



# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Medicina  
Licenciatura en Biomedicina  
Eje terminal en Microbiología

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

## **Determinación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas y bombas de expulsión en *Pseudomonas aeruginosa***

Tesis para obtener el grado de:  
Licenciada en Biomedicina

Presenta  
Midory Sánchez Rentería

Director de tesis  
D.C. Patricia Lozano Zarain

Puebla, Pue. Abril, 2021

## **RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad** del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por permitirme realizar el presente trabajo bajo la dirección de la **D.C. Patricia Lozano Zarain**.

Al **Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla**, que a través de la **Q.F.B. Guadalupe Jimenez Flores** y el **M.C.M.I. José Luis Gálvez Romero** que participaron en la donación de cepas, desarrollo y autorización del proyecto de investigación (Proyecto No. 188.2018).

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la **D. C. Patricia Lozano Zarain**, por todo su atención y apoyo brindado durante la realización de este trabajo, estando siempre pendiente a cada momento. Muchas gracias Dra por darme la oportunidad de formar parte del LMHyC, gracias a ello aparte de llevarme conocimiento e interés por la línea de investigación en la que se trabaja, me permitió conocer a personas y formar parte de una familia científica. Le agradezco mucho no solo por su atención en la parte académica, sino también por estar pendiente en otros momentos. Me llevo una gran experiencia con aprendizajes y enseñanzas al ser parte de un laboratorio y conociendo el trabajo de investigación. Gracias Dra Paty.

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por el tiempo brindado en cada revisión, por las observaciones y comentarios para la mejora de este trabajo y también por su apoyo para llevarlo a cabo. El que pudiera realizar este estudio es algo que de igual manera se lo debo a usted, por su atención y cuidado en el laboratorio, sabiendo que podía contar con su apoyo y ayuda en cualquier situación que se presentara.

A la **D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández**, por el tiempo dedicado en cada revisión y por cada retroalimentación y sugerencia brindada, que permitieron reforzar este trabajo. Así también le agradezco Dra en la parte académica, como estudiante de Microbiología Clínica y Antibioticoterapia, ya que como maestra me proporciono de herramientas para ir saliendo adelante en mis estudios y carrera.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A **Dios** y a la **Virgen**, por guiar mi camino para poder estudiar esta licenciatura, lo que en un principio llego a costar trabajo, pero que al final después de mucho esfuerzo se logró, y por haberme acompañado en el transcurso de toda ella.

A mis papas **Lidia** y **José Luis**, por su infinito apoyo, por estar conmigo en buenas y malas, y brindarme de todas las oportunidades y herramientas para que pudiera estudiar la carrera que había elegido. Por acompañarme en cada etapa, otorgándome de su tiempo y esfuerzo para que no me faltara nada y pudiera contar con una educación. Gracias ma y pa por cada sacrificio que realizaron para que contara con la posibilidad de estudiar y cursar una carrera, lo que he logrado hasta el día de hoy es debido a ustedes. Muchas gracias, los quiero y amo mucho.

A **Abelardo**, por estar conmigo en cada momento, por brindarme su apoyo de forma incondicional, darme ánimos y palabras de aliento, decirme que las cosas irían bien cuando algo me preocupaba y proporcionarme tranquilidad. Así como por estar al pendiente, otorgarme su ayuda cuando la necesitaba y por preocuparse porque estuviera bien. El saber que cuanto contigo es algo significativo para mí y que agradezco mucho con todo el corazón. Mucho, mucho, mucho, demasiado un montón.

A **Andi**, por su consejos y ayuda cuando necesitaba entender un poco de la parte médica y más que nada por su apoyo, ánimo y comprensión en todos estos años de amistad. Gracias por estar conmigo cuando lo he necesitado, me alegra que nos sigamos manteniendo unidas, deseando lo mejor una para la otra. Te quiero mucho.

A **Alma** y **Flor**, por encaminarme en el laboratorio y en el trabajo con *Pseudomonas*, guiándome, dando consejos e incluso proporcionándome de su tiempo para explicarme las cosas y practicar conmigo cuando requerí exponer mi trabajo de investigación. Gracias Alma por tu apoyo y ayuda, gracias Flor por tu disposición y paciencia, les guardo un gran cariño.

A **Jessi**, por estar al pendiente en todo momento, desde planeaciones hasta aquellos resultados que daban dolor de cabeza, como la acetilasa. Por apoyarme de manera cercana cuando tenía dudas, requería de ayuda con mis escritos y presentaciones; aconsejándome sobre cómo mejorar y estando atenta a que tal me iba. Te agradezco mucho Jessi por todo tu apoyo, por tomar parte de tu tiempo en ayudarme y por la disposición que siempre me brindaste, lo valoro mucho.

A mis compañeros de laboratorio **Marco, Miranda, Rene, Pato, Eder** y **Mariela**, que ya sea tuviera una duda o requiriera de su ayuda, siempre tuvieron una buena disposición al apoyarme con el trabajo de laboratorio. A **Cristi, Deysi, Elena, Edwin** y **Denisse**, con quienes podía acudir si tenía alguna pregunta o llegaba a necesitar algo y no faltaba que me proporcionaran de su apoyo; al llegar temprano, explicarme alguna técnica o ayudándome con el trabajo. A **Ceci, Brenda** y **Lore** que me brindaron de su ayuda tanto si era por cosas pequeñas, hasta cuando tocaba hacer actividades laboriosas y en las que de manera amable no faltaba que me apoyaran. Algo que también agradezco, son los momentos divertidos que se compartieron en cumpleaños, convivios y reuniones con todos los del laboratorio, fueron ocasiones muy divertidas.

A las niñas, **Gaby, Diana G, Yess**, compañeras y amigas desde el primer año de carrera con las que siempre conte, de quienes no faltaban los ánimos, el apoyo, ayuda y los mejores deseos. Con las que compartí grandes platicas, momentos e incluso aventuras y que aun cuando tomamos caminos diferentes en la licenciatura nos mantuvimos juntas, pendientes de como nos estaba yendo. Ustedes son personas que agradezco el haber conocido, las quiero niñas.

A **mis compañeros** del eje de microbiología, con quienes logre una buena convivencia, tanto en el salón como fuera de él, pasando momentos divertidos en clase y acompañándonos cuando algo llegaba a suceder. A la vez que no faltaba me dieran su ayuda o apoyo cuando lo necesitaba. Con algunos de ustedes estuve desde el principio de la carrera y me alegró que continuáramos juntos en eje, son amigos a los que les tengo cariño. A otros los conocí hasta el instituto y me hace feliz la cercanía y amistad que se llegó a formar. Los juego de UNO serán algo memorable.

Y de manera muy especial quiero resaltar a una persona. **Dianita**, jamás podría haber imaginado que estaría viviendo sin ti todo este proceso, en ocasiones hablábamos de que como es que sería el titularnos, al ver a nuestros compañeros de laboratorio pasar por ello y me parecía algo lejano. Estuvimos juntas desde el inicio de la carrera y continuó siendo así cuando pasamos a eje, e incluso todavía estuvimos en el mismo laboratorio, con lo que nos fuimos haciendo más cercanas. Agradezco mucho tu compañía, apoyo y ayuda en todo momento; ya sea si algo me preocupaba, tenía dudas o preguntas, o necesitaba de algo. Agradezco las pláticas que compartimos sobre los hobbies que teníamos en común. Agradezco la amistad que me brindaste y que me permitieras ser alguien para ti con quien pudieras hablar de cualquier cosa, reír, hacer bromas y tener la confianza de platicar temas en particular. Se que, si estuvieras aquí en estos momentos, estaríamos pasando juntas por todo lo que conlleva el titularse, ya que hacíamos las cosas a la par. Eres una persona que siempre llevare en mi corazón y a la que recordare con gran cariño por la marca que dejaste en mi vida. Te quiero mucho Diana, descansa en paz.

*“La ciencia también necesita de esto (señalando su corazón) para que pueda funcionar.”*

Martin Landau-Mr. Rzykruski.

Frankenweenie de Tim Burton.

## ÍNDICE

Resumen .....	12
Introducción.....	13
Antecedentes.....	14
Antecedentes generales.....	14
<i>Microorganismos causantes de infecciones hospitalarias</i> .....	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> como microorganismo intrahospitalario	16
Resistencia a los antibióticos.....	18
Mecanismos de resistencia a los antibióticos .....	18
Antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
Antecedentes específicos .....	27
Resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a los antibióticos .....	27
Mecanismos de resistencia a $\beta$ -lactámicos.....	28
Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos .....	28
Mecanismos de resistencia a quinolonas .....	31
Resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en los hospitales .....	33
Justificación .....	36
Planteamiento del problema.....	36
Objetivos .....	37
Objetivo general .....	37
Objetivos específicos .....	37
Esquema general de trabajo.....	37
Material y métodos .....	38
Cepas de estudio .....	38
Condiciones éticas .....	38

Cepas control .....	38
Corroborar el género y especie por pruebas bioquímicas.....	39
Determinación del fenotipo de resistencia por el método de Kirby Baüer .	39
Amplificación de genes de resistencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	41
Extracción de ADN bacteriano por la técnica de ebullición.....	41
Cuantificación y ajuste de ADN .....	42
Amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas.....	42
Concentración mínima inhibitoria en ausencia y presencia del inhibidor de bombas .....	44
Resultados .....	46
Origen e identificación bioquímica para corroborar los aislados de <i>Ps. aeruginosa</i> .....	46
Perfil fenotípico de resistencia .....	47
Detección de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas .....	48
Participación de las bombas de expulsión en la resistencia a GM, AN y CIP ante la presencia de un inhibidor de bombas .....	51
Discusión .....	55
Conclusión.....	66
Perspectivas .....	67
Bibliografía.....	68
Anexos .....	80

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Antibióticos anti-pseudomonas y su mecanismo de acción	26
2	Mecanismos de resistencia de <i>P. aeruginosa</i> a los antibióticos	27
3	Mutaciones en los genes de la DNA girasa y la Topoisomerasa IV involucradas en la resistencia a quinolonas	32
4	Cepas control para la realización de los experimentos	39
5	Puntos de corte establecidos en el CLSI 2018 para la determinación del fenotipo de resistencia	41
6	Primers y condiciones para la amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas	43
7	Componentes para una reacción de PCR	44
8	Puntos de cortes establecidos por el CLSI 2018 para la CMI de GM, AN y CIP	45
9	Correlación entre el gen de resistencia amplificado y el perfil fenotípico de resistencia en cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a aminoglucósidos	49
10	Participación de las bombas de expulsión a los antibióticos GM, AN y CIP ante la presencia del inhibidor de bombas P $\beta$ AN	52-53
11	Cepas que provienen de un mismo paciente	54

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Mecanismos de resistencia a los antibióticos	19
2 (A y B)	Superfamilias de Bombas de expulsión	23
3	Mecanismos de acción del inhibidor de bombas de expulsión fenilalanina-arginil $\beta$ -naftilamida (P $\beta$ AN)	24
4	Sistemas de expulsión en <i>P. aeruginosa</i> implicados en la resistencia a antibióticos	29
5	Sitios de modificación de las principales EMA reportadas en <i>P. aeruginosa</i>	30
6	Esquematización del mecanismo de protección	33
7A)	Distribución de los 67 pacientes en cada uno de los servicios hospitalarios	46
7B)	Origen de los 85 aislados de <i>P. aeruginosa</i> recuperados del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla	46
8	Perfil fenotípico de las 85 cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes	47
9	Detección del gen de resistencia <i>aac(6')-Ib</i> en <i>P. aeruginosa</i>	48
10	Prevalencia del gen de resistencia <i>aac(6')-Ib</i> en 44 cepas de <i>P. aeruginosa</i>	49
11	Detección de los genes de resistencia <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> y <i>qnrS</i>	50
12	Prevalencia de los genes de resistencia <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> y <i>qnrS</i>	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAC</b>	Acetiltransferasas
<b>AN</b>	Amikacina
<b>ANT</b>	Nucleotidiltransferasas
<b>APH</b>	Fosforiltransferasas
<b>ATM</b>	Aztreonam
<b>BLEE</b>	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CICM</b>	Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
<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>EMA</b>	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
<b>EPI</b>	Inhibidor de bombas de expulsión
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>GM</b>	Gentamicina
<b>I+D</b>	Investigación y desarrollo
<b>I.S.S.S.T.E.</b>	Instituto de Seguridad y Servicios de los Trabajadores del Estado
<b>IAAS</b>	Infecciones asociadas a la atención de la salud
<b>IPM</b>	Imipenem
<b>L</b>	Litro
<b>LMHyC</b>	Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad
<b>MDR</b>	Multidrogo resistente
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MF</b>	Medicina familiar
<b>MI</b>	Medicina interna
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Ng</b>	Nanogramos
<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>NN</b>	Tobramicina
<b>NOR</b>	Norfloxacina
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PA<math>\beta</math>N</b>	Fenilalanina-arginil $\beta$ -naftilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PIP</b>	Piperacilina
<b>PPL</b>	Lista global de patógenos prioritarios
<b>SSI</b>	Solución salina isotónica
<b>TIM</b>	Ticarcilina- ac. clavulánico
<b>TSA</b>	Agar soya tripticasa
<b>TZP</b>	Piperacilina-tazobactam
<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros

## Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que ha adquirido importancia en el ambiente hospitalario por su capacidad de ser resistente a múltiples antibióticos, entre los que se encuentran los aminoglucósidos y las quinolonas. Esta propiedad de resistencia representa un desafío terapéutico. Estos antimicrobianos se usan en el tratamiento de las infecciones producidas por *Pseudomonas sp.* y actúan a nivel de procesos celulares importantes para la viabilidad bacteriana como son la síntesis de proteínas y de ADN. De igual modo están los carbapenémicos, antibióticos considerados como última elección en el tratamiento contra *P. aeruginosa*, pero a los cuales se están presentando de forma alarmante niveles de resistencia. El Objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de infecciones nosocomiales. Se trabajaron 85 cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, identificadas como *P. aeruginosa* mediante el sistema semiautomatizado Vitek-2 y pruebas bioquímicas convencionales. Se determinó su perfil fenotípico de resistencia por el método de Kirby Baüer, con la finalidad de seleccionar cepas MDR y específicamente resistentes a aminoglucósidos y quinolonas. A las cepas seleccionadas se les realizó la amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos (*aac(6')-Ib*) y quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) por PCR; y a su vez se identificó la participación de las bombas de expulsión, mediante la determinación de la CMI para gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en presencia y ausencia del inhibidor de bombas fenilalanina-arginil- $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N). De las 85 cepas, 44 se identificaron como MDR; el 35% a piperacilina, 60% a ticarcilina-ac. clavulánico, 20% a piperacilina-tazobactam, 45% a ceftazidima, 41% a cefepime, 37% a aztreonam, 45% a imipenem, 42% a meropenem, 55% a gentamicina, 55% a tobramicina, 40% a amikacina, 51% ciprofloxacina y 50% a norfloxacina. En las cepas resistentes a aminoglucósidos (n=44), el 91% portaron el gen *aac(6')-Ib*, y las cepas resistentes a quinolonas (n=43) no portaron los genes *qnrA*, *B* y *S*. La participación de las bombas de expulsión se observó en el 31% de 16 cepas resistentes a gentamicina, con una disminución de la CMI de 2 a 4 veces, en el 33% de las 15 cepas resistentes a amikacina con una disminución de la CMI de 2 veces y en el 11% de las 36 cepas resistentes a ciprofloxacina con una disminución de la CMI de 2 veces también. Sin embargo, tanto para gentamicina y amikacina se presentaron cepas donde la CMI aumento de 2 a 4 veces en presencia del inhibidor. **Conclusión:** En este estudio se encontraron cepas de *P. aeruginosa* MDR circulantes en un hospital poblano. La resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en algunas de estas cepas, se debe en parte a la participación de bombas de expulsión, mecanismo de resistencia que puede estar involucrado en la expulsión de otros antibióticos, contribuyendo a la MDR de *Pseudomonas aeruginosa* de origen nosocomial.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia, aminoglucósidos, quinolonas, bombas de expulsión.

## Introducción

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de los más grandes problemas a tratar durante el siglo XXI. Si bien el inicio de la era antibiótica supuso una revolución en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, llegando a considerar a los antibióticos como “drogas maravillosas”, la capacidad que las bacterias están presentando para sobrevivir a su acción, es una amenaza creciente que deteriora la eficacia de estos fármacos, siendo entre otras cosas, el uso excesivo e irresponsable, lo que ha contribuido al surgimiento de cepas resistentes (Sabtu *et al.*, 2015; Zaman *et al.*, 2017). En ambientes como lo es el hospitalario, la presencia de resistencia llega a ser alta, al haber una presión de selección debido al uso de antibióticos para tratar y prevenir infecciones (Oromí, 2000).

Entre las bacterias que han adquirido importancia, por la resistencia que presentan a múltiples fármacos, destaca un grupo de patógenos denominado bajo el acrónimo ESKAPE, en el que se incluye *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp*; las cuales son bacterias responsables de la mayoría de las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) (Navidinia, 2016). Dentro del grupo ESKAPE debido a su naturaleza ubicua, persistencia en el ambiente y resistencia innata a múltiples antibióticos e incluso antisépticos, *P. aeruginosa* se cataloga como una de las principales causas de este tipo de infecciones (Alnour & Ahmed-Abakur, 2017).

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio facultativo, no fermentador y es considerado un patógeno oportunista, responsable de una amplia gama de enfermedades infecciosas, particularmente en pacientes inmunocomprometidos (Paz-Zarza *et al.*, 2019; Roca & Ángel, 2014). Además de ser intrínsecamente resistente a diversos antibióticos, tiene la capacidad de adquirir mecanismos de resistencia a través de mutaciones y la adquisición de material genético, lo cual la hace ser un desafío clínico al haber poca disponibilidad de agentes antimicrobianos que puedan actuar contra esta bacteria (Alnour & Ahmed-

Abakur, 2017), siendo motivo de preocupación en el ambiente hospitalario, al asociarse las infecciones causadas por esta bacteria con altas tasas de mortalidad y morbilidad, estadías prologadas y altos costos en la atención sanitaria (Mesaros *et. al.*, 2007) .

## **Antecedentes**

### **Antecedentes generales**

#### ***Microorganismos causantes de infecciones hospitalarias***

Las infecciones hospitalarias, conocidas también como infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), son aquellas que afectan a un paciente bajo atención médica en un hospital o centro sanitario y que no estaban presentes ni incubándose en el momento de su ingreso. Comprenden a su vez a aquellas infecciones que ocurren durante la prestación de atención médica, pero que se manifiestan después del alta; así como las infecciones ocupacionales como en el personal médico (Khan *et al.*, 2017; Rodríguez, 2018). Como agentes causales pueden encontrarse diversos microorganismos, con la capacidad de provocar daño en el ambiente sanitario. Las bacterias son el agente más común, siendo responsables del 90% de este tipo de infecciones, mientras que los virus y hongos contribuyen en menor medida a comparación de las infecciones bacterianas (Khan *et al.*, 2015).

Principalmente existen cuatro tipos de IAAS: 1) infecciones del torrente sanguíneo asociada a la vía central, 2) neumonía asociada al ventilador, 3) infecciones de sitio quirúrgico e 4) infecciones del tracto urinario asociada a catéter. Un grupo selecto de patógenos se ha identificado como responsable de la mayoría de estas infecciones, destacando por su propensión a la resistencia a antibióticos y la gravedad que causan (Pendleton *et al.*, 2013). Los microorganismos que resaltan son los del grupo ESKAPE: el que a su vez hace referencia a la capacidad que tienen de “escapar” del efecto bactericida de los antibióticos (Ma *et al.*, 2020).

La característica común que tiene este grupo de patógenos es su alta prevalencia de resistencia a múltiples antibióticos, encontrándose principalmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI), donde pacientes inmunodeprimidos que padecen diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, pulmonares y renales se ven muy afectados. A su vez, se encuentran catalogados en la lista global de patógenos prioritarios (PPL) de bacterias resistentes a los antibióticos, para ayudar a priorizar la investigación y desarrollo (I + D) de tratamientos antibióticos nuevos y eficaces, establecida por la OMS en 2017 (Founou *et al.*, 2017; World Health Organization, 2017) **Anexo 1**.

Las infecciones causadas por estos patógenos involucran altos índices de mortalidad y morbilidad, altos costos en la atención de la salud, diagnósticos inciertos y falta de confiabilidad en el tratamiento empírico. Por lo que la aparición y diseminación de estas bacterias en el ambiente hospitalario llega a resultar en consecuencias negativas tanto para la salud del paciente, como para la disponibilidad de un tratamiento (Founou *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2020).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, aerobia facultativa, ubicua y persistente en el ambiente, al ser capaz de sobrevivir con los requerimientos mínimos nutricionales. Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y fue aislada por primera vez en 1882 por Carle Gessard. Presenta una forma bacilar y un flagelo polar que le confiere motilidad. Puede crecer a temperaturas de entre 20 y 43°C diferenciándose del resto de las especies de *Pseudomonas* al crecer a altas temperaturas. Se caracteriza por la producción de pigmentos como pioverdina y piocianina, así como por pertenecer al grupo de bacterias no fermentadoras, que comparten la incapacidad para fermentar lactosa (Paz-Zarza *et al.*, 2019; Roca & Ángel, 2014).

