para convertir las secuencias de nucleótidos a aminoácidos, se utilizó ExPASy-Translate Tool y por medio de ClustalW (Clustal Omega) fueron alineadas con la secuencia aminoacídica de OprD de PAO1(número de acceso GenBank NC\_002516.2) para su comparación.

Para el análisis de las secuencias se utilizaron los siguientes programas:

- Flinch TV v1.4.0 Geospiza para visualizar las secuencias obtenidas.
- Nucleic Acid Sequence Massanger, para la edición de la secuencia (<http://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/massager.htm>).
- BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information site, para la comparación de las secuencias ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).
- ClustalW (Clustal Omega), para los alineamientos de las secuencias (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).
- ExPASy-Translate tool, para la conversión de nucleótidos a aminoácidos (<https://web.expasy.org/translate/>).

**Tabla 3. Componentes de una reacción de PCR.**

Reactivos	Concentración inicial	Volumen añadido (µL)	Concentración final (en reacción)
Agua	-	6.12	-
Buffer	10X	1.0	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.0	2.5 mM
dNTPs	10 mM	0.2	0.2 mM
Primer Forward	25 µM	0.3	0.75 µM
Primer Reverse	25 µM	0.3	0.75 µM
Taq	5 U/µL	0.08	0.04 U/µL
ADN de muestra	200 ng/µL	1	-
Volumen final	-	10	-

**Tabla 4. Características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de β-lactamasas. Ojo falta incluir una columna a la extrema derecha con la referencia de cada juego de oligos**

Gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre de los oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de PCR	Referencia
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	741	IMPd-F	CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG	515	94°C 5 min 94°C 1 min 56°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Bello-López, 2015
		IMPd-R	GCCADGCTACDANATTTGCGTC			
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	801	Vimd1- F	GATGGYGTTTGGTCGCATATC	Usando 1-2: 400 Usando 1-3: 600	94°C 5 min 94°C 1 min X°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min X1-2:54°C X1-3:50°C	Bello-López, 2015
		Vimd2-R	GAATGCGCAGCACCRGGA			
		Vimd3-R	CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA			

<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	813	NDM <sub>v</sub> -F	AATATTATGCACCCGGTCGCG	732	94°C 5 min 94°C 1 min 54°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Bello-Lopéz, 2015
		NDM <sub>v</sub> -R	CATCACGATCATGCTGGCCTT			
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	2004	<i>bla</i> <sub>SPM</sub> -F	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	800	94°C 5 min 94°C 1 min 56°C 1 min 30c 68°C 1 min 68°C 10 min	Mendes <i>et al.</i> , 2007
		<i>bla</i> <sub>SPM</sub> -R	CCTTTTCCGCGACCTTGATC			
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	773	GIM-F	AGAACCTTGACCGAACGCAG	748	94°C 5 min 94°C 1 min 57°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Castanheira <i>et al.</i> , 2004
		GIM-R	ACTCATGACTCCTCACGAGG			
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	882	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> -F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	882	94°C 5 min 94°C 30 seg 52°C 30 seg 35c 72°C 1 min 72°C 5 min	Akpaka <i>et al.</i> , 2009
		<i>bla</i> <sub>KPC</sub> -R	TTACTGCCCGTTGACGCCCA			
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	864	GES1-F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	864	94°C 5 min 94°C 1 min 55°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Poirel <i>et al.</i> , 2000
		GES1-R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG			
<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	827	<i>oxa</i> <sub>2Ps</sub> -F	TTCAAGCCAAAGGCACGATAG	703	94°C 5 min 94°C 1 min 58°C 30 seg 35c 72°C 90 seg 72°C 10 min	Steward <i>et al.</i> , 2001
		<i>oxa</i> <sub>2Ps</sub> -R	TCCGAGTTGACTGCCGGGTTG			
<i>bla</i> <sub>OXA-40</sub>	828	<i>oxa</i> <sub>40Ps</sub> -F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	249	94°C 5 min 94°C 25 seg 52°C 40 seg 30c 72°C 50 seg 72°C 6 min	Woodford <i>et al.</i> , 2006
		<i>oxa</i> <sub>40Ps</sub> -R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
<i>bla</i> <sub>OXA-50</sub>	789	<i>oxa</i> <sub>50Ps</sub> -F	GAAAGGCACCTTCGTCTCTAC	453	94°C 4 min 94°C 1 min 55°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Crăciunaș <i>et al.</i> , 2012
		<i>oxa</i> <sub>50Ps</sub> -R	CAGAAAGTGGGTCTGTTCCATC			

**Tabla 5. Características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes reguladores de bombas de expulsión de la familia RND. Incluir las referencias**

Gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre de los Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de PCR	Referencia
<i>mexR</i>	443	mexR-1	CGCCATGGCCCATATTGAG	637	94°C 5 min 94°C 1 min 55°C 1 min 35c 68°C 8 min 72°C 8 min	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexR-2	GGCATTGCGCAGTAAGCGG			
<i>nfxB</i>	563	nfxB-1	CGATCCTTCCTATTGCACG	781	94°C 5 min 94°C 1 min 54°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Linares <i>et al.</i> , 2005
		nfxB-2	GCCAAGTGCCAGTATCG			
<i>mexT</i>	1043	mexT-1	CGGTTGCAGCCTCTAGCC	1005	94°C 5 min 94°C 1 min 58°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexT-2	CGATTTTCCCGTTGCGACG			
<i>mexZ</i>	534	mexZ-1	AGCGGCGCGACAGTAGCATA	939	94°C 5 min 94°C 1 min 60°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Linares <i>et al.</i> , 2005
		mexZ-2	CCGAGGACCAGCGCAGGC			

**Tabla 6. Características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *oprD*.**

Gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre de los Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de PCR	Referencia
<i>oprD</i>	1332	oprD-F Ps	TGCTGCTCCGCAACTACTATTTTC	751	94°C 5 min 94°C 1 min 55°C 1 min 35c 68°C 8 min 72°C 8 min	Naenna <i>et al.</i> , 2010
		oprD-R Ps	GTAGGCCAAGGTGAAAGTGTG			
<i>oprDlong</i>	1332	oprDlong-F	CGCCGACAAGAAGAACTAGC	1412	94°C 5 min 94°C 1 min 55°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007
		oprDlong-R	GTCGATTACAGGATCGACAG			
<i>oprDlong2</i>	1332	oprDlong2-F	CTACGCAGATGCGACATGC	1586	94°C 5 min 94°C 1 min 64°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	Wolter <i>et al.</i> , 2004
		oprDlong2-R	CCTTTATAGGCGCGTTGCC			
<i>oprD*</i>	1332	oprDlong-F	CGCCGACAAGAAGAACTAGC	958	94°C 5 min 94°C 1 min 55°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	En este estudio
		oprD-R Ps	GTAGGCCAAGGTGAAAGTGTG			
<i>oprD*</i>	1332	oprD-F Ps	TGCTGCTCCGCAACTACTATTTTC	1207	94°C 5 min 94°C 1 min 55°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min	En este estudio
		oprDlong-R	GTCGATTACAGGATCGACAG			

**\* Combinaciones de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación y secuenciación de algunos genes.**

## **6.7 Determinación de la expresión de la proteína OprD**

### **6.7.1 Extracción de proteínas**

A partir de un cultivo masivo realizado previamente en una placa de agar BHI al 3% (16 a 18 horas a 37°C), se cosechó todo el inóculo y se colocó en un eppendorf con 1 mL de EDTA al 0.01M, se homogenizó completamente y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, esto con el objetivo de separar el exopolisacárido del paquete celular. Con ayuda de una micropipeta, se quitó el exopolisacárido y fue desechado, se lavaron 2 veces con SSI, se homogenizó y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Se descartó completamente el sobrenadante y se agregaron 500 µL de solución RIPA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA compuesto por: 150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) y 5 µL de inhibidores de proteasas (10X). Se dejó en refrigeración toda la noche.

Al siguiente día, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se colocó en un eppendorf estéril. Se agregó 500 µL de acetona fría para precipitar a las proteínas y se dejó a refrigeración toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el eppendorf a temperatura ambiente, con el objetivo de que se evaporara la acetona. Finalmente, se hidrató con 50 µL de RIPA caliente y se guardó en refrigeración hasta su uso.

### **6.7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS)**

Para la preparación de las muestras, primeramente, fueron ajustadas a 30 µg/µL; se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford, con ayuda de una curva de calibración de albúmina sérica bovina. Se tomó 20 µL del ajuste de la muestra y 20 µL de buffer de corrimiento, se llevó a baño maría por 10 minutos con el fin de desnaturalizar las proteínas. La preparación del gel PAGE-SDS se muestra en la **Tabla 7**.

Se realizó el corrimiento de dos geles PAGE-SDS, uno fue teñido con azul de Coomassie y el otro fue transferido a membrana de nitrocelulosa para ser utilizado en el Western Blot. Estos geles se cargaron en el primer carril con 6  $\mu$ L de marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (10 - 245 kDa), consecutivamente, en cada carril se cargó 10  $\mu$ L de la preparación de la muestra previamente ajustada a 30  $\mu$ g/ $\mu$ L. El corrimiento del gel fue a 80V, una vez que las muestras entraron al gel separador, este voltaje aumentó a 120V.

**Tabla 7. Preparación de gel PAGE-SDS**

<b>Reactivos</b>	<b>Gel separador al 12%</b>	<b>Gel concentrador</b>
Agua	1.35 mL	1.04 mL
Acrilamida 30%	3.0 mL	0.32 mL
Bis-acrilamida 2%	1.22 mL	0.13 mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.86 mL	-
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	-	500 $\mu$ L
Persulfato de amonio	60 $\mu$ L	40 $\mu$ L
TEMED	6 $\mu$ L	3 $\mu$ L

### **6.7.3 Western-Blot**

El gel de PAGE-SDS fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Biorad®) para la detección de la proteína OprD. Previamente, se colocaron en un recipiente la membrana de nitrocelulosa, el gel PAGE-SDS y el papel filtro y se añadió buffer de transferencia (glicina, metanol, TRIS y SDS) frío. Para realizar la transferencia, se utilizó el equipo Trans-blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, Laboratories Inc., Hercules, CA, USA); primeramente, se colocó el papel filtro, seguido de la membrana de nitrocelulosa, luego el gel PAGE-SDS y finalmente un segundo papel filtro, todo humedecido en el buffer de transferencia.

Se presionó ligeramente para eliminar burbujas y se llevó a cabo la transferencia a 15 V por 35 minutos.

Una vez realizada la transferencia, la membrana fue bloqueada con leche sin grasa al 5% y se dejó en refrigeración toda la noche. Al siguiente día, se procedió a lavar 3 veces la membrana con PBS-tween al 0.5% colocándose en agitación suave por 10 minutos. Después, se agregó 20 mL de anticuerpo policlonal anti-OprD hecho en conejo, a una dilución 1:10000. Se dejó en refrigeración toda la noche.

Al siguiente día, se realizaron 3 lavados a la membrana con PBS-tween al 0.5%. Enseguida, se agregó un segundo anticuerpo IgG de cabra anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina, a una dilución 1:5000 y se colocó en agitación suave durante 1 hora. Al finalizar, se lavó nuevamente 3 veces la membrana con PBS-tween al 0.5%.

Finalmente, se agregó 2 mL del reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/p-nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT al 98%) (Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA) para revelar a la membrana. La muestra de PAO1 y la proteína recombinante OprD (obtenida en el LMHC-CICM) fueron utilizadas como controles positivos.

### **6.8 Determinación de la participación de bombas de expulsión en presencia de un inhibidor de bombas de expulsión**

Para determinar la participación de bombas de expulsión de la familia RND en la resistencia a los antibióticos meropenem e imipenem, se utilizó el inhibidor de bombas de expulsión PA $\beta$ N (L-phenylalanine-arginine- $\beta$ -naphthylamide) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 25 mg/L por placa. Primeramente, se verificó que el inhibidor no fuera tóxico para las cepas; para esto, estas cepas se sembraron en ausencia y presencia de PA $\beta$ N. Después se realizó la CMI de meropenem e imipenem (previamente descrita), en ausencia y presencia de PA $\beta$ N a 25 mg/L. La cepa PAO1 se utilizó como control negativo y la cepa PE21 como positivo. Para interpretar los resultados, se consideró la participación de las

bombas de expulsión cuando se observó que la CMI disminuía 2 o más veces en presencia de PAβN (Kumita *et al.*, 2009).

### **6.9 Extracción de alginato**

Se inoculó a la cepa problema masivamente en placas de agar MH, sin antibiótico y con antibiótico a diferentes concentraciones, con base a la CMI que mostró la cepa. Fueron incubadas 24 horas a 37°C y se cosecharon en un tubo eppendorf con 1 mL de EDTA 0.01M, con el fin de separar el exopolisacárido del paquete celular. Se homogenizó completamente por vortex y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Con ayuda de una pipeta, el exopolisacárido fue tomado y colocado en un tubo falcon de 15 mL. Se realizaron 3 lavados más con EDTA 0.01M al tubo eppendorf con el objetivo de obtener todo el exopolisacárido de la cepa.

Se adicionaron 3 volúmenes de alcohol isopropílico al tubo falcon con el exopolisacárido, se homogenizó completamente por vortex y se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se descartó y se dejó secar el tubo falcon por 3 días. La pastilla obtenida fue guardada a temperatura ambiente hasta su uso, mientras que el tubo eppendorf con el paquete celular se conservó a -20°C.

### **6.10 Cuantificación de alginato**

La cuantificación de alginato se realizó mediante la reacción de carbazol (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). La pastilla obtenida en la extracción de alginato (muestra problema) fue hidratada con 10 mL de agua inyectable estéril PISA. Se prepararon 200 mL de solución de ácido sulfúrico-boratos: añadiendo 195 mL de ácido sulfúrico y 5 mL de una solución de boratos 8.8M. Se depositaron 3 mL de la solución en tubos de vidrio, a su vez se agregaron 350 µL de muestra problema y 100 µL de carbazol (0.1%). Paralelamente, se corrió una curva de alginato como se muestra en la **Tabla 8**. Los tubos se agitaron con cuidado en el vortex y después se colocaron a baño maría a 50°C por 30 minutos, donde la

solución cambió a un color rosa. Se procedió a la lectura en espectrofotómetro a 530 nm. La producción total de alginato fue expresada en mg de alginato/ mg de proteína.

**Tabla 8. Preparación de la curva de alginato**

Tubo	$\mu\text{L}$ de solución alginato	$\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O	Concentración mg/mL
1	350	0	1
2	280	70	0.8
3	210	140	0.6
4	140	210	0.4
5	70	280	0.2
6	35	315	0.1
7	17.5	332.5	0.05

### 6.11 Cuantificación de proteínas por Bradford

La cuantificación de proteínas fue realizada por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) en placas de poliestireno de 96 pocillos. Los paquetes celulares obtenidos se lavaron con MgSO<sub>4</sub> 10mM y fueron resuspendidos en 1 mL de la misma solución. En el pocillo se añadieron 155  $\mu\text{L}$  de agua estéril, 5  $\mu\text{L}$  de muestra y 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford. Paralelamente se corrió una curva de albúmina sérica bovina como se muestra en la **Tabla 9**. La lectura fue realizada con ayuda del microlector de placas de Elisa (Thermo Scientific Multiskan EX) a una absorbancia de 595nm.

**Tabla 9. Preparación de la curva de albúmina**

Pocillo	$\mu\text{L}$ de solución albúmina	$\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O	$\mu\text{L}$ de Bradford	Concentración
Blanco	0 $\mu\text{L}$	160	40	0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	0 $\mu\text{L}$	160	40	0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2	5 $\mu\text{L}$	155	40	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
3	10 $\mu\text{L}$	150	40	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
4	20 $\mu\text{L}$	140	40	2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
5	30 $\mu\text{L}$	130	40	3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
6	40 $\mu\text{L}$	120	40	4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
7	50 $\mu\text{L}$	110	40	5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
8	60 $\mu\text{L}$	100	40	6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

### 6.12 Cuantificación de *biofilm* por el método de cristal violeta

Este método fue realizado de acuerdo con Peeters *et al.*, 2008. A partir de un cultivo puro en agar MH con 24 horas de crecimiento, se tomó una colonia y se inoculó en tubos con 3 mL de caldo Mueller-Hinton; un tubo sin antibiótico y el resto con diferentes concentraciones de meropenem, según la CMI que la cepa mostró y fueron incubados durante 24 horas a 37°C .

