

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LABORATORIO
CLÍNICO**

**“CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Pseudomonas* spp.
EN CEPAS PROCEDENTES DEL CEPARIO DE LA CARRERA DE
LABORATORIO CLÍNICO- PUCE”**

AUTORES

**Ambar Nicole Gómez Inca
Angie Mariela Véliz García**

DIRECTOR

Mtr. Andrés Esteban Zabala Parreño

Quito, 2023

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, AMBAR NICOLE GÓMEZ INCA, C.I. 1725218711, autora del trabajo de graduación titulado **“CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Pseudomonas spp.* EN CEPAS PROCEDENTES DEL CEPARIO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO- PUCE”**, previo a la obtención del grado académico de LABORATORIO CLÍNICO en la Facultad de Medicina-Carrera de Laboratorio Clínico:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Ambar Nicole Gómez Inca

C.I. 1725218711

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, ANGIE MARIELA VÉLIZ GARCÍA, C.I. 1310612831, autora del trabajo de graduación titulado **“CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE *Pseudomonas spp.* EN CEPAS PROCEDENTES DEL CEPARIO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO- PUCE”**, previo a la obtención del grado académico de LABORATORIO CLÍNICO en la Facultad de Medicina-Carrera de Laboratorio Clínico:

3. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
4. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Angie Mariela Véliz García

C.I. 1310612831

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación de las Srtas. Ambar Nicole Gómez Inca, Angie Mariela Véliz García intitulado “*CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE Pseudomonas spp. EN CEPAS PROCEDENTES DEL CEPARIO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO- PUCE*”, ha concluido de conformidad con las normas establecidas por la Unidad Académica, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. Andrés Esteban Zabala Parreño

Director

Quito, 2023

DEDICATORIA

A Dios por cada paso y darme la posibilidad de vivir nuevas oportunidades.

A mi familia completa por guiarme en esta nueva etapa de mi vida y permitirme alcanzar uno
de mis sueños.

Ambar Nicole Gómez Inca

DEDICATORIA

A Dios porque ha estado en cada paso conmigo cuidándome
y dándome fortaleza para poder concluir mi carrera.

A mis padres Xavier Hernán y Martha Mariela quienes a lo largo de mi vida han velado por
mi bienestar y educación entregándome todo su amor y apoyo incondicional a través de la
carrera, que, con toda su ayuda, consejos y confianza he conseguido alcanzar una de mis
primeras metas en mi vida profesional.

A mi hermano Carlos que es mi mejor amigo y con su cariño me anima a seguir creciendo.

Angie Mariela Véliz García

AGRADECIMIENTO

A Dios por todas las bendiciones que nos ha dado a cada una día a día.

A nuestros padres por darnos la oportunidad de estudiar una carrera universitaria, y depositar su confianza en que lograríamos nuestras metas en esta etapa inicial de nuestras vidas. Y por brindarnos el apoyo necesario para continuar a pesar de los altos y bajos, además de recordarnos lo fuertes y capaces que somos para lograr nuestros propósitos.

A la carrera de Laboratorio Clínico de la Pontificia Universidad del Ecuador que ha sabido guiarnos en nuestro crecimiento personal como profesionales.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Facultad de Medicina por permitirnos completar nuestros estudios profesionales en tan prestigiosa universidad y a todos los docentes que alguna vez fueron nuestros profesores.

Al Mtr. Andrés Zabala por darnos la oportunidad de trabajar en este proyecto y obtener los resultados deseados. Gracias por la confianza y paciencia para guiarnos cuando se presentaban imprevistos. Al Dr. Santiago Escalante, el uso de las instalaciones y las cepas de la carrera de Laboratorio Clínico. Y al Mtr. Eduardo Villacís, por la atención brindada y apoyo durante nuestro trabajo final.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Pseudomonas* spp. son bacilos Gram negativos no fermentadores y aerobios facultativos los cuales provocan infecciones en las zonas más representativas como tejidos y órganos, se pueden dar por la capacidad de adaptación, diseminación y adquisición de nuevos mecanismos de resistencia siendo considerada un fenómeno de impacto ascendente relacionada con la seguridad del paciente a nivel intrahospitalario. El perfil de resistencia antibiótica para *Pseudomonas* spp. se clasifica como: multirresistentes (MDR), cepas extremadamente resistentes (XDR) y pan-resistentes (PDR). Por este motivo, afecta la formación de enzimas o mutaciones que inactivan antibióticos tales como β -lactámicos y carbapenémicos. La problemática se basa en los genes de resistencia que se desencadena por el uso frecuente y erróneo de antibióticos e incorrecta identificación de género-especie.

MATERIALES Y MÉTODOS: El proyecto se dividió en 4 fases. La primera, selección de cepas de *Pseudomonas* spp., posterior coloración Gram, pruebas bioquímicas y enzimáticas que identificaron cada una de las cepas. La segunda, determinación del perfil fenotípico por difusión en disco, consecuente a ello se obtuvo una lectura interpretativa distribuida por la clasificación de Ambler. La tercera, identificación genotípica de las cepas establecido por extracción del ADN y amplificación de los genes de resistencia. Finalmente, la cuarta fase controles de calidad en cada procedimiento realizado.

RESULTADOS: El 73,4% (47/64) de las cepas identificadas como *Pseudomonas* spp. se asoció con la clasificación genotípica el 38,30% de clase A, 10,64% clase B, 2,13% clase C y 6,38 % clase D. Seguidamente se amplificaron las cadenas de ADN y genes de resistencia con la Master Mix - PCR de punto final para visualizar el producto examinado mediante una corrida electroforética. Se obtuvo que el gen más prevalente es bla_{GES} con un 38,30% (18/47) y la cepa predominante es *P. aeruginosa* con una prueba estadística con valor p de 0,013.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES: La lectura interpretativa del antibiograma deduce mecanismos de resistencia y puntos de corte de cada antibiótico. Se observó prevalencia del gen bla_{GES}/Clase A en la mayoría de las cepas que generarían resistencia a otras familias de fármacos, las carbapenemasas desarrollan resistencia por pérdidas de porinas, β -lactamasas y biofilms. Se sugiere la correcta identificación bacteriana y el uso apropiado del CLSI M:100, 2023, ya que no todos los mecanismos de resistencia son definitivos y se recomienda el uso de pruebas complementarias.

PALABRAS CLAVES: *Pseudomonas* spp., cepas, PRA, perfil de susceptibilidad, fenotípico, genotípico, antibiótico.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Pseudomonas* spp. they are non-fermenting Gram-negative bacilli and facultative aerobic which cause infections in the most representative areas such as tissues and organs, they can be caused by the ability to adapt, spread and acquire new resistance mechanisms, being considered a phenomenon of ascending impact related to the patient safety at the hospital level. The antibiotic resistance profile for *Pseudomonas* spp. they are classified as: multi-resistant (MDR), extremely resistant (XDR) and pan-resistant (PDR) strains. For this reason, it affects the formation of enzymes or promoters that inactivate antibiotics such as β -lactams and carbapenems. The problem is based on the resistance genes that are triggered by the frequent and erroneous use of antibiotics and incorrect identification of the genus-species.

MATERIALS AND METHODS: The project was divided into 4 phases. The first, selection of *Pseudomonas* spp. strains, subsequent Gram staining, biochemical and enzymatic tests that identified each of the strains. The second, determination of the phenotypic profile by disc diffusion, consequently an interpretive reading distributed by Ambler's classification was obtained. The third, genotypic identification of the strains established by DNA extraction and amplification of resistance genes. Finally, the fourth phase controls quality in each procedure carried out.

RESULTS: 73.4% (47/64) of the strains identified as *Pseudomonas* spp. 38.30% class A, 10.64% class B, 2.13% class C and 6.38% class D were associated with the genotypic classification. Subsequently, the DNA chains and resistance genes were amplified with the Master Mix end point PCR to visualize the product examined by an electrophoretic run. It was found that the most prevalent gene is bla_{GES} with 38.30% (18/47) and the predominant strain is *P. aeruginosa* with a statistical test with a p value of 0.013.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS: The interpretive reading of the antibiogram deduces resistance mechanisms and cut-off points for each antibiotic. Prevalence of the bla_{GES}/Class A gene was observed in most of the strains that would generate resistance to other families of drugs, carbapenemases develop resistance due to loss of porins, β -lactamases and biofilms. Correct bacterial identification and appropriate use of CLSI M:100, 2023 is suggested, since not all resistance mechanisms are definitive and the use of complementary tests is recommended.