## ***Pseudomonas aeruginosa* como microorganismo intrahospitalario**

Dado que *P. aeruginosa* cuenta con la capacidad de vivir en condiciones adversas y posee diferentes factores de virulencia, se ha convertido en uno de los principales microorganismos relacionados con las IAAS. Se le cataloga como un patógeno oportunista siendo responsable de una diversidad de infecciones, afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos (Paz-Zarza *et al.*, 2019; Streeter & Katouli, 2016). En el ambiente hospitalario *P. aeruginosa* coloniza con mayor frecuencia, cuando el paciente se encuentra bajo administración de antibióticos de amplio espectro, que a su vez afectan la flora normal. Así mismo, un paciente está predispuesto a adquirir infecciones por esta bacteria, debido a la ruptura de las barreras naturales, por la inserción de dispositivos médicos intravasculares, tubos endotraqueales y/o catéteres urinarios (Alnour & Ahmed-Abakur, 2017).

Entre las infecciones asociadas a *P. aeruginosa* se encuentran:

### a) Infecciones del tracto respiratorio

Se ha observado que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de establecerse en las vías aéreas de pacientes con fibrosis quística (FQ) como en los que padecen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). De igual manera es causante de neumonía, encontrándose entre las neumonías nosocomiales más graves y frecuentes en pacientes críticos, y con ventilación mecánica asistida (neumonía asociada a ventilación mecánica, NAV) (Vall & Mariscal, 2005).

### b) Infecciones del tracto urinario

Con relación a las infecciones de tracto urinario (ITU), *P. aeruginosa* se encuentra entre los principales agentes etiológicos, donde la cateterización es uno de los eventos mecánicos que favorece la entrada de este patógeno a las vías urinarias. (Roca & Ángel, 2014).

#### c) Infecciones del torrente sanguíneo

Actualmente las infecciones del torrente sanguíneo (ITS) causadas por *P. aeruginosa* representan una de las principales causas de bacteriemia nosocomial, siendo las principales fuentes de infección el tracto respiratorio y los catéteres venosos centrales, el tracto urinario, la piel y tejidos blandos (Bassetti *et al.*, 2018).

#### d) Infecciones en piel y tejidos blandos

*P. aeruginosa* es la bacteria que con mayor frecuencia se ha aislado de infecciones en heridas y quemaduras, asociándose a altas tasas de mortalidad y morbilidad en infecciones de heridas causadas por *P. aeruginosa* MDR. Además, existe el factor que puede llegar a diseminarse desde el sitio de infección inicial hacia el torrente sanguíneo causando sepsis (Streeter & Katouli, 2016).

#### e) Queratitis bacteriana

La queratitis bacteriana por *P. aeruginosa* principalmente está asociada con el uso de lentes de contacto; sin embargo, también puede estar involucrada en pacientes con una enfermedad ocular preexistente o en una poscirugía ocular (Streeter & Katouli, 2016).

Otro factor que considerar de *P. aeruginosa*, es su capacidad de encontrarse en diferentes reservorios del ambiente hospitalario, como el agua potable, grifos, regaderas, equipos de terapia respiratoria, endoscopios, desinfectantes, antisépticos, material de limpieza, etc. Los sitios relacionados con el agua y una alta humedad son donde puede ser encontrada esta bacteria con mayor probabilidad (Kerr & Snelling, 2009).

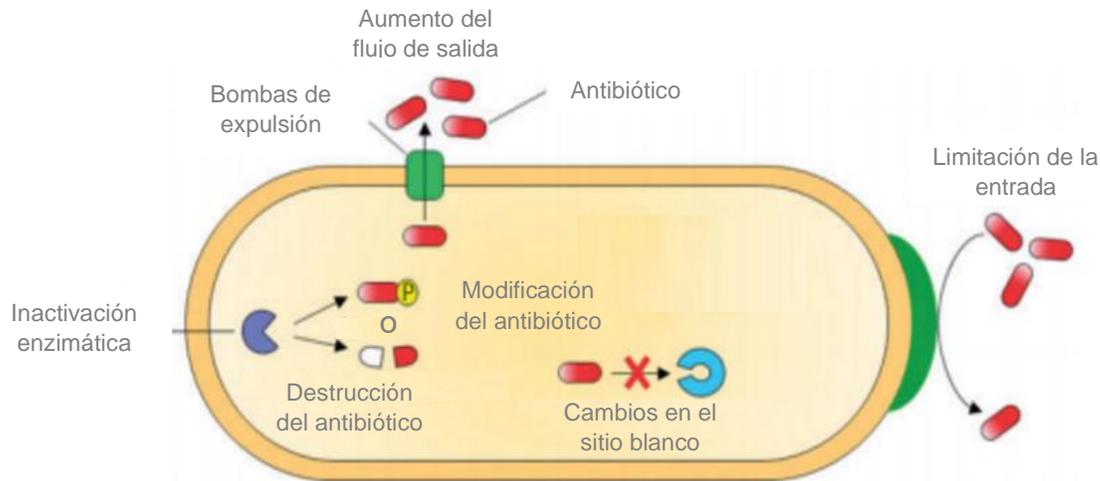
## **Resistencia a los antibióticos**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Foro Económico Mundial (FEM), la resistencia a los antibióticos es uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial; esto es debido a que genera un aumento de la morbi-mortalidad al no poder ser controladas las enfermedades infecciosas, hay una reducción de la eficacia terapéutica lo que puede generar un retroceso de la medicina moderna a la era pre-antibiótica, favorecer la diseminación del microorganismo infeccioso de una persona a otra, un aumento en los costos en la atención a la salud por la necesidad de cuidados intensivos y a su vez por representar una amenaza tanto al comercio como a la economía (Calderón & Aguilar, 2016).

Que un microorganismo presente resistencia es inevitable, es un proceso natural y parte de su evolución (Martínez, 2008). Sin embargo, el uso no adecuado y excesivo de antibióticos han contribuido al incremento de la resistencia, mediante la selección de bacterias no susceptibles a su acción. Lugares como los hospitales representan un factor importante en el desarrollo de la resistencia, por ser un ambiente donde la presión de selección es alta, debido al amplio uso de antibióticos (Oromí, 2000; Prestinaci *et al.*, 2015).

## **Mecanismos de resistencia a los antibióticos**

La resistencia a los antibióticos puede estar mediada por diferentes mecanismos, estando involucrados cuatro principalmente: 1) Inactivación del antibiótico, 2) Cambios en el sitio blanco, 3) Limitación de la entrada del antibiótico y 4) Bombas de expulsión (Rice & Bonomo, 2017). De los cuales una sola cepa bacteriana puede presentar varios de ellos, resultando en la generación de bacterias con un fenotipo multidrogo resistente (MDR) (Cantón *et al.*, 2013; Laws *et al.*, 2019) **(Figura 1)**.



**Figura 1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.** Una bacteria puede presentar resistencia a través de enzimas que modifican o destruyen el fármaco, mediante la protección o modificación del sitio blanco, por cambios en la permeabilidad de la membrana (disminución o mutación de porinas) y por un aumento en la expulsión del antibiótico debido a la sobreexpresión de bombas de eflujo. Imagen modificada de Alav *et al.*, 2018.

### ***Inactivación del antibiótico***

La inactivación del antibiótico es una de las estrategias más exitosas de las bacterias. Involucra la producción de enzimas que destruyen al antibiótico mediante hidrólisis o que modifican su estructura química a través de la transferencia de grupos, impidiendo que el antibiótico interactúe con su sitio blanco (Munita & Arias, 2016).

- Inactivación por hidrólisis

Entre las enzimas con actividad hidrolítica se encuentran principalmente las  $\beta$ -lactamasas, que confieren resistencia a antibióticos de la familia de  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos), al hidrolizar el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico (Suárez & Gudiol, 2009). Se clasifican de acuerdo con la homología de su secuencia de aminoácidos (Ambler) o con respecto a su especificidad de sustrato y perfil de inhibición (Bush-Jacoby-Medeiros) (Laws *et al.*, 2019). Como ejemplo se encuentran las  $\beta$ -lactamasas AmpC, las

carbapenemasas, oxacilinasas y las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Reygaert, 2018; Strateva & Yordanov, 2009).

- Inactivación por transferencia de grupos

Dentro de estas enzimas se encuentran las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA), las cuales se categorizan en tres familias de acuerdo con su capacidad para acetilar (aminoglucósido *N*-acetiltransferasas [AAC]), fosforilar (aminoglucósidos *O*-fosforiltransferasas [APH]) o adenilar (aminoglucósido *O*-nucleotidiltransferasas [ANT]) de forma específica grupos amino o hidroxilo ubicados alrededor del antibiótico. Lo que resulta en la disminución de afinidad hacia su objetivo y con ello la pérdida de su potencial antibacterial.

De las tres familias las AAC comprenden el grupo más amplio de EMA y aunque su principal modo de acción es la acetilación de aminoglucósidos, se ha identificado que una variante de esta familia (AAC(6')-Ib-cr) tiene la capacidad de modificar fluoroquinolonas como lo es el ciprofloxacino, sin alterar su actividad contra los aminoglucósidos (Krause *et al.*, 2016).

### ***Cambios en el sitio blanco***

Las bacterias han desarrollado diferentes estrategias entre las que se incluye la protección del sitio blanco y su modificación (Munita & Arias, 2016).

- Protección del sitio blanco

La protección del sitio blanco implica la asociación física de una proteína de resistencia o proteína de protección, con el blanco del antibiótico, con la finalidad de evitar que este pueda llegar a ser inhibido por el fármaco. Ejemplo de ello son las proteínas Tet(O) y Tet(M) que confieren resistencia a tetraciclina, al desplazar al antibiótico de su sitio de unión en el ribosoma, las proteínas FusB que confieren resistencia al ac. fusídico mediante su unión a un sitio diferente del antibiótico en el factor de elongación, que resulta en un cambio conformacional que restaura su función a pesar de la presencia del antibiótico y las proteínas Qnr, que median una baja resistencia a quinolonas al asociarse con el complejo de escisión que forman

la DNA girasa y topoisomerasa IV con el ADN, inhibiendo la unión del antibiótico (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015; Wilson *et al.*, 2020).

- **Modificación del sitio blanco**

Entre las modificaciones que pueden tener lugar, están las mutaciones puntuales en los genes que codifican para el sitio objetivo del antibiótico, como los genes que codifican para las subunidades de la DNA girasa (*gyrA/gyrB*) y topoisomerasa IV (*parC/parE*), siendo el principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas. Por otra parte, están las alteraciones enzimáticas en el sitio de unión del fármaco, como la metilación del ARNr 16S de la subunidad 30S del ribosoma, por medio de metilasas ARNr 16S, resultando en altos niveles de resistencia a casi todos los aminoglucósidos y/o el remplazo o cambio del blanco original, por nuevas dianas que cumplen funciones similares pero que no son inhibidas por el antimicrobiano. Tal es el caso de la enzima PBP2, una proteína de unión a penicilina (PBP), involucrada en la síntesis de la pared celular la cual presenta una baja afinidad hacia los  $\beta$ -lactámicos y el cambio de D-Ala-D-Ala a D-ala-D-Lac del peptidoglicano confiriendo resistencia a vancomicina (Costello *et al.*, 2018; Munita & Arias, 2016).

### ***Limitación de la entrada del antibiótico***

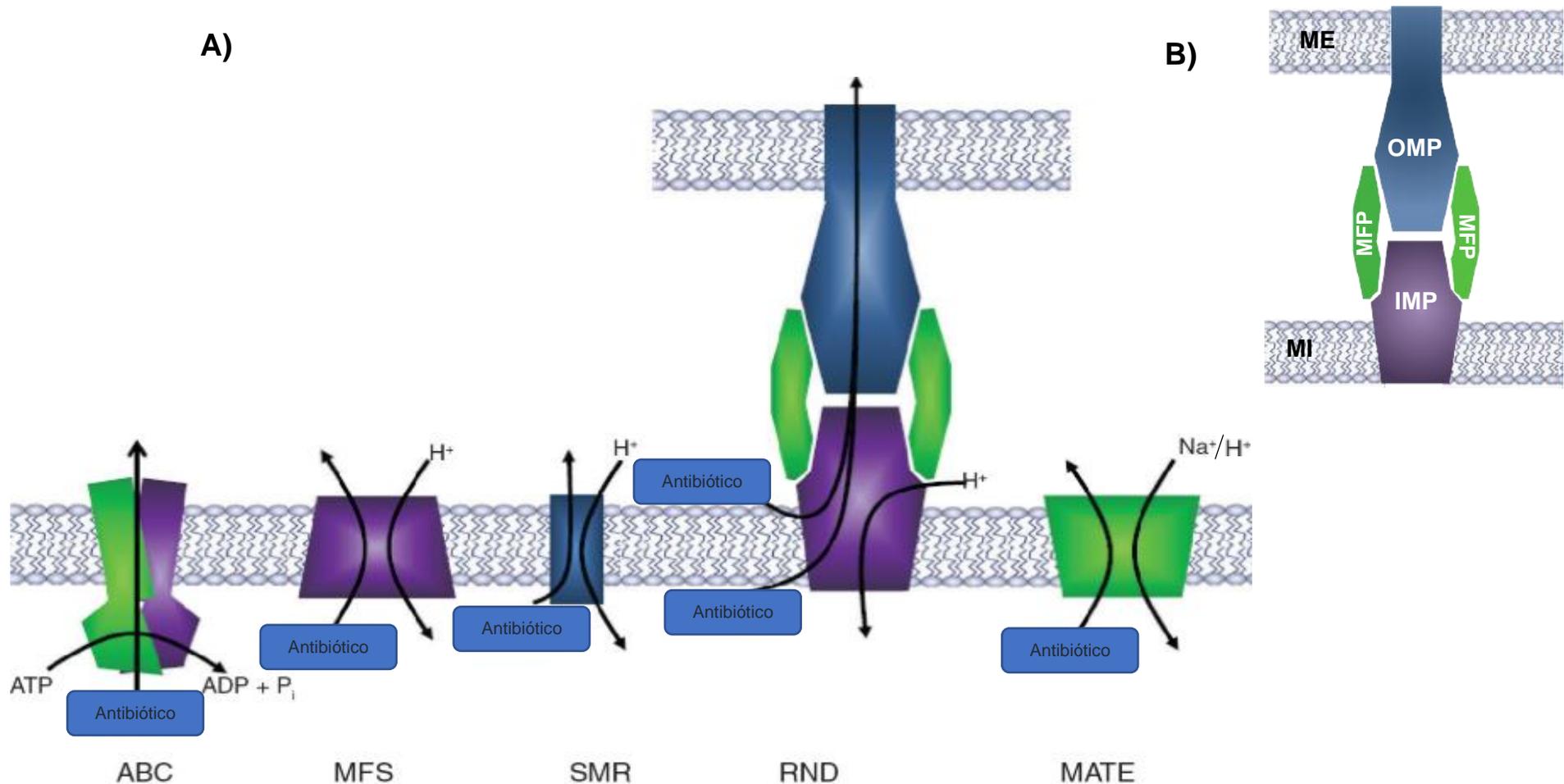
Se da mediante cambios en la permeabilidad que se generan a través de alteraciones en las proteínas porinas de la membrana externa, ya sea por una disminución en el número de porinas presentes o por mutaciones que conducen a su pérdida o cambio funcional, resultando en una resistencia a antibióticos. Un clásico ejemplo son mutaciones en el gen *oprD*, que llegan a provocar la terminación temprana de la traducción de la proteína o mutaciones que causan una regulación negativa llevando a la pérdida de su función e impidiendo el acceso de antibióticos, entre otros (Bello & Dingle, 2018; Blair *et al.*, 2015; Reygaert, 2018).

## ***Bombas de expulsión***

Algunas bacterias poseen proteínas de membrana denominadas bombas de expulsión, las cuales funcionan como exportadoras de antibióticos que actúan a nivel intracelular. Estas bombas expulsan el antibiótico de una manera rápida, por lo que su concentración en el interior de la bacteria no es suficiente para provocar un efecto antibacteriano (Santajit & Indrawattana, 2016).

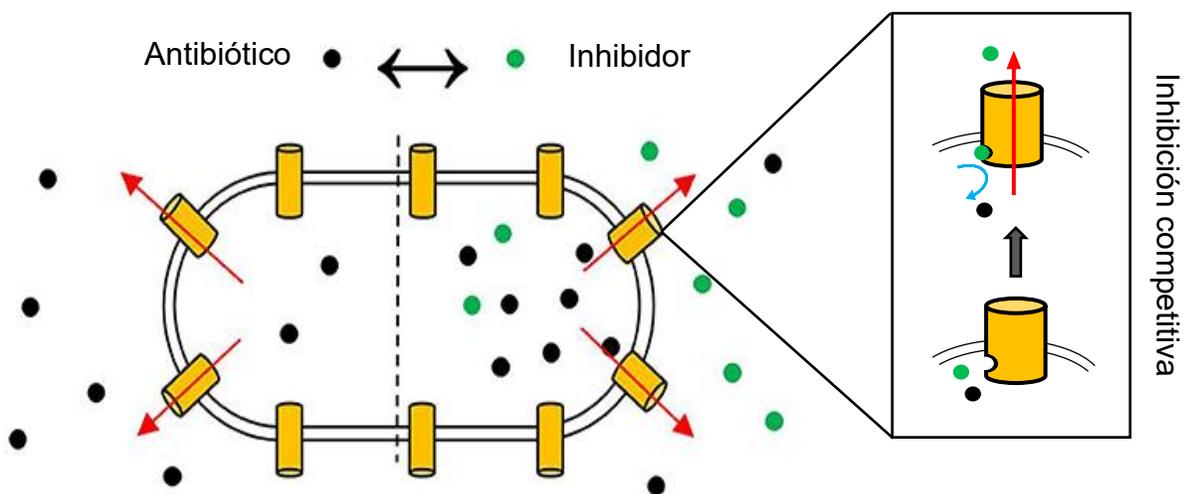
Existen cinco superfamilias de bombas de expulsión: ATP binding cassette (ABC), multidrug and toxic compound extrusion (MATE), small multidrug resistance (SMR), major facilitator superfamily (MFS) y la familia resistance-nodulation-cell division (RND) (Reygaert, 2018) (**Figura 2A**). De acuerdo con su especificidad y mecanismo, pueden ser capaces de expulsar un antibiótico o un amplio espectro de fármacos estructuralmente no relacionados, lo que contribuye significativamente en la multidrogo resistencia (Džidić *et al.*, 2008; Marchetti *et al.*, 2011).

La familia RND encontrada en Gram negativas, es la mejor caracterizada de los sistemas de expulsión y clínicamente relevante, funcionando como un complejo tripartita (proteína de membrana interna [IMP], proteína de fusión de membrana [MFP] y una proteína de membrana externa [OMP]), que forma un canal continuo a través de la envoltura celular, el cual asegura la expulsión del sustrato hacia el medio externo (**Figura 2B**). La sobreexpresión de esta familia de bombas se ha asociado a un incremento en la resistencia a múltiples fármacos. Ejemplos bien estudiados incluyen a las bombas Acr en *E. coli* y Mex en *P. aeruginosa* (Blair *et al.*, 2015; Fernando & Kumar, 2013).



**Figura 2. Superfamilias de Bombas de expulsión.** **A)** Como fuente de energía la familia de transportadores ABC utiliza ATP para exportar antibióticos fuera de la célula. Las familias MFS, SMR y RND emplean la fuerza protón motriz, mientras que la familia MATE se caracteriza por usar como sustrato H<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>. **B)** El sistema de tres componentes de la familia RND permite el transporte de antibióticos a través de ambas membranas. **IMP:** proteína de membrana interna, **MFP:** proteína de fusión de membrana, **OMP:** proteína de membrana externa. Imagen modificada de Blair *et al.*, 2014.

Dada la contribución de los mecanismos de eflujo en la resistencia a los antibióticos, se ha buscado el uso de inhibidores de bombas de expulsión como adyuvantes para potenciar la actividad de los antimicrobianos. El compuesto más conocido es el inhibidor fenilalanina-arginil  $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N), cuyo mecanismo de acción es a través de la inhibición competitiva. La bomba reconoce como sustrato al inhibidor en lugar del antibiótico, expulsándolo fuera de la célula mientras el antibiótico permanece intracelularmente y se incrementa su concentración (Askoura *et al.*, 2011; Lamers *et al.*, 2013) (**Figura 3**).



**Figura 3. Mecanismo de acción del inhibidor de bombas de expulsión fenilalanina-arginil  $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N).** El inhibidor se une a la bomba de expulsión y es expulsado fuera de la célula mientras que el antibiótico permanece intracelularmente. Imagen modificada de Shriram *et al.*, 2018.

### **Antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa***

Los antibióticos que frecuentemente se administran para el tratamiento contra *P. aeruginosa* involucran a tres familias: 1)  $\beta$ -lactámicos, 2) aminoglucósidos y 3) quinolonas; los cuales son los agentes anti-pseudomonas más importantes (Hancock & Speert, 2000; Pachori *et al.*, 2019; Rossolini & Mantengoli, 2005) (**Tabla 1**).