Con el fin de estandarizar el inóculo presente en cada tubo, se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Se tomó 1 mL del crecimiento en el caldo MH y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Se descartó sobrenadante y se lavó el paquete celular con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10mM, se homogenizó en vortex y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos. El paquete celular obtenido se resuspendió en 1 mL de la misma solución, fue homogenizado y se realizó la cuantificación de proteínas con el fin de estandarizar el inóculo presente en cada tubo. Una vez estandarizados los inóculos, se realizó una dilución 1:100 y se procedió a distribuir 200  $\mu\text{L}$  en los pocillos de placas poliestireno de 96 pocillos; para cada cepa se realizaron 2 series (una para

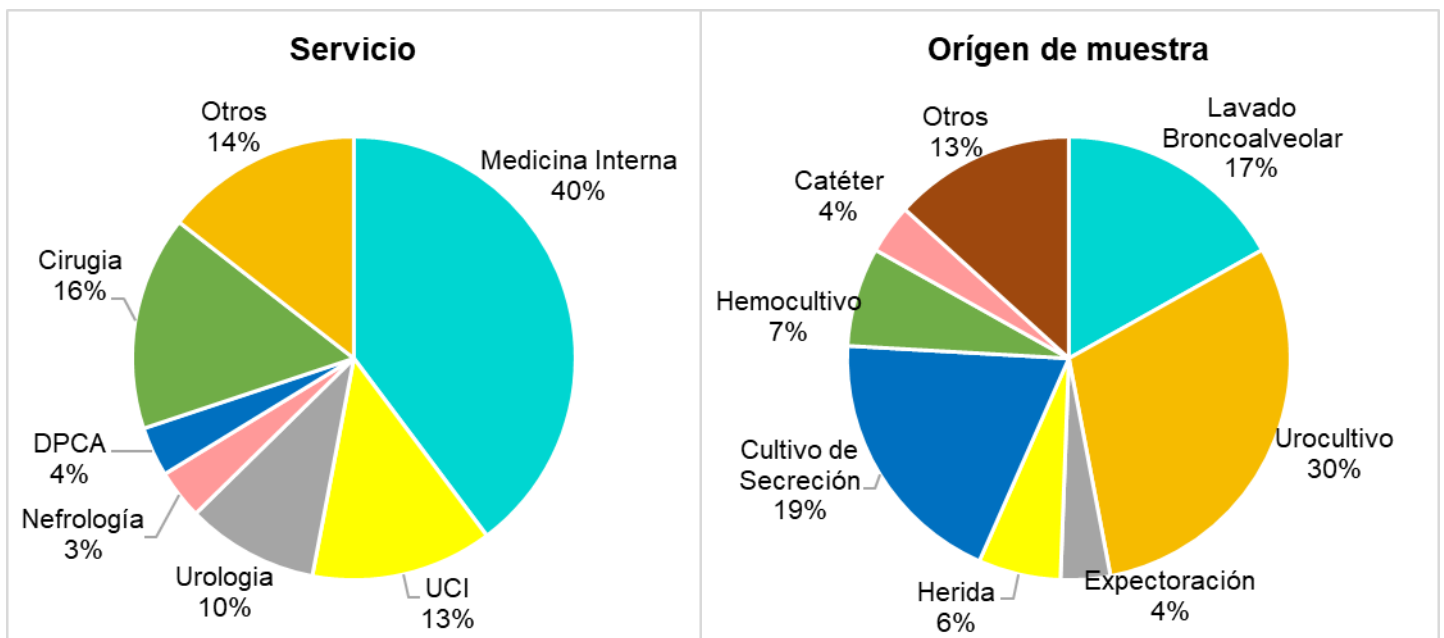
crecimiento total del cultivo y otra para la cuantificación de *biofilm*). Cada serie se realizó por quintuplicado. Se incubó por 24 horas a 37°C.

En una serie se determinó el crecimiento total del cultivo. Con ayuda de una micropipeta, se tomó el contenido del pocillo y se colocó en un tubo eppendorf. Se lavó el pocillo con 200 µL de MgSO<sub>4</sub> 10mM y se agregó al tubo eppendorf correspondiente, después se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos y se descartó sobrenadante. El paquete celular fue lavado nuevamente con 200 µL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos, se resuspendió en 200 µL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se procedió a la cuantificación de proteínas por Bradford.

La otra placa fue utilizada para la cuantificación de *biofilm*, este fue cuantificado de dos formas; *biofilm* aéreo y *biofilm* estático. Para el *biofilm* aéreo, se tomó con ayuda de una micropipeta la capa superior del cultivo, donde se observó una superficie viscosa y se separó en un pocillo nuevo. Para el *biofilm* estático, se retiró con cuidado el cultivo (sin tocar las paredes ni el fondo del pocillo). Después, se realizó un lavado con 200 µL de PBS 1X cada pocillo. Posteriormente, se agregaron 200 µL de metanol, con el fin de fijar el *biofilm* y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el metanol y la placa se dejó secando por 10 minutos. Se añadieron 200 µL de cristal violeta al 10% y se dejó incubar a temperatura ambiente por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se descartó el cristal violeta y se realizaron de 2 a 3 lavados con agua tridestilada, para descartar el exceso de cristal violeta. Finalmente, se añadieron 200 µL de ácido acético 66% a cada pocillo y se dejó incubando con tapa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se procedió a la lectura de la densidad óptica a 600nm en el microlector de placas Elisa (Thermo Scientific Multiskan EX). La cuantificación del *biofilm* se calcula dividiendo las lecturas obtenidas de la densidad óptica entre mg totales de proteína.

## 7. RESULTADOS

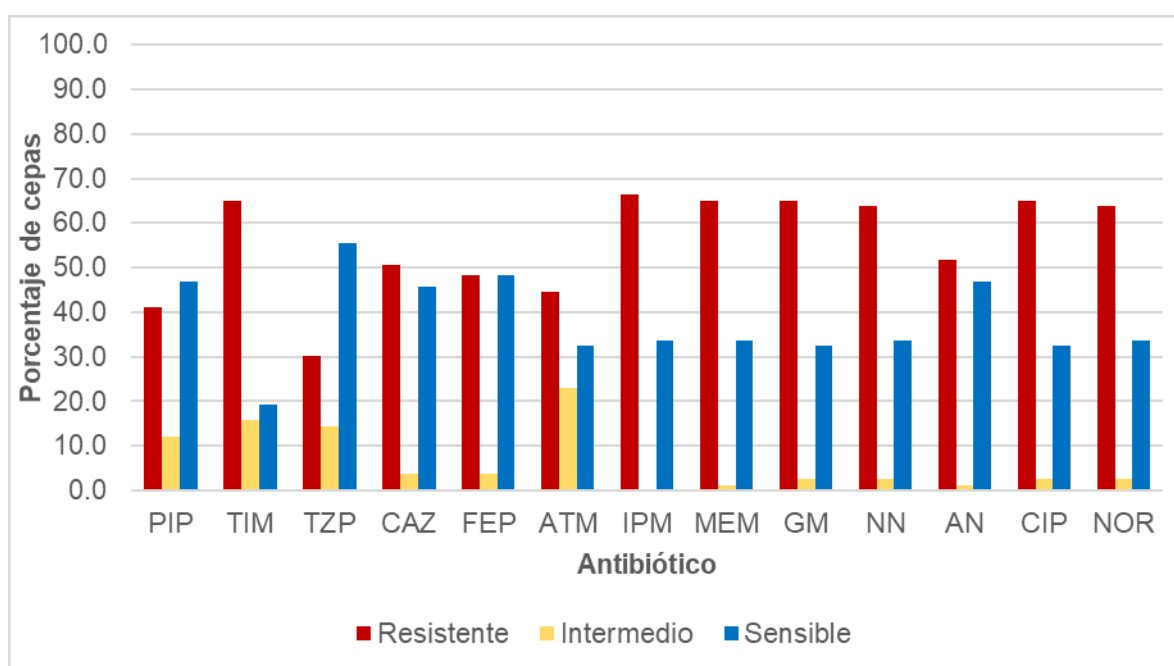
Se trabajaron 83 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, obtenidas en el periodo del 16 de junio 2013 a 21 de marzo 2017. Las cepas fueron recolectadas de distintas áreas hospitalarias: 40% de medicina interna, 16% de cirugía, 13% de la unidad de cuidados intensivos (UCI), 10% de urología, 4% de diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA), 3% de nefrología y otros 14%. Estos aislados fueron recuperados de distintos sitios anatómicos: 30% urocultivo, 19% cultivo de secreción, 17% lavado broncoalveolar, 7% hemocultivo, 6% heridas, 4% catéter, 4% expectoración y otros 13% (**Figura 6**).



**Figura 6.** Distribución de las 83 cepas en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. A). Área hospitalaria. B) Sitio anatómico de aislamiento de las cepas.

## Perfil fenotípico de resistencia

De 83 cepas de *P. aeruginosa*, 55 (66.2%) fueron multidrogoresistentes (MDR) y resistentes a carbapenémicos (RC), de las cuales: 41% fue resistente a piperacilina, 65.1% a ticarcilina/clavulanato, 30.1% a piperacilina/tazobactam, 50.6% a ceftazidime, 48.2% a cefepime, 44.6% a azitromicina, 65.1% a gentamicina, 63.9% a tobramicina, 51.8% a amikacina, 65.1% a ciprofloxacina, 63.9% a norfloxacino, 65.1% para meropenem y 66.3% para imipenem (**Figura 7**).



**Figura 7.** Perfil de resistencia de 83 cepas de *P. aeruginosa*. Rojo: resistente, amarillo: intermedio y azul: sensible. PIP: Piperacilina, TIM: Ticarcilina/Clavulanato, TZP: Piperacilina/Tazobactam, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cepefime, ATM: Aztreonam, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, GM: Gentamicina, NN: Tobramicina, AN: Amikacina, CIP: Ciprofloxacina, NOR: Norfloxacina.

## Detección de genes de resistencia para carbapenémicos

Se seleccionaron 54 cepas de *P. aeruginosa* por ser multidrogoresistentes (MDR) y resistentes a ambos carbapenémicos (RC). Se realizó la detección de genes de resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos, dando como resultado: 10 cepas portadoras de *bla*<sub>IMP</sub>, 36 cepas *bla*<sub>GES</sub> y 37 cepas *bla*<sub>OXA-2</sub> (Figura 8 y Figura 9) (Anexo 2). Las cepas fueron negativas a *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>OXA-40</sub>.

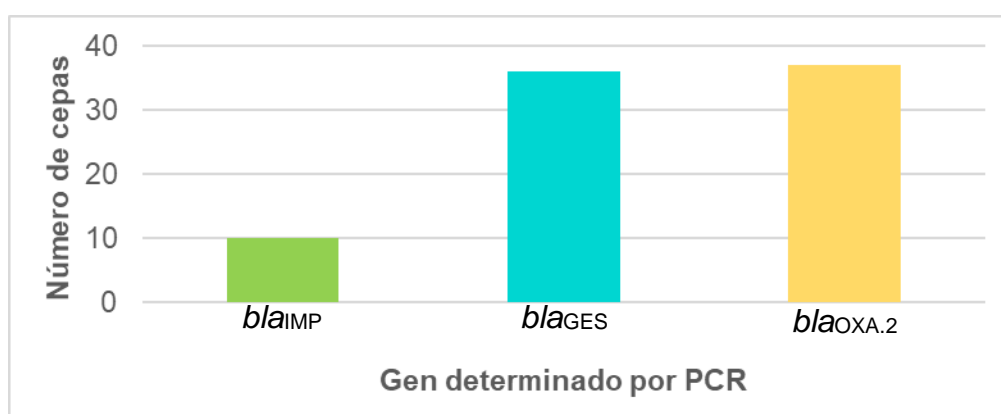


Figura 8. Determinación de genes de β-lactamasas en cepas de *P. aeruginosa* MDR-RC (n=54).

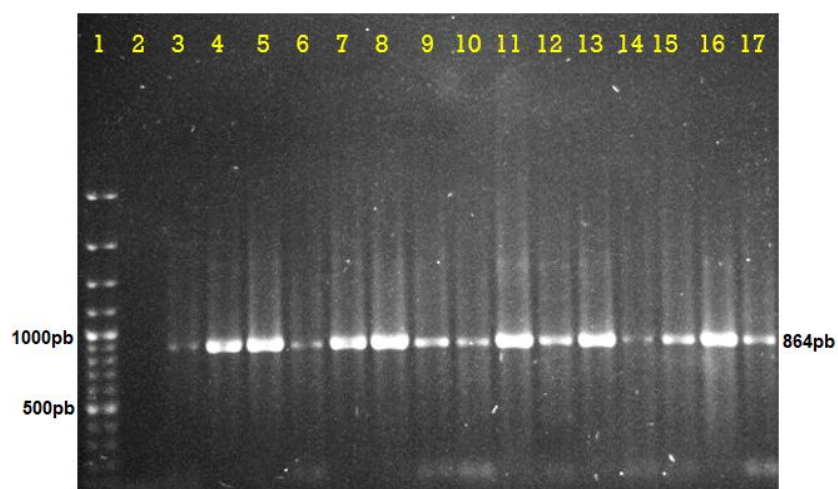
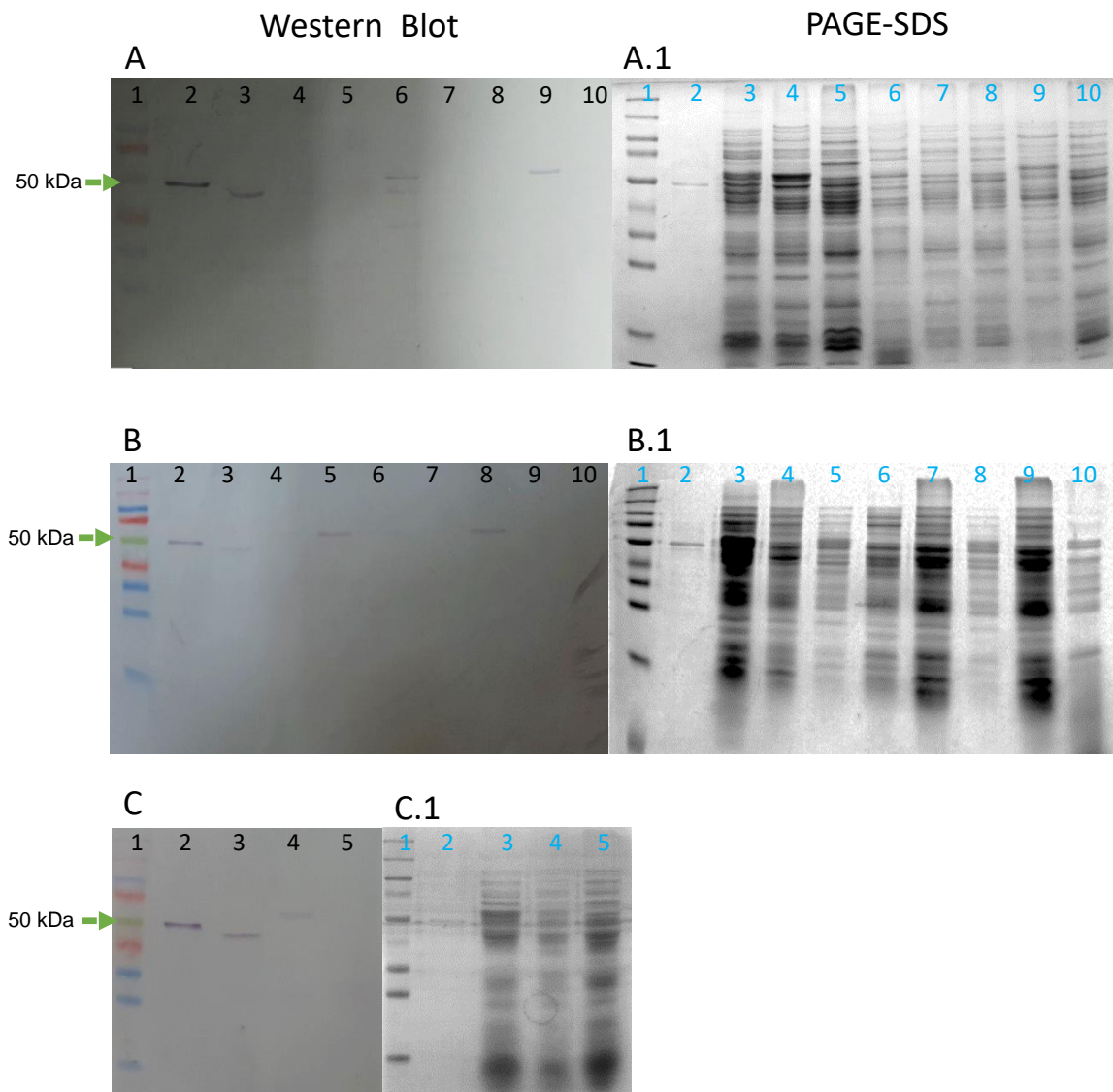


Figura 9. Determinación de *bla*<sub>GES</sub>. Gel de electroforesis representativo con productos de PCR para la *bla*<sub>GES</sub>. 1. Marcador GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). 2. Blanco. 3. Control positivo PE21 portadora de *bla*<sub>GES-32</sub>. 4. PE168. 5. PE174. 6. PE179. 7. PE187. 8. PE189. 9. PE194. 10. PE195. 11. PE196. 12. PE198. 13. PE204. 14. PE205. 15. PE208. 16. PE213. 17. PE217.