KEY WORDS: *Pseudomonas* spp., strains, PRA, susceptibility profile, phenotypic, genotypic, antibiotic.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	II
CERTIFICACIÓN.....	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO	VII
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT	IX
TABLA DE CONTENIDOS	X
LISTA DE TABLAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS	XIII
LISTA DE SIGLAS	XIV
CAPITULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.4 OBJETIVOS	6
1.4.1 <i>Objetivo general</i>	6
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i>	6
1.4.3 <i>Limitaciones del estudio</i>	6
CAPITULO II	7
2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	7
2.1.1 <i>Antecedentes</i>	7
2.2 MARCO TEÓRICO.....	9
2.2.1 <i>Género de Pseudomonas spp.</i>	9
2.2.2 <i>Factores de virulencia</i>	10
2.2.3 <i>Formación de biofilms</i>	11
2.2.4 <i>Sistemas de adquisición del hierro</i>	11
2.2.5 <i>Sistemas de secreción</i>	11
2.2.6 <i>Motilidad</i>	13
2.2.7 <i>Metabolitos secundarios</i>	13
2.2.8 <i>Sistema de señalización en la regulación de genes de virulencia</i>	14
2.2.9 <i>Otros productos bacterianos</i>	15

2.2.10	<i>Presentación clínica de importancia</i>	15
2.2.11	<i>Pruebas diagnósticas en el laboratorio</i>	16
2.2.12	<i>Antibióticos</i>	17
2.2.13	<i>Métodos para identificar la susceptibilidad antimicrobiana</i>	20
2.2.14	<i>Mecanismo de resistencia bacteriana</i>	21
2.2.15	<i>Enzimas de resistencia antimicrobiana</i>	24
2.2.16	<i>Importancia y descripción de los primers</i>	26
2.3	MARCO CONCEPTUAL	28
	CAPITULO III.....	29
3.1	MARCO METODOLÓGICO.....	29
3.1.1	<i>Tipo de estudio</i>	29
3.1.2	<i>Tipo de muestreo</i>	29
3.1.3	<i>Tamaño de la Muestra</i>	29
3.1.4	<i>Criterios de Inclusión</i>	29
3.1.5	<i>Criterios de Exclusión</i>	30
3.1.6	<i>Análisis Estadístico</i>	30
3.2	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	30
3.2.1	<i>Variable Principal</i>	30
3.2.2	<i>Variable Secundaria</i>	30
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.4	PROCEDIMIENTO	32
3.4.1	<i>Fase uno: Selección de cepas de Pseudomonas para estudio</i>	32
3.4.3	<i>Fase dos: Determinación del perfil fenotípico mediante el método de difusión en disco</i> 33	
3.4.4	<i>Fase tres: Identificación genotípica de las especies de Pseudomonas spp.</i>	33
3.4.5	<i>Fase cuatro: Control de calidad de los procedimientos de laboratorio</i>	35
	CAPITULO IV	36
4.1	RESULTADOS	36
4.1.2	<i>Identificación del perfil de susceptibilidad por medio del método de difusión en disco de las cepas aisladas en el cepario</i>	37
4.1.3	<i>Identificación molecular de los genes de resistencia en cepas de Pseudomonas spp. del cepario mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	38

<i>4.1.4 Determinación de la frecuencia de los genes de resistencia en cepas de Pseudomonas spp. obtenidas a partir de aislados conservados en el cepario mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</i>	40
CAPITULO V	42
5.1 DISCUSIÓN	42
5.2 CONCLUSIONES	46
5.3 RECOMENDACIONES.....	47
5.4 BIBLIOGRAFIA	48
5.5 ANEXOS	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Enzimas de resistencia antimicrobiana	25
Tabla 2 Genes de resistencia asociados a <i>Pseudomonas</i> spp.....	26
Tabla 3 Secuencia de los primers asociados a los genes de resistencia	27
Tabla 4 Operacionalización de las variables	31
Tabla 5 Materiales, reactivos y equipos	32
Tabla 6 Secuencia de los genes de <i>Pseudomonas</i> spp.	35
Tabla 7 Identificación de las cepas almacenadas en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico.....	36
Tabla 8 Frecuencia de genes y clases.....	40
Tabla 9 Correlación de los genes con las cepas	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Antibiograma.....	20
Figura 2 Diagrama de flujo para la identificación de clases según Ambler	33
Figura 3 Porcentaje de susceptibilidad de antibiograma	37
Figura 4 Corrida electroforética.....	38
Figura 5 Porcentaje de cepas identificadas por clase.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Protocolo de PCR para la detección de genes de resistencia para <i>Pseudomonas</i> spp.	57
---	----

LISTA DE SIGLAS

- **AK:** amikacina
- **AMC:** amoxicilina/clavulánico
- **AMX:** amoxicilina
- **APB:** ácido borónico
- **ATM:** aztreonam
- **CAZ/CLA:** ceftazidima/ácido clavulánico
- **CAZ:** ceftadizidima
- **CDC:** Centers for Disease Control and Prevention
- **CIP:** ciprofloxacina
- **CL:** cloranfenicol
- **CLSI:** Clinical & Laboratory Standards Institute
- **CN:** gentamicina
- **CPO:** cefpiroma
- **CRO:** ceftriaxona
- **CTX:** cefotaxima
- **DO:** doxicilina
- **EDL:** EDTA
- **EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- **ETP:** ertapenem
- **FEP:** cefepima
- **FOX:** cefoxitina
- **HK:** histidina quinasa
- **IMP:** imipenem
- **IVU:** infecciones de vías urinarias
- **KF:** cefalotina
- **LPS:** lipopolisacáridos
- **MDR:** cepas multirresistentes
- **MER:** meropenem
- **NET:** netilmicina
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PDR:** cepas panresistencia
- **PL:** fosfolípidos

- **PL:** fosfolípidos
- **PRA:** perfil de resistencia antimicrobiana
- **PRL:** piperacilina
- **RND:** resistencia/nodulación/división celular
- **RR:** regulador de respuesta
- **TIC:** ticarcilina
- **TIM:** ticarcilina/ácido clavulánico
- **TOB:** tobramicina
- **TZP:** piperacilina/ tazobactam
- **XDR:** cepas extremadamente resistentes

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las *Pseudomonas* spp. son bacilos Gram negativos no fermentadores y aerobios facultativos que provocan infecciones que afectan la piel, mucosas respiratorias, tejidos blandos, tejido ocular, revestimiento auditivo, vías urinarias e inclusive provocar bacteriemias (Murray et al., 2017). Estas infecciones tienden a suceder por la capacidad de adaptación, diseminación y adquisición de nuevos mecanismos de resistencia adquirida, lo cual hace que el tratamiento a este tipo infecciones sea un reto. En efecto, la resistencia antimicrobiana es considerada un fenómeno de impacto ascendente que se relaciona con la seguridad del paciente a nivel intrahospitalario (Ali y M.A.Nagla, 2020).

Naturalmente *Pseudomonas* spp. poseen fimbrias que salen desde la superficie la cual favorece a la adherencia de las células huésped. El LPS que hay en varios inmunotipos interfiere en las propiedades endotóxicas que se clasifican de acuerdo con este y la susceptibilidad a la pirocina. La exotoxina A causa necrosis en tejidos bloquea la síntesis de proteínas por un mecanismo de acción parecido a la toxina de la difteria. Las *Pseudomonas* spp. producen toxinas de tipo III que generan una muerte celular o interferencia con la respuesta inmune, la exoenzima tipo S y T son enzimas de tipo bifuncional con actividad de GTPasa y ribosiltransferasa de ADP, la exoenzima U es un LPS y adenilato ciclasa (Carroll et al., 2016).

La resistencia a los antibióticos se da intrínsecamente por el poco movimiento de los mismos por medio de poros de la membrana externa hacia la célula regularizándose por bombas de flujo de salida, la resistencia adquirida tiende a ser por transferencia horizontal de los genes de resistencia sobre plásmidos, elementos génicos o mutaciones que aumentan la expresión de resistencia como en los aminoglucósidos y β -lactámicos. La resistencia adaptativa es inducida cuando se exponen a estímulos ambientales o antibióticos específicos tales como β -lactámicos que desencadenan la expresión del gen Amp-C (Espinoza Pesantez et al., 2021; Murray et al., 2017).

Las técnicas para el estudio del perfil de susceptibilidad antibacteriana son indispensables para la identificación de la bacteria y la selección del antibiótico necesario clínicamente eficaz en el tratamiento frente a un tipo de *Pseudomonas* spp. en específico acorde con el patógeno.

Asimismo, las pruebas diagnósticas se basan en la coloración Gram para predecir el tipo de microorganismo, la prueba oxidasa nos indica la presencia de enzimas oxidasas por la existencia de citocromo oxidasa. Los cultivos en los agares correspondientes como MacConkey, Nutritivo y Base Sangre son vitales para el crecimiento de las colonias en las condiciones adecuadas.

El método de difusión en disco tiene como finalidad la inhibición del crecimiento por ciertos antibióticos evaluados de acuerdo con los puntos de corte del CLSI: M100, 2023 relacionado con el perfil fenotípico según la clasificación de Ambler; en cuanto a lo genotípico se evaluaron diferentes genes de resistencia como bla_{GES}, bla_{SIM}, bla_{VIM}, bla_{FOX} y bla_{OXA-10}. Por último, el propósito de la PCR es genotipificar las cepas y estipular su sensibilidad conforme al uso de los cebadores específicos.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Las *Pseudomonas* spp. forman parte de un grupo amplio de bacilos Gram negativos, no fermentadores son patógenos ubicuos y oportunistas, cuentan con un flagelo polar para su motilidad, son aerobios facultativos y puede crecer a elevadas temperaturas, sus factores de virulencia se basan en la producción de proteasas y elastasas (Alonso et al., 2020). Con frecuencia se encuentran en el suelo, compuestos orgánicos en putrefacción, vegetación, agua y en ambientes hospitalarios, con principal relevancia por su propagación hacia la comunidad. Las infecciones provocadas por las *Pseudomonas* spp. afectan la piel, mucosas respiratorias, tejidos blandos, tejido ocular, revestimiento auditivo, vías urinarias y lo más importante provocar bacteriemias (Murray et al., 2017).

Cada linaje de *Pseudomonas* spp. se puede clasificar de acuerdo con el perfil de resistencia antibiótica (PRA) tales como: multirresistentes (MDR), resistencia desde un medicamento entre 1 o 3 categorías de antibióticos probados; cepas extremadamente resistentes (XDR), que no tienen sensibilidad a los agentes en todas las categorías de antibióticos con excepción de uno o dos antimicrobianos; y pan-resistentes (PDR) no son susceptibles a ningún agente antimicrobiano en cualquier categoría (Oliver y Nicolau, 2010). Como consecuencia de ello, la resistencia antimicrobiana es tomada en consideración como un fenómeno de impacto transcendental que se relaciona con la seguridad del paciente a nivel intrahospitalario (Ali y M.A.Nagla, 2020). El PRA de *Pseudomonas* spp. se afecta debido a la inducción y formación de enzimas o mutaciones que van a inactivar antibióticos tales como β -lactámicos y carbapenémicos (Vila y Marco, 2010).