- $\beta$ -lactámicos

Los  $\beta$ -lactámicos son antibióticos bactericidas involucrados en la inhibición de la síntesis de la pared celular, al interferir con la formación del peptidoglicano en la última etapa de su producción, pero también al actuar mediante la activación de una autolisina bacteriana endógena, que lo destruye (Gómez *et al.*, 2015). Los  $\beta$ -lactámicos con mayor actividad ante *P. aeruginosa* incluyen piperacilina, ticarcilina, cefalosporinas de 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación (ceftazidima y cefepime), imipenem y meropenem (Moore & Flaws, 2011).

- Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas con un amplio espectro de acción involucrados en la inhibición de la síntesis de proteínas, al unirse con alta afinidad a la subunidad 30S del ribosoma. Los aminoglucósidos usualmente utilizados contra *P. aeruginosa* involucran a gentamicina, tobramicina y amikacina (Moore & Flaws, 2011; Serio *et al.*, 2018).

- Quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro, los cuales en su mayoría presenta un átomo de flúor en el C6, lo que hace denominarlas “Fluoroquinolonas” (Serio *et al.*, 2018). Esta familia de antibióticos participa en la inhibición de la síntesis de ADN, mediante su interacción con el complejo de escisión formado entre el ácido nucleico y la ADN girasa y la topoisomerasa IV (Pham *et al.*, 2019). Las fluoroquinolonas con actividad anti-pseudomonas incluyen ciprofloxacina, levofloxacina y ofloxacino (Moore & Flaws, 2011).

Tabla 1. Antibióticos anti-pseudomonas y su mecanismo de acción.

Clase de antibiótico	Antibiótico	Mecanismo de acción
Penicilinas	Ticarcilina Penicilina	
Penicilinas/Inhibidor de $\beta$ -lactamasas	Ticarcilina/ac. clavulánico Piperacilina/tazobactam	
Cefalosporinas	Ceftazidima (3 <sup>a</sup> generación) Cefepime (4 <sup>a</sup> generación)	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Monobactam	Aztreonam	
Carbapenémicos	Imipenem Meropenem Doripenem	
Aminoglucósidos	Gentamicina Amikacina Tobramicina	Inhibición de la síntesis de proteínas
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Levofloxacina Ofloxacino	Inhibición de la síntesis de ADN

Tomado de Moore & Flaws, 2011; Pachori *et al.*, 2019.

Teniendo en cuenta que *P. aeruginosa* es un patógeno que llega a ser letal, se recomienda el inicio de un régimen empírico basado en un tratamiento combinado cuando se sospecha de su presencia, seguido de una rápida reducción una vez que se tiene el conocimiento del resultado de la prueba de susceptibilidad, lo cual se vuelve crítico para limitar la presión selectiva con el antibiótico y por tanto el desarrollo de resistencia durante la terapia.

Usualmente el tratamiento combinado incluye un  $\beta$ -lactámico (penicilina, cefalosporina o carbapenémico) asociado a un segundo agente anti-pseudomonas como es un aminoglucósido o fluoroquinolona (preferentemente ciprofloxacina), teniendo como fundamento la terapia combinada, el reducir las posibilidades de selección de mutantes, así como aprovechar la actividad sinérgica entre ambos agentes. Una vez que se ha obtenido el resultado de la prueba de susceptibilidad, se considera la monoterapia con un antibiótico al que el aislado sea susceptible, representando los  $\beta$ -lactámicos una opción potencial como terapia definitiva (Bassetti *et al.*, 2018; Mesaros *et al.*, 2007; Rossolini & Mantengoli, 2005).

Sin embargo, en infecciones serias causada por *P. aeruginosa*, o determinadas situaciones clínicas o microbiológicas (progreso desfavorable del paciente o un perfil particular de resistencia) la terapia combinada se vuelve una opción, así como la monoterapia con aminoglucósidos al tratarse de infecciones en el tracto urinario (French National Authority for Health (HAS), 2019; Rossolini & Mantengoli, 2005).

### Antecedentes específicos

#### Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antibióticos

Se ha demostrado que *P. aeruginosa* presenta un alto nivel de resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos, debido a la expresión de bombas de eflujo que expulsan antibióticos fuera de la célula, la baja permeabilidad de su membrana y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos. Por otro lado su capacidad de adquirir o desarrollar nuevos mecanismos de resistencia, contribuye al desarrollo de cepas MDR, aumentando la dificultad para poder ser eliminada y resultando en más casos de infecciones persistentes (Mesaros *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2019) (Tabla 2).

Tabla 2. Mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos.

Resistencia a	Mecanismo de resistencia	Tipo de resistencia
<b>β-lactámicos</b>	β-lactamasas	Intrínseca/Adquirida
	Disminución de la permeabilidad	Intrínseca/Adquirida
	Bombas de expulsión	Intrínseca/Adquirida
<b>Aminoglucósidos</b>	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	Adquirida
	Bombas de expulsión	Intrínseca/Adquirida
	Metilasas ARNr 16S	Intrínseca/Adquirida
<b>Quinolonas</b>	Mutaciones del sitio blanco	Adquirida
	Bombas de expulsión	Intrínseca/Adquirida
	*Enzima modificadora de aminoglucósidos	Adquirida
	Protección del sitio blanco	Adquirida

*P. aeruginosa* presenta una diversidad de mecanismos de resistencia, los cuales pueden ser intrínsecos (innatos) o haber sido adquiridos (genes de resistencia, cambios mutacionales). \*Variante de una EMA que proporciona resistencia a fluoroquinolonas. Tomado de Meletis & Bagkeri, 2013; Nicolau & Oliver, 2010; Pang *et al.*, 2019.

De acuerdo con la OMS, *P. aeruginosa* está considerada entre los tres primeros microorganismos de su PPL (Lista global de Patógenos Prioritarios) resistentes a antibióticos, encontrándose como un patógeno de prioridad crítica I, para el cual es necesario la I + D (Investigación y Desarrollo) de nuevos antibióticos para su tratamiento (World Health Organization, 2017) **(Anexo 1)**.

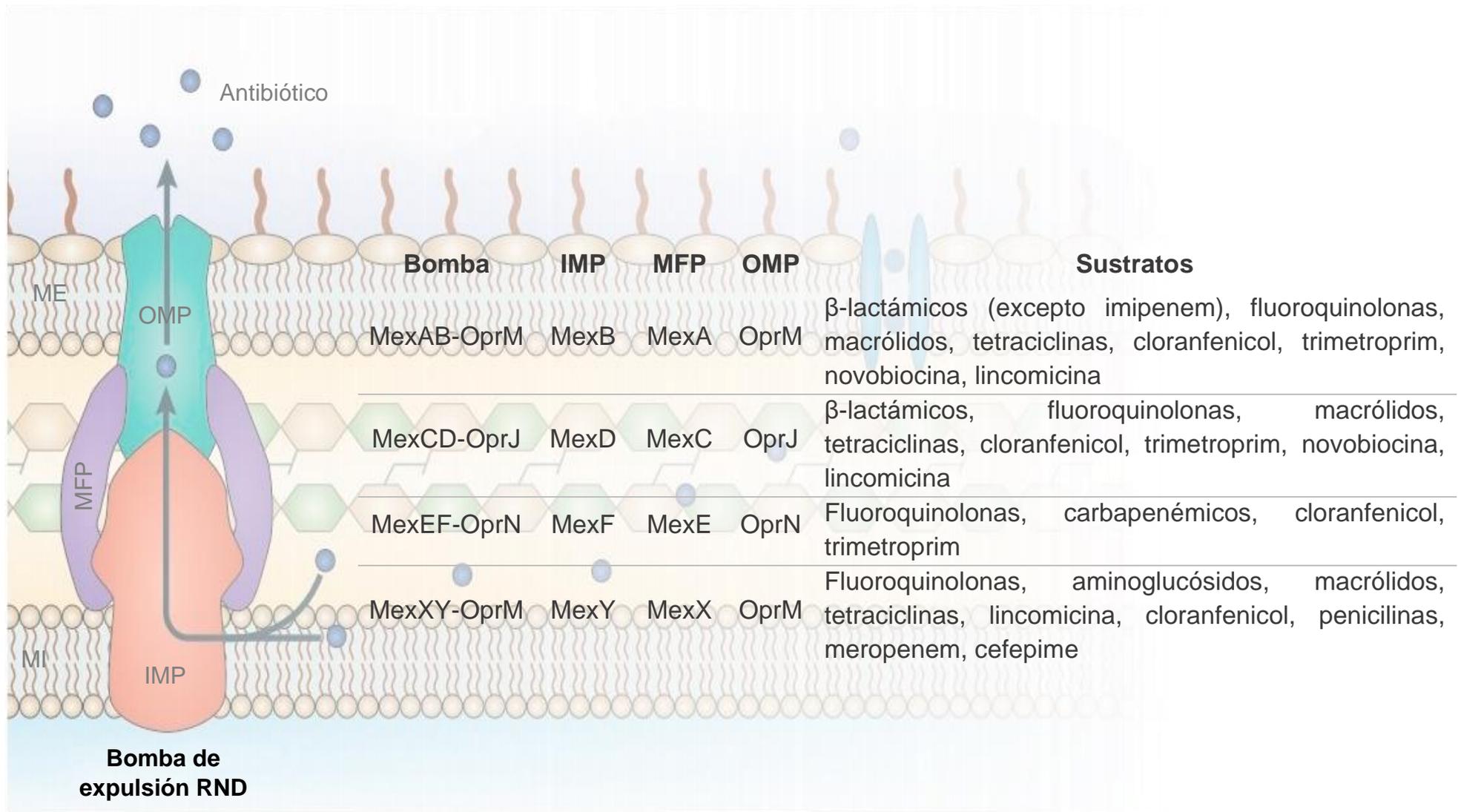
### **Mecanismos de resistencia a $\beta$ -lactámicos**

La producción de  $\beta$ -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia de *P. aeruginosa* a los  $\beta$ -lactámicos. Entre las enzimas que produce se encuentran las cefalosporinasas (AmpC),  $\beta$ -lactamasas hidrolizantes de carbenicilina (PSE-1 y 4), BLEEs (SHV, TEM, VEB, GES-1 y 2, PER-1, BEL-1, KPC, OXA) y carbapenemasas (IMP, VIM, SPM, GIM).

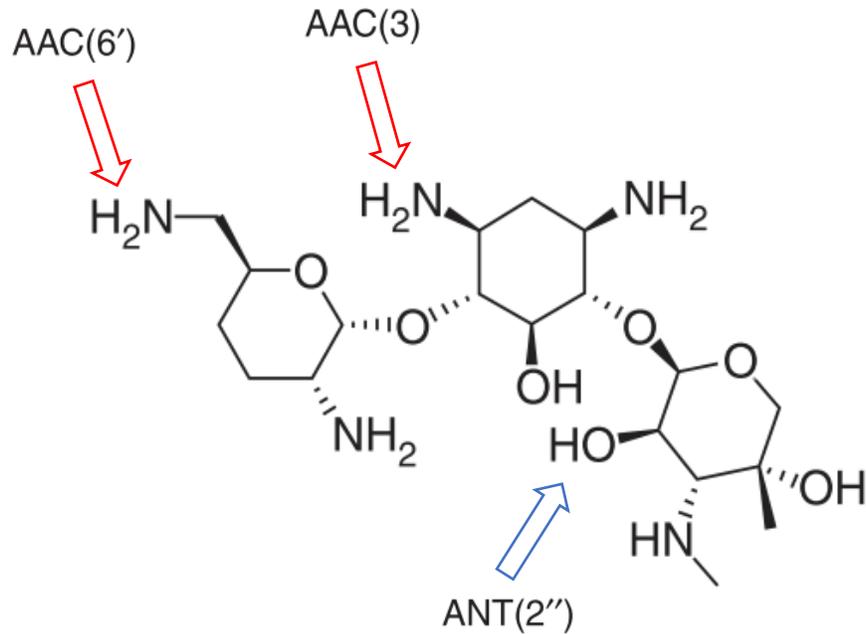
A su vez, se ha reportado que cambios en la permeabilidad, debido a la represión o inactivación de la porina especializada OprD, ubicada en la membrana externa de *P. aeruginosa*, evita la entrada de los  $\beta$ -lactámicos en particular de imipenem (carbapenémico). Asimismo, también se encuentra involucrada la sobreexpresión de las bombas de expulsión como mecanismos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, las cuales están mediadas por cuatro sistemas de eflujo que pertenecen a la familia RND (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM) y que contribuyen a la resistencia a múltiples fármacos anti-pseudomonas (Nicolau & Oliver, 2010; Strateva & Yordanov, 2009) **(Figura 4)**.

### **Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos**

Entre los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos en *P. aeruginosa* se encuentran las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA), siendo las enzimas que acetilan la posición 3 [AAC(3)] y 6' [AAC(6')] junto con las que adenilan en la posición 2'' [ANT(2'')] del antibiótico, las que comúnmente se encuentran en esta bacteria (Poole, 2011) **(Figura 5)**.



**Figura 4. Sistemas de expulsión en *P. aeruginosa* implicados en la resistencia a antibióticos.** IMP: Proteína de membrana interna, MFP: Proteína de fusión de membrana, OPM: Proteína de membrana externa. Tomado de Askoura et al., 2011; El Zowalaty et al., 2015; Strateva & Yordanov, 2009. Imagen modificada de Blair *et al.*, 2015



**Figura 5. Sitios de modificación de las principales EMA reportadas en *P. aeruginosa*.** Las AAC (acetiltransferasas) acetilan los grupos aminos (flecha roja) y la ANT (nucleotidiltransferasa) adenila el grupo hidroxilo (flecha azul) ubicados alrededor del antibiótico gentamicina. Imagen modificada de Krause *et al.*, 2016.

Cinco subfamilias de la AAC(3) se han descrito en *P. aeruginosa* (I, II, III, IV y VI), sin embargo, la AAC(3)-I que confiere resistencia a gentamicina y la AAC(3)-II a gentamicina y tobramicina, son las más comunes. En el caso de la AAC(6'), la cual se considera la familia de AAC que mayormente contribuye en la resistencia a aminoglucósidos, solo dos subfamilias se han reportado, la AAC(6')-I (con su diversidad de variantes) que genera resistencia a tobramicina y amikacina y la AAC(6')-II que lo hace hacia tobramicina y gentamicina (Meletis & Bagkeri, 2013; Strateva & Yordanov, 2009). Como parte de las variantes de la AAC(6')-I, la AAC(6')-Ib se considera la de mayor relevancia clínica al encontrarse en más del 70% de los aislados clínicos de Gram negativos, sin ser *P. aeruginosa* la excepción (Ramirez *et al.*, 2013).

Con respecto a las nucleotidiltransferasas (ANT), es la subfamilia ANT(2'')-I la que principalmente prevalece en *P. aeruginosa*, encontrándose en aislados con resistencia a gentamicina y tobramicina, pero no a amikacina. Otras nucleotidiltransferasas que de igual manera se han reportado, pero son poco

comunes incluyen a la ANT(3") y la ANT(4')-II (variantes IIa y IIb). Y conforme a las fosforiltransferasas son enzimas de la familia APH(3') y APH(2"), las que especialmente se han identificado en *P. aeruginosa* (Meletis & Bagkeri, 2013; Poole, 2005) (**Anexo 2**).

*P. aeruginosa* también presenta una resistencia a aminoglucósidos independiente de las EMA la cual se relaciona con las bombas de flujo de la familia RND, siendo especialmente la bomba de expulsión MexXY-OprM la que actúa contra esta familia de antibióticos y a la que se ha visto implicada en la resistencia a aminoglucósidos en aislados clínicos, pero principalmente en aquellos provenientes de fibrosis quística. A su vez, se encuentra la metilación del ARNr 16S, mediada por un grupo de enzimas denominadas metilasas ARNr 16S, las cuales confieren altos niveles de resistencia a aminoglucósidos clínicamente relevantes: amikacina, gentamicina y tobramicina (Poole, 2011).

### **Mecanismos de resistencia a quinolonas**

Puesto que el objetivo de las quinolonas es la inhibición de la síntesis de ADN, las mutaciones en los genes que codifican para las subunidades de la girasa (*gyrA/gyrB*) y/o de la topoisomerasa IV (*parC/parE*) son el principal mecanismo de resistencia (**Tabla 2**). Lo que resulta en una disminución en la afinidad de la enzima por el antibiótico, conduciendo a una menor susceptibilidad de *P. aeruginosa* a las quinolonas (Pang *et al.*, 2019). Principalmente son mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* los que llegan a encontrarse en aislados altamente resistentes, mientras que mutaciones en *gyrB* y *parE* son menos frecuentes (Meletis & Bagkeri, 2013).

Las bombas de expulsión son otro mecanismo implicado en la resistencia a las quinolonas. Como se mencionó anteriormente *P. aeruginosa* presenta cuatro sistemas de bombas implicados en la resistencia a antibióticos: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM (**Figura 4**) y aunque cada una tiene preferencia por un conjunto de antibióticos, las cuatro contribuyen en la resistencia a las fluoroquinolonas como consecuencia de eventos mutacionales en sus genes reguladores (Rehman *et al.*, 2019; Strateva & Yordanov, 2009). Las bombas

MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN se han vinculado principalmente en la resistencia a fluoroquinolonas en aislados clínicos (Poole, 2011).

**Tabla 3. Mutaciones en los genes de la DNA girasa y Topoisomerasa IV involucradas en la resistencia a quinolonas.**

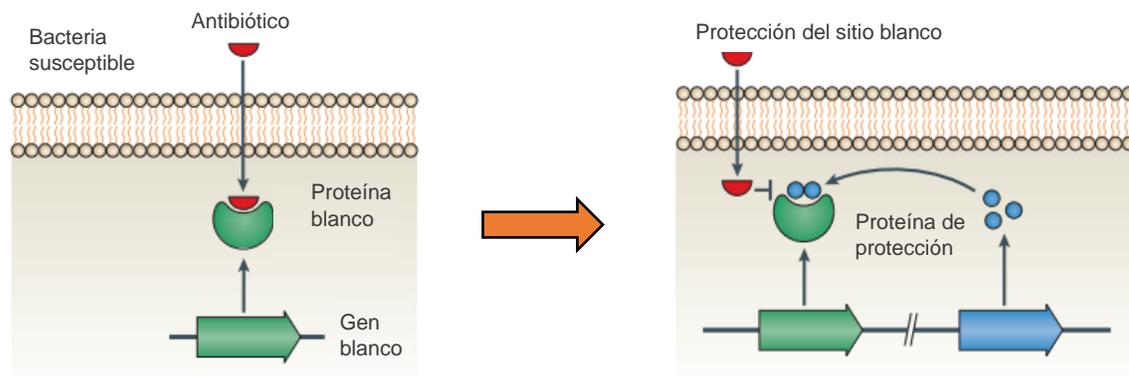
Gen	Cambio aminoacídico
	DNA girasa
<i>gyrA</i>	Thr83Ile, Asp87Asn/Tyr/Gly, Gly81Asp, Thr84Ala, Tyr86Asn, Gln106Leu
<i>gyrB</i>	Ser466Phe/Tyr, Glu468Asp/His, Gln467Arg
	Topoisomerasa IV
<i>parC</i>	Ser87Leu/Trp, Ser80Leu, Glu84Lys

Se ha observado que la combinación de diferentes mutaciones confieren altos niveles de resistencia a quinolonas en cepas de *P. aeruginosa*. Tomado de Fàbrega *et al.*, 2009; López-Causapé *et al.*, 2018; Rehman *et al.*, 2019.

Además de los mecanismos ya descritos, se han identificado en *P. aeruginosa* genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos. Entre ellos está el gen *aac(6')-Ib-cr* que codifica para una variante de la AAC(6')-Ib, la cual acetila el nitrógeno no sustituido del C7 del anillo de piperazina de algunas fluoroquinolonas, entre ellas la ciprofloxacina y la norfloxacina, disminuyendo su actividad antimicrobiana. Esta nueva variante se diferencia de la AAC(6')-Ib por dos mutaciones puntuales W102R y D179Y, responsables en la disminución de la susceptibilidad de las fluoroquinolonas (Aldred *et al.*, 2014; Álvarez-Hernández *et al.*, 2015; Poole, 2011). Por otra parte, recientemente en *P. aeruginosa* se ha identificada una nueva enzima modificadora con actividad fosforilasa, a la cual se ha denominado CrpP y que confiere una resistencia específica a ciprofloxacina (Chávez-Jacobo *et al.*, 2018).