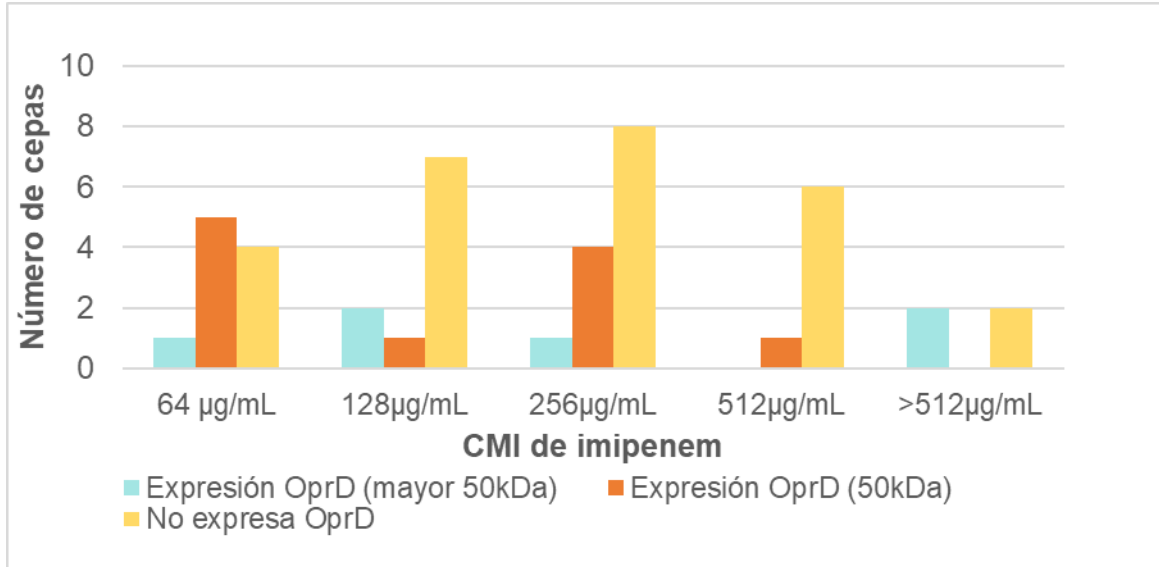
## Determinación de la expresión de OprD

Se eliminaron las 10 cepas que portaron *bla<sub>IMP</sub>*, debido a que el objetivo de este estudio fue la investigación de otros mecanismos de resistencia hacia carbapenémicos en cepas no portadoras de carbapenemasas, quedando 44 cepas de *P. aeruginosa* no portadoras de carbapenemasas.

A las 44 cepas de *P. aeruginosa* se les realizó la detección de la expresión de la proteína OprD mediante Western Blot. En 17 cepas se expresó la proteína OprD observando bandas de diferentes tamaños: en 6 cepas se observó una banda en un peso aproximado de 70 kDa, mientras que en 11 cepas se observó una banda de un peso de 50 kDa, el esperado para la proteína OprD, y el que coincide con los controles usados. En 27 cepas no hubo expresión de la proteína OprD (no aparecen bandas del peso esperado) (**Figura 10**). En la **Figura 11** observamos el número de cepas que no expresaron o expresaron la proteína con diferente tamaño de banda con respecto a la CMI para imipenem.



**Figura 10. Determinación de la expresión de la OprD. Geles representativos de la expresión de la proteína OprD por PAGE-SDS y Western-blot de las cepas de *P. aeruginosa*.** A) inmunodetección de la proteína OprD Carril 1. Marcador de peso molecular (Spectra™), Carril 2. Proteína OprD recombinante (50kDa), Carril 3. OprD de PAO1 (48 kDa), Carril 4. PE101, Carril 5. PE127, Carril 6. PE143, Carril 7. PE147, Carril 8. PE149, Carril 9. PE154, Carril 10. PE159. A.1) Gel espejo PAGE-SDS. B) Carril 1. Marcador (Spectra™), Carril 2. Proteína OprD recombinante, Carril 3. PAO1, Carril 4. PE174, Carril 5. PE179, Carril 6. PE187, Carril 7. PE189, Carril 8. PE195, Carril 9. PE196, Carril 10. PE198. B.1) Gel PAGE-SDS. C) Carril 1. Marcador (Spectra™), Carril 2. Proteína OprD recombinante, Carril 3. PAO1, Carril 4. PE19, Carril 5. PE160. C.1) Gel espejo PAGE-SDS. El experimento se realizó por duplicado.



**Figura 11.** Expresión de la proteína OprD (n=44). La determinación de la expresión de OprD se realizó por PAGE-SDS y Western Blot. Los resultados se representan en relación con los valores de CMI que mostraron las cepas para imipenem.

### Determinación de mutaciones en el gen *oprD*

Con base a los resultados obtenidos de la detección de la proteína OprD por Western Blot, se escogieron 4 cepas de *P. aeruginosa* para la secuenciación del gen *oprD*, con el fin de buscar mutaciones que afectaran a los loops L2 y L3 y que contribuyeran en la resistencia a imipenem. De las 4 cepas, en 3 (PE19, PE30 y PE213) se expresó la proteína OprD mientras que en 1 (PE47) estuvo ausente; la secuencia parcial del gen *oprD* de las 4 cepas fue mandado a secuenciar por la metodología SANGER al laboratorio LANGEBIO (Irapuato, Guanajuato). Una vez obtenidas las secuencias, estas se analizaron con el algoritmo de Blast y se obtuvo que todas correspondían al gen *oprD*. Posteriormente, fueron alineadas con secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína OprD de PAO1 (NC\_002516.29), la cual fue utilizada como cepa de referencia.

Al amplificar el gen *oprD* de las cepas PE19 y PE213 se logró distinguir la presencia de dos bandas de distintos tamaños: una similar al peso del control *oprD* de PAO1 (958pb) y otra con un peso de 2700pb aproximadamente (**Figura 12A y B**). En ambos casos se mandó a secuenciar las bandas de peso de 2700pb. En el caso de las cepas PE30 y PE47 la amplificación del gen *oprD* mostró una banda de un peso de 958pb, el cual coincidía con el gen de la cepa control PAO1.

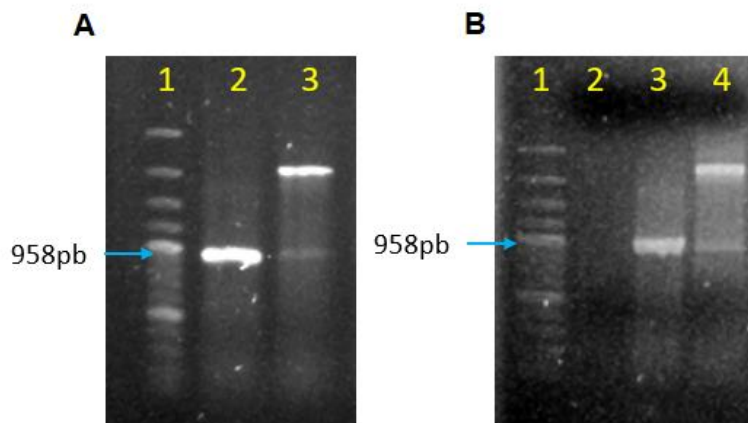
La cepa PE19 expresó a la proteína OprD (mayor a 50kDa) y al realizar la amplificación del gen *oprD* se encontró la presencia de dos bandas, una del peso esperado para el gen *oprD* y una de mayor peso (2700pb aproximadamente), en esta última, la secuencia mostró la presencia de la secuencia de inserción IS1394 en la posición nucleotídica 430 (**Anexo 3 y 4**). En el caso de la cepa PE213 expresó a la proteína OprD (50 kDa) y, al igual que la PE19, presentó 2 bandas y la secuenciación de la banda de 2700pb mostró la secuencia de inserción ISPa1328 en el nucleótido 131 (**Anexo 8 y 9**). La cepa PE30 expresó a la proteína OprD (50 kDa) y se encontraron diversos cambios de aminoácidos, sin embargo, ninguna de ellas afectando a los loops L2 y L3 (**Anexo 5**). La cepa PE47 no expresó a OprD y en el gen se encontró a la secuencia de inserción ISPa61 en el nucleótido 833 (**Anexo 6 y 7**).

En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos de la secuenciación parcial del gen *oprD* y la expresión de la porina OprD por Western Blot y la secuenciación parcial del gen *oprD*.

**Tabla 10. Resultados de la secuenciación parcial del gen *oprD***

Número de cepa	Detección de la proteína OprD	Análisis de la secuenciación parcial del gen <i>oprD</i>
PE19	Expresión de OprD (mayor a 50kDa)	IS1394
PE30	Expresión de OprD (50 kDa)	D43N, S57E, S59R, I210A, E202Q
PE47	No expresó	ISPa61
PE213	Expresión de OprD (50 kDa)	ISPa1328

A: alanina, D: ácido aspártico, E: ácido glutámico, I: isoleucina, N: asparagina, Q: glutamina, R: arginina, S: serina,



**Figura 12. A) Gel de electroforesis con productos de PCR para *oprD*, utilizando los oligonucleótidos OprDlongF y OprDR. 1. Marcador GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 2. Control positivo PAO1, 3. PE19 B) Gel de electroforesis con productos de PCR para *oprD*, utilizando los oligonucleótidos OprDlongF y OprDR. 1. Marcador GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 2. Blanco, 3. Control positivo PAO1, 4. PE213. Se utilizaron los oligonucleótidos oprDlong-F y oprD-R Ps para la amplificación de ambos casos.**

## Participación de las bombas de expulsión mediante la presencia de un inhibidor de bombas de expulsión

En las 44 cepas de *P. aeruginosa* se determinó a CMI para meropenem e imipenem en presencia y ausencia del inhibidor de bombas de expulsión PA $\beta$ N, con el objetivo de observar la participación de las bombas de expulsión como mecanismo de resistencia hacia estos antibióticos. Previo al experimento con la CMI, se observó que PA $\beta$ N inhibió el crecimiento de la cepa PE204 por lo que, en esta cepa, no se pudo determinar la participación de bombas de expulsión para la resistencia carbapenémicos.

Para el caso de meropenem en ausencia y presencia de PA $\beta$ N, se observó la influencia del inhibidor en 31 cepas: en 9 cepas la CMI disminuyó 2 veces, en 7 cepas 4 veces, en 5 cepas 8 veces, en 1 cepa 16 veces, en 5 cepas 32 veces, en 3 cepas 64 veces y en 1 cepa 128 veces. No hubo disminución en la CMI de 12 cepas, las cuales mostraban una CMI de 8 a >512  $\mu$ g/mL.

Por otro lado, para imipenem en ausencia y presencia de PA $\beta$ N, se observó nuevamente la influencia del inhibidor en 21 cepas, de las cuales: en 12 cepas disminuyó 2 veces, en 6 cepas 4 veces y en 3 cepas 8 veces. En 22 cepas no se mostró una disminución de la CMI en presencia del inhibidor, las cuales mostraron una CMI de 64 a >512  $\mu$ g/mL. La cepa PE90 en presencia del inhibidor aumentó la CMI 4 veces.

Puesto que la cepa PE19 mostraba una CMI >512  $\mu$ g/mL para imipenem y disminuyó a 512  $\mu$ g/mL en presencia de PA $\beta$ N, se volvió a realizar el experimento a mayores concentraciones de imipenem: a 1024  $\mu$ g/mL y 2048  $\mu$ g/mL, en ausencia y presencia de PA $\beta$ N. La cepa mostró una CMI de 2048  $\mu$ g/mL, la cual disminuyó 4 veces en presencia de PA $\beta$ N.

Fue de interés conocer las bombas de expulsión de la familia RND presentes en las cepas, por lo que se amplificaron los genes reguladores de estos sistemas: *mexR*, *nfxB*, *mexT* y *mexZ*. Las 44 cepas presentaron el gen *mexR*, el cual es regulador del sistema MexAB; 8 cepas el gen *nfxB*, regulador del sistema MexCD;

23 para *mexT*, regulador de MexEF y 19 *mexZ*, regulador de MexXY (**Figura 13**).

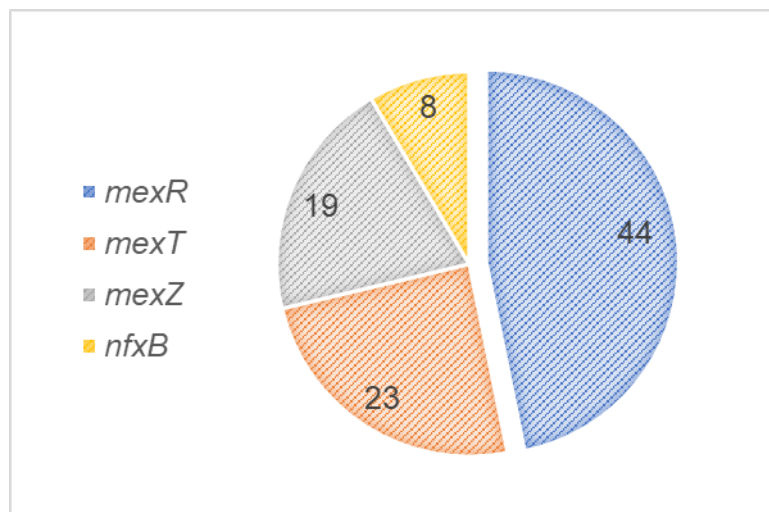
En la **Tabla 11** se muestra un resumen de estos resultados.