De igual manera, la disminución de susceptibilidad a múltiples fármacos de espectro extendido debería alinearse a evaluaciones individuales, como por ejemplo la identificación de género-especie por medio de la técnica PCR y caracterizar el perfil fenotípico-genotípico y de susceptibilidad para lograr determinar la presencia de diferentes genes de resistencia. Verifica así su PRA y poder brindar un tratamiento óptimo e impedir el desarrollo de nuevas resistencias adquiridas (Pang et al., 2019). Por otro lado, cabe recalcar que no existen estudios u análisis actuales a nivel nacional de forma similar en el cual se pueda evidenciar el perfil fenotípico y genotípico que determinen la susceptibilidad a los antibióticos de amplio espectro como los β -lactámicos y carbapenémicos (MSP, 2018; Solórzano y Parrales, 2021).

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las características más importantes de las *Pseudomonas* spp. son las resistencias adquiridas a diversos antibióticos durante un tratamiento por medio de la adquisición de genes de resistencia, mismos que se encuentran localizados en elementos génicos móviles como plásmidos e integrones, de la misma manera por mutaciones que tergiversan la función de mecanismos de codificación cromosómica (Vila y Marco, 2010). Además, existen tres factores primordiales que destacan en su resistencia antimicrobiana, como la escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de β -lactamasas cromosómicas inducibles de tipo Amp-C y la expresión de sistemas de expulsión activa. Estos tres factores juntos proporcionan una resistencia antimicrobiana de forma natural a penicilinas, aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxime, ceftriaxome, cefalosporina de tercera generación de administración oral, cloranferincol, nitrofurantoina, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclinas, noboviocina y ácido nalidíxico (Nitz et al., 2021).

El perfil de resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas* spp. tiene estrecha relación la cual se infiere con la clasificación de Ambler, misma que se divide en clase A, B, C y D. Las β -lactamasas, son capaces de hidrolizar la carbenicilina, ticarcilina y piperilina, a pesar de que se inhiben con ácido clavulánico y tazobactam, siendo estos últimos inhibidores del crecimiento bacteriano, y se van a subdividir en genes de resistencia como TEM y PSE, y resistencia enzimática de tipo BLEE (López Ramirez, 2016). Las carbapenemasas se dividen en KPC y MBL (metalo β -lactamasas) que no se ven afectados por los monobactámicos como el aztreonam, ni se inhiben con ácido clavulánico y tazobactam, pero si por quelantes iónicos divalentes como el EDTA, estos se subdividen en IMP, VIM, SPM y GIM. Por otro lado, las oxacilinas, son un grupo de espectro hidrolítico divergente codificados por genes integrados en plásmidos e integrones, los cuales no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam (Vila y Marco, 2010).

Ciertas cepas MDR y XDR ha aumentado su prevalencia con una tasa del 15 y 30% respectivamente, no obstante, en algunos países europeos prevalece una resistencia elevada al 10% para todos los grupos de antibióticos considerados de vigilancia médica. El “*European Centers for Disease Prevention and Control*” indica que el 13,7% de aislamientos de *Pseudomonas* spp. tienden ser resistentes por lo menos a tres grupos de antibióticos (Horcajada et al., 2019). Por ello es considerable determinar la resistencia de *Pseudomonas* spp. a los

antibióticos, tales como: β -lactámicos, carbapenémicos, multidrogoresistentes. Que consecuentemente generan problemas en la salud pública, ambiente hospitalario y comunitario. Debido a que este tipo de mutaciones no son detectadas con frecuencia en los aislamientos (Tarafdar et al., 2020).

La investigación se sustenta en la determinación del perfil de susceptibilidad de *Pseudomonas* spp. por la resistencia bacteriana delimitada a ciertos antibióticos, esta bacteria es considerada emergente y declarada un problema sanitario por la OMS debido a su multirresistencia y amenaza hospitalaria (Calderón et al., 2019; OMS, 2017). Del mismo modo, es una bacteria de diseminación comunitaria, por lo tanto, pone en riesgo la salud pública. También, se evidencia su importancia clínica por medio de su morbilidad y mortalidad, con regularidad en pacientes inmunodeprimidos (Ochoa et al., 2013). El estudio es imprescindible debido a que en la actualidad no se conoce con exactitud todos los genes de resistencia desarrollados por *Pseudomonas* spp., por lo que al momento se conocen elementos genéticos móviles y cromosomales en relación con la selección natural propia de la bacteria (Botelho et al., 2019).

Pseudomonas spp. puede albergar diferentes genes tipo carbapenemasas como bla_{VIM}, bla_{IMP} o bla_{KPC}. (Tickler et al., 2022) el primer aislamiento fue reportado en Chile y Venezuela del bla_{VIM} y con resistencia en el IMP (Labarca et al., 2014), en Nicaragua recientemente se reportó coexpresión de carbapenemasas en *P. aeruginosa*, el 70% de aislamientos con bla_{SPM} o bla_{GIM} (García-Betancur et al., 2021).

El problema radica en la presencia de bacterias multirresistentes a consecuencia del uso y mal suministro de antibióticos e incorrecta identificación de género-especie. Los genes de resistencia se inducen por brotes nosocomiales originados en pacientes de áreas endémicas que son transmitidos, y su aparición es infrecuente por lo que se hace una comparación con una base de datos internacionales para puntualizar su variación (Muro, 2018).

Pregunta del problema: ¿Cuál es el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Pseudomonas* spp. procedentes del cepario de la carrera de Laboratorio Clínico – PUCE?

Alcance del estudio: La investigación se centra en identificar el perfil fenotípico y genotípico de cepas de *Pseudomonas* spp. provenientes del cepario de la PUCE.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Correlacionar la presencia de los genes de resistencia con los patrones fenotípicos de las cepas de *Pseudomonas* spp. a partir de aislados conservados en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE – Quito.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el perfil de sensibilidad de las cepas de *Pseudomonas* spp. a partir de aislados conservados en el cepario mediante el método de difusión en disco.
- Identificar molecularmente los genes de resistencia en cepas de *Pseudomonas* spp. obtenidas a partir de aislados conservados en el cepario mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Determinar la frecuencia de los genes de resistencia en cepas de *Pseudomonas* spp. obtenidas a partir de aislados conservados en el cepario mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.4.3 Limitaciones del estudio

El estudio está limitado exclusivamente por determinación del perfil de resistencia en cepas previamente aisladas e identificadas fenotípica y genotípicamente como *Pseudomonas* spp. con enfoque primordial en la técnica de Kirby Bauer y presencia de genes de resistencia por medio de la Reacción de Cadena de la Polimerasa.

CAPITULO II

2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1.1 Antecedentes

El género de *Pseudomonas* spp. fue visto por primera vez a finales del siglo XIX, por un botánico alemán llamado Walther Migula que observó células móviles con esporas, y con un solo flagelo, donde proviene el nombre de “*pseudo*” por identificación falsa y “*monas*” por su ser microorganismo monoflagelado (Sousa et al., 2021). Son bacterias Gram negativas que miden alrededor de 0,5 a 0,9µm por 1,4 a 3,0µm, como se describió al inicio son microorganismos con un flagelo polar que le permite la movilidad, en su estructura posee una membrana interna, capa de peptidoglicanos y una membrana externa (PL, LPS y proteínas).

Consideradas como bacterias aerobias facultativas no fermentadoras debido a que su energía proviene de la fermentación de los carbohidratos, son ubicuas y pueden vivir en el medio ambiente y agua, crecen entre los 25 a 37°C, pero ante temperaturas más altas o bajas se desarrollan lentamente. En cepas aisladas de pacientes que tienen una infección por *Pseudomonas* spp. se identifica que pueden tener poca o ninguna cadena lateral de polisacáridos o también conocido como antígeno O, esto tiene relación directa con la poliaگلutinabilidad en el suero (Ochoa et al., 2013).

Las manifestaciones clínicas que se presentan varían de la enfermedad, localidad de la afección, y desarrollo de post-cirugías o post-curaciones. Entre las formas de contagio más comunes son en el tracto urinario debido al uso de catéteres o soluciones de irrigación, el uso de respiradores contaminados provoca una neumonía necrosante, el consumo de frutas y vegetales sin previo aseo, entre otros. De acuerdo con laboratorios, las bacterias que más han sido aisladas son *P. aeruginosa* y *P. maltophilia*, la última se encuentra en la leche y agua, asociándose con infecciones oportunistas como neumonías, infección urinaria, septicemia, heridas y meningitis. Las infecciones ocasionadas por *P. cepacia* se localizan en plantas, pero en seres humanos provoca endocarditis, neumonía, infección en heridas, infección urinaria y vasculitis necrotizante (Biggers, 2018). Cuando la bacteria alcanza el pulmón es considerada como una neumonía, que presenta fiebre, dificultad para respirar y tos. En la piel, se conoce como foliculitis y se evidencia con enrojecimiento de la piel y formación de abscesos. En el odio,

dentro del canal auditivo externo, se conoce como “oído de nadador” y provoca picazón, secreción y falla auditiva. En los ojos se produce una inflamación, hinchazón, secreción de pus, enrojecimiento y problemas en la visión. Cuando la infección alcanza el punto máximo de diseminación en el torrente sanguíneo es una bacteriemia, esta puede provocar fatiga, malestar general, fiebre, hipotensión, shock hemodinámico, falla multiorgánica, etc. (Rogers, 2019).