De igual manera se han reportado los genes *qnr*, los cuales se encuentran principalmente en patógenos de la familia *Enterobacteriaceae* y que codifican para proteínas pertenecientes a la familia de repetición de pentapéptidos. Estas proteínas median una baja resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas, al proteger a la girasa y topoisomerasa IV mediante su unión a ellas, inhibiendo la entrada del

antibiótico en el complejo de escisión enzimático que forman (**Figura 6**). Por otra parte, también se ha propuesto que median la resistencia a quinolonas, al disminuir la unión de la girasa y la topoisomerasa IV al ADN, reduciendo el número de blancos enzimáticos disponibles en el cromosoma (Aldred *et al.*, 2014; Álvarez-Hernández *et al.*, 2015). De las cinco familias de genes existentes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*), en *P. aeruginosa* se ha llegado a identificar el gen *qnrA* en cepas aisladas al Sur de China, el gen *qnrB* en cepas aisladas en Polonia y el gen *qnrS* en cepas aisladas en Brasil (Araujo *et al.*, 2016; Michalska *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015).



**Figura 6. Esquematación del mecanismo de protección.** En una bacteria susceptible, el antibiótico es capaz de inhibir la acción de su sitio blanco, mientras que al ser codificada una proteína de protección (ej.: QNR), esta se posiciona en el lugar de unión del antibiótico, evitando que lleve a cabo su función. Imagen modificada de Blair *et al.*, 2015.

### Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en los hospitales

Debido a la importancia que *P. aeruginosa* resistente a los antibióticos tiene en el ambiente hospitalario, diversos estudios se han llevado a cabo para conocer su susceptibilidad antimicrobiana y presencia de mecanismos de resistencia.

Kashif *et al.*, en 2017, en Irán, recuperaron 60 aislados de *P. aeruginosa* de pacientes quemados del Hospital Shahid Motahari, en las que observaron que 97.2% eran resistentes a amikacina, 95% a gentamicina y 94% a ciprofloxacina; y al analizar a las cepas con resistencia a aminoglucósidos, se encontraron CMI de 2 y de 128-256  $\mu\text{g/ml}$  para amikacina y de 8-256  $\mu\text{g/ml}$  para gentamicina, a la par que

identificaron genes de resistencia a aminoglucósidos: *aadA* (87.5%), *aph(6')VI* (85%), *aph(3')-Ib* (60%), *aadB* (55%) y *aac(6')-II* (10%) (Kashfi *et al.*, 2017).

En India, en un estudio llevado a cabo en un centro de salud de tercer nivel, de 140 aislados de *P. aeruginosa* en los que únicamente se estudió la resistencia a aminoglucósidos, el 80% presentó resistencia a gentamicina, el 77.86% a netilmicina, el 72.86% a tobramicina y el 62.14% a amikacina, así mismo se identificó en un 58.57% la *aac(6')-I*, en un 50% la *ant(2'')-I*, en un 32.14% la *aph(3')-I* y en un 8.57% la *aac(3)-II* (Hazra *et al.*, 2019).

Por otra parte, en Túnez Nejma *et al.*, en el año 2017 aislaron 81 cepas de *P. aeruginosa* de muestras de pacientes hospitalizados en diferentes unidades del Hospital Universitario de Monastir, de las cuales el 100% fue resistente a ciprofloxacina, el 96% a gentamicina, el 93% a tobramicina y el 67% a amikacina. De las cepas resistentes a ciprofloxacina identificaron valores de CMI entre 2 a  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ , así como una mutación en *gyrA* (Thr83-Ile) en el 100% de las cepas y una mutación en *parC* (Ser87-Leu) en el 77% de los aislados (Nejma *et al.*, 2017). En Egipto, de 92 aislados de *P. aeruginosa* recuperados de diferentes unidades del Hospital Universitario del Cairo, el 45.6% (42/92) mostro ser resistente a quinolonas (ciprofloxacina y levofloxacina), a la vez que se identificó que el 42.9% (18/42) presentaron genes de resistencia a quinolonas; en una cepa se observó la presencia de la *aac(6')-Ib + qnrA + qnrS*, en dos cepas la *aac(6')-Ib + qnrA*, en tres cepas la *aac(6')-Ib + qnrS* y en doce cepas únicamente la *aac(6')-Ib* (Ali *et al.*, 2018).

En México Espinoza-Tavera *et al.*, en el año 2014, aislaron 84 cepas de *P. aeruginosa* de pacientes con infecciones de pie diabético de la Unidad Médica de Especialidades de la Ciudad de Matamoros, Tamaulipas, identificando que el 90.4% presento resistencia a kanamicina, el 73.8% a gentamicina, el 70.2% a norfloxacina, el 69% a amikacina y el 67.8% a tobramicina (Espinoza-Tavera *et al.*, 2014). Ochoa *et al.*, en el año 2013 en un proyecto llevado a cabo en el Hospital Infantil de México de Federico Gómez, aislaron 92 cepas de *P. aeruginosa* de pacientes pediátricos, observando que el 66.3% presento resistencia a levofloxacina y que 64.1% a

gentamicina y ciprofloxacina, aparte de que el 63% se identificó como cepas MDR (Ochoa *et al.*, 2013).

Además, en un estudio llevado a cabo en el Hospital Regional ISSSTE de Puebla por López-García *et al.*, en el año 2018, con el objetivo de investigar los mecanismos de resistencia en cepas MDR de *P. aeruginosa*. 41 aislados presentaron resistencia a múltiples fármacos, observándose porcentajes de resistencia a ciprofloxacina y norfloxacina del 69%, gentamicina del 68%, tobramicina del 66% y amikacina del 63%, a la vez que se detectaron genes de resistencia a aminoglucósidos (*aac(6')-Ib (aacA4)* y *aac(3)-IIa*) y la participación de bombas de expulsión en la resistencia a quinolonas, al presentarse una disminución en la CMI de ciprofloxacina de  $\geq 2$  veces ante la presencia de un inhibidor de bombas de expulsión (López-García *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en los estudios mencionados denotan la importancia en la investigación de la resistencia de *P. aeruginosa* a antibióticos de la familia de aminoglucósidos y quinolonas. De los cuales se observan porcentajes elevados de resistencia, así como la presencia de diferentes mecanismos, siendo esencial el monitoreo de los perfiles y mecanismos de resistencia. En particular en Puebla donde son pocos los estudios que se han llevado a cabo, desconociendo la prevalencia de resistencia en los hospitales y a su vez de los mecanismos involucrados.

## **Justificación**

*Pseudomonas aeruginosa* representa un problema de salud pública a nivel mundial, al ser un patógeno que se aísla con alta prevalencia en los ambientes hospitalarios. Esta bacteria tiene la capacidad de generar una gran diversidad de infecciones en pacientes inmunocomprometidos, lo que en ocasiones se relaciona a elevadas tasas de mortalidad. La presencia de múltiples mecanismos de resistencia tanto intrínsecos como adquiridos, la posicionan como un reto terapéutico, al haber una limitada disposición de antibióticos que sean útiles para su tratamiento. Conocer los mecanismos involucrados en su resistencia, genera la oportunidad de desarrollar estrategias en los hospitales para un mejor conocimiento de los niveles de resistencia, manejo, control y atención al paciente; evitando a la vez una consecuente diseminación de la resistencia. Por lo que en este estudio se realizó la búsqueda de mecanismos de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en *Ps. aeruginosa* aisladas de un Hospital Poblano.

## **Planteamiento del problema**

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de los principales problemas en la atención a la salud en los ambientes hospitalarios, al impedir que se lleve a cabo el tratamiento adecuado de un paciente. Esto debido a la poca disponibilidad de antibióticos efectivos. Entre los patógenos nosocomiales, *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia está asociado a infecciones y que presenta un amplio perfil de resistencia. Por lo que incluso antibióticos de segunda elección como los aminoglucósidos y quinolonas están dejando de ser útiles contra esta bacteria, convirtiéndose en una amenaza para el sector salud. Es entonces necesario el estudio de la resistencia a estas familias de antibióticos en los hospitales, mediante la identificación de los genes y mecanismos de resistencia que están presentando cepas de *Ps. aeruginosa* aisladas de este ambiente.

## Objetivos

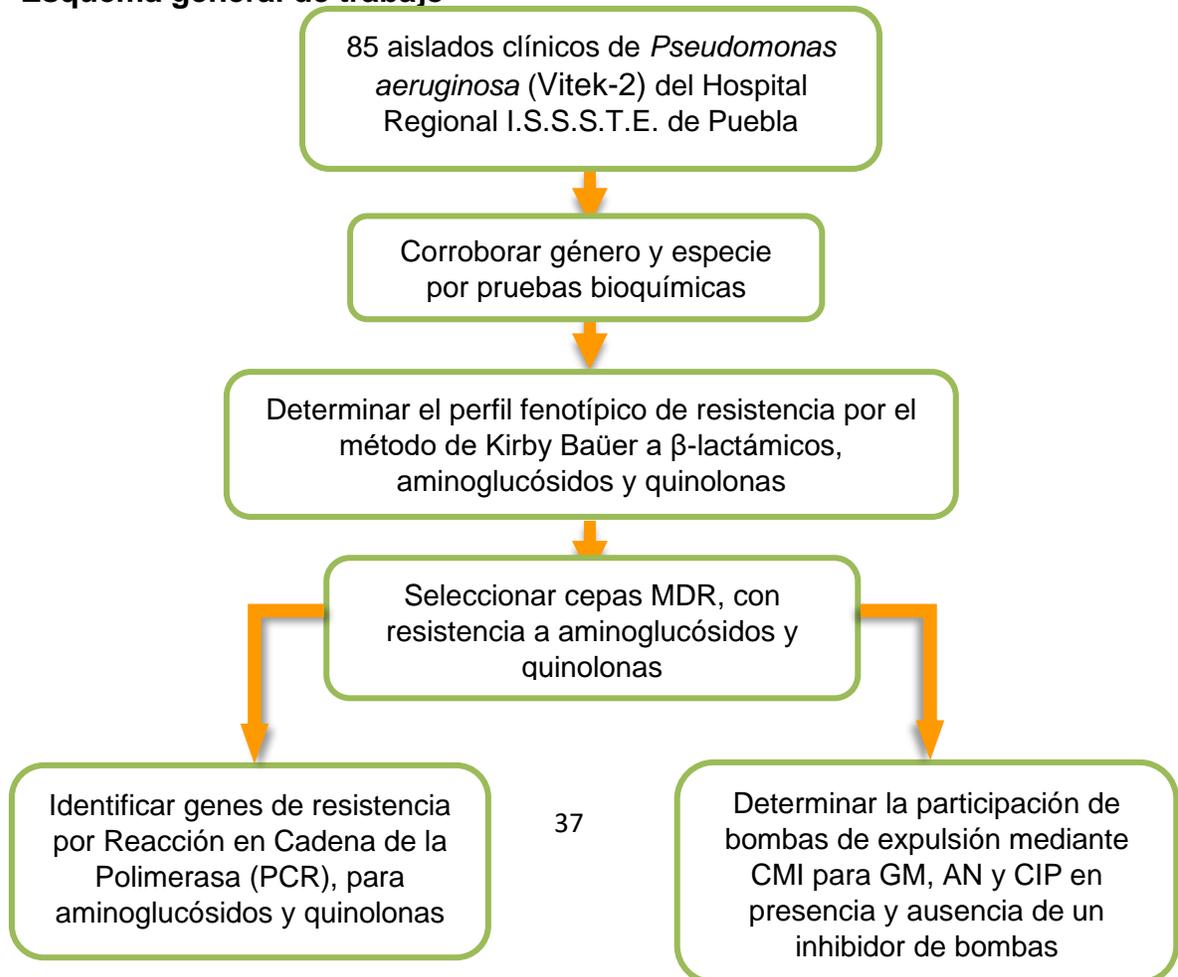
### Objetivo general

Estudiar los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de infecciones nosocomiales.

### Objetivos específicos

1. Corroborar la identidad de cepas de *Ps. aeruginosa* obtenidas de infecciones nosocomiales.
2. Determinar el fenotipo de resistencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Identificar genes involucrados en la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas.
4. Determinar la participación de las bombas de expulsión en la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas.

### Esquema general de trabajo



## **Material y métodos**

### **Cepas de estudio**

Se estudiaron 85 cepas provenientes de aislamientos clínicos de diferentes sitios anatómicos y unidades del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, previamente identificadas por el sistema semiautomatizado Vitek-2 como *P. aeruginosa*. Los aislados fueron recolectados por parte del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) durante el periodo de octubre de 2015 a octubre de 2017 y se almacenaron en crioviales con 1 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y glicerol al 10%, en el ultracongelador a -70°C.

Para realizar los experimentos las cepas se sembraron en placas de Agar Soya Tripticasa (TSA) por la técnica de estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se realizó un segundo pase en placas nuevas de TSA, con la finalidad de corroborar su morfología (colonias pequeñas, redondas, lisas, con borde continuo y en ocasiones brillantes y con pigmento) y pureza, y recuperarlas del estrés sometido por la congelación. A partir de este segundo inóculo se prosiguió a realizar los procedimientos correspondientes.

### **Condiciones éticas**

La recolección de aislados se realizó durante el muestreo de rutina del hospital, manteniendo los datos del paciente bajo anonimato. El protocolo para llevar a cabo este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, con el número de registro 188.2018.

### **Cepas control**

Para el desarrollo de las técnicas realizadas en este estudio, se emplearon cepas como controles positivos y negativos (**Tabla 4**).

**Tabla 4 . Cepas control para la realización de los experimentos**

<b>Amplificación de genes</b>				
<b>Cepa</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Gen Control</b>	<b>Donada por</b>	<b>Fuente</b>
C7226	<i>E. coli</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	LMHyC-CICM, BUAP	Tesis de Doctorado Cortés-Cortés, 2016
C7219 (N. 57)	<i>E. coli</i>	<i>qnrA</i>	LMHyC-CICM, BUAP	Tesis de Doctorado Cortés-Cortés, 2016
SA96	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB</i>	LMHyC-CICM, BUAP	Tesis de Maestría González-Jiménez, 2013
<b>Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en ausencia y presencia de inhibidor de bombas</b>				
<b>Cepa</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Control</b>	<b>Donada por</b>	<b>Fuente</b>
PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	Negativo	Centro de Investigaciones Microbiológicas, BUAP	Dra. Gloria Soberón Dr. Miguel Castañeda
PE21	<i>P. aeruginosa</i>	Positivo	LMHyC-CICM, BUAP	Tesis de Doctorado López-García, 2019

### **Corroborar el género y especie por pruebas bioquímicas**

De las cepas que presentaron un crecimiento adecuado, morfología colonial y pureza en placas de TSA incubadas a 37°C por 24 horas, se tomó una colonia para estriar en forma de cola de ratón en una placa de agar MacConkey. Con una colonia aislada se realizaron las pruebas bioquímicas Triple Azúcar Hierro (TSI), Lisina Hierro Agar (LIA), Movilidad Indol Ornitina (MIO) y Citrato. Las pruebas se prepararon de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se pusieron a prueba de esterilidad a 37° por 24 horas. Pasado el tiempo se llevó a cabo su inoculación y lectura conforme a los lineamientos establecidos en el libro de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin (2004).

### **Determinación del fenotipo de resistencia por el método de Kirby Baüer**

La identificación del perfil de resistencia se llevó a cabo mediante la prueba de difusión en agar usando sensidiscos de  $\beta$ -lactámicos: piperacilina (PIP), piperacilina-tazobactam (TZP), ticarcilina-ac. clavulánico (TIM), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IPM) y meropenem (MEM). De aminoglucósidos: gentamicina (GM), tobramicina (NN) y amikacina (AN), y de quinolonas: ciprofloxacina (CIP) y norfloxacina (NOR) con base al CLSI 2018.

A partir de una placa de TSA sembrada de forma masiva e incubada a 37°C por 18 horas, se tomó una muestra con ayuda del asa bacteriológica, la cual fue suspendida en un tubo de ensayo con 2 mL de solución salina isotónica (SSI 0.9%) hasta ajustar el patrón de turbidez del nefelómetro de McFarland 0.5 (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC). Establecida la solución se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, retirando el exceso al presionar e ir girando el hisopo contra las paredes del tubo. Posteriormente se sembró de forma masiva en placas de 20 mL con agar Müller Hinton (MH) en 3 direcciones diferentes, al rotar la placa 60° cada vez y pasando por último el hisopo sobre la periferia del agar, para conseguir una siembra uniforme.

Ya inoculadas las placas se colocaron los sensidiscos de los 13 antibióticos correspondientes mediante el uso de una pinza estéril, presionando ligeramente sobre ellos para que el contacto con el agar fuera más estable. Por cada cepa se realizaron 3 juegos de placas (con 5, 4 y 4 sensidiscos) **(Anexo 3)**.

Las placas fueron invertidas e incubadas a 37°C de 18 a 24 horas. Se procedió a la lectura de los halos de inhibición con apoyo de una regla, comparando el diámetro formado con los puntos de corte establecidos para cada antibiótico reportados en el CLSI 2018, lo que permitió clasificar cada cepa como resistente (R), intermedia (I) o sensible (S) a cada antibiótico utilizado **(Tabla 5)**.

**Tabla 5. Puntos de corte de establecidos en el CLSI 2018 para la determinación del fenotipo de resistencia**

Antibiótico	Puntos de corte de la zona de diámetro (mm)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Piperacilina	≥21	15-20	≤14
Ticarcilina- ac. clavulánico	≥24	16-23	≤16
Piperacilina- Tazobactam	≥21	15-20	≤14
Ceftazidima	≥18	15-17	≤14
Cefepime	≥18	15-17	≤14
Aztreonam	≥22	16-21	≤15
Imipenem	≥19	16-18	≤15
Meropenem	≥19	16-18	≤15
Gentamicina	≥15	13-14	≤12
Tobramicina	≥15	13-14	≤12
Amikacina	≥17	15-16	≤14
Ciprofloxacina	≥21	16-20	≤15
Norfloxacina	≥17	13-16	≤12

Tomado de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2018.

### **Amplificación de genes de resistencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

#### **Extracción de ADN bacteriano por la técnica de ebullición**

De un cultivo en placa de TSA sembrado de forma masiva e incubado a 37°C por 24 horas, se tomaron de 2 a 3 asadas de inóculo y se colocaron en un tubo eppendorf con 800 µL de SSI estéril. Se homogeneizó la suspensión con el vortex y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, decantando el sobrenadante y repitiendo el lavado 2 veces más. En el último lavado el sobrenadante se descartó por completo y se resuspendió la pastilla con 800 µL de agua inyectable estéril (PISA). El tubo se homogeneizó por completo con el vortex y se dejó en ebullición a baño maría por 10 minutos, se retiró y dejó enfriar, para nuevamente homogeneizar con el vortex y centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos. Al final el sobrenadante obtenido se colocó en un eppendorf estéril y se resguardó a -20°C.

## Cuantificación y ajuste de ADN

La cuantificación de ADN se realizó con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se midió la concentración en ng/ $\mu$ L, tomando en cuenta que el ADN se mide a una absorbancia de 260 nm (A260), en la cual una unidad de densidad óptica equivale a 50  $\mu$ g/mL de ADN de doble hebra (DNA-50).

Para la medición de los lisados el equipo se calibró con una solución blanco (agua estéril) y se colocó 2  $\mu$ L de la muestra previamente homogeneizada. Se tuvo cuidado de limpiar tanto el pedestal superior como el inferior del NanoDrop entre cada medición, con el fin de evitar una medición errónea. De acuerdo con la concentración obtenida, se realizó el ajuste de los lisados a 200 ng/ $\mu$ L en un volumen de 300  $\mu$ L. Se corroboró la concentración de DNA en el NanoDrop y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## Amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas

La identificación de genes de resistencia a aminoglucósidos (*aac(6<sup>+</sup>)-Ib*) y quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) se realizó utilizando primers específicos para cada gen. Se siguieron las condiciones de amplificación de acuerdo con los protocolos estandarizados por el LMHyC, con base en las fuentes de las que se obtuvieron los oligonucleótidos (**Tabla 6**).

Cada reacción se realizó a un volumen final de 10  $\mu$ L, colocando sus componentes en las cantidades y concentraciones establecidas por el laboratorio (**Tabla 7**).

Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 2% y se corrieron a 100 V. Solo se colocó marcador de peso molecular en los casos donde no se contaba con un gen control (*qnrS*). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (BET) durante 10 a 15 segundos y se dejaron desteñir en agua por 20 minutos, para después ser visualizados en el sistema digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems.