**Tabla 11. Detección de la proteína OprD, amplificación de genes reguladores de bombas de expulsión y la participación de bombas de expulsión en cepas de *P. aeruginosa* (n=44)**

Número de cepa	Detección de la proteína OprD	Reguladores de bomba de expulsión	CMI (µg/mL)			
			MEM (MEM+PAβN)	Disminución	IPM (IPM+PAβN)	Disminución
PE18	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, mexZ</i>	8 (8)	0	128 (32)	4 veces
PE19	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexZ</i>	128 (128)	0	2048 (512)	4 veces
PE24	No expresó	<i>mexR</i>	32 (32)	0	128 (128)	0
PE26	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	8 (4)	2 veces	128 (64)	2 veces
PE28	No expresó	<i>mexR</i>	32 (32)	0	64 (32)	2 veces
PE29	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexT</i>	64 (64)	0	64 (32)	2 veces
PE30	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (32)	0	256 (256)	0
PE47	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	256 (128)	2 veces	128 (32)	4 veces
PE53	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	128 (32)	4 veces	256 (256)	0
PE55	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	256 (128)	2 veces	128 (32)	4 veces
PE58	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	256 (128)	2 veces	128 (32)	4 veces
PE60	No expresó	<i>mexR</i>	256 (128)	2 veces	256 (128)	2 veces
PE65	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (16)	2 veces	64 (64)	0
PE67	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (2)	16 veces	64 (64)	0
PE68	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, nfxB</i>	128 (16)	8 veces	128 (128)	0
PE76	No expresó	<i>mexR</i>	32 (16)	2 veces	64 (64)	0
PE86	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	128 (32)	4 veces	256 (256)	0
PE87	No expresó	<i>mexR, nfxB, mexT, mexZ</i>	64 (32)	2 veces	256 (128)	2 veces

PE90	No expresó	<i>mexR, nfxB, mexT</i>	32 (32)	0	64 (256)	Aumenta 4 veces
PE93	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexT</i>	>512 (>512)	0	>512 (>512)	0
PE96	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR</i>	128 (128)	0	256 (256)	0
PE101	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (8)	4 veces	128 (64)	2 veces
PE127	No expresó	<i>mexR</i>	512 (8)	64 veces	512 (512)	0
PE143	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexT, mexZ</i>	128 (32)	4 veces	64 (64)	0
PE145	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (8)	4 veces	512 (512)	0
PE147	No expresó	<i>mexR</i>	256 (8)	32 veces	>512 (>512)	0
PE149	No expresó	<i>mexR</i>	256 (8)	32 veces	512 (512)	0
PE154	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT</i>	32 (8)	4 veces	256 (128)	2 veces
PE159	No expresó	<i>mexR</i>	256 (4)	64 veces	256 (32)	8 veces
PE160	No expresó	<i>mexR</i>	512 (4)	128 veces	512 (512)	0
PE168	No expresó	<i>mexR</i>	256 (32)	8 veces	512 (256)	2 veces
PE174	No expresó	<i>mexR</i>	256 (8)	32 veces	>512 (>512)	0
PE179	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR</i>	64 (8)	8 veces	64 (32)	2 veces
PE187	No expresó	<i>mexR</i>	256 (32)	8 veces	256 (64)	4 veces
PE189	No expresó	<i>mexR</i>	256 (8)	32 veces	256 (32)	8 veces
PE194	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexT, mexZ</i>	64 (64)	0	64 (64)	0
PE195	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR</i>	64 (8)	8 veces	128 (128)	0
PE196	No expresó	<i>mexR</i>	256 (4)	64 veces	512 (64)	8 veces
PE198	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	128 (32)	4 veces	256 (128)	2 veces
PE204	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT</i>	256	PAβN inhibe crecimiento	256	PAβN inhibe crecimiento
PE205	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT</i>	64 (64)	0	256 (128)	2 veces
PE208	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	16 (16)	0	64 (64)	0
PE213	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR</i>	512 (16)	32 veces	512 (256)	2 veces

PE217	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (16)	2 veces	64 (64)	0
-------	---------------------------	-------------------------	---------	---------	---------	---



**Figura 13.** Genes reguladores de bombas de expulsión de la familia RND (n=44).

Con base a los resultados obtenidos, fueron seleccionadas 10 cepas de *P. aeruginosa* para conocer si además de los mecanismos de resistencia que presentaban algunas de las cepas, también se encontraban involucrados la formación de *biofilm* y la producción de alginato en la resistencia a meropenem. Estas cepas mostraban una CMI de 64 µg/mL a >512 µg/mL para meropenem y de 128 µg/mL a 2048 µg/mL para imipenem: en 6 cepas no se expresó la proteína OprD y en 4 cepas se detectó la expresión de esta proteína. De las 6 cepas que no expresaron a la proteína OprD, en 4 se observó la participación de bombas de expulsión para meropenem e imipenem, mientras que en 2 no participaron. De las 4 cepas que expresaron la proteína OprD, en 1 cepa se observó la participación de bombas de expulsión para ambos antibióticos, mientras que en 2 cepas se observó solo para imipenem y en 1 cepa solo para meropenem (**Tabla 12**). En el

**Anexo 2** se muestran las características de las 44 cepas de *P. aeruginosa* estudiadas.

### **Cuantificación de *biofilm* en ausencia y presencia de meropenem a diferentes concentraciones.**

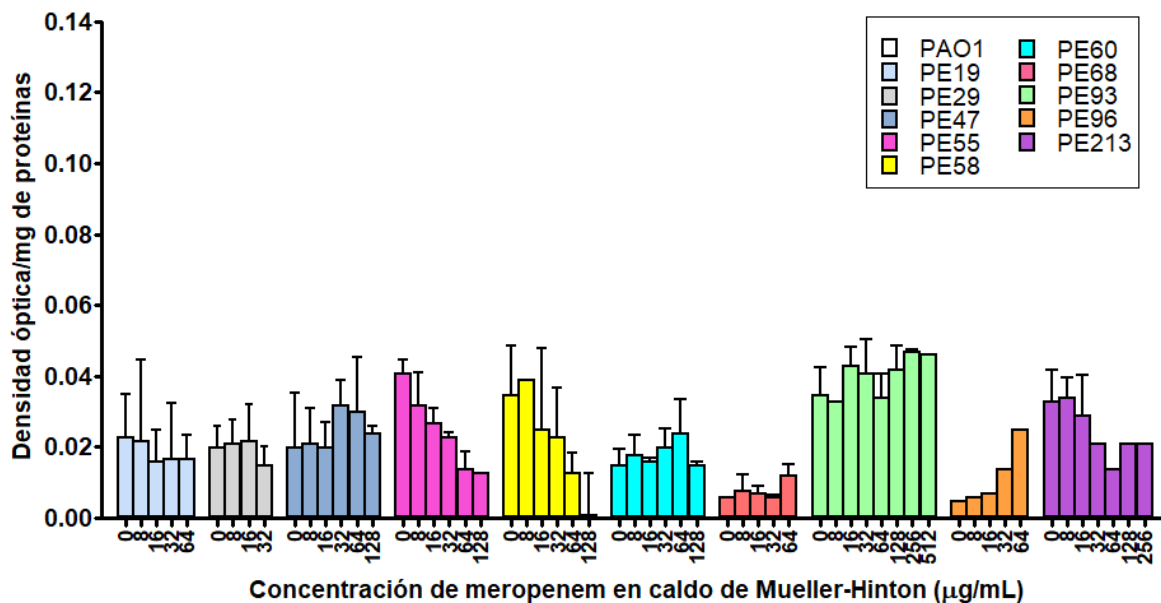
A 10 cepas de *P. aeruginosa* se les realizó la cuantificación de *biofilm* en presencia de distintas concentraciones de meropenem, las cuales fueron elegidas con base a la CMI que mostraron; el objetivo fue observar si se daba un cambio en la producción de *biofilm* a distintas concentraciones del antibiótico. Para cada cepa se cuantificó el *biofilm* aéreo y el *biofilm* estático, y al final, se sumaron ambas para obtener el total de *biofilm* formado. Se utilizó a la cepa PAO1 como control comparativo en la formación de *biofilm* estático y *biofilm* total (**Figura 16**).

En la cuantificación del *biofilm* aéreo, las cepas PE47 y PE96 mostraron un aumento en la concentración de 32 µg/mL. En las cepas PE55, PE58 y PE213 se observó una disminución en la formación de *biofilm* en las concentraciones 8 µg/mL, 16 µg/mL y 32 µg/mL respectivamente. El resto de las cepas no mostraron cambios en las concentraciones probadas.

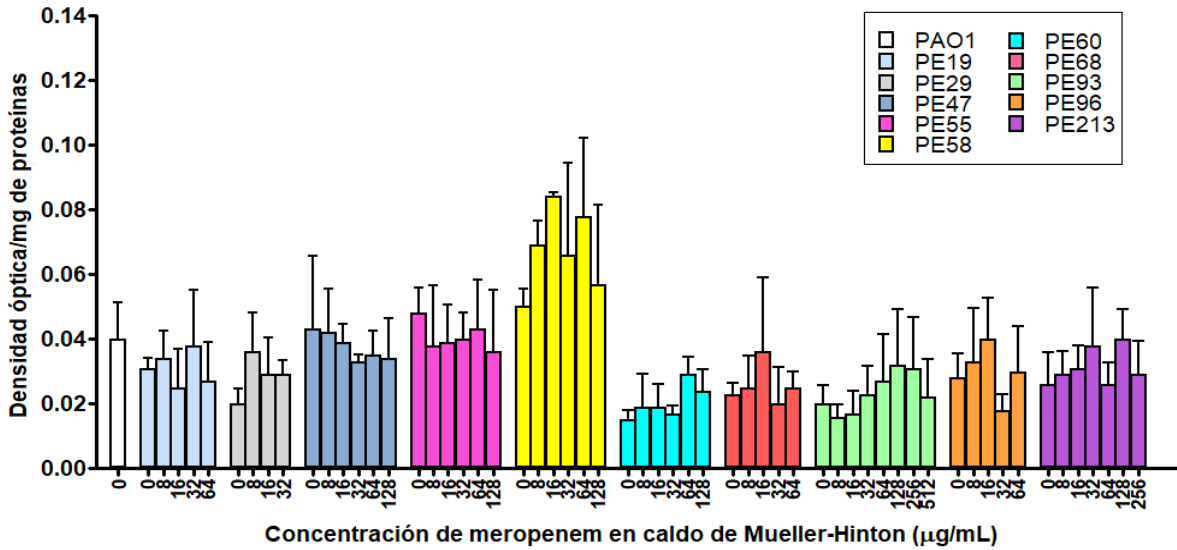
En comparación con los sitios anatómicos de donde las cepas provenían, presentaron una mayor producción de *biofilm* aéreo las cepas PE55, PE58 y PE93 que provenían de lavado broncoalveolar, herida (absceso) y vías urinarias (urocultivo) respectivamente. La cepa PAO1 no presentó formación de *biofilm* aéreo. (**Figura 14**).

Por otra parte, se observó un aumento en la formación de *biofilm* estático en las cepas PE29 y PE58 a la concentración de 8 µg/mL, PE60 a 64 µg/mL, y las cepas PE68 y PE96 a 16 µg/mL. En el resto de las cepas no hubo cambios a las distintas concentraciones de meropenem probadas. La cepa PE96 mostró una disminución en la formación de *biofilm* estático en la concentración de 32 µg/mL. Al comparar la formación de *biofilm* estático de las cepas, la cepa PE58 presentó la mayor producción; esta cepa provenía de una herida (absceso) (**Figura 15**).

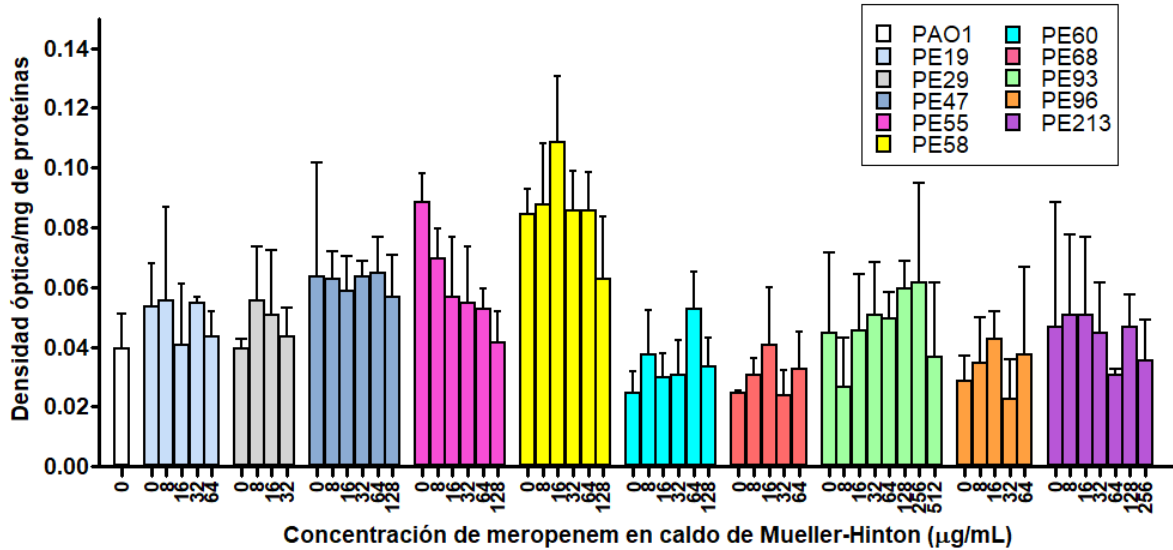
Para obtener el *biofilm* total formado, los valores obtenidos de *biofilm* aéreo y estático se sumaron, y se pudo observar el aumento en la formación de *biofilm* total en las cepas PE29 a la concentración de 8  $\mu\text{g/mL}$ , PE58 y PE68 a 16  $\mu\text{g/mL}$ , y en la cepa PE60 a 64  $\mu\text{g/mL}$ . Se observaron cambios en el *biofilm* total en 2 cepas: la cepa PE93 mostró un aumento a la concentración de 8  $\mu\text{g/mL}$  y disminuyó a 128  $\mu\text{g/mL}$ , y en la cepa PE96 se observó un aumento a la concentración de 16  $\mu\text{g/mL}$  y disminuyó a 32  $\mu\text{g/mL}$ . Por el contrario, en las cepas PE19 y PE213 se observó la disminución del *biofilm* total a la concentración de 16  $\mu\text{g/mL}$  y 64  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. La cepa PE55 mostró una formación de *biofilm* menor comparada con la formada en ausencia del antibiótico. Al comparar la producción de *biofilm* total de las cepas, PE58 presentó la mayor producción, por otro lado, al comparar con el *biofilm* total de PAO1, las cepas mostraron una mayor producción a excepción de las cepas PE60, PE68, PE96 y PE213 (**Figura 16**)



**Figura 14.** Representación gráfica de la cuantificación del *biofilm* aéreo en las 10 cepas de *P. aeruginosa*. Se muestran las diferentes concentraciones de meropenem a las que fue cuantificada la formación de *biofilm* aéreo en cada cepa. PAO1 no mostró formación de *biofilm* aéreo.



**Figura 15.** Representación gráfica de la cuantificación del *biofilm* estático en 10 cepas de *P. aeruginosa*. Se muestran las diferentes concentraciones de meropenem a las que fue cuantificada la formación de *biofilm* estático en cada cepa.

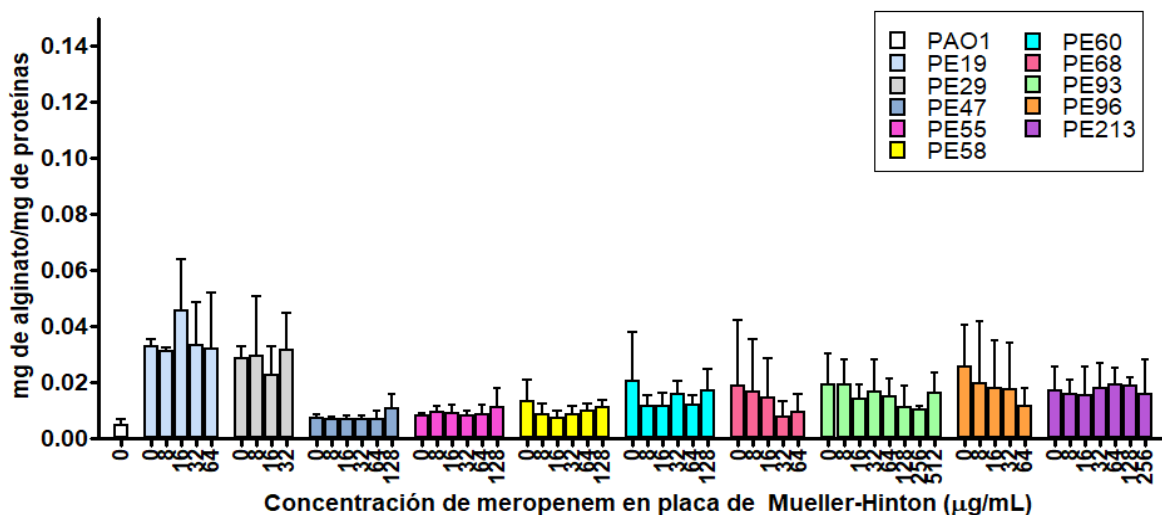


**Figura 16.** Representación gráfica de la cuantificación del *biofilm* total formado (suma de *biofilm* aéreo y estático) en ausencia y presencia de meropenem, a distintas concentraciones del antibiótico (n=10).

## Cuantificación de alginato en ausencia y presencia de meropenem a diferentes concentraciones.

A las 10 cepas de *P. aeruginosa* se les realizó la cuantificación de alginato por el método de carbazol a diferentes concentraciones del antibiótico meropenem, en base a la CMI que mostró cada cepa.

La cepa PE19 mostró un aumento en la producción de alginato a la concentración de 16  $\mu\text{g/mL}$ , por el contrario, el resto de las cepas mostraron una producción homogénea a las diferentes concentraciones de meropenem probadas (**Figura 17**). Al comparar, las cepas mostraron diferencias entre ellas respecto a la producción de este exopolisacárido: las cepas con mayor producción de alginato fueron las cepas PE19 y PE29, las cuales provenían de muestras de hemocultivo y secreción de herida respectivamente.



**Figura 17.** Representación gráfica de la cuantificación de alginato a diferentes concentraciones de meropenem, en base a la CMI que mostró la cepa (n=10).

En la **Tabla 12** se presenta un resumen de los datos obtenidos de las 10 cepas de *P. aeruginosa*, donde se muestran las características de cada una: el origen de la muestra, fenotipo de resistencia, genotipo, expresión de la proteína OprD, participación de bombas de expulsión para meropenem e imipenem y la media de la producción de *biofilm* y de alginato.