Según el CDC las infecciones provocadas por *P. aeruginosa* MDR provoca más de 32.600 infecciones en pacientes hospitalizados y cerca de 2.700 muertes en Estados Unidos (CDC, 2019). Las *Pseudomonas* spp. son bacterias de gran importancia médica debido a su alta capacidad de ajuste a diferentes ambientes. En el ambiente hospitalario el uso de ventiladores mecánicos, procedimientos de curación para quemaduras, heridas quirúrgicas y catéteres son factores de riesgo donde el paciente se convierte en un blanco fácil para adquirir una infección. La forma de propagación puede ser en ambientes cerrados y abiertos, agua o suelos (Bhargava, 2020). Para evitarlas, se necesita de un lavado constante de manos con agua y jabón, desinfección de alimentos, uso de desinfectante de base alcohólica, entre otros, en caso de que el paciente se encuentre hospitalizado es importante la limpieza exhaustiva de la habitación y sanitización diaria (Bassetti et al., 2018).

El inminente problema de la salud pública se radica en las consecuencias provocadas por la infección de *Pseudomonas* spp. donde se puede encontrar bacteriemias, septicemias, infección pulmonar, y otros que inducen el uso de zonas como cuidados intensivos, cuidado personalizado o paliativo y medicamentos de alto espectro. En cuanto al tratamiento la elección de los antibióticos depende de los resultados obtenidos previamente de un antibiograma, mientras tanto, se le administran medicamentos de primera línea. De acuerdo con las pautas del Reino Unido para este tipo de infecciones se recomienda un tratamiento profiláctico con flucloxacilina, cefalosporinas, tobramicina, colomicina, aztreonam, gentamicina, cefepime, carbapenémicos, entre otros (W. Smith et al., 2017).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Género de *Pseudomonas* spp.

Las *Pseudomonas* spp. son bacterias ubicuas y de vida libre que se pueden desarrollar en el medio ambiente, agua, suelo y vegetación. Se clasifican en alrededor de 140 especies diferentes, de las cuales la gran mayoría son saprofitas, y tan solo unas 25 especies son consideradas patógenas para el ser humano, entre ellas encontramos a *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. maltophilia* y *P. putrefaciens*. Dos especies, *P. mallei* y *P. pseudomallei*, son capaces de producir enfermedades específicas como el muermo (enfermedad de los equinos) y la melioidosis. Las especies que presentan más del 80% de frecuencia en infección son *P. aeruginosa* y *P. maltophilia* (Jurado-Martín et al., 2021).

Los factores de riesgo para una infección de *Pseudomonas* spp. MDR puede variar por la edad, sexo, uso de antibióticos previos de amplio espectro, empleo y disposición de sondas vesicales, catéteres y líneas centrales, estancia en el hospital, postoperatorios, diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), entre otros. Para el uso de antibióticos de amplio espectro se suelen usar carbapenémicos, cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, piperacilina o tazobactam, o la combinación de 2 o más antibióticos. La utilización desmedida de estos fármacos provoca la resistencia bacteriana, que a lo largo de los años se volverá un problema muy importante debido a que ya no existirá ningún tipo de medicamento que pueda combatir una infección y provocar graves consecuencias (Jáuregui-Rojas Paola et al., 2021).

En personas sanas no ocasiona daños o por lo general suelen ser leves y se curan en un período corto de tiempo. Las enfermedades causadas por *Pseudomonas* spp. pueden incluir infecciones sanguíneas, pulmonares, óseas, auditivas (oído externo, oído de nadador y traumas), valvular del corazón, urinarios y en uñas, erupciones cutáneas, comezón, entre otros (NMDOH, 2018). Una vez que la infección se torne grave el paciente tiene una alta mortalidad debido a que se encuentra en una zona con un ambiente bacteriano hostil, sistema inmune bajo o comprometido, resistencia antibiótica, producción de enzimas y toxinas extracelulares. Normalmente la transmisión de este tipo de bacterias es de paciente a paciente, contacto con fómites o ingestión de alimentos contaminados (Iglewski, 1996).

2.2.2 Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *Pseudomonas* spp. le proporciona resistencia variada para que pueda sobrevivir en cualquier ambiente y ante cualquier agente de eliminación que provoque el huésped (Jurado-Martín et al., 2021; Qin et al., 2022; Sousa et al., 2021; Wagener et al., 2021).

a Lipopolisacáridos y proteínas

En la membrana externa de la bacteria se concentra una bicapa que limita la entrada de cualquier compuesto perjudicial, en la cara interna posee PL y en la cara externa comprende LPS (Høiby et al., 2015).

I Lipopolisacáridos:

Se forma por lípido A, región central y antígeno O, es una barrera física que sirve en la interacción con los receptores del huésped para provocar daño celular con actividad endotóxica. Se une con otros LPS y media la endotoxicidad. El antígeno O, es una cadena larga variable e inmunogénica de polisacáridos repetitivos lineales o ramificados, se exponen en cubiertas lisas o ásperas y se producen al mismo tiempo dos antígenos, el antígeno polisacárido común (CPA) que es un homopolímero con estructura conservada y el antígeno específico O (OSA) que es un heteropolímero (Jurado-Martín et al., 2021).

b Proteínas de membrana externa

I Porinas: OprF, OprH y OprD

La porina en mayor cantidad corresponde a la OprF no lipoproteica perteneciente a la familia OmpA, se encarga de la integridad celular, regulación de otros factores de virulencia, unión al peptidoglucano, adhesión en células del huésped, adquisición de iones, canales de difusión y sensores para el sistema inmunológico. El OprH, pertenece a la familia OmpW y su función es unir proteínas, transporte, resistencia a polimixinas y aminoglucósidos. La OprD es parte de la familia OmpF y se basa en la unión a la laminina, resistencia a los carbapenémicos y transporte de moléculas (Jurado-Martín et al., 2021).

II *Lipoproteínas:*

Se suelen agrupar por familias y dependen de su función, parte de ellos se encarga de formar el ensamblaje para la biogénesis, los demás sirven para el mantenimiento de la integridad celular. El OprM, OprN, OprJ, OpmF, OpmB y OpmE son encargados de sacar las moléculas perjudiciales (como antibióticos) para brindarle mayor resistencia al microorganismo (Jurado-Martín et al., 2021).

2.2.3 Formación de biofilms

El género de *Pseudomonas* spp. suelen formar capas grandes de biofilms para ayudarle en la supervivencia contra los antibióticos y defensas del huésped. De esta forma se ve afectada la función de eliminación de un agente patógeno extraño. El desarrollo de estos biofilms es multifactorial, el cambio más importante es el fisiológico para tener un crecimiento abundante (Jurado-Martín et al., 2021; Wagener et al., 2021).

2.2.4 Sistemas de adquisición del hierro

El hierro es un nutriente primordial para el crecimiento de la bacteria, para adquirirlo puede ser por medio de la producción de compuestos orgánicos o sideróforos (pioverdina y pioquelina), captación de xenosideróforos y atracción de moléculas del grupo hemo por el sistema Has y Phu (Qin et al., 2022).

2.2.5 Sistemas de secreción

Existen sistemas complejos de secreción que se explican a continuación y que le brindan a la bacteria factores de virulencia como elastasas, toxinas, proteasas y lipasas, provienen del citosol como del ambiente externo celular. Entre ellos, tenemos los sistemas de secreción de tipo I (T1SS), tipo II (T2SS), tipo III (T3SS), tipo V (T5SS) y tipo VI (T6SS).

El sistema de secreción tipo I o T1SS es simple, solamente requiere de tres componentes como la membrana externa, transportador ABC o casete de unión para ATP que se inserta en la membrana interna y brinda energía para el transporte y por último una proteína adaptadora que conecte los componentes en el periplasma. El sistema se subdivide en dos, el HasAp que tiene

un transportador ABC (HasD), un adaptador (HasE) y un OMF (HasF), esta es un hemóforo con capacidad de unión al grupo hemo de la hemoglobina. Su acción es muy importante para la supervivencia de la bacteria y en las primeras etapas de la infección por la adquisición del hierro de las células huéspedes. Y el segundo subtipo es el sistema Apr que incluye su transportador (AprD), un adaptador (AprE) y OMF (AprF) que tiene actividad en la secreción extracelular de proteasas alcalinas como AprA y AprX, que son factores de virulencia (Sousa et al., 2021).

En cuanto al sistema de secreción tipo II o T2SS es conservado en bacterias Gram negativas, donde se encarga del transporte de proteínas grandes que se han plegado en el periplasma por medio de la membrana externa. Se desarrolla en dos etapas, la primera es la entrega dependiente de Sex o Tat desde el citosol al periplasma y la segunda es la secreción mediada por T2SS. El sistema se subdivide en dos, el Xcp de la proteína extracelular que secreta 14 proteínas con diferentes funciones y el Hxc que sirve para el crecimiento del fósforo y secreta solamente la proteína LapA, se modifica en 11 genes organizados por cada dos operones. Secreta proteínas tales como LasB y LasA, lipasas como PlcN, PlcH, LipA y LipC, entre otros (Sousa et al., 2021).

Para el sistema de secreción tipo III o T3SS, este se encarga de la formación del complejo de agujas para la inyección de proteínas efectoras que van desde el citoplasma hacia el exterior. Con elevado grado de complejidad, que involucran 36 genes codificados por operones y agrupados en el cromosoma de la bacteria. Su función es la biogénesis y regulación de translocación secretora del tipo III. Utiliza proteínas efectoras como ExoS, ExoT, ExoU y ExoY que provocan la toxicidad en la célula. Se subdivide en dos niveles, el primero es la transcripción de genes T3SS, donde se activan en contacto con la célula del huésped, esta se desarrolla en limitación del calcio y en la unión directa, esta se regula por la ExsA considerado un activador transcripcional. Y el segundo es un transportador de espermidina (SpuDEFGH) que le da la capacidad de detectar las moléculas de señal de fluidos, la espermidina es un catión y poliamina que responde al estrés, tolerancia de ácidos y resistencia antibiótica (Jurado-Martín et al., 2021).