**Tabla 6. Primers y condiciones para la amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas**

Gen	Tamaño del gen (pb)	Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones	Fuente
<b>Genes de resistencia a aminoglucósidos</b>						
<i>aac(6')-Ib</i>	612	aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	94°C 5 min 94°C 45s 60°C 45s 72°C 45s 72°C 5 min 20 ciclos	Park et al., 2006
		aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
<b>Genes de resistencia a quinolonas</b>						
<i>qnrA</i>	657	qnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580	95°C 5 min 95°C 1 min 55°C 1 min 72°C 1 min 72°C 7 min 40 ciclos	Cattoir et al., 2007
		qnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
<i>qnrB</i>	681	qnrB-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	95°C 5 min 95°C 1 min 56°C 1 min 72°C 1 min 72°C 7 min 35 ciclos	Cattoir et al., 2007
		qnrB-R	TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA			
<i>qnrS</i>	657	qnrS-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	427	95°C 5 min 95°C 1 min 56°C 1 min 72°C 1 min 72°C 7 min 35 ciclos	Cattoir et al., 2007
		qnrS-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGC			

**Tabla 7. Componentes para una reacción de PCR**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Volumen (µL)</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Agua</b>	-	6.12	-
<b>Buffer</b>	10X	1	1X
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1	2.5 mM
<b>dNTP's</b>	10 mM	0.2	0.2 mM
<b>Primer Forward</b>	25 µM	0.3	0.75 µM
<b>Primer Reverse</b>	25 µM	0.3	0.75 µM
<b>Taq polimerasa</b>	5 U/µL	0.08	0.04 U/µL
<b>ADN</b>	200 ng/µL	1	20 ng/µL
<b>Volumen final</b>	-	10	-

### **Concentración mínima inhibitoria en ausencia y presencia del inhibidor de bombas**

Para determinar la participación de las bombas de expulsión de la familia RND, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de dilución en agar, para los antibióticos GM, AN y CIP tanto en presencia y ausencia de un inhibidor de bombas Fenilalanina-arginil-β-naftilamida (PAβN). Antes de llevar a cabo el procedimiento se corroboró que el inhibidor no perjudicara el crecimiento de las bacterias, sembrando dos placas de MH con y sin PAβN (25 mg/L), esperando que las cepas crecieran de la misma manera en presencia y ausencia del inhibidor.

Se prepararon placas con agar MH suplementadas con el antibiótico de interés, a partir de una concentración de 2 µg/ml hasta 512 µg/ml usando diluciones dobles. Por cada concentración de antibiótico se hicieron dos juegos de placas, uno con el medio y el antibiótico, más una placa con solo medio, y otro con el medio, el antibiótico y el inhibidor de bombas (25 mg/L), más una placa con solo el medio y el inhibidor; Por cada juego fueron 10 placas, nueve placas correspondían a la

concentración de los antibióticos y una placa al control. Las placas fueron sometidas a prueba de esterilidad a 37°C de 18 a 24 horas.

Por cada cepa se preparó una suspensión al 0.5 del nefelómetro de McFarland de la misma forma que para la técnica de Kirby Baüer. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 de la suspensión, en un tubo eppendorf estéril a un volumen de 1000 µL (100 µL de la suspensión y 900 µL de SSI). De las diluciones obtenidas se depositaron por triplicado 2 µL en cada placa de ambos juegos. Una vez inoculadas las placas, se incubaron a 37°C de 16 a 20 horas.

La lectura de las placas se realizó mediante la identificación de la concentración de antibiótico a la que ya no se observó crecimiento de cada cepa, considerándola como su CMI (**Tabla 8**). El criterio para considerar la participación de las bombas de expulsión, fue observar una disminución de al menos dos veces en los valores de la CMI en presencia del inhibidor (Kumita *et al.*, 2009).

**Tabla 8. Puntos de corte establecidos por el CLSI 2018 para la CMI de GM, AN y CIP**

Antibiótico	Puntos de corte de la CMI (µg/mL)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	≤4	8	≥16
Amikacina	≤16	32	≥64
Ciprofloxacina	≤1	2	≥4

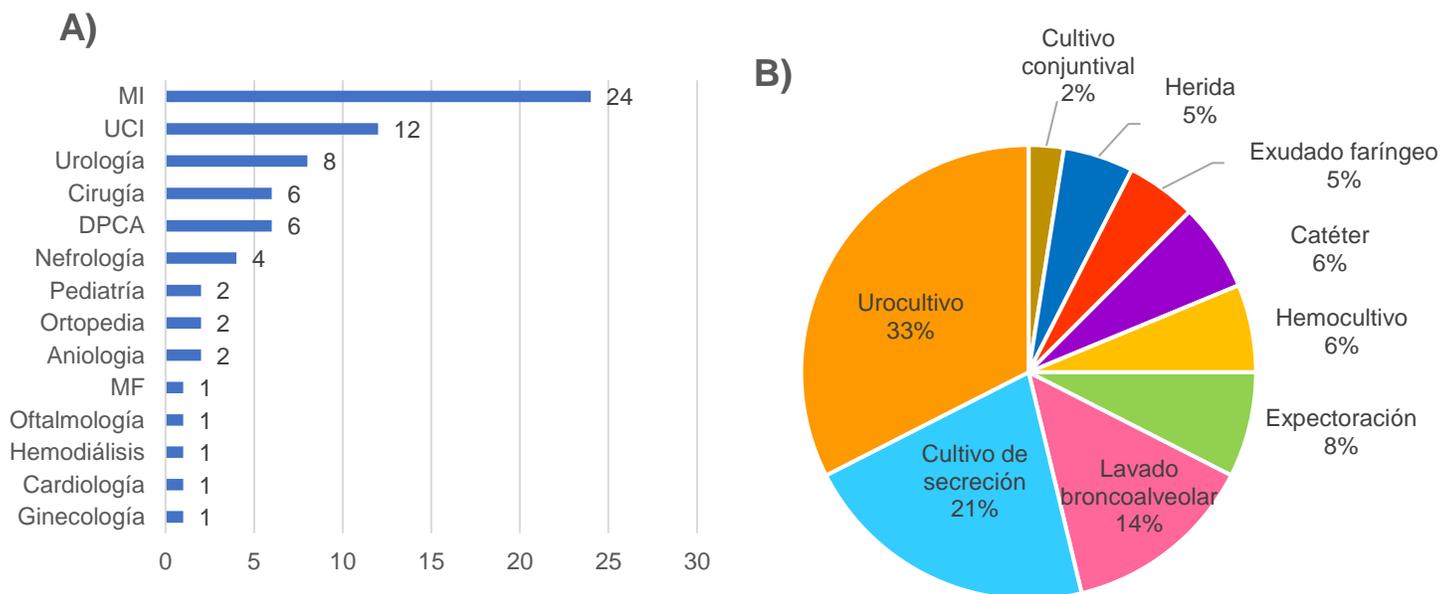
Tomado de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2018.

## Resultados

### Origen e identificación bioquímica para corroborar los aislados de *Ps. aeruginosa*.

Se trabajó con 85 aislados provenientes de pacientes del Hospital Regional del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (I.S.S.S.T.E.) de Puebla, obtenidos en el periodo de octubre 2015 a octubre de 2017 y previamente identificados por el sistema semi automatizado Vitek-2 como *P. aeruginosa*. Se corroboró género y especie por pruebas bioquímicas convencionales.

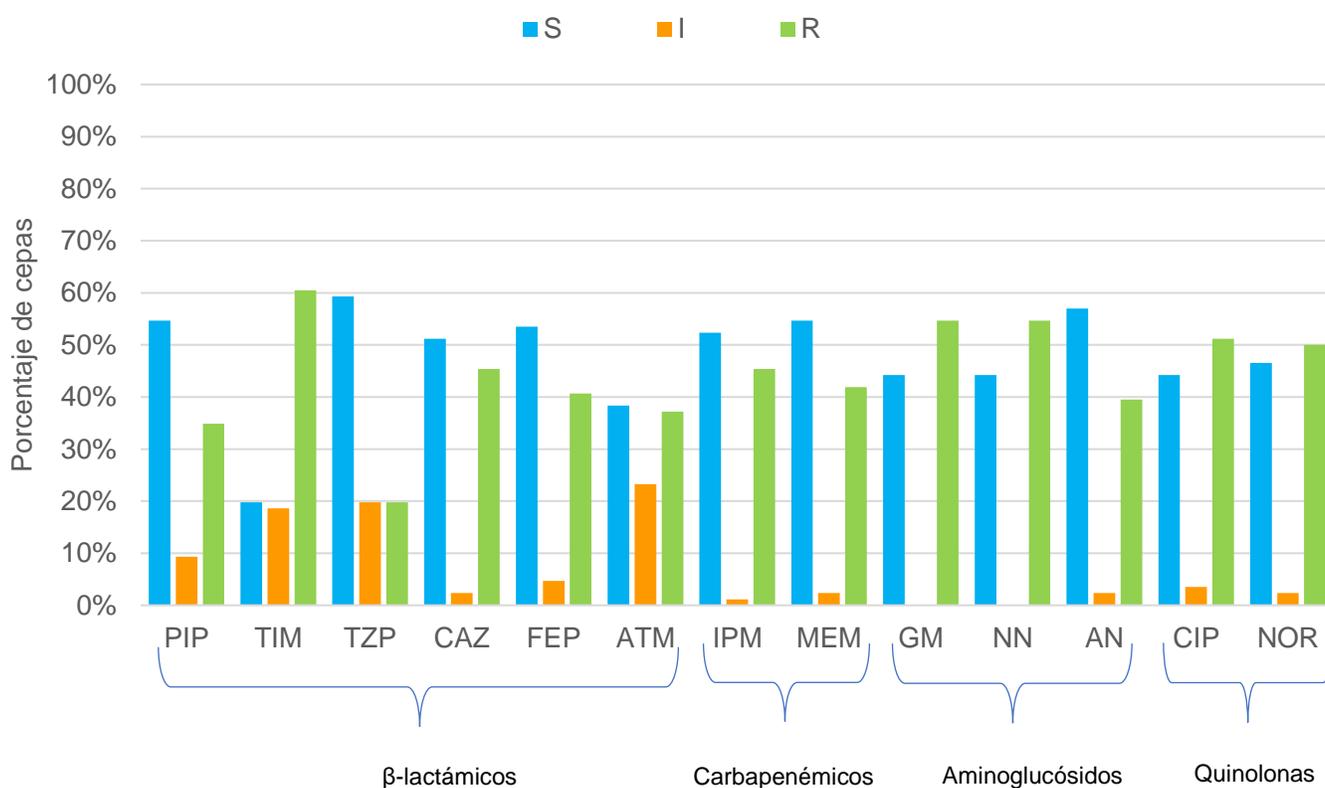
Las 85 cepas, procedentes de 67 pacientes, fueron recuperadas de diferentes servicios hospitalarios. Los aislados se recuperaron de pacientes internados principalmente de medicina interna (MI), de la unidad de cuidados intensivos (UCI) y urología (**Figura 7A**). Los 85 aislados fueron obtenidos de los siguientes sitios anatómicos: de urocultivo (33%), cultivo de secreción (21%), lavado broncoalveolar (14%), entre otros (**Figura 7B**).



**Figura 7. A)** Distribución de los 67 pacientes en cada uno de los servicios hospitalarios, a partir de los cuales se obtuvieron las cepas de *Ps. aeruginosa*. **B)** Origen de los 85 aislados de *P. aeruginosa* recuperados del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.

## Perfil fenotípico de resistencia

De las 85 cepas de *P. aeruginosa*, se identificaron 44 cepas como MDR, observándose que un 35% presentó resistencia a piperacilina, 60% a ticarcilina-ac. clavulánico, 20% a piperacilina-tazobactam, 45% a ceftazidima, 41% a cefepime, 37% a aztreonam, 45% a imipenem, 42% a meropenem, 55% a gentamicina, 55% a tobramicina, 40% a amikacina, 51% ciprofloxacina y 50% a norfloxacina (**Figura 8**).

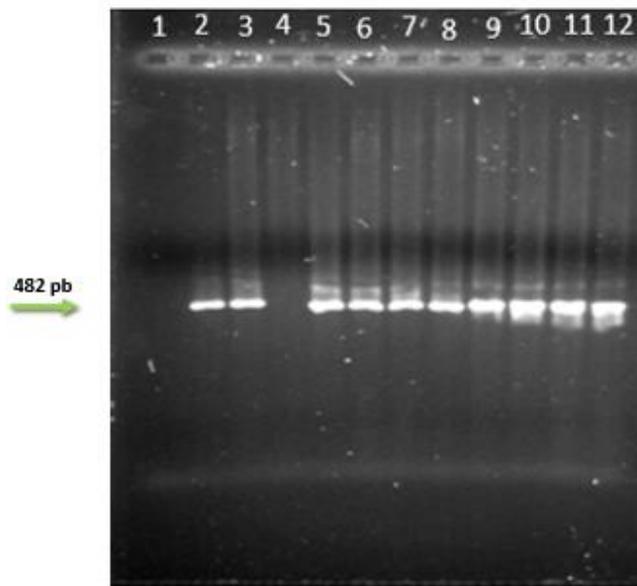


**Figura 8. Perfil fenotípico de resistencia de las 85 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes.** PIP: piperacilina, TIM: ticarcilina-ac. clavulánico, TZP: piperacilina-tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IPM: imipenem, MEM: meropenem, GM: gentamicina, NN: tobramicina, AN: amikacina, CIP: ciprofloxacina y NOR: norfloxacina. S: sensible (azul), I: Intermedio (anaranjado), R: Resistente (verde).

## Detección de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas

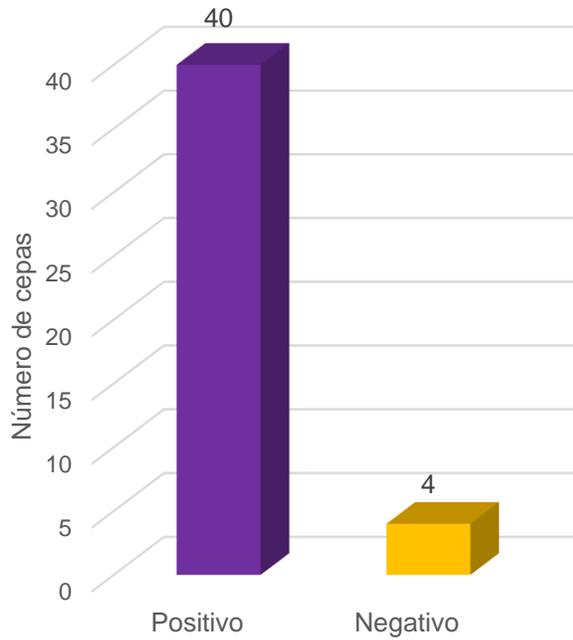
A partir de las 44 cepas identificadas como MDR se seleccionaron aquellas con un perfil de resistencia a aminoglucósidos (n=44) y quinolonas (n=43), para la búsqueda de genes de resistencia: *aac(6')-Ib* (aminoglucósidos), *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* (quinolonas).

Para las 44 cepas de *P. aeruginosa* se realizó la amplificación del gen *aac(6')-Ib*, esperando obtener un amplificado de 482 pb. Se usó como control positivo la cepa C7226 (**Figura 9**).



**Figura 9. Detección del gen de resistencia *aac(6')-Ib* en *P. aeruginosa*.** Electroforesis en gel de acrilamida representativo de 10 de las 44 cepas. **1.** Blanco, **2.** Control positivo *E. coli* C7226, **3.** PsE121, **4.** PsE125, **5.** PsE126, **6.** PsE128, **7.** PsE130, **8.** PsE133, **9.** PE137, **10.** PsE139, **11.** PsE140 y **12.** PsE142.

91% de las cepas (n=40) poseen el gen *aac(6')-Ib*, mientras que para un 9% (n=4) la reacción de PCR fue negativa (**Figura 10**). En aquellas cepas que portaron el gen, se identificaron dos perfiles fenotípicos, Perfil I: AN-NN-GM, Perfil II: NN-GM, de acuerdo con el perfil fenotípico esperado (**Tabla 9**).



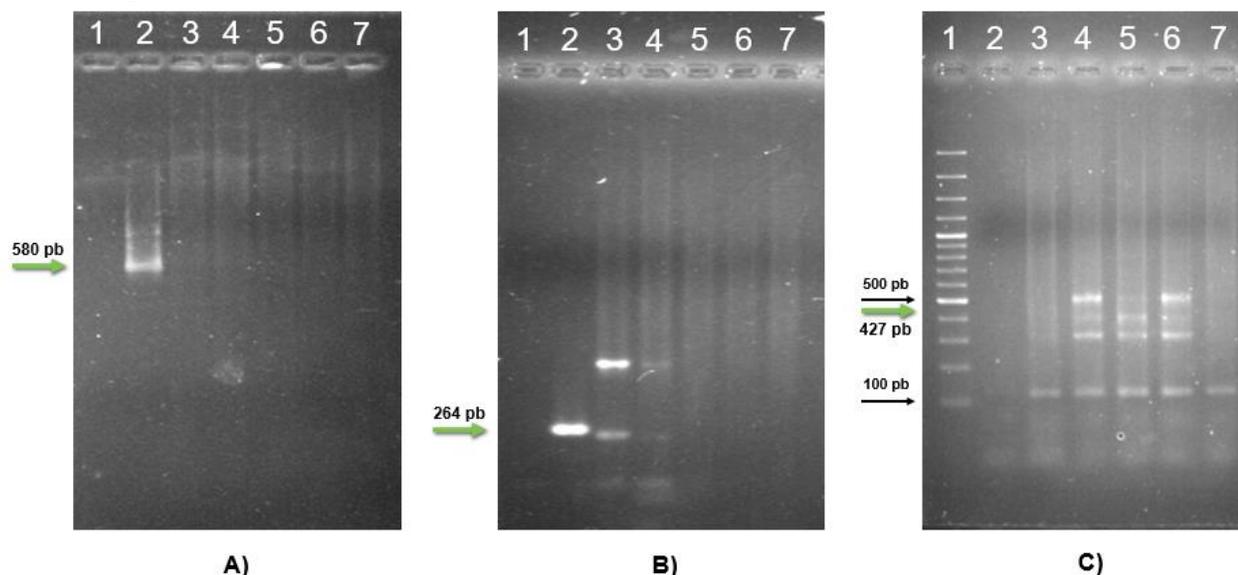
**Figura 10.** Prevalencia del gen de resistencia *aac(6)-Ib* en 44 cepas de *P. aeruginosa*.  
**Morado:** Positivo **Amarillo:** Negativo.

**Tabla 9.** Correlación entre el gen de resistencia amplificado y el perfil fenotípico de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos

Gen amplificado	No. de aislados (%)	Perfil fenotípico esperado	Perfil fenotípico observado (no. de aislados)
<i>aac(6)-Ib</i>	40 (91%)	AN, NN	<b>Perfil I (29)</b>
			AN, NN, GM
			<b>Perfil II (11)</b>
			NN, GM

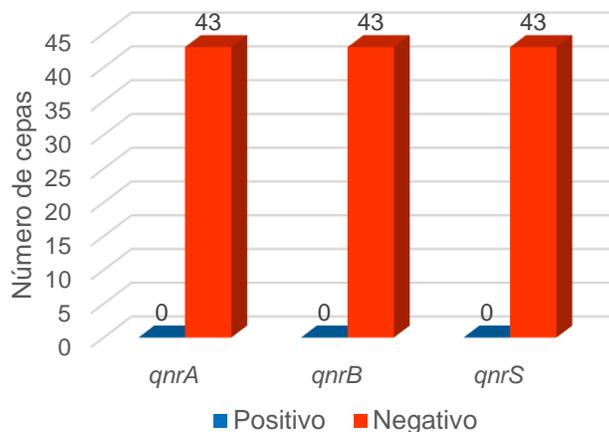
**AN:** amikacina, **NN:** tobramicina, **GM:** gentamicina.

En el caso de las 43 cepas con resistencia a quinolonas, se hizo la detección de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, esperando obtener amplificadores de 580, 264 y 427 pb respectivamente. Como control positivo para *qnrA* se utilizó la cepa C7219 y para *qnrB* la cepa SA96. Mientras que para *qnrS* no se contó con un control positivo (Figura 11).



**Figura 11. Detección de los genes de resistencia A) *qnrA*, B) *qnrB* y C) *qnrS* en *P. aeruginosa*.** Electroforesis en geles de acrilamida representativos de 5 de las 43 cepas. **A)** 1. Blanco, 2. Control positivo *E. coli* C7219. **B)** 1. Blanco, 2. Control positivo *K. pneumoniae* SA96 y **(C)** 1. Marcador de peso molecular, 2. Blanco. **A), B)** y **C)** 3. PsE239, 4. PsE241, 5. PsE243, 6. PsE244, 7. PsE245.

En el 100% de las cepas (n=43) el resultado fue negativo para la amplificación de los tres genes (Figura 12).



**Figura 12. Prevalencia de los genes de resistencia *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en 43 cepas de *P. aeruginosa*.** Azul: positivo y Rojo: negativo.

## **Participación de las bombas de expulsión en la resistencia a GM, AN y CIP ante la presencia de un inhibidor de bombas**

De las 44 cepas MDR, se seleccionaron aquellas que presentaron resistencia a GM, AN y CIP, con la finalidad de identificar la participación de las bombas de expulsión como mecanismo de resistencia a estos antibióticos, lo cual se realizó determinando la CMI ante la presencia y ausencia del inhibidor de bombas de expulsión Fenilalanina-arginil- $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N) (**Tabla 10**).

Las cepas con resistencia a GM (n=16) presentaron una CMI de 8  $\mu$ g/ml, 32  $\mu$ g/ml y de 128  $\mu$ g/ml a >512  $\mu$ g/ml. Al realizar la CMI ante la presencia de PA $\beta$ N, se observó la influencia del inhibidor en cinco cepas: en cuatro cepas la CMI disminuyó 2 veces y en una cepa 4 veces. En siete cepas no hubo disminución, mientras que en cuatro cepas en vez de disminuir la CMI hubo un aumento, en 3 cepas de 2 veces y en una cepa de 4 veces.