**Tabla 12. Datos obtenidos de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* a las que se les cuantificó la formación de *biofilm* y producción de alginato (n=10)**

Número de cepa	Origen de la muestra	Fenotipo de resistencia	Genotipo de resistencia	Detección de proteína OprD	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)		Producción de biopelícula (D.O./mg proteína total)	Producción de alginato (mg alginato/mg proteína total)
					MEM (MEM+ PAβN)	IPM (IPM + PAβN)		
PE47	Lavado broncoalveolar	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	256 (128)	128 (32)	0.062 ± 0.003	0.008 ± 0.001
PE55	Lavado broncoalveolar	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub>	No expresó	256 (128)	128 (32)	0.061 ± 0.016	0.010 ± 0.001
PE58	Herida (absceso)	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	256 (128)	128 (32)	0.087 ± 0.014	0.010 ± 0.002
PE60	Urocultivo	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-20</sub>	No expresó	256 (128)	256 (128)	0.035 ± 0.010	0.015 ± 0.004
PE213	Lavado broncoalveolar	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	512 (16)	512 (256)	0.044 ± 0.008	0.018 ± 0.002
PE68	Tumor cerebral	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor 50kDa)	128 (16)	128 (128)	0.031 ± 0.007	0.014 ± 0.005
PE19	Hemocultivo	TIM, CAZ, FEP, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor 50kDa)	128 (128)	2048 (512)	0.050 ± 0.007	0.035 ± 0.006
PE29	Secreción de herida	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor 50kDa)	64 (64)	64 (32)	0.048 ± 0.007	0.029 ± 0.004
PE96	Catéter venoso central	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor 50kDa)	128 (128)	256 (256)	0.034 ± 0.008	0.019 ± 0.005
PE93	Urocultivo	TIM, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	Ninguna	Expresión OprD (mayor 50kDa)	>512 (>512)	>512 (>512)	0.047 ± 0.008	0.016 ± 0.003

## 8. DISCUSIÓN

En la actualidad, *P. aeruginosa* es considerada una bacteria común dentro el ámbito hospitalario, capaz de causar infecciones a pacientes que se encuentran delicados por su estado de salud. En este estudio se obtuvieron 83 aislados clínicos de *P. aeruginosa* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla; mayoritariamente, las cepas provenían de muestras obtenidas de vías urinarias (30%), cultivo de secreción de heridas (19%) y lavado broncoalveolar (17%), sitios anatómicos donde comúnmente se conoce que infecta esta bacteria (Azam & Khan, 2018). Se trabajaron 54 cepas de *P. aeruginosa* multidrogorresistentes (MDR) y resistente a carbapenémicos (RC), lo cual es importante debido a que estos antibióticos son la última opción terapéutica, y representa un problema de gran importancia para este hospital.

De las 54 cepas MDR-RC, 10 fueron portadoras de *bla*<sub>IMP</sub>, y fueron descartadas del estudio debido a que la resistencia hacia carbapenémicos podría ser atribuída principalmente a la presencia de esta metalo- $\beta$ -lactamasa; sin embargo, 44 cepas no fueron portadoras de carbapenemasas, y fue de interés conocer otros mecanismos de resistencia que pudieran estar involucrados en la resistencia a carbapenémicos. Es común contar con la presencia de carbapenemasas en cepas clínicas de *P. Aeruginosa*; sin embargo, son pocos los estudios donde previamente se ha observado que, al no portar carbapenemasas, influyen otros mecanismos de resistencia hacia carbapenémicos. Se ha reportado la pérdida o modificaciones de la proteína OprD y la sobreexpresión de bombas de expulsión, participando en la resistencia a carbapenémicos (Lee & Koo, 2012; Rojo-Bezarez *et al.*, 2014), pero debido a que cada hospital cuenta con un cuadro de medicamentos específico, lo cual ejerce una presión de selección diferente que puede modificar la presencia o el comportamiento de los mecanismos de resistencia, es de importancia estudiarlos en hospitales mexicanos. De las 44 cepas de *P. aeruginosa* no portadoras de carbapenemasas, 36 cepas portaron otras  $\beta$ -lactamasas como GES que, si bien se han reportado variantes con

actividad de carbapenemasa, la hidrólisis hacia estos antibióticos es casi nula mostrando CMI bajas; por lo que no se le puede atribuir los niveles altos de resistencia a carbapenémicos que presentaron estas cepas, por lo que también fueron incluídas en el estudio (Nicolau & Oliver, 2010).

A las 44 cepas de *P. aeruginosa* no portadoras de carbapenemasas se les realizó la detección de la expresión de la porina OprD mediante Western Blot. En 27 cepas no se detectó la expresión de la proteína, se ha reportado que la pérdida de la expresión de la proteína se debe la presencia de secuencias de inserción como ISPa1328, ISPa133, ISPpu-21, ISPa8 e IS1394 y codones de paro prematuros, las cuales impedían la expresión de la porina OprD (Al-Bayssari *et al.*, 2015; Campana *et al.*, 2016; Hirabayashi *et al.*, 2017; Shariari *et al.*, 2017; López *et al.*, 2018).

Se seleccionó la cepa PE47 representativa de las que no expresaron a la porina OprD y en la secuencia parcial del gen se encontró una secuencia de inserción en el nucleótido 833 la cual tiene 93% de identidad con ISPa61 y pertenece a la familia ISL3, por lo que podría tratarse de una nueva variante de IS. La secuencia de inserción ISPa61 no había sido reportada truncando OprD; sin embargo, Sun *et al.*, 2016, reportaron un plásmido de *P. aeruginosa* conteniendo a esta secuencia de inserción.

En 11 cepas se detectó la expresión de la proteína OprD con un peso aproximado de 50 kDa correspondiente al peso esperado de la proteína, por lo que se seleccionaron 2 cepas representativas de este grupo (PE30 y PE213) para amplificar el gen *oprD*. En la cepa PE30 no se encontraron mutaciones en la secuencia parcial del gen que afectaran a los loops L2 y L3, por lo que se podría inferir que la porina OprD se encuentra funcional y no participaría como mecanismo de resistencia a imipenem (Li *et al.*, 2012). En la segunda cepa, PE213, la amplificación del gen *oprD* mostró dos bandas, de las cuales sólo se mandó a secuenciar la que presentó un mayor tamaño. En la secuencia parcial del gen se encontró a la secuencia de inserción ISPa1328 en la posición nucleotídica 131, truncando al gen *oprD*, previamente reportado por Al-Bayssari *et al.*, 2015.

Cabe mencionar que en esta cepa sí se detectó la expresión de la porina, por lo que podría tratarse de una mezcla de poblaciones de *P. aeruginosa* en el mismo paciente. Previamente fue observado en un estudio anterior, realizado en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad por González *et al.*, 2019, con cepas clínicas de *P. aeruginosa* provenientes del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, en las cuales se detectó la expresión de la porina OprD mediante Western Blot e Inmunofluorescencia indirecta en la cual se uso un anticuerpo de conejo contra OprD y un anticuerpo anti-conejo acoplado a FITC, se observó una mezcla de poblaciones bacterianas en el mismo aislado clínico, donde en unas se observó que expresaban a la porina OprD y en otras no.

Del grupo de las 6 cepas donde se detectó a la porina OprD en un peso aproximado de 70 kDa, se seleccionó a la cepa PE19 cuya amplificación del gen *oprD* mostró dos bandas y se mandó a secuenciar a la banda de mayor tamaño, la cual presentó la inserción de IS1394; debido a que se realizó una secuenciación parcial no se logró observar si esta secuencia de inserción se encontraba completa, sin embargo, esta inserción posiblemente no está impidiendo la expresión de la porina en esta cepa, lo que explicaría la banda detectada en Western Blot. Estos resultados son opuestos a los encontrados por López *et al.*, 2018, donde la secuencia de inserción IS1394 sí afecto la expresión de la porina y no fue detectada por Western Blot. La detección de la porina a un tamaño mayor a 50 kDa no había sido previamente reportado, por lo que es importante llevar acabo la detección de la porina por anticuerpos y no solo determinarla por corrimiento electroforético PAGE-SDS, además de complementar el estudio de la porina con la amplificación y secuenciación del gen *oprD*, por lo que seria importante continuar con el estudio.

Livermoore en 2001 menciona que cuando no se expresa la porina OprD o presenta modificaciones en los loops L2 y L3, la CMI para imipenem es de 8 µg/mL a 32 µg/mL, las cepas presentes en este estudio mostraron CMI mayores para carbapenémicos, por lo que se buscaron otros mecanismos de resistencia como la sobreexpresión de bombas de expulsión.

Para determinar la participación de bombas de expulsión como mecanismo de resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos, se utilizó el inhibidor de bombas de expulsión PA $\beta$ N a una concentración de 25 mg/L, según lo recomendado por Kumita *et al.*, 2009. Este compuesto fue capaz de inhibir las bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND, gracias a su afinidad por esta región. Al interactuar con esta región, bloquea a la bomba de expulsión e impide la eliminación de los antibióticos (Kumita *et al.*, 2009; Lamut *et al.*, 2019).

Cabe mencionar, que la cepa PE204 no fue contemplada para este experimento, debido a que el PA $\beta$ N impidió el crecimiento de la bacteria, sin embargo, la cepa fue portadora de los reguladores *mexR* y *mexT*, por lo que sería importante determinar una curva de sobrevivencia de las cepas en presencia del inhibidor, o en el caso de ésta cepa, utilizar otro inhibidor como los que han sido reportados por Lamut *et al.*, 2019.

En 31 cepas se observó la disminución de CMI de meropenem de 2 hasta 128 veces en presencia de PA $\beta$ N. Además, se observó que las cepas PE127, PE159 y PE196 disminuyeron la CMI de meropenem 64 veces y la cepa PE160 disminuyó 128 veces, por lo que se infiere que la sobreexpresión de las bombas de expulsión sea el mecanismo principal de resistencia hacia meropenem. Contrario a lo reportado previamente López *et al.*, 2018, donde en cepas portadoras de carbapenemasas la disminución de la CMI de meropenem fue únicamente de 2 a 16 veces en presencia del inhibidor.

Por otro lado, se conoce que los sistemas MexAB, MexCD y MexXY están involucrados en la expulsión del antibiótico meropenem (Lister, 2009). Al realizar la amplificación de los genes reguladores de bombas de expulsión, las 44 cepas fueron portadoras de *mexR*, regulador del sistema MexAB-OprM; por lo que podríamos inferir que todas las cepas son portadoras de esta bomba. En 18 cepas se observó que esta bomba era la única presente, además en estas cepas se observó una disminución de la CMI de meropenem en presencia del PA $\beta$ N, a excepción de tres cepas donde no hubo disminución de la CMI. Por lo que se puede pensar que siendo MexAB-OprM el único sistema presente, su

sobreexpresión es importante para la sobrevivencia de la bacteria en presencia de meropenem, aunque no podemos dejar de lado la acción de otros mecanismos de resistencia como es la participación de la enzima AmpC (Rostami *et al.*, 2018)

Veinticinco cepas portaban más de 2 reguladores de bombas de expulsión, de las cuales en 20 cepas se observó la disminución de la CMI de carbapenémicos, y con esta metodología no es posible determinar cuál es la bomba participante en la resistencia, como se ha reportado en otros estudios, utilizando RT-PCR cuantitativa de los genes reguladores y estructurales de las bombas de expulsión (Lee & Ko, 2012; Muderris *et al.*, 2018). Es importante mencionar que la sobreexpresión de bombas de expulsión no únicamente confiere resistencia a carbapenémicos sino también a diversas familias de antibióticos (Lister, 2009), por lo que sería interesante evaluar su participación con otros antimicrobianos.

Otros autores mencionan que las bombas de expulsión no tienen afinidad por el antibiótico imipenem (Lister, 2009; Dreier & Ruggerone, 2017), pero con los datos obtenidos en este trabajo, 21 cepas mostraron disminución de la CMI de imipenem en presencia de PA $\beta$ N, por lo que las bombas de expulsión podrían estar participando en la eliminación de este antibiótico.

Nueve cepas portaron el gen *mexZ* regulador del sistema MexXY-OprM y mostraron disminución de la CMI de imipenem en presencia de PA $\beta$ N, de modo que posiblemente esta bomba sea uno de los mecanismos responsables de la resistencia a imipenem. Un resultado similar fue observado en un estudio realizado con cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem, utilizando berberina como inhibidor del sistema MexXY-OprM y encontraron que la CMI de imipenem disminuía en presencia del inhibidor (Su & Wang, 2017). Interesantemente, en la cepa PE90 se observó un aumento de la CMI para imipenem en presencia de PA $\beta$ N, esto probablemente sea debido a que la presencia del carbapenémico pudiera haber activado la sobreexpresión de AmpC; ya que en un estudio realizado por Kumari *et al.*, 2014, observaron que su inducción está determinada por la presencia de ciertos antibióticos  $\beta$ -lactámicos como el imipenem. Otros

autores mencionan que la regulación de estos mecanismos de resistencia es bastante compleja, y que hay interacción entre la regulación de bombas de expulsión, la expresión de AmpC y la pérdida de la porina OprD para la resistencia hacia carbapenémicos (Quale *et al.*, 2006; Lister, 2009).

Por otra parte, en 12 cepas se observó la disminución de la CMI de imipenem en presencia de PA $\beta$ N: 9 cepas portaron solo a *mexR*, 2 cepas portaron a *mexR* y *mexT* y 1 cepa portó a *mexR*, *nfxB* y *mexT*, por lo que probablemente alguno de los sistemas que portaban podría estar participando en la eliminación del antibiótico. Se observó que 9 cepas portaron a *mexR* únicamente y mostraron disminuir la CMI de imipenem en presencia de PA $\beta$ N, por lo que se plantea que el sistema MexAB-OprM podría estar involucrado en la eliminación de este antibiótico. En un estudio similar, realizado por Kao *et al.*, 2016, realizaron la CMI de imipenem de cepas de *P. aeruginosa* en presencia y ausencia de PA $\beta$ N, y mostraron que la CMI disminuía cuando el inhibidor estaba presente, por lo tanto, infirieron la participación de estos sistemas en la resistencia a imipenem, sin embargo, no determinaron que bomba de expulsión estaba presente en la bacteria.

El regulador *mexT* fue encontrado en 13 cepas que no expresaron la porina OprD, donde se observó que en 11 cepas tuvo influencia el inhibidor de bombas de expulsión: en 4 cepas se observó la disminución de la CMI de meropenem y en 7 cepas para meropenem e imipenem en presencia de PA $\beta$ N, lo que supone que la participación de este regulador tenga efecto sobre la expresión de la porina, como describió Lister, 2009, que la sobreexpresión del sistema MexEF-OprN, puede reprimir al gen *oprD* impidiendo su expresión. Cabe mencionar, que la pérdida de la porina en conjunto con la participación de bombas de expulsión podría ser la causa de los valores altos de CMI (64  $\mu$ g/mL a >512  $\mu$ g/mL) para imipenem que mostraron estas cepas.

En este estudio, se observaron cepas que mostraban una CMI elevada para carbapenémicos y que no podía ser del todo explicada con los mecanismos de resistencia ya mencionados, por lo que fueron seleccionadas 10 cepas de *P.*

*aeruginosa* con base a la CMI de meropenem que presentaron, para investigar la presencia de mecanismos estructurales que pudieran estar participando en la resistencia hacia estos antibióticos, como fue la cuantificación de *biofilm* y la producción de alginato.

Friedman y Kolter en 2004, mencionan que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de formar distintos tipos de *biofilm* dependiendo del medio en que se encuentre, entre estas se encuentra el *biofilm* aéreo, formado en la interfaz aire-líquido, y el *biofilm* estático, formado en superficies sólidas, por lo cual en este estudio se realizó la cuantificación de ambos tipos de *biofilm* para obtener la formación de *biofilm* total.

En comparación con la formación de *biofilm* de la cepa PAO1, las 10 cepas de *P. aeruginosa* fueron mayor productoras de *biofilm*, debido a que estas cepas fueron aislados clínicos, probablemente, se esté presentando como respuesta al estrés causado por la respuesta inmune de los pacientes, además, en algunas de ellas se observó una variación en la formación de *biofilm* en las diferentes concentraciones de meropenem probadas; sin embargo, al no ser cambios significativos en la formación de *biofilm*, no pudo relacionarse como un mecanismo de resistencia a meropenem. Únicamente la cepa PE58 mostró un aumento en la formación de *biofilm* en presencia del antibiótico a la concentración de 16 µg/mL, por lo que se sugiere que en esta cepa el *biofilm* pudiera estar contribuyendo en la resistencia a meropenem, aunque su papel principal es la protección contra la respuesta inmune (Mauch *et al.*, 2018). Previamente se ha estudiado en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, aisladas de oído, que la presencia de los antibióticos amoxicilina y cefotaxima promueven la formación de *biofilm*, en comparación con el *biofilm* formado en ausencia del antibiótico (Aka & Haji, 2015). Un dato interesante fue que la cepa PE55 mostró una disminución en la formación de *biofilm* en presencia de meropenem, al igual que las cepas PE93 y PE96 a las concentraciones de 16 y 32 µg/mL, respectivamente. Un evento semejante al observado en este estudio fue el reportado por Aka & Haji en 2015, en donde ellos

observaron una disminución de la formación de *biofilm*, pero en presencia de ciprofloxacina.