El sistema de secreción tipo V o T5SS es una vía simple que usa auto transportadores (AT o T5aSS) y dos sistemas secretores (TPS o T5bSS). El funcionamiento se basa en el transporte y permanencia de la membrana externa, para liberarse en el medio exterior posterior a la escisión

proteolítica. Reconocen prótidos modulares como una señal peptídica que se conecta por un dominio proteico. En el caso de *P. aeruginosa* se tiene un T5aSS que equivale a EstA, conservan actividad de esterasa auto transportadora, produce ramnolípidos que afectan en la movilidad celular y formación de biofilms (Sousa et al., 2021).

Y, por último, el sistema de secreción tipo VI o T6SS corresponden a agujas extendidas en bacterias Gram negativas. Su actividad está en la secreción de proteínas sin péptido señal que se dominan por Hcp y VgrG que requieren del sistema para ser liberadas. Existen 3 locis codificantes HSI-I, HSI-II y HSI-III que emplean 20 genes para interacción con otras bacterias (Jurado-Martín et al., 2021).

2.2.6 Motilidad

La motilidad sirve para la colonización de superficies bióticas, abióticas, propagación y diseminación. Ayuda en la formación de biofilms, que como consecuencia se forman colonias MDR. La motilidad espasmódica depende de la extensión y retracción de los pilis del flagelo, que le permite nadar y moverse en superficies sólidas. Las *Pseudomonas* spp. tiene un solo flagelo polar compuesto por flagelina FliC, posee un motor dentro de la membrana, peptidoglucano y filamentos. Para los movimientos de nadar y enjambre se impulsan por la rotación del flagelo, en el caso de propulsión al frente el flagelo se mueve en rotación contraria a las agujas del reloj, cada uno de los movimientos son gracias a la quimiotaxis y señales químicas (Qin et al., 2022).

2.2.7 Metabolitos secundarios

Las *Pseudomonas* spp. usan proteínas y péptidos que brindan resistencia. Los metabolitos que usa tienen una acción negativa en las células del huésped por la inhibición de crecimiento y lisis celular. Los más importantes son la fenazina (piocianina – estrés oxidativo: *phzM* y *phzS*), alquilquinolonas, homoserina lactonas y ramnolípidos. Este género de bacterias tiene la capacidad de sintetizar el cianuro de hidrógeno, que en altas concentraciones celulares e hipotensión provocan un fallo celular (Eyebe et al., 2022).

2.2.8 Sistema de señalización en la regulación de genes de virulencia

a Sistema de detección de quorum

La comunicación y regulación bacteriana se basa en la generación y liberación de moléculas de señalización que son autoinductores para detectar el quorum. Se necesitan varias células para alcanzar el límite y una concentración específica para la expresión de un gen. Regulan factores de virulencia, movilidad, adhesión y formación de biofilms. (Eyebe et al., 2022).

Se divide en dos homólogos de LuxIR (*las* y *rhl*) dependiente de N-acil homoserina lactona o AHL y una quinolona o PQS. El sistema *las* se compone por LasI que autoinduce la homoserina lactona para unirse con la proteína transcripcional (LasR), regula positivamente el *rhl* que usa la proteína transcripcional RhIR y desarrolla la síntesis de la proteína autoinductora sintasa o RhII y *pqs* que se convierte en una monooxigenasa que controla la biosíntesis de los factores de virulencia relacionados con piocianina y ramnolípidos además de interferir en el desarrollo de biofilms (Eyebe et al., 2022).

b GacS/GacA – Sistema de dos componentes

Los sistemas se forman por histidina quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR). El sistema GacS/GacA controla los procesos infecciosos cuando contraregula la expresión de los factores de virulencia como T3SS, T6SS, pili tipo IV y flagelos, mecanismos de infección aguda y crónica, contiene un sensor híbrido de transmembrana HK (GacS) que fosforila el RR y los dominios de fosfotransferencia de histidina (Eyebe et al., 2022).

c Señales de nucleótidos

Difusión de señales en un grupo de moléculas con nucleótidos para el control bacteriano. Usa el monofosfato de adenosina cíclico o cAMP para señalización especial en la regulación de los factores de virulencia. Producción y regulación de exotoxina A, T2SS, T3SS y sistemas *las* y *rhl* (Eyebe et al., 2022).

2.2.9 Otros productos bacterianos

a Ramnolípidos

Son metabolitos secundarios que cooperan en la patogenia del microorganismo en el pulmón para degenerar el surfactante pulmonar y alterar las uniones estrechas del epitelio. Se encarga igualmente de suprimir el sistema de inmunidad innata del huésped para que no exista respuesta de las defensinas inducidas por la flagelina (Iglewski, 1996).

b Enzimas antioxidantes

Le favorecen en la superación del estrés oxidativo en el huésped por medio de catalasas, reductasas y dismutasas (Iglewski, 1996).

2.2.10 Presentación clínica de importancia

Como bien se conoce el estado de salud de una persona infectada por *Pseudomonas* spp. varía por los factores de riesgo o enfermedad predisponente que pueda existir como fibrosis quística, diabetes mellitus, traumas, trastornos del sistema inmunológico, respiradores mecanismos, VIH, neoplasias malignas, entre otros (Bhargava, 2020; Eyebe et al., 2022).

A continuación, se detallan diferentes síntomas que pueden provocar una infección por *Pseudomonas* spp. que se distribuye por diferentes zonas del cuerpo, en cuanto a la parte superior la otitis es conocida como “oído de nadador” y suele presentar síntomas como secreción, fiebre, edema, sensibilidad, parálisis del nervio facial (infrecuente), dolor, etc. la infección puede comenzar como aguda, pero se desarrolla a una invasiva crónica si no es tratada adecuadamente y si el paciente es diabético no controlado, posteriormente puede extenderse hacia el hueso temporal y provocar osteomielitis y parálisis nerviosa, hasta ascender al sistema nervioso central (Quereshi, 2020). En la zona ocular, la bacteria ingresa a la capa cornea por medio de traumatismo grave, exposición a ambientes hospitalarios y lentes de contacto que da como resultado la producción de lesiones como queratitis bacteriana, endoftalmitis, absceso escleral y oftalmia neonatal, donde se presenta síntomas como dolor, problemas de visión, enrojecimiento del ojo e hinchazón (Chiu, 2022).

En cuanto a la infección de órganos, *Pseudomonas* spp. puede invadir los pulmones y provoca síndromes clínicos diferentes, la colonización de la bacteria se produce comúnmente por ventilación mecánica y falla respiratoria a causa de una neumonía o enfermedades similares (Ramphal et al., 2008). En el sistema urinario la proliferación es común en ambientes hospitalarios por la alta y rápida capacidad de adquirir resistencia antibiótica, es habitual encontrar pacientes que presenten disuria, dolor lumbar y pélvico, fiebre, orina turbia y de mal olor, y en ciertas ocasiones presentar una infección de vías urinarias (IVU) causadas por más de un patógeno (Lamas Ferreiro et al., 2017). En ocasiones más graves y crónicas se puede producir bacteriemias con alta probabilidad de mortalidad y costosa atención sanitaria, por lo que la bacteria se encuentra en el torrente sanguíneo y puede invadir cualquier órgano vital del cuerpo humano, se presenta con síntomas como falla multiorgánica, fiebre, pérdida del conocimiento, hipotensión, shock hemodinámico, etc. (Micek et al., 2005).

En la piel, se afectan zonas axilares, anogenitales y úlceras. La clínica varía por la presencia de lesiones eritematosas hemorrágicas, abscesos profundos, celulitis, piel supurativa, escara negra o purpura, fascitis necrosante y erupción acneiforme. En uñas, se obtiene una coloración verdosa (paroniquia) y onicolísis. Las quemaduras, son centros de colonización por ser zonas húmedas y con piel en estado de recuperación. En huesos y articulaciones, son provocadas por prótesis y cirugías, pero de consecuencias graves ya que requiere la amputación de un miembro inferior o superior, ya que el tratamiento a elección suele ser intravenoso por lo menos durante tres semanas hasta meses (Cerioli et al., 2020; Wu, 2021).

2.2.11 Pruebas diagnósticas en el laboratorio

a Prueba de oxidasa

La mayoría de las especies del género *Pseudomonas* spp. son oxidasa positiva, es decir que el disco de prueba de oxidasa se pinta de color azul violáceo entre los primeros 10-20 segundos de la reacción. Esto indica que la bacteria en cuestión presenta un sistema de citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo con indicador de pH diclorhidrato de tetra-metil-penilendiamina/ azul de indofenol. Mismo que es reducido por el oxígeno molecular generado por agua y peróxido de hidrógeno. Hay que tener en cuenta que el oxígeno actúa como receptor final de electrones en cadena transportadora (Cercenado y Cantón, 2010).

b ***Coloración de Gram***

La coloración se compone por cristal violeta y safranina, yodo Gram (fija el tinte) y alcohol cetona (decolorante). Su objetivo principal es la identificación de la pared celular bacteriana para retener un colorante. Las Gram positivas poseen mayor cantidad de peptidoglicano en su membrana extracelular, y se colorean de morado, por el contrario, las Gram negativas disponen de mayor cantidad de lípidos y se colorean de rosado (Becton Dickinson, 2014b; Tripathi y Sapra, 2021).

c ***Cultivo***

Los cultivos que se usan para *Pseudomonas* spp. tienden a crecer en perfectas condiciones en una incubadora por 24 horas a 37°C en agar MacConkey y Agar Nutritivo. Las colonias de *Pseudomonas* spp. tienen apariencia plana, bordes semidentados y brillo metálico. Si la bacteria involucra biofilms crean resistencia bacteriana y su aspecto es mucoide, lisa y pequeña (LaBauve y Wargo, 2012).

d ***Agar MacConkey***

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial, que se usa para verificar el crecimiento de Gram negativas que pueden o no fermentar la lactosa, gracias a las sales biliares que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas (Becton Dickinson, 2014^a; HiMedia Laboratories, 2012).

e ***Agar Nutritivo***

Es un medio de cultivo universal útil que mantiene los detalles morfológicos de las colonias (Becton, 2014; HiMedia Laboratories, 2011).