En el caso de las cepas resistentes a AN (n=15), presentaron una CMI de 32  $\mu$ g/ml a >512  $\mu$ g/ml. Al determinar la CMI en presencia de PA $\beta$ N, se identificó en cinco cepas la influencia del inhibidor, al disminuir la CMI 2 veces. En seis cepas no hubo disminución, pero por otra parte al igual que sucedió con GM, en 4 cepas en vez de disminuir la CMI se presentó un aumento de 2 veces.

Por último, las cepas con resistencia a CIP (n=36) presentaron valores de CMI de 2  $\mu$ g/ml y de 32  $\mu$ g/ml a >512  $\mu$ g/ml. Al realizar la CMI ante la presencia de PA $\beta$ N, se observó su influencia en cuatro cepas, al disminuir la CMI 2 veces. En 32 cepas no hubo disminución.

Una vez terminado el análisis de las cepas, se identificó que aquellas que provinieron de un mismo paciente, presentaban diferencias entre si (**Tabla 11**).

Tabla 10. Participación de las bombas de expulsión en la resistencia a los antibióticos GM, AN y CIP

Número de cepa	Fecha recolección	Servicio	Muestra	Fenotipo de resistencia	CMI µg/mL		
					GM (+PAβN)	AN (+PAβN)	CIP (+PAβN)
PsE103	05/11/2015	Pediatría	Expectoración	PIP TIM CAZ GM NN AN	256 (256)	128 ↑(256)	-
PsE105	17/11/2015	MI	Herida	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	128 ↑(256)	128 ↑(256)	32 (32)
PsE107	26/11/2015	UCI	Urocultivo	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	128 ↑(256)	128 (128)	32 (32)
PsE108	02/12/2015	MI	Expectoración	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	32 ↑(64)	128 ↑(256)	128 (128)
PsE112	25/11/2015	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	512 ↓(256)	512 ↓(256)	>512 (>512)
PsE114	01/12/2015	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM NN CIP NOR	-	-	32 (32)
PsE115	07/12/2015	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	512 (512)	256 (256)	>512 (>512)
PsE118	29/12/2015	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	512 (512)	516 ↓(256)	>512 (>512)
PsE119	30/12/2015	UCI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP IPM MEM GM NN AN CIP NOR	>512 (>512)	512 (512)	256 (256)
PsE121	04/01/2016	Urología	Urocultivo	PIP TIM IPM MEM GM NN CIP NOR	512 (512)	-	>512 (>512)
PsE125	30/12/2015	UCI	Hemocultivo/CVC	PIP TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM CIP	8 ↓(2)	-	2 (2)
PsE126	16/12/2015	UCI	Lavado bronquioalveolar	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	>512 ↓(512)	512 ↓(256)	256 ↓(128)
PsE128	05/01/2016	UCI	Lavado bronquioalveolar	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	64 (64)	32 (32)
PsE130	19/01/2016	Urología	Urocultivo	TIM CAZ GM NN AN CIP NOR	512 (512)	32 (32)	64 (64)
PsE133	18/02/2016	UCI	Cultivo secreción herida	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	128 ↑(512)	128 (128)	32 (32)
PsE137	22/03/2016	Cirugía	Expectoración	TIM CAZ FEP IPM GM NN AN CIP NOR	>512 ↓(512)	512 ↓(256)	256 (256)
PsE139	01/03/2016	Urología	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP IPM MEM GM NN AN CIP NOR	>512 ↓(512)	>512 ↓(512)	256 (256)
PsE140	28/03/2016	UCI	Lavado bronquioalveolar	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	128 (128)	64 ↑(128)	32 (32)
PsE142	07/04/2016	MI	Cultivo herida quirúrgica	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	128 (128)
PsE144	14/04/2016	Urología	Urocultivo	PIP TIM CAZ ATM GM NN CIP NOR	ND	-	64 (64)

Rojo: disminución de la CMI, Azul: aumento de la CMI.

Continuación Tabla 10. Participación de las bombas de expulsión en la resistencia a los antibióticos GM, AN y CIP

Número de cepa	Fecha recolección	Servicio	Muestra	Fenotipo de resistencia	CMI µg/mL		
					GM (+PAβN)	AN (+PAβN)	CIP (+PAβN)
PsE150	09/05/2016	Cirugía	Herida	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	32 (32)
PsE151	11/05/2016	MI	Urocultivo	TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	256 (256)
PsE152	08/05/2016	MI	Cultivo catéter venoso central	TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	256 (256)
PsE156	21/06/2016	UCI	Cultivo de secreción	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	32 (32)
PsE157	21/06/2016	UCI	Cultivo lavado bronquial	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	32 (32)
PsE158	17/06/2016	UCI	Cultivo lavado bronquial	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	<b>32</b> <b>↓(16)</b>
PsE165	09/08/2016	MI	Hemocultivo	TIM GM NN CIP NOR	ND	-	128 (128)
PsE175	28/09/2016	Ginecología	Urocultivo	TIM IPM NN AN CIP NOR	-	ND	512 (512)
PsE177	19/10/2016	MI	Hemocultivo	TIM CAZ FEP IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	<b>256</b> <b>↓(128)</b>
PsE184	16/11/2016	MI	Cultivo lavado bronquial	TIM CAZ FEP IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	128 (128)
PsE193	15/02/2017	Urología	Urocultivo	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN CIP NOR	ND	-	64 (64)
PsE197	01/02/2017	Urología	Urocultivo	TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN CIP NOR	ND	ND	>512 (>512)
PsE201	15/02/2017	Cardiología H	Urocultivo	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN CIP NOR	ND	ND	512 (512)
PsE211	22/03/2017	Cirugía H	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP GM NN AN CIP NOR	ND	-	64 (64)
PsE223	07/07/2017	MF	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	<b>128</b> <b>↓(64)</b>
PsE224	10/07/2017	MI	Urocultivo	TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN CIP NOR	ND	-	256 (256)
PsE228	22/08/2017	MI	Urocultivo	TIM CAZ FEP IPM MEM GM NN AN CIP NOR	ND	ND	256 (256)

**Rojo:** disminución de la CMI, **Azul:** aumento de la CMI.

Tabla 11. Cepas que provienen de un mismo paciente

Número de cepa	Fecha recolección	Servicio	Muestra	Fenotipo de resistencia	Genotipo		CMI µg/mL		
					Aminoglucósidos	Quinolonas	CIP (+PAβN)	AN (+PAβN)	GM (+PAβN)
PsE112	25/11/2015	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	>512 (>512)	<b>512</b> ↓(256)	<b>512</b> ↓(256)
PsE115	07/12/2015	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	>512 (>512)	256 (256)	512 (512)
PsE118	29/12/2015	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	>512 (>512)	<b>512</b> ↓(256)	512 (512)
PsE130	19/01/2016	Urología	Urocultivo	TIM CAZ GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	64 (64)	32 (32)	512 (512)
PsE139	01/03/2016	Urología	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	256 (256)	<b>&gt;512</b> ↓(512)	<b>&gt;512</b> ↓(512)
PsE 144	14/04/2016	Urología	Urocultivo	PIP TIM CAZ ATM GM NN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	64 (64)	-	ND
PsE151	11/05/2016	MI	Urocultivo	TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	256 (256)	ND	ND
PsE152	08/05/2016	MI	Cultivo catéter venoso central	TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	256 (256)	ND	ND
PsE156	21/06/2016	UCI	Cultivo de secreción	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	32 (32)	ND	ND
PsE157	21/06/2016	UCI	Cultivo lavado bronquial	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	32 (32)	ND	ND

Cepas de un mismo paciente resaltadas en franjas de color. **Rojo**: disminución de la CMI.

## Discusión

De todos los Gram negativos *Pseudomonas aeruginosa* es considerado como un patógeno oportunista predominante, responsable de un amplio rango de infecciones, principalmente en pacientes con una enfermedad subyacente o un estado inmunocomprometido. Debido a su capacidad de sobrevivir en el ambiente hospitalario, presentar una resistencia innata a los antibióticos y poder desarrollar resistencia a múltiples fármacos, es motivo de preocupación, representado una causa importante de morbi-mortalidad, largas estadías hospitalarias e incremento en los costos de atención (Alnour & Ahmed-Abakur, 2017; Davane *et al.*, 2014).

En este estudio se trabajó con 85 aislados de *P. aeruginosa* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, recuperados de 14 servicios hospitalarios, con diferente especialidad. Esto nos permitió observar que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de presentarse en diferentes áreas hospitalarias y de colonizar distintos sitios anatómicos y de causar diversas infecciones nosocomiales, de las cuales se considera responsable en aproximadamente del 10 al 15% a nivel mundial (Lebeque *et al.*, 2006; Paz-Zarza *et al.*, 2019).

La mayoría de los aislados se recuperaron de Medicina Interna, UCI y urología, unidades donde se llegan a encontrar pacientes inmunocomprometidos, que requieren de procedimientos y/o dispositivos invasivos (ejemplo: cirugía, ventilación mecánica y cateterización) y en ocasiones estadías prolongadas. Estos son factores que favorecen la infección por *P. aeruginosa*, y por tanto podrían ser el motivo de que se aislara principalmente en estos tres servicios hospitalarios (Becchi *et al.*, 2010; Pachori *et al.*, 2019).

Las muestras provinieron principalmente de urocultivo, cultivo de secreción y lavado broncoalveolar, que es de donde principalmente se aísla *P. aeruginosa*, ya que se ha observado que representa la tercera causa de infecciones urinarias y la segunda causa de neumonía adquirida en el hospital asociada a pacientes ventilados (Paz-Zarza *et al.*, 2019; Streeter & Katouli, 2016).

Por otra parte, se determinó el perfil de resistencia de las 85 cepas y se identificaron 44 MDR (52%), es decir, que fueron resistentes al menos a un agente antimicrobiano de tres o más categorías de los antibióticos utilizados:  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas (Magiorakos *et al.*, 2012).

Se ha observado en estudios de otros países (Egipto, Pakistán, Brasil, Alemania, India) que la frecuencia de *P. aeruginosa* MDR es del 12.3 al 36.5%. Asimismo, de acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), se estimó que el 13% de las cepas de *P. aeruginosa* que causan infecciones son MDR (Alnour & Ahmed-Abakur, 2017; CDC, 2013), lo cual es mucho menor a lo obtenido en este trabajo. Lo anterior resalta la importancia de realizar más estudios y monitoreo de las cepas de *P. aeruginosa* que circulan en hospitales mexicanos y sobre todo poblanos. Los resultados de MDR obtenidos en el presente trabajo pueden respaldarse con los datos del Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY (1997-2016), donde se reporta que la región de América Latina posee la mayor frecuencia de aislados de cepas de *P. aeruginosa* MDR (41.1%) (Shortridge *et al.*, 2019).

De los 13 antibióticos probados para la determinación del perfil fenotípico de resistencia, se observó que las cepas en estudio tuvieron mayor porcentaje de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos: ticarcilina-ácido clavulánico (60%), imipenem (45%) y meropenem (42%); también a los aminoglucósidos como gentamicina (55%), tobramicina (55%) y amikacina (40%); y a las quinolonas ciprofloxacina (51%) y norfloxacina (50%), antibióticos que principalmente son utilizados para el tratamiento contra infecciones por *P. aeruginosa* (Hancock & Speert, 2000).

En el caso de ticarcilina-ácido clavulánico, otros estudios han informado porcentajes de resistencia por arriba del 60% (Ochoa *et al.*, 2013; Pandrea *et al.*, 2016; Salazar-Holguín & Cisneros-Robledo, 2016; Sohn *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha observado un incremento de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, lo cual representa un problema alarmante, ya que estos antibióticos son usados como última opción terapéutica. En diferentes trabajos se han reportado porcentajes de resistencia en cepas clínicas de *P.*

*aeruginosa* a imipenem que van del 2 hasta el 42% y para meropenem desde el 10 hasta 46%, semejante a los reportados en el presente estudio (El Zowalaty *et al.*, 2015).

También se observó que del 40 al 55% de las cepas estudiadas, fueron resistentes a aminoglucósidos y quinolonas, lo cual difiere de los porcentajes señalados en otros trabajos (Brown & Izundu, 2004; Dièye *et al.*, 2020; Estepa *et al.*, 2017). De acuerdo a un proyecto llevado a cabo por Lila y colaboradores en un centro clínico de Kosovo, observaron porcentajes de resistencia para los aminoglucósidos (amikacina, gentamicina y tobramicina) del 55% al 77.2% y para las quinolonas (norfloxacin y ciprofloxacina) del 28.7% al 30% (Lila *et al.*, 2016). En Arabia Saudita en un centro de salud de tercer nivel, de 30 aislados el 43.3% presento resistencia a gentamicina, el 56.7% a amikacina, el 76.7% a tobramicina y el 13.3% a ciprofloxacina (Ahmad *et al.*, 2020). Por otro lado, en Irán de 100 aislados recuperados de pacientes con quemaduras, el 100% presento resistencia a amikacina, tobramicina y ciprofloxacina, y el 49% a gentamicina (Jafari *et al.*, 2013). Mientras que en México, Vera estudió 24 cepas clínicas, y observo que 66.6% fueron resistentes a amikacina, 75% a gentamicina y 58.3% a norfloxacina y ciprofloxacina (Vera *et al.*, 2006). Y por otra parte Chávez-Valencia incluyó en su estudio 29 cepas provenientes de urocultivo, de las cuales el 37.9% fueron resistente a amikacina, el 48% a norfloxacina y el 52% a ciprofloxacina (Chávez-Valencia *et al.*, 2010).

Si bien en algunos casos los porcentajes de cepas resistentes a los antibióticos descritos en este trabajo llegan a concordar con lo que se ha reportado en otras investigaciones, también podemos observar el acelerado incremento de la resistencia que se está generando y la necesidad de replantear el uso que se le está dando a estos antibióticos.

De las 44 cepas MDR, se seleccionaron 44 cepas resistentes a aminoglucósidos y 43 resistentes a quinolonas para la amplificación de los genes de resistencia (**Anexo 4**). A las cepas resistentes a aminoglucósidos se les amplifico el gen *aac(6)-Ib*, uno de los principales genes de resistencia a aminoglucósidos en *P.*

*aeruginosa*, el cual confiere resistencia a amikacina y tobramicina y codifica para una enzima modificadora de aminoglucósidos (EMA), principal mecanismo de resistencia a esta familia de antibióticos (Pachori *et al.*, 2019).

Del total de cepas resistentes a aminoglucósidos se observó que el 91% (n=40) portaron el gen *aac(6')-Ib*. Porcentaje mayor al que comúnmente se ha observado en otros países, que va desde un 6.1% hasta un 74.02%.

En un estudio llevado a cabo en un hospital de 3er nivel en Arabia Saudita, con la finalidad de identificar la prevalencia de genes de resistencia a aminoglucósidos; se encontró que de un total de 65 aislados hospitalarios, sólo el 6.1% portaban el gen *aac(6')-Ib* (Asghar & Ahmed, 2018); en Ecuador de un total de 78 aislados recuperados de diferentes hospitales en los que se buscaron enzimas modificadoras de aminoglucósidos se identificó que el 14.10% portaban la AAC(6')-Ib (Barba *et al.*, 2017), mientras que en Francia de 52 cepas resistentes a aminoglucósidos, sólo el 36.5% portaban el gen *aac(6')-Ib* (Dubois *et al.*, 2008). Por otra parte, en Iraq, se estudiaron 28 cepas de *P. aeruginosa* y se observó que el 42.8% presentó el gen *aac(6')-Ib* (Al-Jubori *et al.*, 2015). De igual manera en Venezuela, de 39 cepas recuperadas de diferentes unidades hospitalarias, se reportó en el 64.10% la AAC(6')-Ib (Teixeira *et al.*, 2016), así como en un estudio realizado en Irán, se identificó el gen *aac(6')-Ib* en el 74.02% (n=77) de los aislados de pacientes con quemaduras (Jafari *et al.*, 2013).

Los altos porcentajes de prevalencia del gen *aac(6')-Ib* en las cepas de *P. aeruginosa* en este estudio, podría deberse a la presión de selección generada por el uso extenso de aminoglucósidos en los tratamientos. O bien, el gen *aac(6')-Ib* podría estar codificado en algún elemento genético móvil como plásmidos, que le permita su diseminación a otras cepas dentro del mismo nicho ecológico (Miller *et al.*, 1997; Ramirez *et al.*, 2013).

Algo a señalar, es que la presencia de este gen se asoció a dos fenotipos de resistencia: cepas resistentes a amikacina, tobramicina y gentamicina en el 72.5% (29/40) y cepas resistentes a los antibióticos tobramicina y gentamicina en el 27.5%

(11/40) (**Tabla 9**). Cabe recordar que el perfil de resistencia que confiere la enzima amplificada no incluye a gentamicina. No obstante, estudios han reportado en *P. aeruginosa* al gen *aac(6')-Ib'* que confiere resistencia a gentamicina en lugar de amikacina, debido a mutaciones puntuales (Leu90Ser, Leu119Ser) que resultan en un cambio de la especificidad de sustrato. Por consiguiente, esto podría llegar a explicar los fenotipos de resistencia observados, ya sea al estar presente solo el gen de la acetilasa mutado (resistencia a NN y GM) o en conjunto con el de la acetilasa sin mutar, ampliando el rango de resistencia (resistencia a AN, NN y GM). Sin embargo, se requiere la secuenciación del gen para saber si tiene dicha mutación (Dubois *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 1993).

Curiosamente en las cepas que no amplificaron el gen *aac(6')-Ib*, se observó que tres presentaron resistencia fenotípica a los antibióticos amikacina y tobramicina. Esto podría indicarnos que otro mecanismo de resistencia estaría siendo el responsable, como EMA de la familia AAC(3), ANT(2') y ANT(4'), bombas de expulsión y metilasas, permitiendo a su vez explicar la resistencia a gentamicina que fue registrada en la mayoría de las cepas (Meletis & Bagkeri, 2013; Poole, 2011) (**Anexo 4**).

De igual manera, se buscaron los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en 43 cepas resistentes a quinolonas. Estos genes se han reportado principalmente en especies de la familia *Enterobacteriaceae*, pero podrían ser adquiridos por cepas de *P. aeruginosa* por medio de plásmidos.

Al realizar la amplificación de los genes *qnr*, el 100% de las cepas (n=43) fueron negativas; coincidiendo con reportes donde se identifica una baja prevalencia; como los realizados en la Universidad de Ondokuz Myıs, Turquía. En él se estudiaron 64 cepas de *Ps. aeruginosa* resistentes a ciprofloxacina, y todas fueron negativas en la amplificación de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* (Cayci *et al.*, 2014). Por otra parte, en Egipto Saleh y Balboula, estudiaron 63 cepas resistentes a quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacino y/o levofloxacina), e identificaron en una sola cepa (1.5%) el gen *qnrB* mientras que en tres cepas (4.7%) el gen *qnrS* (Saleh & Balboula, 2017), así mismo en Pakistán, de 83 aislados resistentes a

levofloxacin, pertenecientes a pacientes con quemaduras, en tres (3.6%) se identificó el gen *qnrA*, en nueve (10.8%) el gen *qnrB* y en dos (2.4%) el gen *qnrS* (Rafiq *et al.*, 2019).

Cabe mencionar que, aunque en este estudio la incidencia de los genes *qnr* fue nula, el hecho de que en otros trabajos se reporte su presencia en *P. aeruginosa* señala que son genes que se requiere buscar, ya que es un mecanismo de resistencia que se está presentando en esta bacteria. La presencia de este gen si bien se asocia a un bajo nivel de resistencia a quinolonas, se ha propuesto que promueve la aparición de cepas altamente resistentes a esta familia de antibióticos, al facilitar la generación de mutaciones en los genes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV (Munita & Arias, 2016).

Por otro lado, se llevó a cabo la determinación de la participación de las bombas de expulsión de la familia RND, que especialmente se han asociado al fenotipo MDR, al contribuir de forma significativa en la resistencia antibiótica de *P. aeruginosa* por su capacidad de expulsar una variedad de agentes antimicrobianos (Poole, 2011; Santajit & Indrawattana, 2016).

Para determinar la participación de las bombas de expulsión como mecanismo de resistencia, de las 44 cepas MDR, se seleccionaron aquellas con resistencia a gentamicina (n=16), amikacina (n=15) y ciprofloxacina (n=36) con la finalidad de comparar su CMI en presencia y en ausencia del inhibidor de bombas de expulsión PAβN. Se observó la participación de las bombas ya que hubo una disminución en la CMI de dos o más veces en presencia del inhibidor (Kumita *et al.*, 2009).

De 16 cepas resistentes a gentamicina, en 5 (31%) se identificó la influencia del inhibidor, ya que se observó que en las cepas PsE112 y PsE126, PsE137 y PsE139, la CMI disminuyó dos veces de 512 a 256 µg/mL y de >512 a 512 µg/mL respectivamente; mientras que en la cepa PsE125 la CMI disminuyó cuatro veces de 8 a 2 µg/mL. Por lo cual se infiere que las bombas de expulsión podrían estar participando en la resistencia a gentamicina en estas cepas; particularmente la

bomba MexXY, por ser la única responsable en *P. aeruginosa* de expulsar aminoglucósidos (Garneau-Tsodikova & Labby, 2015).