El *biofilm* promueve la persistencia de las cepas de *P. aeruginosa*, principalmente en los sitios anatómicos donde es más favorable la formación de *biofilm*, como en pulmones de pacientes cursando enfermedades como fibrosis quística o EPOC, y en vías urinarias, cuando la infección es recurrente (Alav *et al.*, 2018; Maharjan *et al.*, 2018); sin embargo, en este estudio no se observó esta relación, posiblemente por tratarse de IAAS y no tratarse de infecciones persistentes en los pacientes. La cepa que mostró una mayor formación de *biofilm* fue la cepa PE58, la cual provenía de una herida (absceso), aunque se conoce que *P. aeruginosa* es capaz de causar este tipo de infección, no hay estudios donde se relacione este sitio de aislamiento con la formación de *biofilm*.

Por otra parte, a las 10 cepas mencionadas también se les cuantificó la producción de alginato a distintas concentraciones de meropenem. La cepa PE19 mostró un aumento en la producción de este exopolisacárido a la concentración de 16 µg/mL, por lo que podría contribuir como mecanismo de resistencia hacia meropenem, como fue previamente reportado por Nepomuceno en 2015, donde observó que en 3 cepas, había un aumento de la producción de alginato en presencia de meropenem. En el resto de las cepas no se mostró una variación significativa en la producción de alginato a las distintas concentraciones de antibiótico probadas, por lo que en este caso el alginato no se podría relacionar con la resistencia a meropenem; y sería interesante realizar el mismo experimento pero en presencia de imipenem.

Las cepas donde se observó una mayor producción de este exopolisacárido fueron PE19 y PE29, las cuales provenían de hemocultivo y secreción de herida, respectivamente, sin embargo, no se ha reportado el papel que tiene el alginato en estos sitios de aislamiento, por lo que sería importante continuar con el estudio de cepas provenientes de IAAS, ya que la presencia de este exopolisacárido contribuye a la persistencia de las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Esta característica únicamente se ha estudiado en pacientes con fibrosis quística, y se

asocia con otras complicaciones derivadas de la infección, como daño tisular y pérdida de la función pulmonar (Rau *et al.*, 2010; Høiby *et al.*, 2017).

Puesto que la cuantificación de *biofilm* y la producción de alginato fueron realizados con un número pequeño de cepas de *P. aeruginosa*, no se descarta la participación de los mecanismos estructurales en la resistencia hacia carbapenémicos, y se sugiere se continúe con su investigación. Además del alginato, sería interesante cuantificar el resto de los componentes presentes en el *biofilm*, como los exopolisacáridos Psl y Pel, y su relación con la resistencia a los carbapenémicos.

## 9. CONCLUSIÓN

Se encontró que el mecanismo de resistencia para imipenem fue la pérdida de la porina OprD en conjunto con bombas de expulsión. La resistencia a meropenem se atribuyó principalmente al sistema MexAB-OprM. Además, en dos cepas se observó la participación de mecanismos estructurales (*biofilm* y alginato) que pudieran estar contribuyendo en la resistencia a meropenem.

Este estudio mostró la importancia de investigar diferentes mecanismos de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* no portadoras de carbapenemasas, debido a que contribuye a la baja efectividad del tratamiento y a la persistencia de la bacteria en el ambiente hospitalario, por la complejidad de su activación.

## 10. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio de las 6 cepas de *P. aeruginosa* que expresaron a la proteína OprD en un peso mayor a 50 kDa, mediante la secuenciación del gen y RT-PCR cuantitativa.
- Investigar la participación de la sobreexpresión de AmpC en la resistencia hacia carbapenémicos.
- Realizar RT-PCR cuantitativa de los reguladores *mexR*, *nfxB*, *mexT* y *mexZ* en presencia de imipenem para conocer la participación de las bombas de expulsión en la eliminación de este antibiótico.
- Cuantificar la formación de *biofilm* en presencia de imipenem, aminoglucósidos y quinolonas.
- Cuantificar la producción de otros componentes en el *biofilm*: como Psl y Pel, además del alginato, que pudieran estar participando como mecanismo estructural en la resistencia a carbapenémicos.

## 11. REFERENCIAS

- Abdi-Ali, A., Mohammadi-Mehr, M., & Agha Alaei, Y. (2006). Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(3), 196–200. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.10.007>
- Aka, Safaa T., & Haji, Sayran H. (2015). Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 149-154. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120140218>
- Akpaka, P. E., Swanston, W. H., Ihereme, H. N., Correa, A., Torres, J. A., Tafur, J. D., Montealegre, M. C., Quinn, J. P. & Villegas, M. V. (2009) Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *Journal of clinical microbiology*, 47(8), 2670–2671. <http://doi.org/10.1128/JCM.00362-09>
- Alav, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- Al-Bayssari, C., Valentini, C., Gomez, C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J.-M. (2015). First detection of insertion sequence element ISPa1328 in the oprD porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from an idiopathic pulmonary fibrosis patient in Marseille, France. *New Microbes and New Infections*, 7, 26–27. <http://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.05.004>
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2018). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E. P., & Høiby, N. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(4), 1175–1187. <http://doi.org/10.1128/aac.48.4.1175-1187.2004>
- del Barrio-Tofiño E., López-Causapé C., Cabot G., Rivera A., Benito N., Segura C., Montero M.M., Sorlí L., Tubau F., Gómez-Zorrilla S., Tormo N., Durá-Navarro R., Viedma E., Resino-Foz E., Fernández-Martínez M., González-Rico C., Alejo- Cancho I., Martínez J. A., Labayru-Echverria C., Dueñas C., Ayestarán I., Zamorano L., Martinez-Martinez L.,

- Horcajada J. P., Oliver, A. (2017). Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61: e01589-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01589-17>
- Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M. (2011) New treatment options against gram-negative organisms. *Crit Care.*; 15(2):215. <https://doi.org/10.1186/cc9997>
- Bello López, E. (2015). Tesis de Maestría. Estudio molecular de la resistencia a los antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Bello-López, E., Castro-Jaimes, S., Cevallos, M. Á., Rocha-Gracia, R., Castañeda-Lucio, M., Sáenz, Y., Torres, C., Gutiérrez-Cazares, Z., Martínez-Laguna, Y. & Lozano-Zarain, P. (2019). Resistome and a Novel *bla*<sub>NDM-1</sub>-Harboring Plasmid of an *Acinetobacter haemolyticus* Strain from a Children's Hospital in Puebla, Mexico. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 25(7), 1023–1031. <http://doi.org/10.1089/mdr.2019.0034>
- Biswas, S., Mohammad, M. M., Patel, D. R., Movileanu, L., & van den Berg, B. (2007). Structural insight into OprD substrate specificity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(11), 1108–1109. <http://doi.org/10.1038/nsmb1304>
- Bjarnsholt, T., Tolker-Nielsen, T., Høiby, N., & Givskov, M. (2010). Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12, e11. <http://doi.org/10.1017/S1462399410001420>
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](http://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1)
- Bontron, S., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). In vitro prediction of the evolution of GES-1  $\beta$ -lactamase hydrolytic activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), 1664–1670. <https://doi.org/10.1128/AAC.04450-14>
- Campana, E. H., Xavier, D. E., Petrolini, F. V.-B., Cordeiro-Moura, J. R., Araujo, M. R. E. de, & Gales, A. C. (2017). Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(1), 57–62. <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.10.008>

- Carrara-Marroni, F. E., Cayó, R., Streling, A. P., Ramos da Silva, A. C., Lima P, R., Romanin, P., Venâncio, E., Eches P., M. R., Pelisson, M., Gales, A. C.(2015). Emergence and spread of KPC-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 3, 304–306. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.07.002>
- Castanheira, M., Toleman, M. A., Jones, R. N., Schmidt, F. J., & Walsh, T. R. (2004). Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(12), 4654–4661. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004>
- Castanheira, M., Mills, J. C., Farrell, D. J., & Jones, R. N. (2014). Mutation-driven  $\beta$ -lactam resistance mechanisms among contemporary ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(11), 6844–6850. <http://doi.org/10.1128/AAC.03681-14>
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J. P., Bosch, J. & Soto, S. M. (2018). Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microbial Drug Resistance*. <http://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Dufour, A., & Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(5), 698–722. <http://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
- Crăciunaș C, Butiuc-Keul A, Flonta M, Brad A, Sigarteu M. (2010) Application of molecular techniques to the study of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Cluj-Napoca, Romania. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. Tomo XVII(2):243-247
- Dreier, J. & Ruggerone P. (2015). Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*. 6(July), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00660>
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), 351–368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>
- Escandón-Vargas, K., Reyes, S., Gutiérrez, S., & Villegas, M. (2016). The epidemiology of

carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 15(3), 277 - 297. <http://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>

Friedman, L., & Kolter, R. (2003). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(3), 675–690. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x>

Garza-González E, Morfín-Otero R, Mendoza-Olazarán S, Bocanegra-Ibarias P, Flores-Treviño S, Rodríguez-Noriega E, Ponce-de-León A, Sanchez-Francia D, Franco-Cendejas R, Arroyo-Escalante S, Velázquez-Acosta C, Rojas-Larios F, Quintanilla LJ, Maldonado-Anicacio JY, Martínez-Miranda R, Ostos-Cantú HL, Gomez-Choel A, Jaime-Sanchez JL, Avilés-Benítez LK, Feliciano-Guzmán JM, Peña-López CD, Couoh-May CA, Molina-Jaimes A, Vázquez-Narvaez EG, Rincón-Zuno J, Rivera-Garay R, Galindo-Espinoza A, Martínez-Ramírez A, Mora JP, Corte-Rojas RE, López-Ovilla I, Monroy-Colin VA, Barajas-Magallón JM, Morales-De-la-Peña CT, Aguirre-Burciaga E, Coronado-Ramírez M, Rosales-García AA, Ayala-Tarín MD, Sida-Rodríguez S, Pérez-Vega BA, Navarro-Rodríguez A, Juárez-Velázquez GE, Cetina-Umaña CM, Mena-Ramírez JP, Canizales-Oviedo J, Moreno-Méndez MI, Romero-Romero D, Arévalo-Mejía A, Cobos-Canul DI, Aguilar-Orozco G, Silva-Sánchez J, Camacho-Ortiz A. (2019) A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE* 14(3): e0209865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>

Garza-Ramos, U., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Tamayo-Legorreta, E., Catalan-Najera, J. C., Morfín-Otero, R., Noriega-Rodriguez, E., Volkow, P., Juárez-Cornejo, P., González, A., Gaytan-Martínez, J., Del Rocío González-Martínez, M., Vazquez-Farias, M. & Silva-Sanchez, J. (2014). Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 9–11. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.029>

Ghadam, P., Akhlaghi, F., & Ali, A. (2017). One-step purification and characterization of alginate lyase from a clinical *Pseudomonas aeruginosa* with destructive activity on bacterial biofilm. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(5), 467–473. <http://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.8668>

Girlich, D., Naas, T., & Nordmann, P. (2004). Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobials Agents of*

*Chemotherapy*, 48(6), 2043–2048. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2043>

- Gonzalez-Vazquez, M. C., Rocha-Gracia, R.C., Carabarin-Lima, A., Bello-Lopez, E., Martinez-Laguna, Y., Lozano-Zarain, P. (2019) Location of OprD Porin in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Artículo en proceso de publicación.
- Gupta, P., Chhibber, S., & Harjai, K. (2016). Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian Journal of Medical Research*, 143(5) 643–651. <http://doi.org/10.4103/0971-5916.187114>
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Pérez, J. L. & Oliver, A. (2007). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(12), 4329–4335. <http://doi.org/10.1128/AAC.00810-07>
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., & Parsek, M. R. (2001). Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5395–5401. <http://doi.org/10.1128/jb.183.18.5395-5401.2001>
- Hirabayashi A., Kato, D., Tomita, Y., Iguchi, M., Yamada, K., Kouyama, Y., Morioka, H., Tetsuka, N. & Yagi, T. (2017). Risk factors for and role of OprD protein in increasing minimal inhibitory concentrations of carbapenems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 66:1562–1572 <http://doi.org/10.1099/jmm.0.0006>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Jensen, P. Ø., Kolpen, M., Qvist, T., Aanaes, K., Pressler, T., Skov, M. & Ciofu, O. (2017). Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *APMIS, Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 125(4), 339–343. <https://doi.org/10.1111/apm.12689>
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., & Lee, K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & chemotherapy*, 47(2), 81–97. <http://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>
- Jeannot, K., Elsen, S., Ko, T., Attree, I., Delden, C. Van, & Ple, P. (2008). Resistance and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Overproducing the MexCD-OprJ Efflux Pump. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2455–2462. <https://doi.org/10.1128/AAC.01107-07>

- Jeong, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., & Karim, A. M. (2015). Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 0067, 9654–9692. <https://doi.org/10.3390/ijms16059654>
- Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2017). Psl Produced by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to the Establishment of Biofilms and Immune. *mBio*, 8(3), e00864-17. <http://doi.org/10.1128/mBio.00864-17>
- Kao, C.-Y., Chen, S.-S., Hung, K.-H., Wu, H.-M., Hsueh, P.-R., Yan, J.-J., & Wu, J.-J. (2016). Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiology*, 16(1). <http://doi.org/10.1186/s12866-016-0719-2>
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-Induced Biofilm Formation. *The International Journal of Artificial Organs*, 34(9), 737–751. <http://doi.org/10.5301/ijao.5000027>
- Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Hackel, M. A., Lob, S. H., & Sahm, D. F. (2017). Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013–2015. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(3), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.03.006>
- Kumari, H., Balasubramanian, D., Zincke, D., & Mathee, K. (2014). Role of *Pseudomonas aeruginosa* AmpR on  $\beta$ -lactam and non- $\beta$ -lactam transient cross-resistance upon pre-exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics. *Journal of Medical Microbiology*, 63(Pt\_4), 544–555. <http://do.org/10.1099/jmm.0.070185-0>
- Kumita, W., Saito, R., Sato, K., Ode, T., Moriya, K., Koike, K., Chida, T. & Okamura, N. (2009). Molecular characterizations of carbapenem and ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas putida*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 15(1), 6–12. <http://doi.org/10.1007/s10156-008-0661-9>
- Lamut, A., Mašič, L. P., Kikelj, D. & Tomašič, T. (2019). Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Med Res Rev*, 1–45. <https://doi.org/10.1002/med.21591>
- Lee, J., & Ko, K. S. (2012). OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(2), 168–172.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.004>

- Li, H., Luo, Y., Williams, B. J., Blackwell, T. S., Xie, C.(2013). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *NIH Public Access*. 302(2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>
- Linares, J. F., López, J. A., Camafeita, E., Albar, J. P., Rojo, F., & Martínez, J. L. (2005). Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1384–91.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>. <http://doi.org/10.1128/JB.187.4.1384-1391.2005>
- López García, A. (2019). Tesis de Doctorado. Resistencia molecular en *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- López-García, A., Rocha-Gracia, R. del C., Bello-López, E., Juárez-Zelocualtecal, C., Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M., López-Pliego L., González-Vázquez C., Torres C., Ayala-Nuñez T., Jiménez-Flores G., Arenas-Hernández M. P., Lozano-Zarain, P. (2018). Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican Hospital. *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, 1523–1536. <http://doi.org/10.2147/idr.s173455>
- Livermore, D. M. (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(3), 247–250. <http://doi.org/10.1093/jac/47.3.247>
- Ma, L., Wang, J., Wang, S., Anderson, E. M., Lam, J. S., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. (2012). Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environmental microbiology*, 14(8), 1995–2005. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02753.x>
- Maharjan, G., Khadka, P., Siddhi Shilpakar, G., Chapagain, G., & Dhungana, G. R. (2018). Catheter-Associated Urinary Tract Infection and Obstinate Biofilm Producers. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018, 1–7. <http://doi.org/10.1155/2018/7624857>

- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Servicio de Enfermedades Infecciosas*. 21(1), 42-55. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72873-0](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72873-0)
- Martinez Rojas, D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009, 29. 78 - 83
- Mauch, R. M., Jensen, P. Ø., Moser, C., Levy, C. E., & Høiby, N. (2018). Mechanisms of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17(2), 143–152. <http://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.08.012>
- Mendes, R. E., Kiyota, K. A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S. S., Gales, A. C., Pignatari, A. C. C. & Tufik, S. (2007). Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *Journal of clinical microbiology*, 45(2), 544–547. <http://doi.org/10.1128/JCM.01728-06>
- Miller, L. M., Silver, C. D., Herman, R., Thomas, G. H., Krauss, T. F., & Johnson, S. D. (2019). Surface-Bound Antibiotic for the Detection of  $\beta$  - Lactamases. *ACS Applied Materials and Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b05793>
- Muller, C., Plésiat, P., & Jeannot, K. (2011). A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(3), 1211–1221. <http://doi.org/10.1128/AAC.01252-10>
- Naenna O, Noisumdaeng P, Pongpech P, Tribuddharat C. (2010) Detection of outer membrane porin protein, an imipenem influx channel, in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 41(3):614-624
- Nepomuceno, A. A. (2015). Tesis de Maestría. Papel del exopolisacárido en cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* causante de infecciones nosocomiales. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)

- Organización Mundial de la Salud. (27 de Febrero de 2017). Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Palanisamy, N. K., Ferina, N., Amirulhusni, A. N., Mohd-Zain, Z., Hussaini, J., Ping, L. J., & Durairaj, R. (2014). Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 2. <http://doi.org/10.1186/1477-3155-12-2>
- Patel, G., & Bonomo, R. A. (2013). "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Frontiers in microbiology*, 4, 48. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00048>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–686. <http://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 157–165. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., & Nordmann, P. (2000). Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(3), 622–632. <http://doi.org/10.1128/aac.44.3.622-632.2000>
- Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., & Landman, D. (2006). Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(5), 1633–1641. <http://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1633-1641.2006>
- Rau, M. H., Hansen, S. K., Johansen, H. K., Thomsen, L. E., Workman, C. T., Nielsen, K. F., Jelsbak, L., Høiby, N., Yang, L. & Molin, S. (2010). Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environmental Microbiology*. 12(6), 1643–1658 <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02211.x>
- Ramsey, D. M., & Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology*, 56(2), 309–322. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

- Rojo-bezares, B., Estepa, V., Cebollada, R., Toro, M. De, Somalo, S., Seral, C., Castillo, F. K., Torres, C. & Sáenz, Y. (2014). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3-4):405-14 <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.01.001>
- Rostami, S., Farajzadeh Sheikh, A., Shoja, S., Farahani, A., Tabatabaiefar, M. A., Jolodar, A., & Sheikhi, R. (2018). Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 127–132. <http://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.08.016>
- Ruiz-garbajosa, P. & Cantón, R. (2017). Update in Bacteriology Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* . *Implications for empiric and definitive therapy*. 30, 8–12. PMID: 28882007
- Sader, H. S., Huband, M. D., Castanheira, M., & Flamm, R. K. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Susceptibility Results from Four Years (2012 to 2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring Program in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), 1–7. <https://doi.org/10.1128/aac.02252-1>
- Sevillano, E., Gallego, L., & García-lobo, J. M. (2009). First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P . aeruginosa isolates*, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathologie Biologie*, 57, 493–495. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.002>
- Shariati, A., Azimi, T., Ardebili, A., Chirani, A. S., Bahramian, A., Pormohammad, A., Sadredinamin, M., Erfanimanesh, S., Bostanghadiri, N., Shams, S. & Hashemi, A. (2017). Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. *New microbes and new infections*, 21, 75–80. <http://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.013>
- Steward, C. D., Rasheed, J. K., Hubert, S. K., Biddle, J. W., Raney, P. M., Anderson, G. J., Williams, P. P., Brittain, K. L., Oliver, A., McGowan, J. E. & Tenover, F. C. (2001). Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), 2864–2872.

<http://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2864-2872.2001>

Su, F., & Wang, J. (2018). Berberine inhibits the MexXY-OprM efflux pump to reverse imipenem resistance in a clinical carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate in a planktonic state. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(1), 467–472. <http://doi.org/10.3892/etm.2017.5431>

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

Sun, F., Zhou, D., Wang, Q., Feng, J., Feng, W., Luo, W., Zhang, D., Liu, Y., Qiu, X., Yin, Z., Chen, W. & Xia, P. (2016). The first report of detecting the bla SIM-2 gene and determining the complete sequence of the SIM-encoding plasmid. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(4), 347–351. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.001>

Terzi, H. A., Kulah, C. & Ciftci, I. H.(2014). The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;30:2681–2687 <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1692-2>

Ullah, W., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S., Ali, N., & Muhammad, N. (2017). Microbial Pathogenesis CTX-M-15 and OXA-10 beta lactamases in multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* : First report from Pakistan. *Microbial Pathogenesis*, 105, 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.039>

Vital-López, F. G., Reifman, J., & Wallqvist, A. (2015). Biofilm Formation Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Predicted via Genome-Scale Kinetic Models of Bacterial Metabolism. *PLoS computational biology*, 11(10), e1004452. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004452>

Wang, J., Zhou, J., Qu, T., Shen, P., Wei, Z., Yu, Y., & Li, L. (2010). International Journal of Antimicrobial Agents Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(5), 486–491. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.014>

Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology*, 753–767. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00041-x>

Wasserman, T., Meinike, J. K., Ivanyshyn, K., Bjarnsholt, T., Khademi, M. H., Jelsbak, L., Høiby, N. & Ciofu, O. (2016) The phenotypic evolution of *Pseudomonas aeruginosa* populations

changes in the presence of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin. *Microbiology*, 162(5), 865-875. <http://doi.org/10.1099/mic.0.000273>

Wolter, D. J., Hanson, N. D., & Lister, P. D. (2004) Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiology Letters*. 236(1):137–143. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.05.039>

Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Amyes, S. G. & Livermore, D. M.. (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal Antimicrobial Agents*. 27(4):351–353. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>

Zeng, Z., Wang, W., Huang, M., Shi, L., Wang, Y., & Shao, H. (2014). Mechanisms of carbapenem resistance in cephalosporin-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(3), 268–270. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.014>

## 12. ANEXOS

Anexo 1. Tabla con 21 cepas de *P. aeruginosa*, previamente estudiadas por López A. en 2019

Número de cepa	Fenotipo	Genotipo	Detección de la proteína OprD
PE18	PIP, IPM, MEM	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE19	TIM, CAZ, FEP, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE24	IPM, MEM,	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE26	PIP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó
PE28	IPM, MEM	Ninguno	-
PE29	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE30	CAZ, FEP, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó
PE47	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE53	TIM, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó
PE55	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub>	-
PE58	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE60	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-20</sub>	No expresó
PE65	TIM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó
PE67	IPM, MEM, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE68	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE76	PIP, TIM, CAZ, IPM, MEM	Ninguno	No expresó
PE86	PIP, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-
PE87	PIP, TIM, CAZ, FEP, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó
PE90	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó
PE93	TIM, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	Ninguno	-
PE96	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	-

**Anexo 2. Características de las 44 cepas de *P. aeruginosa* presentes en este estudio**

Número de cepa	Fenotipo de resistencia	Genotipo de resistencia	Detección de la proteína OprD	Genes reguladores de bombas de expulsión	CMI (µg/mL)	
					MEM (MEM+PAβN)	IPM (IPM+PAβN)
PE18	PIP, IPM, MEM	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, mexZ</i>	8 (8)	128 (32)
PE19	TIM, CAZ, FEP, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexZ</i>	128 (128)	2048 (512)
PE24	IPM, MEM	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	32 (32)	128 (128)
PE26	PIP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	8 (4)	128 (64)
PE28	IPM, MEM	Ninguno	No expresó	<i>mexR</i>	32 (32)	64 (32)
PE29	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexT</i>	64 (64)	64 (32)
PE30	CAZ, FEP, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (32)	256 (256)
PE47	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	256 (128)	128 (32)
PE53	TIM, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	128 (32)	256 (256)
PE55	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	256 (128)	128 (32)

PE58	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	256 (128)	128 (32)
PE60	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-20</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (128)	256 (128)
PE65	TIM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (16)	64 (64)
PE67	IPM, MEM, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (2)	64 (64)
PE68	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, nfxB</i>	128 (16)	128 (128)
PE76	PIP, TIM, CAZ, IPM, MEM	Ninguno	No expresó	<i>mexR</i>	32 (16)	64 (64)
PE86	PIP, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	128 (32)	256 (256)
PE87	PIP, TIM, CAZ, FEP, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, nfxB, mexT, mexZ</i>	64 (32)	256 (128)
PE90	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, nfxB, mexT</i>	32 (32)	64 (256)
PE93	TIM, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	Ninguno	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexT</i>	>512 (>512)	>512 (>512)
PE96	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES-19</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (mayor a 50kDa)	<i>mexR</i>	128 (128)	256 (256)
PE101	PIP, TIM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (8)	128 (64)
PE127	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	512 (8)	512 (512)
PE143	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexT, mexZ</i>	128 (32)	64 (64)

PE145	TIM, IPM, MEM, GM, NN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (8)	512 (512)
PE147	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (8)	>512 (>512)
PE149	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (8)	512 (512)
PE154	TIM, CAZ, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT</i>	32 (8)	256 (128)
PE159	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (4)	256 (32)
PE160	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	512 (4)	512 (512)
PE168	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (32)	512 (256)
PE174	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (8)	>512 (>512)
PE179	TIM, ATM, IPM, MEM, GM, NN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR</i>	64 (8)	64 (32)
PE187	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (32)	256 (64)
PE189	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (8)	256 (32)
PE194	TIM, TZP, CAZ, ATM, IPM, MEM, GM, NN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, nfxB, mexT, mexZ</i>	64 (64)	64 (64)
PE195	TIM, IPM, MEM, GM, NN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR</i>	64 (8)	128 (128)

PE196	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR</i>	256 (4)	512 (64)
PE198	TIM, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	No expresó	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	128 (32)	256 (128)
PE204	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT</i>	256	256
PE205	TIM, CAZ, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT</i>	64 (64)	256 (128)
PE208	IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	16 (16)	64 (64)
PE213	PIP, TIM, TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR</i>	512 (16)	512 (256)
PE217	PIP, TIM, IPM, MEM, GM, NN, AN, CIP, NOR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	Expresión OprD (50kDa)	<i>mexR, mexT, mexZ</i>	32 (16)	64 (64)

PE19-OprD	ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCG-TTGACTGGCGGTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTC	59
PA01-OprD	ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCATTCGACTGGCGGTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTC ***** * *****	60
PE19-OprD	GCCGTGGCCGAA-TTTTCGTACCAGATCAGGCCGATTCGAAGGGGCTCATCGAAGCCTGC	118
PA01-OprD	GCCGTGGCCGACGCATTCGTACAGCGATCAGGCCGAAGCGAAGGGGTTTCATCGAAGACAGC ***** * *****	120
PE19-OprD	CCCCTGACCTGTTTACTCCGCACCTACTTTCCACCACGCGCCGGCAACGAATTGCGGGCT	178
PA01-OprD	AGCCTCGACCTGCTGCTCCGCACTACTATTTCAACCGTGACGGCAAGAGCGGCAGCGGG *** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	180
PE19-OprD	GATCGCGTCTATTGGACCTTGACTTCTTCACCTCCTTCTAACCCGTGTTTC-----	229
PA01-OprD	GACCGCGTGCAGTGGACCAAGGCTTCCTCACCACCTATGAATCCGGCTTACCCAAGGC ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	240
PE19-OprD	-----	229
PA01-OprD	ACTGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTCGGCTACCTGGGCTGAAGCTCGACGGCACCTCC	300
PE19-OprD	-----	0
PA01-OprD	GACAAGACCGGCACCGGCAACCTGCCGTTGATGAACGACGGCAAGCCGCGCATGACTAC	360
PE19-OprD	-----	0
PA01-OprD	AGCCGCGCCGGCGCGCGCTGAAGGTGCGCATCTCCAAGACCATGCTGAAGTGGGGCGAG	420
PE19-OprD	-----AGCAACGAGA---ACATAAACGGCTGATCCGCCAGTACCTGCCCAAGGGC	48
PA01-OprD	ATGCAACCGACCGCCCGGTCTTCGCGCTGGCGGCAGCCGCTGTTCCCGCAGACCGCG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	480
PE19-OprD	ACGCAATTGTCGGTTTACAGCCAGGAG-----CAGTTGGATGCCATTGC	92
PA01-OprD	ACCGGCTTCCAGCTGCAGAGCAGCGAATTCGAAGGGCTCGACCTCGAGGCAGGCCACTTC ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	540
PE19-OprD	CTAC---GAAGGGAACATCCGACCGCGCAAGCG-----CTTCAATTGGAAATGCCCG	141
PA01-OprD	ACCGAGGGAAGGAGCCGACCACCGTCAAATCGCGTGGCGAATCTATGCCACCTACGCA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	600
PE19-OprD	ATTGAGGTCA-TGACAGAGGTAGTGGCGTTCGACATGATGCACCTGCTTCAATCCAGTA	200
PA01-OprD	GGCGAGACCGCCAAGAGCGCCGATTTTCATTGGGGCCGCTACGCAATCACCATAACCTC *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	660
PE19-OprD	ACCGT--GTTGCACTCAGCTTCTGCAACCGCCATCTATCGCCAGTACTACCTGAACACC	258
PA01-OprD	AGCGCTCCCTGTACGGCGCCGAACCTCGAAGACATCTATCGCCAGTATTACCTGAACAGC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	720
PE19-OprD	AACTACACCATCCCGCTGGCCTCCGATCAATCGCTGGGCTTCGACTTCAACATCTACCGC	318
PA01-OprD	AACTACACCATCCCACTGGCATCCGACCAATCGCTGGGCTTCGATTTCACATCTACCGC ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	780
PE19-OprD	ACCACCGACGAAGGCAAGTCCAAGGCTGGCGACATCAGCAACACCACCTGTACCTGGCGG	378
PA01-OprD	ACAAACGATGAAGGCAAGGCCAAGGCCGGCGACATCAGCAACACCACCTGGTCCCTGGCG ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	840
PE19-OprD	CGCGAGACATCGTTATAGG-----	397
PA01-OprD	GCAGCTTACTCTGGATGCGCACACTTTCACCTTGGCTACCAGAAGGTCCATGGCGAT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	900
PE19-OprD	-----	397
PA01-OprD	CAGCGTGTGATATATCGGCTTCGGCCGCAACGGCTCTGGCGCAGGTGGCGACTCGATT	960
PE19-OprD	-----	397
PA01-OprD	TTCTCGCCAACCTGTCCAGTACTCCGACTTCAACGGCCCTGGCGAGAAATCCTGGCAG	1020
PE19-OprD	-----	397
PA01-OprD	GCTCGCTACGACCTGAACCTAGCTCCTATGGCGTTCGCCGCTGACTTTCATGGTCCCG	1080

PE19-OprD	-----	397
PA01-OprD	TATATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACCAAGATGTCTGACAACAACGTCGGCTATAAG	1140
PE19-OprD	-----	397
PA01-OprD	AACTACGGCTACGGCGAGGATGGCAAGCACCACGAAACCAACCTCGAAGCCAAGTACGTG	1200
PE19-OprD	-----	397
PA01-OprD	GTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTCGTCCGCATCCGCCAGGCCTGGCACCGTGCC	1260
PE19-OprD	-----	397
PA01-OprD	AACGCCGACCAGGGCGAAGGCGACCAGAACGAGTTCGGCCTGATCGTCGACTATCCGCTG	1320
PE19-OprD	-----	397
PA01-OprD	TCGATCCTGTAA	1332

**Anexo 3. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *oprD* de la cepa PE19 con la secuencia del gen *oprD* de PA01. Secuenciación realizada con los primers OprDlong-F y OprD-R.**