2.2.12 Antibióticos

Se encargan de combatir cualquier tipo de infección bacteriana o fúngica con la finalidad de reponer el sistema inmunológico y brindar una mejoría al huésped para alterar o matar el crecimiento de los microorganismos. Se pueden administrar por diferentes vías y gravedad de la infección, por vía oral (capsulas o jarabes), tópicos (cremas, ungüentos o gotas) e intravenosa

(infecciones graves). Estos medicamentos se dividen en familias como β -lactámicos, penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos, inhibidores de las β -lactamasas, macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, etc. (Lister et al., 2009).

a *β -lactámicos*

Son útiles en una gran variedad de indicaciones clínicas. Su característica común son un anillo de tres carbonos y un nitrógeno (Pandey y Cascella, 2022).

b *Penicilinas*

Cuentan con un anillo de ácido 6-animopenicilánico y varias cadenas anulares, se dividen en aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y penicilinas naturales. Se usan en infecciones relacionadas con bacterias Gram positivas y negativas en faringitis estreptocócica, infecciones de piel, sífilis, entre otros (Yip Derek y Geerriets Valerie, 2022).

c *Cefalosporinas*

Contienen un ácido 7-aminocefalosporánico y una cadena lateral con anillos de 3,6- dihidro-2H-1,3-tiazano, esta se subdivide en: primera generación como cefazolina y cefalexina en infecciones de piel y profilaxis quirúrgica; segunda son cefuroxima, cefotetán y cefprozil sirven para infección del tracto respiratorio superior; tercera como cefotaxima, ceftriaxona, cefixima y ceftibuten para neumonías, infecciones urinarias y endocarditis; cuarta o anti- pseudomónicas como la ceftazidima, cefepima y ceftolozano en meningitis, infecciones abdominales y nosocomiales; quinta o cefalosporinas contra MRSA como la ceftarolina y ceftobiprol en neumonías adquiridas e infecciones en tejidos blandos (Bui y Preuss, 2022).

d *Monobactámicos*

Conservan un anillo del tipo β -lactámico único y sirve como medio de unión para otro anillo. Un representante es el aztreonam, que es muy útil contra microorganismos Gram negativos, pero sin actividad en bacterias Gram positivas o anaerobios, trata infecciones nosocomiales e infecciones del tracto urinario (Memon, 2021).

e Carbapenémicos

Un carbapenem se acopla a los anillos β -lactámicos para brindar una protección contra la mayoría de las enzimas β -lactamasas. Los antibióticos que se agregan en esta clase son: el imipenem, meropenem, doripenem y ertapenem que tratan infecciones nosocomiales, meningitis y adquiridas en la comunidad (Memon y Khan, 2021).

f Inhibidores de las β -lactamasas

Son enzimas inactivadoras de las serinas β -lactamasas, que tienen la capacidad de hidrolizar e inactivar el anillo β -lactámico, principalmente en bacterias Gram negativas. Se clasifican en inactivadores de primera generación como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, y los nuevos como el avibactam y vaborbactam útiles en KPC, son rentables en el tratamiento de infecciones en tejidos blandos y graves. Igualmente, se pueden dividir como aminopenicilinas con actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y agentes anaerobios, suele usarse la amoxicilina y ampicilina para tratar infecciones del tracto respiratorio superior e infecciones abdominales. Y las ureidopenicilinas, como la piperacilina que tiene actividad en contra de las bacterias Gram negativas (Khanna y Gerriets, 2022).

g Aminoglucósidos

Son antibióticos de amplio espectro y actúan por medio de la inhibición en la síntesis de las proteínas, al unirse fuertemente en el sitio A del ARN ribosómico 16S, así se promueve la traducción equivocada al momento de la lectura incorrecta de los codones, el ensamblaje será erróneo y causará daños en la membrana celular. Pueden ser de origen natural o semisintético derivados de los actinomicetos. Tienen actividad contra patógenos Gram positivos y Gram negativos. Los antibióticos comunes usados de esta categoría es la estreptomicina, gentamicina, tobramicina, amikacina y neomicina, sirven en el tratamiento contra infecciones pulmonares y de tracto urinario complicadas (Krause et al., 2016).

h Fluoroquinolonas

Estos fármacos inhiben las enzimas que influyen en la síntesis del ADN de la bacteria, entre ella está el ADN topoisomerasa que es importante en la replicación, pues separa las hebras e

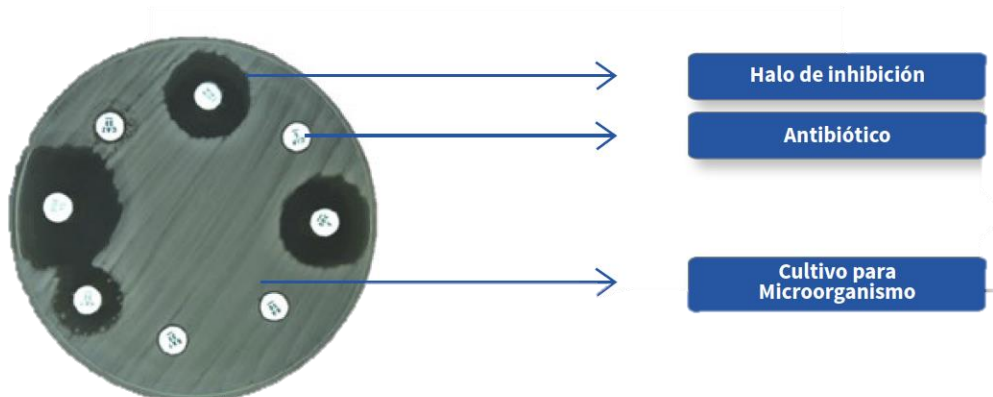
inserta un nuevo hilo de ADN por ruptura para volver a sellar las hebras originales. Son agentes de amplio espectro y suelen ser la base de los espectros antibacterianos, se puede dividir por generaciones, la primera corresponde a la creación del ácido nalidíxico, la segunda fueron las fluoroquinolonas obtenidas por la fluoración de una molécula en la posición C6, como la norfloxacin y ciprofloxacina. Sirven para infecciones contra Gram negativos y Gram positivos, infecciones de piel, enfermedades de transmisión sexual y del tracto respiratorio inferior (Fàbrega et al., 2009).

2.2.13 Métodos para identificar la susceptibilidad antimicrobiana

a *Método de difusión en disco y antibiograma*

Es un método sencillo, de bajo costo y útil para identificar un sin número de bacterias por su susceptibilidad antimicrobiana. Se usan placas Petri con agar Müeller Hinton (Becton Dickinson GmbH, 2017) y se inocula el microorganismo con una suspensión a escala McFarland de 0,5 por medio de la siembra por agotamiento (Sanz Cervera, 2010), en la misma superficie se colocan discos de papel filtro que contiene una concentración conocida de un determinado antibiótico, estas cajas Petri se incuban por 24 horas a 37°C. El resultado es un antibiograma en el cual el patógeno crece por todo el agar y se inhibe por ciertos antibióticos para posteriormente lectura interpretativa de acuerdo con el CLSI M:100, 2023 estos resultados son cualitativos para clasificarlos como sensibles, intermedios, sensible dosis dependiente o resistentes (Balouiri et al., 2016; CLSI, 2023).

Figura 1 Antibiograma



Fuente: (Sandoval, 2014).

***b* Método de genotipificación por PCR**

La PCR es un método que permite la amplificación del ADN e identificación de los genes de resistencia, esta técnica es simple, rápida, sensible y específica. Se basa principalmente en la detección de agentes infecciosos y la discriminación de aquellas cepas sin características primordiales indispensables. El diseño de los cebadores brinda especificidad a la hora de secuenciar, y la sensibilidad de la técnica contribuye la detección de microorganismos en muestras con baja cantidad de patógenos (NHS, 2015).

2.2.14 Mecanismo de resistencia bacteriana

Las *Pseudomonas* spp. poseen varios tipos de resistencias como: intrínseca, adquirida y adaptativa, cada una de estas se desarrolla por características de impermeabilidad de la membrana celular. Comúnmente, la resistencia antibiótica se activa en medios hospitalarios y les confieren resistencia a grupos de antibióticos como aminoglucósidos, β -lactámicos y quinolonas, por la capacidad de contrarrestar el ataque de los fármacos y evadir el mecanismo de acción de estos (Gómez et al., 2015; Pang et al., 2019).

Este tipo de bacterias son consideradas un desafío terapéutico en cuanto a su tratamiento en infecciones comunitarias y nosocomiales, esto se debe a que el antibiótico usado como primera línea ha desarrollado resistencia por lo tanto aumenta significativamente la morbilidad y mortalidad. Y se desarrolla tenacidad por medio de elementos génicos móviles (plásmidos), mutaciones y codificaciones cromosómicas, dando como consecuencia un número reducido de opciones terapéuticas. *Pseudomonas* spp. son bacterias que tienen mayor tasa de resistencia a los antibióticos como fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacina), en pacientes dentro de cuidados intensivos presentan resistencia a los β -lactámicos y aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina o amikacina) (Lister et al., 2009).