Igualmente, de las 15 cepas con resistencia a amikacina solo en 5 (33%) se identificó la influencia del inhibidor, ya que disminuyó la CMI 2 veces en las cepas PsE112, PsE118, PsE126 y PsE137 de 512 a 256 µg/mL y en la cepa PsE139 >512 a 512 µg/mL. No obstante, aun cuando se observó la participación de las bombas para ambos aminoglucósidos, las cepas en estudio seguían presentando resistencia, de acuerdo con los valores establecidos por el CLSI para la CMI de estos antibióticos. Motivo por el cual se piensa que otros mecanismos de resistencia podrían estar involucrados. Uno de los mecanismos que se relacionan con este fenotipo, es la producción de la enzima AAC(6')-Ib en las cepas resistentes a amikacina (**Anexo 5**). Coincidiendo con reportes donde se indica que la bomba de expulsión MexXY junto con la combinación de EMA, pueden contribuir de manera significativa al desarrollo de resistencia a aminoglucósidos (CMI: 100-1000 µg/mL). En tanto que para las 5 cepas con resistencia a gentamicina podría estar involucrada la producción de alguna otra EMA u otro mecanismo en conjunto (Morita *et al.*, 2012b).

Es necesario recordar que no hay una única EMA responsable de la resistencia a aminoglucósidos (**Anexo 2**) y que, a parte de las bombas de expulsión, pueden estar implicados algunos mecanismos de resistencia como la modificación del sitio blanco por metilación (metilasas ARNr 16S) (Serio *et al.*, 2018). Como se observó en un estudio realizado por Gurung y colaboradores en un hospital de Corea del Sur, en el cual a partir de 14 aislados de *P. aeruginosa* que presentaron altos niveles de resistencia a todos los aminoglucósidos probados (amikacina, gentamicina, isepamicina, kanamicina, netilmicina, espectinomicina y tobramicina: CMI ≥256 µg/mL), detectaron el gen de metilasa *armA*, aparte de que observaron que portaban genes de EMA (*ant(2'')-Ia*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-VIa* y *aac(3)-Ia*) (Gurung *et al.*, 2010). Por otra parte, en Brasil en un estudio con la finalidad de identificar la coproducción de metalo β-lactamasas y metilasas ARNr 16S; en 51 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, observaron que el 75% presentaron el gen de metilasa *rmtD*, lo cual se

asoció a valores de CMI a amikacina, gentamicina y arbekacina >256 µg/mL (Doi *et al.*, 2007). A su vez en India, se realizó un estudio en el que se recolectaron 92 cepas resistentes a aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, tobramicina y netilmicina) de diferentes hospitales, donde el 57.6% portaron los genes: *aac(6')-I*, *aac(3)-II/IV*, *ant(2'')-I* y *aph(3')-VI*, mientras que el 20.6% (n=19) portaron genes de metilasas: *rmtB*, *rmtC*, *rmtF* y *armA* observándose en el 58% (11/19) y 68% (13/19) CMI >256 µg/mL para amikacina y gentamicina respectivamente (Mohanam & Menon, 2017). Es así, que en las cepas que presentaron participación de las bombas de expulsión, podrían estar implicadas las modificaciones en el sitio blanco por metilación, como responsables de los valores de CMI observados después del uso del inhibidor.

Igualmente, un resultado interesante a señalar en nuestro estudio, es que en cuatro cepas resistentes a gentamicina: PsE105, PsE107, PsE108 y PsE133 y cuatro cepas resistentes a amikacina: PsE103, PsE105, PsE108 y PsE140 su CMI aumentó de 2 a 4 veces en presencia del inhibidor PAβN, hecho contrario a lo comúnmente se esperaría. Sin embargo, hay trabajos que presentan resultados similares. Ejemplo de ello es el estudio realizado por Amábile-Cuevas, donde a partir de cuatro aislados clínicos de *P. aeruginosa* hiper-resistentes a amikacina (CMI 10,000 µg/mL a 20,000 µg/mL), observó un aumento de 2 o más veces en su CMI para los aminoglucósidos amikacina y gentamicina cuando se realizó la CMI con el inhibidor de bombas de expulsión PAβN. Concluyendo que ante el efecto contradictorio del inhibidor sobre la bomba de expulsión MexXY (en caso de ser la sobreexpresión de dicha bomba la responsable de la hiper resistencia observada) otro mecanismo completamente diferente estaría participando (Amábile-Cuevas, 2017). Tal podría ser el caso de las porinas, ya que en otro estudio donde se trabajó con diferentes aislados clínicos de Enterobacterias, se observó que al medir los valores de CMI para el antibiótico ertapenem en presencia del inhibidor PAβN, las cepas con un aumento de 2 a 4 veces en su CMI, presentaban una expresión alterada de las mismas, sugiriendo que dicho factor sería el responsable del efecto observado (Saw *et al.*, 2016).

Aun así, no hay que descartar que las bombas de expulsión puedan tener alguna relación, debido a la compleja regulación que poseen. Una característica que presenta la bomba MexXY, es que no tiene una proteína de membrana propia, actuando de manera conjunta con la proteína OprM y posiblemente con otras proteínas de membrana como: OprA, OpmG, OpmH y Opml (Jo *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2012a). Además, se ha identificado que mutaciones en su represor MexZ, confieren una sobreexpresión de la bomba de expulsión. Así como mutaciones en el gen *parR*, el cual forma parte de un operón que codifica para un sistema de doble componente, ParRS y que promueve una regulación al alza de *mexXY*, activando el sistema de salida MexXY (Morita *et al.*, 2012b; Poole, 2011). De igual modo se ha descrito que la inducción de la bomba MexXY, depende de la interacción de los ribosomas bacterianos con inhibidores de la síntesis de proteínas como los aminoglucósidos, resultando en el aumento de la expresión del gen *mexXY* (Lister *et al.*, 2009). Por tanto, al estar involucradas diversas vías en la actividad de la bomba de expulsión, alguna podría explicar el porqué del incremento de la CMI ante el inhibidor PA $\beta$ N.

También en la determinación de la participación de las bombas de expulsión en la resistencia a ciprofloxacina, de 36 cepas solo en cuatro cepas (11%) se observó una disminución en su CMI de 2 veces en presencia del inhibidor; PsE126 y PsE177 de 256  $\mu$ g/mL a 128  $\mu$ g/mL, PsE 223 de 128  $\mu$ g/mL a 64  $\mu$ g/mL y PsE158 de 32  $\mu$ g/mL a 16  $\mu$ g/mL; sugiriendo la participación de las bombas MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ y/o MexEF-OprN, ya que las cuatro están involucradas en la expulsión de fluoroquinolonas (López-Causapé *et al.*, 2018). Pero aun con ello, los valores de CMI obtenidos hacen pensar que otro mecanismo de resistencia podría estar participando. Como por ejemplo mutaciones en genes que codifican para la DNA girasa (*gyrA/gyrB*) y topoisomerasa IV (*parC/parE*), que son los principales contribuyentes a la resistencia de ciprofloxacina en *P. aeruginosa*. Confiriendo la combinación de mutaciones *gyrA/parC* una mayor resistencia (Rehman *et al.*, 2019).

Como ejemplo de ello, un estudio llevado a cabo en Italia por Pasca y colaboradores, donde a partir de 45 aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a ciprofloxacina, identificaron que el 57.7% presentó mutaciones en *gyrA* (T83I) y *parC* (S87L/W; E91K), seguido de un 26.6% que presentó mutaciones en *gyrA* (T83I), *gyrB* (E468D) y *parC* (S87W) asociándose a CMI de 16 µg/mL a >128 µg/mL. Además, observaron que el 62.2% presentó la participación de bombas de expulsión, ya que disminuyó su CMI de 2 a 8 veces en presencia del inhibidor MC-207,110 (PAβN). Igualmente, la expresión de los genes: *mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexX* se corroboró en 7 cepas mediante RT-PCR (Pasca *et al.*, 2012).

En otro estudio investigaron las mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* en aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a ciprofloxacina, donde se observó que de 103 aislados recuperados de diferentes hospitales de Corea del Sur, predominó la mutación en *gyrA* (T83I) en el 45.6% y la combinación de mutaciones *gyrA* (T83I)/*parC* (S87L o E91K) en el 30.09%, con valores de CMI a ciprofloxacina de 2 µg/mL a 64 µg/mL y 8 µg/mL a 256 µg/mL respectivamente. También se observó mediante estudios adicionales, que aquellas cepas con mayor nivel de resistencia, presentaban mutaciones en el gen *mexR*, que es responsable de la sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM (Lee *et al.*, 2005).

Mientras que en un trabajo realizado en Irán por Takrami en el que se buscaron mutaciones en *gyrA* y *parC*, y en los reguladores de la bomba de expulsión MexAB-OprM relacionados a su sobreexpresión (*mexR* y *nalC*), se observó que 14 cepas resistentes a ciprofloxacina presentaban mutaciones en *gyrA*, 3 en *parC*, 3 en *mexR* y once en *nalC*; encontrando que aquellas cepas con mutaciones en *gyrA*, *parC*, *mexR* y/o *nalC* presentaban los valores más altos en su CMI (CMI 256 µg/mL y 1024 µg/mL) (Takrami *et al.*, 2017).

Por consiguiente, la combinación de las bombas de expulsión con mutaciones del sitio blanco, podrían estar involucradas en las cuatro cepas que presentaron una participación de las bombas, pero que mantuvieron una resistencia a ciprofloxacina aun en la presencia del inhibidor. Razón por la que es importante la búsqueda de mutaciones en *gyrA* y *parC*, en nuestras cepas, debido a los valores de resistencia

a los que se encuentran asociados. A su vez, un factor relevante a considerar es que las cuatro cepas portaron el gen *aac(6')-Ib*, del cual se tiene una variante que confiere resistencia a ciprofloxacina (*aac(6')-Ib-cr*), por tanto dicha variante podría estar implicada en la resistencia a este antibiótico, pero sería necesario la secuenciación del gen para comprobarlo (Cattoir & Nordmann, 2009) **(Anexo 5)**.

Es importante mencionar que también hubo cepas del mismo paciente con diferentes características. Las cepas PsE112, PsE115 y PsE118, se aislaron del mismo paciente, y presentaron el mismo perfil fenotípico y genotípico de resistencia, pero variaron en los valores de CMI de GM y AN en presencia y ausencia del inhibidor **(Tabla 11)**. Esto podría deberse a un desarrollo de resistencia, al haber una diferencia de tiempo entre el primer aislado recuperado y los aislados subsecuentes.

En los aislados PsE130, PsE139 y PsE140, aunque son del mismo paciente, sus perfiles fenotípicos fueron diferentes, así como sus valores de CMI con y sin inhibidor. Infiriendo que se podría tratar de cepas distintas, al ser aisladas con meses de diferencia una de otra. Mientras que para las cepas PsE151 y PsE152, provenientes del mismo paciente y del servicio de MI, se diferenciaron únicamente por el sitio de infección de la toma de muestra. Mismo caso se presentó con las cepas PsE156 y PsE157 aisladas de un mismo paciente en la UCI. Lo que hace inferir que la misma cepa podría estar circulando en la unidad de la que fueron recuperadas, ya que no hay mucha diferencia entre el tiempo que fueron aisladas. **(Tabla 11)**. Sin embargo, para identificar el porqué de las variaciones presentadas, es necesario llevar a cabo más estudios como electroforesis de campos pulsados (PFGE) y secuenciación (Estepa *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2013; Jaillard *et al.*, 2017).

## **Conclusión**

Con este estudio se mostró la presencia de cepas circulantes de *P. aeruginosa* MDR en un hospital Poblano causantes de infecciones, presentándose valores de resistencia a carbapenémicos que requieren de vigilancia al ser antibióticos de última elección en el tratamiento contra *Pseudomonas*. Particularmente se observó que la resistencia a aminoglucósidos está dada parcialmente por mecanismos de resistencia adquiridos como son la AAC(6')-Ib y la expresión de bombas de expulsión. Para quinolonas se observó que las bombas de expulsión participan en la resistencia a estos antibióticos en algunas cepas. La participación de bombas de expulsión es un mecanismo que hay que tomar en cuenta en estas cepas debido a que también pueden estar involucrados en la expulsión de otros antibióticos. No se descarta la posibilidad de que estén participando otros mecanismos de resistencia.

## Perspectivas

- Determinar la participación de las bombas de expulsión en la resistencia a GM, AN y CIP en las cepas faltantes.
- Estudiar los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos
- Investigar la participación de otras enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*aac(3)-I* y *II*, *aac(6')-II*, *ant(2'')-I*, *ant(4')*, *aph(3')-I*) y metilasas ARNr 16S (*armA*, *rmtB*, *rmtD*).
- Secuenciar cepas que presentan el gen *aac(6')-Ib* para identificar la variante de resistencia a quinolonas.
- Amplificar genes reguladores de las bombas de expulsión (*mexR*, *mexT*, *mexZ*, *nfxB*) e identificar mutaciones.
- Amplificar y secuenciar los genes *gyrA* y *parC* para identificar mutaciones.
- Realizar PFGE de las cepas estudiadas.

## Bibliografía

- Ahmad, S., Alotaibi, M. A., & Alamri, M. S. (2020). Antibiotic Sensitivity Pattern of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* at a Tertiary Care Hospital in Saudi Arabia. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci*, 19(1), 77–82.
- Al-Jubori, S. S., Al-Jabiri, H. A., & Al-Kadmy, I. M. . (2015). Molecular Detection of Aminoglycoside Resistance Mediated by Efflux Pump and Modifying Enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iraqi Hospitals. *GCMBPF*, 96–100. <https://doi.org/10.15242/iicbe.c0615057>
- 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>
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Ali, S. A. M., Hassan, R. M. M., Khairat, S. M., & Salama, A. M. A. (2018). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* and *aac(6')-Ib* in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology Research Journal International*, 25(2), 1–12. <https://doi.org/10.9734/mrji/2018/44295>
- Alnour, T. M., & Ahmed-Abakur, E. H. (2017). Multidrug Resistant *Pseudomonas (P) aeruginosa*: Medical Impact, Pathogenicity, Resistance Mechanisms and Epidemiology. *JSM Microbiology*, 5(3), 1–8.
- Álvarez-Hernández, D. A., Garza-Mayén, G. S., & Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista chilena de infectología*, 32(5), 499–504. [www.sochinf.cl](http://www.sochinf.cl)
- Amábile-Cuevas, C. F. (2017). Selection of Amikacin Hyper-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* after Stepwise Exposure to High Amikacin Concentrations. *Microbial Drug Resistance*, 23(1), 32–36. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0218>
- Araujo, B. F., Ferreira, M. L., De Campos, P. A., Royer, S., Batistão, D. W. D. F., Dantas, R. C. C., Gonçalves, I. R., Faria, A. L. S., De Brito, C. S., Yokosawa, J., Gontijo-Filho, P. P., & Ribas, R. M. (2016). Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *P. aeruginosa* carrying *aac(6')-ib-cr*, *qnrS1* and *blaSPM* genes in Brazil. *PLoS ONE*, 11(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155914>
- Asghar, A. H., & Ahmed, O. B. (2018). Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a tertiary care hospital in Makkah, KSA. *Clinical Practice*, 15(2), 541–547. <https://doi.org/10.4172/clinical-practice.1000391>

- Askoura, M., Mattawa, W., Abujamel, T., & Taher, I. (2011). Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan Journal of Medicine*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.3402/ljm.v6i0.5870>
- Barba, P., Ortega, P. D., Yauri, M. F., Rodríguez, R. M., Zurita, J., & Alcocer, I. (2017). Detección de genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 33(1–2), 46–56. <https://doi.org/10.26807/remcb.v33i1-2.222>
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, 7, 1–18. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Becchi, M. A., Pescetelli, M., Caiti, O., & Carulli, N. (2010). Characteristics of patients in a ward of Academic Internal Medicine: Implications for medical care, training programmes and research. *Internal and Emergency Medicine*, 5(3), 205–213. <https://doi.org/10.1007/s11739-009-0325-5>
- Bello, A., & Dingle, T. C. (2018). What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Newsletter*, 40(20), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.10.001>
- Blair, J. M. A., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. V. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/FMB.14.66>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Brown, P. D., & Izundu, A. (2004). Antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Jamaica. *Rev Panam Salud Publica*, 16(2), 125–130.
- Calderón, R. G., & Aguilar, U. L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 73(621), 757–763. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=66647%0Ahttp://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/620/art52.pdf>
- Cantón, R., Horcajada, J. P., Oliver, A., Garbajosa, P. R., & Vila, J. (2013). Inappropriate use of antibiotics in hospitals: The complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(SUPPL. 4), 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70126-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70126-5)

- Cattoir, V., & Nordmann, P. (2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Gram-Negative Bacterial Species: An Update. *Current Medicinal Chemistry*, 16(8), 1028–1046. <https://doi.org/10.2174/092986709787581879>
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J., Nordmann, P., Mondor, H., Publique, A., & Hôpitaux De Paris, /. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 394–397. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm204>
- Cayci, Y. T., Coban, A., & Gunaydin, M. (2014). Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 32(3), 285–289. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.136567>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States*. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.05.006>
- Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Romo-Rodríguez, P., Pérez-Gallardo, R. V., Campos-García, J., Félix Gutiérrez-Corona, J., García-Merinos, J. P., Meza-Carmen, V., Silva-Sánchez, J., & Ramírez-Díaz, M. I. (2018). CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.02629-17>
- Chávez-Valencia, V., Gallegos-Nava, S., & Arce-Salinas, C. A. (2010). Patrones de resistencia antimicrobiana y etiología en infecciones urinarias no complicadas. *Gaceta Medica de Mexico*, 146(4), 269–273. [www.anmm.org.mx](http://www.anmm.org.mx)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 29th ed. En *M100, 29th Edition*.
- Cortés-Cortés, G. (2016). Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México (Tesis de Doctorado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Costello, S. E., Deshpande, L. M., Davis, A. P., Mendes, R. E., & Castanheira, M. (2018). Aminoglycoside-modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methyltransferase genes among a global collection of Gram-negative isolates. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.020>
- Davane, M., Suryawanshi, N., Pichare, A., & Nagoba, B. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* from hospital environment. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 4(1), 42–43. <https://doi.org/10.5799/ahinjs.02.2014.01.0124>
- Dièye, B., Mi, D., & Ai, S. (2020). Epidemiological Aspects and Antibiotic Resistance Profile of *Pseudomonas aeruginosa* in Fann CHNU. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 7(1), 1–6.