PE19-OprD	-----AGCAACGAGAACAT	30
IS1394	TGCGACCCACACAGCCCCTGGCAGCGCGGCAGCAACGAGAACATCAACGGCCTGATCCGC	900
	*****	
PE19-OprD	CAGTACCTGCCCAAGGGCACGCAATTGTCGGTTTACAGCCAGGAGCAGTTGGATGCCATT	90
IS1394	CAGTACCTGCCCAAGGGCACGGACTTGTTCGGTTTACAGCCAGGAGCAGTTGGATGCCATT	960
	*****	
PE19-OprD	GCCTACGAAGGGAACATCCGACCGCGCAAGCGCTTCAATTGGAAATGCCCGATTGAGGTC	150
IS1394	GCCTACGAAGTGAACATCCGACCGCGCAAGCGCTTCAATTGGAAATGCCCGATTGAGGTC	1020
	*****	
PE19-OprD	ATGACAGAGGTAGTGGCGTTGCAGCATGATGCACCTGCTTCAATCCAGTAACCGTGTTGC	210
IS1394	ATGACAGAGGTAGTGGCGTTGCAGCATGATGCACCTGCTTCAATCCAGTAACCGTGTTGC	1080
	*****	
PE19-OprD	ACTCAGCTTCTGCAACCGCCATCTATCGCCAGTACTACCTGAACACCACTACACCATC	270
IS1394	ACTCAGCTTCTGCAACCGCC-----	1100
	*****	

**Anexo 4. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *oprD* de la cepa PE19 con la secuencia de inserción IS1394. Secuenciación realizada con el primer OprD-R.**

```

PE30-OprD -----GSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLNLLLRNYFFNRDGKEGRG 45
PAO1-OprD MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYFFNRDGKSGSG 60
          *****-*****
          *****-*****

PE30-OprD DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPMNDGKPRDDY 105
PAO1-OprD DRVDWTQGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGKLDGTSDKTGTGNLPMNDGKPRDDY 120
          *****

PE30-OprD SRAGGAVKVRISKMLKKGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF 165
PAO1-OprD SRAGGAVKVRISKMLKKGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF 180
          *****

PE30-OprD TEGKEPTTVKSRGELYATYAGQTAKSADFAAGGRYAITDNLSA----- 207
PAO1-OprD TEGKEPTTVKSRGELYATYAGETAKSADFIAGGRYAITDNLSASLYGAELEDIYRQYYLNS 240
          *****

PE30-OprD ----- 207
PAO1-OprD NYTIPLASDQSLGFDNFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQKVHGD 300

PE30-OprD ----- 207
PAO1-OprD QPFDYIGFGRNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNGPGEKSWQARYDLNLASYGVPGLTFMVR 360

PE30-OprD ----- 207
PAO1-OprD YINGKDIDGTKMSDNNVGYKNYGYGEDGKHETNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA 420

PE30-OprD ----- 207
PAO1-OprD NADQEGEQNEFRLIVDYPLSIL 443

```

**Anexo 5. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *oprD* de la cepa PE30, los cambios encontrados en la secuencia con respecto a PAO1 no contribuyen a la resistencia a imipenem. Secuenciación realizada con el primer OprDlong-F.**

PE47-OprD	-----GTTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTC	24
PA01-OprD	ATGAAAGTGATGAAGTGGAGCGCCATTGCACTGGCGGTTTCCGCAGGTAGCACTCAGTTC *****	60
PE47-OprD	GCCGTGGCCGACGCATTCGTTCAGCGATCAGGCCGAAGCGAAGGGTTCATCGAAGACAGC	84
PA01-OprD	GCCGTGGCCGACGCATTCGTTCAGCGATCAGGCCGAAGCGAAGGGTTCATCGAAGACAGC *****	120
PE47-OprD	AGCCTCGACCTGCTGCTCCGCAACTACTATTTC AACCGTGACGGCAAGAGCGGCAGCGGG	144
PA01-OprD	AGCCTCGACCTGCTGCTCCGCAACTACTATTTC AACCGTGACGGCAAGAGCGGCAGCGGG *****	180
PE47-OprD	GACCGCGTCGACTGGACCCAAGGCTTCTCACCACCTATGAATCCGGCTTCACCCAAGGC	204
PA01-OprD	GACCGCGTCGACTGGACCCAAGGCTTCTCACCACCTATGAATCCGGCTTCACCCAAGGC *****	240
PE47-OprD	ACCGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTCGGCTACCTCGGTCTGAAGCTCGACGGCACCTCG	264
PA01-OprD	ACTGTGGGCTTCGGCGTCGATGCCTTCGGCTACCTGGGCTGAAGCTCGACGGCACCTCC ** ***** *	300
PE47-OprD	GACAAGAGCGGTACCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACGGCAGCCCCGTGACGACTAC	324
PA01-OprD	GACAAGACCGGCACCGGCAACCTGCCGGTGATGAACGACGGCAGCCCCGTGACGACTAC ***** ** *	360
PE47-OprD	AGCCGCGCCGGTGGCGCGGTGAAGGTACGCATCTCCAAGACCATGTTGAAGTGGGGCGAG	384
PA01-OprD	AGCCGCGCCGGTGGCGCGGTGAAGGTACGCATCTCCAAGACCATGTTGAAGTGGGGCGAG ***** ***** *	420
PE47-OprD	ATGCAGCCGACCGCTCCGGTCTTCGCCGCCGGCGGCAGCCGCTGTTCCCGCAGACCGCG	444
PA01-OprD	ATGCAACCGACCGCCCCGGTCTTCGCCGCTGGCGGCAGCCGCTGTTCCCGCAGACCGCG ***** ***** *	480
PE47-OprD	ACCGGCTTCCAAGTGCAGAGCAGCGAACTCGAAGGGCTCGATC-----	487
PA01-OprD	ACCGGCTTCCAGCTGCAGAGCAGCGAATTCGAAGGGCTCGACCTCGAGGCAGGCCACTTC ***** ***** *	540
PE47-OprD	-----	0
PA01-OprD	ACCGAGGGCAAGGAGCCGACCACCGTCAAATCGCGTGGCGAACTCTATGCCACCTACGCA	600
PE47-OprD	-----	0
PA01-OprD	GGCGAGACCGCCAAGAGCGCCGATTTTCATTGGGGCCGCTACGCAATCACCATAACCTC	660
PE47-OprD	-----	0
PA01-OprD	AGCGCCTCCCTGTACGGCGCCGAAGTTCGAAGACATCTATCGCCAGTATTACCTGAACAGC	720
PE47-OprD	-----	0
PA01-OprD	AACTACACCATCCACTGGCATCCGACCAATCGCTGGGCTTCGATTCAACATCTACCGC	780
PE47-OprD	-----CGCCCCGAG	8
PA01-OprD	ACAAACGATGAAGGCAAGGCCAAGGCCGGCGACATCAGCAACACCCTTGGTCCCTGGCG * * * *	840
PE47-OprD	GCATCCTTGCCAGTGTCACTTCCACATGCATACCAGCGTCTTGAGGGTG---TTAAC	64
PA01-OprD	GCAGCCTACACTCTGGATGCGCACACTTTCACCTTGCCCTACCAGAAGGTCCATGGCGAT *** ** * ** * ** * ** * ** * *	900
PE47-OprD	AACCGCATCA----AGGTGATCAAGCGCATGGCCTATGGATTTCGGGACTCGGAATAC	118
PA01-OprD	CAGCCGTTTGATTATATCGGCTTCGGCCGCAACGGCTCTGGCGCAGG--TGCGACTCGA * * * * * * * * * * * *	958
PE47-OprD	TTCTTTCTGAAAAAACAAGGCCGCTTCCCCGGGAAAGCGCGATGAACCAGAAAATCCTGGC	178
PA01-OprD	TTTTCCTCGCCAACTCTGTCCAGTACTCCGACTTCAACGGCCCTGGCGAGAAAATCCTGGC ** * * ** * ** * ** * * *****	1018
PE47-OprD	AGGCCCGCTACGACCTGAACCTCGCCTCCTATGGCGTTCGGGCTGACTTTCATGGTCC	238
PA01-OprD	AGGCTCGCTACGACCTGAACCTAGCCTCCTATGGCGTTCGGGCTGACTTTCATGGTCC **** *****	1078

```

PE47-OprD      GCTATATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACCAAGATGTCTGACAACAACGTCGGCTATA      298
PA01-OprD      GCTATATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACCAAGATGTCTGACAACAACGTCGGCTATA      1138
*****

PE47-OprD      AGAACTACGGCTACGGCGAGGACGGCAAGCACCACGAGACCAACCTGGAAGCCAAGTACG      358
PA01-OprD      AGAACTACGGCTACGGCGAGGATGGCAAGCACCACGAAACCAACCTCGAAGCCAAGTACG      1198
*****

PE47-OprD      TGGTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTG-----                               387
PA01-OprD      TGGTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTCTGTTCCGCATCCGCCAGGCCTGGCACCGTG      1258
*****

PE47-OprD      -----                               387
PA01-OprD      CCAACGCCGACCAGGGCGAAGGCGACCAGAACGAGTTCCGCCTGATCGTCTGACTATCCGC      1318

PE47-OprD      -----                               387
PA01-OprD      TGTCGATCCTGTAA      1332

```

**Anexo 6. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *oprD* de la cepa PE47, con la secuencia del gen *oprD* de PAO1. Secuenciación realizada con el primer OprDlong-F y OprDlong-R**

```

PE47-OprD      -----CGC      3
ISPa61         CGCCCGGGACAGCGGCCTCGCGCCGCTACAGCGCTTCGCTCGCAACCTGGCGCAAATACGC      900
*****

PE47-OprD      CCGAGGCATCCTTGCAGTGCCTCACTTCCACATGCATACCAGCGTCTTGAGGGTGTAA      63
ISPa61         CCGAGGCATCCTCGCCAGTGCCTCACTTCCATATGCATACCAGCGTCTTGAGGGCGTAA      960
*****

PE47-OprD      CAACCGCATCAAGGTGATCAAGCGCATGGCCTATGGATTTCGGGACTCGGAATACTTCTT      123
ISPa61         CAACCGCATCAAGGTGATCAAGCGTATGGCCTATGGTTTTTCGGGACTCGGAATACTTTTT      1020
*****

PE47-OprD      TCTGAAATCAAGGCGCCTTCCCGGGAAAGCGCGATGAACAGAAATCCTGGCAGGCC      183
ISPa61         CCTGAAATCAAGGCTGCCTTCCCGGGAAAGCGCGATGAACATATTTTITGGTGTCCCA      1080
*****

PE47-OprD      CGCTACGACCTGAAGCTCGCCTCCTATGGCGTTCCCGGCTGACTTTCATGGTCCGCTAT      243
ISPa61         GAAGTCGGCCCGAGTCTTGGGTACGTCCGCGCCTTTGAAACGCGTCCGTGCGATACGCCAG      1140
** **      ** * * *      ** * *      * *      * * * *

PE47-OprD      ATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACCAAGATGTCTGACAACAACGTCGGCTATAAGAAC      303
ISPa61         CACCGTGG-----AGTAGCTGATGTAGCCGACGCTGTATTCGTCCTTGAGGCT      1188
* ***      * * * * *      * * * * *

PE47-OprD      TACGGCTACGGCGAGGACGGCAAGCACCACGAGACCAACCTGGAAGCCAAGTACGTGGTC      363
ISPa61         GTCGGGTATTTGCGCGGCATTGGGAATCAGC-----                          1219

```

**Anexo 7. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *oprD* de la cepa PE47 con respecto a la secuencia de inserción ISPa61 (familia ISL3). Secuenciación realizada con el primer OprDlong-R**



PE213-OprD	-----	609
PA01-OprD	AACGGCTCTGGCGCAGGTGGCGACTCGATTTTCCTCGCCAACCTGTCCAGTACTCCGAC	990
PE213-OprD	-----	609
PA01-OprD	TTCAACGGCCCTGGCGAGAAATCCTGGCAGGCTCGCTACGACCTGAACCTAGCCTCCTAT	1050
PE213-OprD	-----	609
PA01-OprD	GGCGTTCCCGCCTGACTTTCATGGTCCGCTATATCAATGGCAAGGACATCGATGGCACC	1110
PE213-OprD	-----	609
PA01-OprD	AAGATGTCTGACAACAACGTCGGCTATAAGAACTACGGCTACGGCGAGGATGGCAAGCAC	1170
PE213-OprD	-----	609
PA01-OprD	CACGAAACCAACCTCGAAGCCAAGTACGTGGTCCAGTCCGGTCCGGCCAAGGACCTGTCTG	1230
PE213-OprD	-----	609
PA01-OprD	TTCCGCATCCGCCAGGCCTGGCACCGTGCCAACGCCGACCAGGGCGAAGGCGACCAGAAC	1290
PE213-OprD	-----	609
PA01-OprD	GAGTCCGCCTGATCGTCGACTATCCGCTGTCGATCCTGTAA	1332

**Anexo 8. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *oprD* de la cepa PE213, con la secuencia del gen *oprD* de PA01. Secuenciación realizada con el primer OprDlong-F.**

```

PE213-OprD      ACTCAGTTCGCCGTGGCCGACGCATTTCGTCAGCGATCAGGCCGAAGCGAAGGGGTTTCATC 120
ISPa1328      ----- 0

PE213-OprD      GAAGACAGCAGCCTCGACCGAGGGTGTCCGAAATTTTGTGTAACCGGCTCATGAGCGACA 180
ISPa1328      -----GAGGGTGTCCGAAATTTTGTGTAACCGGCTCATGAGCGACA 41
                *****

PE213-OprD      CTGTCGCTGAGAAGTGGAGACACCCATGAACAAGACGCCCCACACCATTACCGACGAACTG 240
ISPa1328      CTGTCGCTGAGAAGTGGAGACACCCATGAACAAGACGCCCCACACCATTACCGACGAACTG 101
                *****

PE213-OprD      CTGGATCAGCTTCTGGCCAATTATCAGAAGCCTGAAGACTTGATCGGTACCGACGGCATC 300
ISPa1328      CTGGATCAGCTTCTGGCCAATTATCAGAAGCCTGAAGACTTGATCGGTACCGACGGCATC 161
                *****

PE213-OprD      CTCAAGCAACTGACCAAGAAGTTGGTCGAGCGTGCCTGGATGCCGAGCTGACCCACCAC 360
ISPa1328      CTCAAGCAACTGACCAAGAAGTTGGTCGAGCGTGCCTGGATGCCGAGCTGACCCACCAC 221
                *****

PE213-OprD      CTGGGCCACAACAAGCATCAGCCTGTGAGCAATTGGATGGGCAACACCCGCAACGGTTTC 420
ISPa1328      CTGGGCCACAACAAGCATCAGCCTGTGAGCAATTGGATGGGCAACACCCGCAACGGTTTC 281
                *****

PE213-OprD      AGCAAGAAGAACTCAAGGGCGAGTTCGGTGAAGTGCATCGAGGTACCGCGCGACCGG 480
ISPa1328      AGCAAGAAGAACTCAAGGGCGAGTTCGGTGAAGTGCATCGAGGTACCGCGCGACCGG 341
                *****

PE213-OprD      CATGGCACCTTCGATCCGCAGATCATCGAGAAGCACCAGACCCGCTGGACGGGCTTCGAC 540
ISPa1328      CATGGCACCTTCGATCCGCAGATCATCGAGAAGCACCAGACCCGCTGGACGGGCTTCGAC 401
                *****

PE213-OprD      GACAAGATCCTTTCGCTGTATGCCCGCGGCATGACGGTGCAGGATCCAGGCGCACTTG 600
ISPa1328      GACAAGATCCTTTCGCTGTATGCCCGCGGCATGACGGTGCAGGATCCAGGCGCACTTG 461
                *****

PE213-OprD      CAGGAAATG----- 609
ISPa1328      CAGGAAATGTACGGTCCGAGGTGTCACCCAGCCTGATCTCCTCGGTGACCGACGCGGTG 521
                *****

```

**Anexo 9. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *oprD* de la cepa PE213 con la secuencia de inserción ISPa1328. Secuenciación realizada con el gen *OprD*long-F.**

#### Anexo 9. Actividades realizadas durante la maestría

- **Soto-Acosta Flor María**, Esquivel-Olivares Dora Cecilia, Rocha-Gracia Rosa del Carmen, Lopez-Gracia Alma, Castañeda-Lucio Miguel, Jimenez-Flores Guadalupe, Lozano-Zarain Patricia. **Participación de diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa***. XLIV Congreso Anual de la AMIMC. **Poliforum de León, Gto. 22 al 25 de mayo 2019.**
- Soto-Acosta Flor María, Rocha-Gracia Rosa del Carmen, Castañeda-Lucio Miguel, Lopez-Gracia Alma, Jimenez-Flores Guadalupe, Esquivel-Olivares Dora Cecilia, Lozano-Zarain Patricia. **Participación de bombas de expulsión, porina OprD, producción de biopelícula y alginato en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa***. II Congreso Internacional de Microbiología Básica y aplicada. **Unidad de Seminarios BUAP, Puebla Puebla. 11 – 13 de septiembre 2019.**