***a* Resistencia intrínseca**

Responde a la capacidad innata para disminuir la eficacia de cualquier tipo de antibiótico, en el caso del género de *Pseudomonas* spp. tienen una resistencia natural contra la permeabilidad restringida de la membrana celular externa, sistemas de eflujo y enzimas inactivadoras.

I *Sistema de eflujo o bombas de expulsión:*

Son complejos enzimáticos de la membrana que eliminan las células detergentes y cualquier sustancia anfipática que pueda destruir a la bacteria. Es conocido como MexAB-OprM que se forma por un prótido del complejo en la membrana del citosol, proteínas ligadoras en la zona periplásmica y canal de salida en la cápsula externa. El propósito es sacar al exterior y contra la gradiente de concentración los β -lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim. Igualmente, las bombas de expulsión tienen una capacidad de ser estimuladas por ciertos antibióticos como la ciprofloxacina. Los cambios mutacionales, incluidos aquellos de única base de nucleótidos en el ADN cromosómico, pueden sobreexpresar las bombas (Martínez Martínez y Pascual Hernández, 2017).

La bomba de eflujo MexCD-OprJ es homóloga de la MexAB-OprM, encargada de eliminar antibióticos como β -lactámicos, cloranfenicol, novobiocina, fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos y trimetoprima, carece de un sustrato largo, pero si exporta las cefalosporinas de cuarta generación. El sistema se divide en 5 superfamilias establecidas por secuencia de aminoácidos, fuente de energía y especificidad del sustrato. La primera familia son los casetes de unión al ATP, la segunda, facilitadores de resistencia a múltiples medicamentos, la tercera, facilitadores principales, la cuarta, división de RND y la quinta, extrusiones de compuestos tóxicos (Lister et al., 2009).

II *Porinas y mecanismos de penetración:*

El ingreso de la imipenemasa y carbapenemasas por membrana externa de *Pseudomonas* spp. se da por OprD, específica para el tránsito de aminoácidos dibásicos y glutamato. Este género de bacterias es más sensible, si se adicionan aminoácidos dibásicos se creará una competencia con carbapenémicos para poder pasar por el OprD. La actividad de estos antibióticos reduce la acción de las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos o quinolonas, ya que estos tienen diferentes vías de ingreso y son independientes del OprD (Martínez Martínez y Pascual Hernández, 2017). La porina específica de OprD le brinda facilidad de difusión de aminoácidos por la célula. Sirve como puerta de ingreso favorita para antibióticos carbapenémicos, cuando se pierde la entrada del OprD se disminuye la susceptibilidad. El impacto de esta porina pone en importancia la potencia y resistencia de la bacteria (Lister et al., 2009).

III Resistencia mediada por Amp-C:

Las *Pseudomonas* spp. contienen un transportador conocido como cefalosporinasa Amp-C inducible similar al género de Enterobacterias. Cepas que contengan una cantidad mínima de Amp-C son susceptibles a penicilinas anti-pseudomónicas, combinaciones de inhibidores de la penicilina, cefalosporinas y carbapenémicos; cuando la cantidad producida de Amp-Ces mayor desarrolla resistencia a β -lactámicos excepto los carbapenémicos. La sobreproducción de esta enzima es codificada en el cromosoma y sucede la exposición a β -lactámicos e inhibidores de las β -lactamasas, este proceso es reversible luego de haber eliminado un inductor, pero la desrepresión de la enzima se da cuando las proteínas que están involucradas en la vía de inducción están comprometidas por mutaciones cromosómicas (Lister et al., 2009).

b Resistencia adquirida

La adquisición es por medio de cambios mutacionales y transferencia horizontal de genes. Que contribuye en el desarrollo de cepas MDR y así se dificulta la erradicación de cualquier microorganismo. La resistencia por mutaciones indica una menor captación de los medicamentos, así se modifica la finalidad del antibiótico y la sobreexposición de bombas de expulsión. La interferencia en los objetivos de los fármacos es una estrategia común que tienen las bacterias con la finalidad de evitar la acción de estos, donde cambian los puntos diana (replicación del ADN bacteriano cuando ataca la ADN girasa y topoisomerasa IV) y disminuye la afinidad de unión. También se puede observar el alcance de genes de resistencia, para transporte de plásmidos, integrones y transposones que obtienen genes de transferencia horizontal (Pang et al., 2019).

c Resistencia adaptativa

Permite la supervivencia de la bacteria ante cualquier ataque de antimicrobianos por alteraciones transitorias en la expresión de las proteínas o genes frente a un estímulo ambiental. Se divide en resistencia mediada por biofilms y antibiótica.

La resistencia mediada por biofilms, es una forma de protección que se adhiere a la bacteria y produce sustancias poliméricas extracelular, proteínas, metabolitos, ADN extracelular, la formación de estas películas indicó una menor cantidad de penetración de fármacos como

ampicilina y ciprofloxacina lo que provoca en pacientes en estado crítico poca probabilidad de superar la infección. Y las células resistentes son variantes fenotípicas tolerantes a altas concentraciones de un determinado medicamento, son células de crecimiento lento y con metabolitos inactivos (Pang et al., 2019).

2.2.15 Enzimas de resistencia antimicrobiana

Existe un sin número de enzimas que le proveen a la bacteria factores de resistencia antimicrobiana con la finalidad de sobrevivir ante cualquier ambiente contraproducente (Alonso et al., 2020; Newman et al., 2017).

Tabla 1 Enzimas de resistencia antimicrobiana

Nombre de enzimas	Descripción
<i>LasA</i>	Actividad elastolítica importante en la descomposición de los tejidos del huésped, así se facilita la invasión y el metabolismo de los aminoácidos.
<i>LasB</i>	Tiene actividad elastolítica necesaria para activar el gen <i>LasA</i> . Sirve en la formación de las biofilms e inmunomodulación, descompone los tejidos del huésped y facilita la invasión.
<i>Fosfolipasa A</i>	Libera los ácidos grasos de los fosfolípidos y podría estar implicado en la apoptosis celular y la generación del ROS.
<i>Fosfolipasa C</i>	Tiene la capacidad de hidrolizar la esfingomielina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina. Con actividad hemolítica en la disponibilidad del hierro en el huésped.
<i>Fosfolipasa D</i>	Es secretada por medio del sistema H2 tipo VI, e importante en la competencia bacteriana e invasión de células eucariotas. Refuerzan en la persistencia e invasión en el huésped.
<i>ExoS</i>	Citotoxina tipo III bifuncional, con capacidad de ingresar al citoesqueleto de actina. Sus niveles aumentan con el tiempo a la persistencia y evasión inmune por parte del huésped.
<i>ExoT</i>	Citotoxina tipo III bifuncional, que altera el citoesqueleto de actina e induce la apoptosis mitocondrial en las células del huésped e influyen en la evasión del sistema inmune.
<i>ExoU</i>	Citotoxina tipo III bifuncional, localizado en aislados raros y sirve para funciones de obstaculización.
<i>ExoY</i>	Citotoxina tipo III bifuncional, con adenilato ciclasa, capaz de alterar el citoesqueleto de actina y mejorar la producción de los segundos mensajeros.
<i>Exotoxina A</i>	Inhibe la síntesis de las proteínas eucariotas por la ribosilación de ADN del factor de elongación y conducir al final de la lisis de las células, estimula la inflamación y hepatotoxicidad que regula la inanición de hierro. Colaboran en la evasión inmune e induce la inflamación renal.
<i>Proteasa alcalina</i>	Metaloproteasa de zinc tipo I, que degrada los complementos inmunitarios del huésped. La finalidad es aumentar la disponibilidad de hierro por la descomposición de la transferrina y conlleva la evasión de la respuesta inmune.
<i>Pioverdina y Pioquelina / Sideróforos</i>	Se basa en los mecanismos de absorción del hierro y de esta manera le brinda supervivencia en muchos de los entornos. La pioquelina se ha implicado en infecciones crónicas, mientras que la pioverdina tiene mayor afinidad por el hierro y muestra mayor diversidad.
<i>Alginato</i>	Pertenece a un polímero lineal y su sobreproducción mucoide tiene relación con las infecciones crónicas aisladas, su estructura sirve como un biofilm.
<i>Piocianina</i>	Citotoxina de tipo II que afecta la capacidad de reparación e induce a la inflamación.

Fuente: (Alonso et al., 2020; Newman et al., 2017).

2.2.16 Importancia y descripción de los primers

El desarrollo de la resistencia bacteriana reduce en gran medida las posibilidades de que el paciente pueda adquirir un tratamiento eficaz ante una enfermedad, como consecuencia se prolonga la estancia en el centro de salud, aumento de costos en medicamentos apropiados, estancia y mortalidad (Bronze, 2020).

Tabla 2 Genes de resistencia asociados a *Pseudomonas* spp.

<i>Nombre del gen</i>	<i>Descripción</i>
GES	Enzimas de espectro extendido de Guyana. Se han observado resistencia hacia antibióticos como relebactam, cefaloporinas derivadas de <i>Pseudomonas</i> spp. de clase C (Hujer et al., 2022).
SIM	Son MBL, conocido como Seul imipenemasa. Obtenidas por baja permeabilidad de la membrana externa, mutaciones cromosómicas y transferencia de los genes por medio de plásmidos, bacteriófagos y transposones (Tanriverdi Cayci et al., 2022).
VIM	Indica positividad para MBL por Verona Integrón, se transmiten por plásmidos e integrones de clase 1 y en ciertas ocasiones presenta un biofilm (Voor in 't holt et al., 2018).
FOX	β -lactamasas Amp-C y produce biofilms para conferir resistencia y sobreprotección a la bacteria (Mohamed et al., 2022).
OXA – 10	Resistencia para antibióticos como ceftozolano/tazobactam y ceftazidima/avibactam. Se transmite por plásmidos, son clonaciones mutacionales y recombinantes. En la secuencia de aminoácidos se observan reemplazos y deleciones, de esta manera se modifica la especificidad por el sustrato (Arca-Suárez et al., 2021).