- Doi, Y., Ghilardi, A. C. R., Adams, J., De Oliveira Garcia, D., & Paterson, D. L. (2007). High Prevalence of Metallo-Lactamase and 16S rRNA Methylase Coproduction among Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(9), 3388–3390. <https://doi.org/10.1128/AAC.00443-07>
- Dubois, V., Arpin, C., Dupart, V., Scavelli, A., Coulange, L., André, C., Fischer, I., Grobost, F., Brochet, J. P., Lagrange, I., Dutilh, B., Jullin, J., Noury, P., Larribet, G., & Quentin, C. (2008).  $\beta$ -Lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *62*(2), 316–323. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn174>
- Džidić, S., Šušković, J., & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, *46*(1), 11–21.
- El Zowalaty, M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K., Marei, H. E., & Ashour, H. M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: Arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*, *10*(10), 1683–1706. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.48>
- Espinoza-Tavera, A., Hernández-Gracia, G., & Ávila-Aguilar, S. (2014). Prevalencia y perfil de resistencia a antibióticos de microorganismos aislados de infecciones en pie diabético. *Ciencia UAT*, *9*(1), 84–89.
- Estepa, V., Rojo-Bezares, B., Azcona-Gutiérrez, J. M., Olarte, I., Torres, C., & Sáenz, Y. (2017). Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital español. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *35*(3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.014>
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, *2*(1), 40–61. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>
- Fernández, C. F., López, C. L., & Pascual, H. Á. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *31*(SUPPL.1), 20–25. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70110-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70110-1)
- Fernando, D. M., & Kumar, A. (2013). Resistance-Nodulation-Division multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria: Role in virulence. *Antibiotics*, *2*(1), 163–181. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2010163>
- Founou, R. C., Founou, L. L., & Essack, S. Y. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, *12*(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>

- French National Authority for Health (HAS). (2019). Antibiotic treatment of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* infections in adults: role of carbapenems and their alternatives. [www.anism.sante.fr](http://www.anism.sante.fr)
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2015). Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives Sylvie. *Med. Chem. Commun*, 1–14. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>
- Gómez, J., García-Vázquez, E., & Hernández-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 1–9.
- González-Jiménez, G., A. (2013). Estudio de los genes relacionados con la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos y relación filogenética de cepas de *klebsiella pneumoniae* causantes de un brote de infección nosocomial (Tesis de Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Gurung, M., Moon, D. C., Tamang, M. D., Kim, J., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., & Lee, J. C. (2010). Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla*IMP-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(4), 468–470. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.021>
- Hancock, R. E. W., & Speert, D. P. (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*, 3(4), 247–255. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0152>
- Hazra, S., Roy, P., & Patel, A. (2019). Prevalence of plasmid mediated Aminoglycoside Modifying Enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* in Hospitalized patients at a tertiary care center. *Int. J. Adv. Res*, 7(2), 273–280. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/8485>
- Jafari, M., Fallah, F., Borhan, R. S., Navidinia, M., Karimi, A., Rafiei Tabatabaei, S., & Hashemi, A. (2013). The first report of CMY, *aac(6')-Ib* and 16S rRNA methylase genes among *pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 1(3), 109–112. <https://doi.org/10.5812/pedinfect.11392>
- Jaillard, M., van Belkum, A., Cady, K. C., Creely, D., Shortridge, D., Blanc, B., Barbu, E. M., Dunne, W. M., Zambardi, G., Enright, M., Mugnier, N., Le Priol, C., Schicklin, S., Guigon, G., & Veyrieras, J. B. (2017). Correlation between phenotypic antibiotic susceptibility and the resistome in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.02.026>
- Jo, J. T. H., Brinkman, F. S. L., & Hancock, R. E. W. (2003). Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1101–1111. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1101-1111.2003>

- Kashfi, M., Hashemi, A., Eslami, G., Amin, M. S., Tarashi, S., & Taki, E. (2017). The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, *12*(1), 1–5. <https://doi.org/10.5812/archcid.40896>
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, *73*(4), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>
- Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *5*(7), 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>
- Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *7*(5), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(6), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10156-008-0661-9>
- Lambert, T., Ploy, M. C., & Courvalin, P. (1993). A spontaneous point mutation in the *aac(6')-Ib'* gene results in altered substrate specificity of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *FEMS Microbiology Letters*, *115*(2–3), 297–303. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06654.x>
- Lamers, R. P., Cavallari, J. F., & Burrows, L. L. (2013). The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *PLoS ONE*, *8*(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060666>
- Laws, M., Shaaban, A., & Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: Current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(5), 490–516. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>
- Lebeque, P. Y., Morris, Q. H. J., & Calás, V. N. (2006). Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de Medicina*, *45*(1). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75232006000100005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232006000100005)
- Lee, J. K., Lee, Y. S., Park, Y. K., & Kim, B. S. (2005). Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas*

- aeruginosa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(4), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.11.012>
- Lila, G., Mulliqi-Osmani, G., Bajrami, R., Kurti, A., Azizi, E., & Raka, L. (2016). Antimicrobial resistance profile and serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in university clinical centre of Kosovo. *Acta Medica Mediterranea*, 32(3), 829–835. [https://doi.org/10.19193/0393-6384\\_2016\\_3\\_98](https://doi.org/10.19193/0393-6384_2016_3_98)
- 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>
- López-Causapé, C., Cabot, G., del Barrio-Tofiño, E., & Oliver, A. (2018). The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 9(685), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00685>
- López-García, A. (2019). Resistencia molecular en *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente (Tesis de Doctorado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- López-García, A., Del Carmen Rocha-Gracia, R., Bello-López, E., Juárez-Zelocualtecal, C., Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M., López-Pliego, L., Cristina González-Vázquez, M., Torres, C., Ayala-Nuñez, T., Jiménez-Flores, G., María De La Paz Arenas-Hernández, M., & Lozano-Zarain, P. (2018). Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican hospital. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1523–1536. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173455>
- Ma, Y., Wang, C., Li, Y., Li, J., Wan, Q., Chen, J., Tay, F. R., & Niu, L. (2020). Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. *Advanced Science*, 7(1), 1–43. <https://doi.org/10.1002/advs.201901872>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Marchetti, M. L., Errecalde, J., & Mesterino, N. (2011). Resistencia Bacteriana a los Antimicrobinos Ocasionada por Bombas de Eflujo. Impacto en la Multirresistencia. *Analecta Vet*, 31(2), 40–53.

- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321(5887), 365–367.
- Meletis, G., & Bagkeri, M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options. En *Infection Control* (pp. 33–56). InTech. <https://doi.org/10.5772/55616>
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(6), 560–578. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x>
- Michalska, A. D., Sacha, P. T., Ojdana, D., Wieczorek, A., & Tryniszewska, E. (2014). Prevalence of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones among *Pseudomonas aeruginosa* strains in a University Hospital in Northeastern Poland. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1455–1458. [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)
- Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Hare, R. S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., Shimizu, K., & Shaw, K. J. (1997). The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms - changes with time and geographic area: A reflection of aminoglycoside usage patterns? *Clinical Infectious Diseases*, 24(1 SUPPL.), 46–62. [https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement\\_1.s46](https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement_1.s46)
- Mohanam, L., & Menon, T. (2017). Emergence of *rmtC* and *rmtF* 16S rRNA Methyltransferase in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 35(2), 282–285. [https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM\\_16\\_231](https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_231)
- Moore, N. M., & Flaws, M. L. (2011). Treatment Strategies and Recommendations for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Laboratory Science*, 24(1), 52–56. <http://hwmainit.clsjournal.ascls.org/>
- Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2012a). Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology*, 158(4), 1071–1083. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054320-0>
- Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2012b). Mexxy multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 3(408), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00408>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbial Spectrum*, 4(2), 1–24. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Navidinia, M. (2016). The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Journal of Paramedical Sciences*, 7(3), 43–57.

- Nejma, M. Ben, Sioud, O., & Mastouri, M. (2017). Quinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from University Hospital in Tunisia. *3 Biotech*, *8*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1019-8>
- Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *28*(Supl 1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Bol Med Hosp Infant Mex*, *70*(2), 130–150. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
- Oromí, D. J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Clinica*, *38*(10), 367–370.
- Pachori, P., Gothwal, R., & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes and Diseases*, *6*(2), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>
- Pandrea, S. L., Junie, L. M., Pepelea, L. S., Ciontea, M. I., & Matros, L. (2016). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surgical wards. *Abstracts / International Journal of Infectious Diseases*, *53*, 4–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.117>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, *37*(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme Downloaded from. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, *50*(11), 3953–3955. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-06>
- Pasca, M. R., Dalla Valle, C., De Jesus Lopes Ribeiro, A. L., Buroni, S., Papaleo, M. C., Bazzini, S., Udine, C., Incandela, M. L., Daffara, S., Fani, R., Riccardi, G., & Marone, P. (2012). Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistance clinical isolates. *Microbial Drug Resistance*, *18*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0019>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, *36*(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>

- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Pham, T. D. M., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. T. (2019). Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, 10(10), 1719–1739. <https://doi.org/10.1039/c9md00120d>
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 479–487. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.479-487.2005>
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*, 2(65), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
- Rafiq, K., Ahmad, K., Ahmad, N., Gohar, M., Shehzad, M. A., & Saeed, M. Q. (2019). Determination of Qnr allele frequencies in Fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 69(2), 250–252. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>
- Ramirez, M. S., Nikolaidis, N., & Tolmasky, M. E. (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: The *aac(6')-Ib* paradigm. *Frontiers in Microbiology*, 4(121), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00121>
- Rehman, A., Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 1–10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000873>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rice, L. B., & Bonomo, R. A. (2017). Mechanisms of resistance to antibacterial agents. *Antimicrobial stewardship: principles and practice*, 1082–1114. <https://doi.org/10.1079/9781780644394.0039>
- Roca, A. L., & Ángel, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4), 465–474. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53535594009>
- Rodríguez, S. M. (2018). Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México. *Boletín CONAMED-OPS*, 3(17), 16–20. [www.who.int/gpsc/background/es/index.html](http://www.who.int/gpsc/background/es/index.html)

- Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(Suppl. 4), 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01161.x>
- Sabtu, N., Enoch, D. A., & Brown, N. M. (2015). Antibiotic resistance: What, why, where, when and how? *British Medical Bulletin*, 116, 105–113. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv041>
- Salazar-Holguín, H. D., & Cisneros-Robledo, M. E. (2016). Resistencia a los antimicrobianos de agentes causales de las principales infecciones nosocomiales. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(4), 462–471.
- Saleh, M. A., & Balboula, M. M. (2017). Plasmid Mediated Quinolone Resistance Determinants among Nosocomial Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 6(1), 42–50. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.006>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Saw, H. T. H., Webber, M. A., Mushtaq, S., Woodford, N., & Piddock, L. J. V. (2016). Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1510–1519. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw028>
- Serio, A. W., Keepers, T., Andrews, L., & Krause, K. M. (2018). Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus*, 8(1), 1–20. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0002-2018>
- Shortridge, D., Gales, A. C., Streit, J. M., Huband, M. D., Tsakris, A., & Jones, R. N. (2019). Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Suppl 1), S63–S68. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy343>
- Shriram, V., Khare, T., Bhagwat, R., Shukla, R., & Kumar, V. (2018). Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 9(2990), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02990>
- Sohn, E. S., Yoo, J. S., Lee, J. K., Lee, K. M., Chung, G. T., Shin, E. S., Han, S. Y., Lee, S. H., Kim, J., & Lee, Y. S. (2007). Investigation of  $\beta$ -lactamase-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from non-tertiary care hospitals in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(10), 1733–1737.

- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infect Epidemiol Med*. 2016 Winter, 2(1), 25–32. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.2.1.25>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Takrami, S. R., Ranji, N., & Hakimi, F. (2017). New Mutations in Ciprofloxacin Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Guilan Province, Northern Iran. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 32(4), 218–223. <https://doi.org/10.3103/S089141681704005X>
- Teixeira, B., Rodulfo, H., Carreño, N., Guzmán, M., Salazar, E., & De Donato, M. (2016). AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE GENES IN *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATES FROM CUMANA, VENEZUELA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 58(13), 1–5. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658013>
- Vall, J., & Mariscal, D. (2005). Neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 23(Supl. 3), 30–36.
- Vera, J.-C., Ribas-Aparicio, R. M., Osorio-Carranza, L., & Aparicio, G. (2006). Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario multirresistentes a 21 antibióticos. *Bioquímica*, 31(2), 41–48.
- Wilson, D. N., Haurlyuk, V., Atkinson, G. C., & O'Neill, A. J. (2020). Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z>
- World Health Organization. (2017). *Global priority list of Antibiotic-Resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- Yang, X., Xing, B., Liang, C., Ye, Z., & Zhang, Y. (2015). Prevalence and fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 1386–1390.
- Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 9(6), 1–9. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>

## Anexos

### Anexo 1. Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos

#### Prioridad 1: CRÍTICA

*Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos

*Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos

*Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos, resistente a cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación

#### Prioridad 2: ELEVADA

*Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina

*Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina

*Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina

*Campylobacter*, resistente a las fluoroquinolonas

*Salmonella* spp., resistentes a las fluoroquinolonas

*Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación, resistente a las fluoroquinolonas

#### Prioridad 3: MEDIA

*Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina

*Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina

*Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas

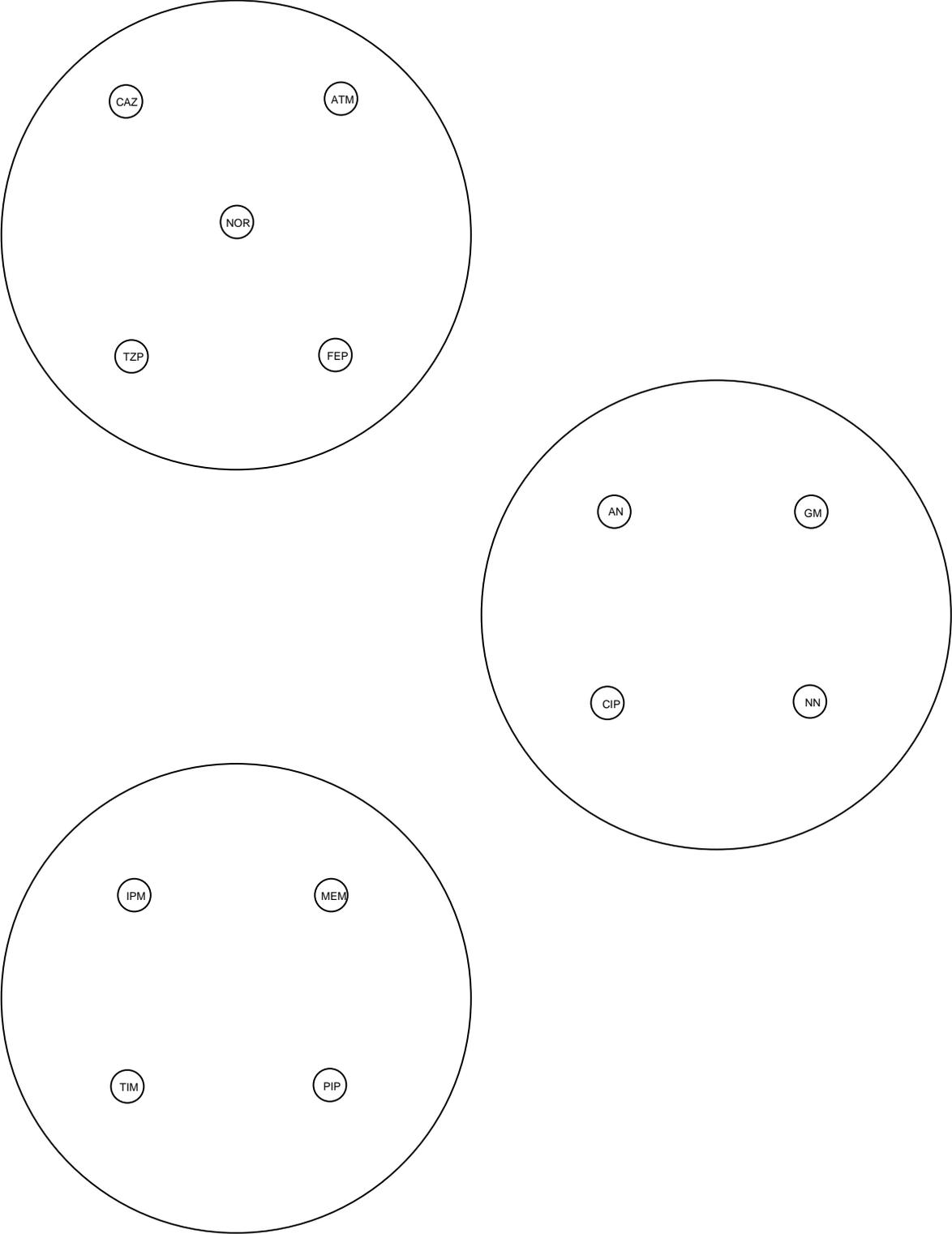
(Modificada de World Health Organization, 2017)

**Anexo 2. Tabla de EMA reportadas en *P. aeruginosa***

<b>Tipo de enzima</b>	<b>Familia</b>	<b>Subfamilia</b>	<b>Sustrato</b>
<b>Acetiltransferasas (AAC)</b>	AAC(3)	I	Gentamicina
		II	Gentamicina Tobramicina
		III	Gentamicina Tobramicina
		IV	Gentamicina
		VI	Gentamicina Tobramicina
	AAC(6')	I	Amikacina Tobramicina
		II	Gentamicina Tobramicina
<b>Nucleotidiltransferasas</b>	ANT(2'')	I	Gentamicina Tobramicina
	ANT(3'')		Estreptomina
	ANT(4')	IIa	Amikacina Tobramicina
		IIb	Amikacina Tobramicina
<b>*Fosforiltransferasas</b>	APH(3')	I	Kanamicina Neomicina
		II	Kanamicina Neomicina
		IIb	Kanamicina
		VI	Amikacina Isepamicina
	APH(2'')		Gentamicina Tobramicina

\*Tienen poca importancia en la clínica al ser enzimas que confieren resistencia a aminoglucósidos que no se utilizan habitualmente en el tratamiento contra *P. aeruginosa*. (Meletis & Bagkeri, 2013; Poole, 2005; Strateva & Yordanov, 2009)

**Anexo 3. Esquema de distribución de los sensidiscos en la placa**



#### Anexo 4. Cepas resistentes a aminoglucósidos y quinolonas

Número de cepa	Servicio	Muestra	Fenotipo de resistencia														
			PIP	TIM	TZP	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	GM	NN	AN	CIP	NOR		
PsE103	Pediatría	Expectoración															
PsE105	MI	Herida															
PsE107	UCI	Urocultivo															
PsE108	MI	Expectoración															
PsE112	MI	Urocultivo															
PsE114	MI	Urocultivo															
PsE115	MI	Urocultivo															
PsE118	MI	Urocultivo															
PsE119	UCI	Urocultivo															
PsE121	Urología	Urocultivo															
PsE125	UCI	Hemocultivo/CVC															
PsE126	UCI	Lavado bronquioalveolar															
PsE128	UCI	Lavado bronquioalveolar															
PsE130	Urología	Urocultivo															
PsE133	UCI	Cultivo secreción herida															
PsE137	Cirugía	Expectoración															
PsE139	Urología	Urocultivo															
PsE140	UCI	Lavado bronquioalveolar															
PsE142	MI	Cultivo herida quirúrgica															
PsE144	Urología	Urocultivo															
PsE150	Cirugía	Herida															
PsE151	MI	Urocultivo															
PsE152	MI	Cultivo catéter venoso central															
PsE156	UCI	Cultivo de secreción															
PsE157	UCI	Cultivo lavado bronquial															
PsE158	UCI	Cultivo lavado bronquial															
PsE165	MI	Hemocultivo															
PsE175	Ginecología	Urocultivo															
PsE177	MI	Hemocultivo															
PsE184	MI	Cultivo lavado bronquial															
PsE193	Urología	Urocultivo															
PsE197	Urología	Urocultivo															
PsE201	Cardiología H	Urocultivo															
PsE211	Cirugía H	Urocultivo															
PsE223	MF	Urocultivo															
PsE224	MI	Urocultivo															
PsE228	MI	Urocultivo															
PsE231	MI	Exudado faríngeo															
PsE238	MI	Urocultivo															
PsE239	MI	Urocultivo															
PsE241	Urología	Urocultivo															
PsE243	Urología	Urocultivo															
PsE244	Urología	Urocultivo															
PsE245	Cirugía	Cultivo de secreción															

**PIP:** piperacilina, **TIM:** ticarcilina-ac. clavulánico, **TZP:** piperacilina-tazobactam, **CAZ:** ceftazidima, **FEP:** cefepime, **ATM:** aztreonam, **IPM:** imipenem, **MEM:** meropenem, **GM:** gentamicina, **NN:** tobramicina, **AN:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacina y **NOR:** norfloxacina. **Azul:** antibiótico al que presentaron resistencia.

### Anexo 5. Características de las cepas que presentaron participación de las bombas de expulsión

Número de cepa	Servicio	Muestra	Fenotipo de resistencia	Genotipo		CMI µg/mL		
				Aminoglucósidos	Quinolonas	GM (+PAβN)	AN (+PAβN)	CIP (+PAβN)
PsE103	Pediatría	Expectoración	PIP TIM CAZ GM NN AN	-	-	256 (256)	128 ↑(256)	-
PsE105	MI	Herida	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	128 ↑(256)	128 ↑(256)	32 (32)
PsE107	UCI	Urocultivo	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	128 ↑(256)	128 (128)	32 (32)
PsE108	MI	Expectoración	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	-	-	32 ↑(64)	128 ↑(256)	128 (128)
PsE112	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	512 ↓(256)	512 ↓(256)	>512 (>512)
PsE118	MI	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	512 (512)	512 ↓(256)	>512 (>512)
PsE125	UCI	Hemocultivo/CVC	PIP TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM CIP	-	-	8 ↓(2)	-	2 (2)
PsE126	UCI	Lavado bronquioalveolar	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	>512 ↓(512)	512 ↓(256)	256 ↓(128)
PsE133	UCI	Cultivo secreción herida	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	128 ↑(512)	128 (128)	32 (32)
PsE137	Cirugía	Expectoración	TIM CAZ FEP IPM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	>512 ↓(512)	512 ↓(256)	256 (256)
PsE139	Urología	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	>512 ↓(512)	>512 ↓(512)	256 (256)
PsE140	UCI	Lavado bronquioalveolar	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	128 (128)	64 ↑(128)	32 (32)
PsE158	UCI	Cultivo lavado bronquial	PIP TIM TZP CAZ FEP ATM IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	ND	ND	32 ↓(16)
PsE177	MI	Hemocultivo	TIM CAZ FEP IPM MEM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	ND	ND	256 ↓(128)
PsE223	MF	Urocultivo	PIP TIM CAZ FEP ATM GM NN AN CIP NOR	<i>aac(6')-Ib</i>	-	ND	ND	128 ↓(64)

**MI:** medicina interna, **UCI:** unidad de cuidados intensivos, **MF:** medicina familiar, **PIP:** piperacilina, **TIM:** ticarcilina-ac. clavulánico, **TZP:** piperacilina-tazobactam, **CAZ:** ceftazidima, **FEP:** cefepime, **ATM:** aztreonam, **IPM:** imipenem, **MEM:** meropenem, **GM:** gentamicina, **NN:** tobramicina, **AN:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacina y **NOR:** norfloxacina. **CMI:** concentración mínima inhibitoria, **Rojo:** disminución de la CMI, **Azul:** aumento de la CMI.