Fuente: (Bronze, 2020).

Las serin-carbapenemasas clase A poseen una capacidad hidrolítica contra IMP y MER mismas que confieren resistencia al ATM, pero no a las cefalosporinas de tercera generación y son inhibidas por el ácido clavulánico. El GES-2 surge por un reemplazo sencillo de aminoácidos del GES-1 que pertenece al grupo de BLEE no derivadas de TEM o SHV. Las MBL de clase B tienen dos familias importantes: VIM e IMP, son transferibles porque están localizados en integrones tipo 1 y en plásmidos (PSE-1 y PSE-4). Se caracterizan por generar resistencia a los β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Se encuentran distribuidas a nivel mundial por ejemplo en Colombia, se ha detectado el VIM en *P. aeruginosa*. Las carbapenemasas tipo serina de la clase D no han recibido tanta atención como las MBL, es importante considerarlas como potencialmente peligrosas, aunque su actividad carbapenemasa es pobre, se incrementa si otros mecanismos de resistencia están presentes como bombas de flujo o disminución en la permeabilidad ocasionada por cambios en las porinas o por modificaciones en las proteínas de

unión a las penicilinas. Las carbapenemasas se detectan con una prueba de sinergia de doble disco, con EDTA e IMP, la producción de una gran zona de inhibición y sinergia se interpreta como positiva para MBL. Y una prueba de sinergia con discos combinados IMP con y sin EDTA, el diámetro de la zona de inhibición mayor o igual que 7mm se considera positivo para MBL (Verma et al., 2019). En la Tabla 3 se presentan las secuencias disponibles de los primers de interés.

Tabla 3 Secuencia de los primers asociados a los genes de resistencia

NOMBRE DEL GEN	SECUENCIA FORWARD	SECUENCIA REVERSE
<i>GES</i>	ATGCGCTTCATTCACGCAC	CTATTTGTCCGTGCTCAGG
<i>SIM</i>	TACAAGGGATTCGGCATCG	TAATGGCCTGTTCCCATGTG
<i>VIM</i>	GATGGTGTTTGGTCGCATA	CGAATGCGCAGCACCAG
<i>FOX</i>	CTACAGTGCGGGTGGTTT	CTATTTGCGGCCAGGTGA
<i>OXA 10</i>	TCAACAAATCGCCAGAGAAG	TCCCACACCAGAAAAACCAG

Fuente: (Curvalin, 2010; Gajamer et al., 2020; Lu et al., 2017).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

- **Antibiograma:** determina la sensibilidad y resistencia de los antibióticos capaces de inhibir el crecimiento de los hongos o las bacterias que causan infecciones, el resultado establece el tipo de tratamiento más conveniente (Street et al., 2022).
- **Antibióticos:** son sustancias antibacterianas con la finalidad de eliminar o inhibir el crecimiento del microorganismo. Estos pueden administrarse por vía oral, intravenosa o intramuscular (NHS, 2022).
- **Fenotipificación:** son aquellas características químicas, bioquímicas y físicas que son observables (Zerón, 2010).
- **Genotipificación:** proceso que analiza el ADN con el propósito de identificar los nucleótidos que determinan la presencia de ciertas variantes (Zerón, 2010).
- **Método de difusión en disco o Kirby Bauer:** es una técnica de rutina para verificar la sensibilidad de un microorganismo por medio del uso de discos de antibióticos de concentración conocida (Tankeshwar, 2022).
- **PCR:** se define como “Reacción en cadena de la polimerasa”, y corresponde a una técnica para amplificar rápidamente las copias de un segmento de ADN específico para posteriormente ser usado en un estudio. Se pueden usar fragmentos muy cortos y amplificarlos de tal manera que se obtienen resultados puros y confiables (M. Smith, 2022).
- **Perfil de susceptibilidad:** determina que antibióticos en concreto pueden ser sensibles ante un microorganismo, estas guían al especialista en la elección y dosificación de un fármaco (Street et al., 2022).
- **Resistencia antimicrobiana:** sucede cuando los microorganismos desarrollan cualquier tipo de capacidad que evadan las respuestas de los antibióticos diseñados para erradicarlos, por lo tanto, el microorganismo no se muere y se sigue multiplicando (CDC, 2021).

CAPITULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 Tipo de estudio

La investigación realizada corresponde a un estudio de tipo descriptivo - observacional y transversal. Descriptivo puesto que se detallaron los perfiles fenotípicos y genotípicos de acuerdo con la resistencia antimicrobiana, de la misma manera en la que no interfirió la unidad de análisis dado que las cepas de *Pseudomonas* spp. fueron aisladas y conservadas en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE. Observacional porque no hubo manipulación de las variables en proyecto y transversal porque su medición se realizó una sola vez.

3.1.2 Tipo de muestreo

La investigación se desarrolló en el Distrito Metropolitano de Quito perteneciente a la zona 9 en el Laboratorio de investigación de la Carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE.

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia debido a la selección de cepas identificadas como *Pseudomonas* spp. del cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE mismas que cumplieron con los criterios de inclusión específicos para el estudio.

3.1.3 Tamaño de la Muestra

El universo estuvo conformado por 64 cepas de las cuales 47 corresponden al género de *Pseudomonas* spp. que estaban conservadas, almacenadas y viables en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE.

3.1.4 Criterios de Inclusión

- Cepas identificadas como *Pseudomonas* spp. del cepario de la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE.
- Cepas Viables.

3.1.5 Criterios de Exclusión

- Ausencia de crecimiento en el medio de cultivo posterior a 24 horas de incubación.
- Cultivos contaminados con otros microorganismos sin posibilidad de recuperación.

3.1.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se desarrolló en el programa SPSS v19.0, en el cual se establecieron las frecuencias relativas y absolutas de acuerdo con el tipo de variable, y la determinación de la relación entre los perfiles de resistencia, la presencia de los genes y cepas de *Pseudomonas* spp., por medio de la prueba χ^2 con un α del 0,05.

3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.2.1 Variable Principal

Método de difusión en disco y Reacción en Cadena de la Polimerasa

3.2.2 Variable Secundaria

Perfil fenotípico y genotípico de los aislados de las cepas *Pseudomonas* spp. procedentes del cepario de la Carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE

.

Tabla 4 Operacionalización de las variables

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES						
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN ESPECÍFICA	DIMENSIONE/ INDICADORES	SUB-DIMENSIONES/ SUB-INDICADORES	ÍNDICE (S)
Determinar el perfil de sensibilidad de las cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. a partir de aislados conservados en el cepario mediante el método de difusión en disco	Perfil de susceptibilidad de las cepas aisladas <i>Pseudomonas</i> spp	Son pruebas desensibilidad de un microorganismo frente a diferentes tipos de antibióticos con concentración conocida (Vazquez-Pertejo, 2020)	Fase de susceptibilidad o resistencia de las cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. frente a diferentes tipos de antibióticos Definir si el antibiótico es sensible, intermedio o resistente	Medición del halo de inhibición	- Sensible - Intermedio - Resistente De acuerdo a los intervalos de medición de la guía del CLSI M100, 2023	Cualitativa
Identificar molecularmente los genes de resistencia en cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. obtenidas a partir de aislados conservados en el cepario mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Caracterización genotípica de cepas de <i>Pseudomonas</i> spp.	Corresponde al código genético de las células de un organismo y lo que determinan con ciertas características. Identificación de genes de resistencia para antibióticos de amplio espectro (Elnour et al, 2018).	-	Presencia de los genes conservados: - Presencia - Ausencia	Frecuencia relativa	Cualitativa
Determinar la frecuencia de los genes de resistencia en cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. obtenidas a partir de aislados conservados en el cepario mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Genes y patrones de resistencia	Por medio de técnicas moleculares se detectará la presencia de los genes que codifican para carbapenemasas conforme a la resistencia antibiótica (Nirvia Margot Cuaical Ramos et al., 2012)	-	Determinación de resistencia antibiótica	-	Cualitativa

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

En la tabla 5 se detallan los materiales, reactivos y equipos que se usaron en el proyecto:

Tabla 5 Materiales, reactivos y equipos

MATERIALES	REACTIVOS	EQUIPOS
- Cajas Petri plásticas	- Agua destilada	- Balanza analítica
- Placas porta objetos de vidrio	- Agua estéril	- Microscopio óptico
- Asas calibradas	- Agua libre de nucleasas	- Incubadora de 37°C
- Pinzas metalizadas	- Alcohol	- Pipetas automáticas
- Puntas desechables	- RNAes Away	- Congeladora-
- Lápices de cera	- Agar MacConkey	Refrigeradora
- Marcadores permanentes de punta fina	- Agar Nutritivo	- Termociclador
- Barrilla	- Agar Müeller Hinton	- Equipo de electroforesis
- Guantes de nitrilo	- Agar Base Sangre	- Autoclave
- Mascarillas descartables	- Medio Skim Milk	- Nanodrop 2000
- Papel seda	- Kit de colorante Gram	- Cabinas de bioseguridad
- Microtubos 1,5 mL	- Solución salina	- Centrifuga
	- Discos de antibióticos	- Vortex
	- Gel agarosa	- Estufa
	- Primers	- Termobloque
	- Buffer	
	- Extracción de ADN por técnica kit Invitrogen	

Fuente: Autoría Propia

3.4 PROCEDIMIENTO

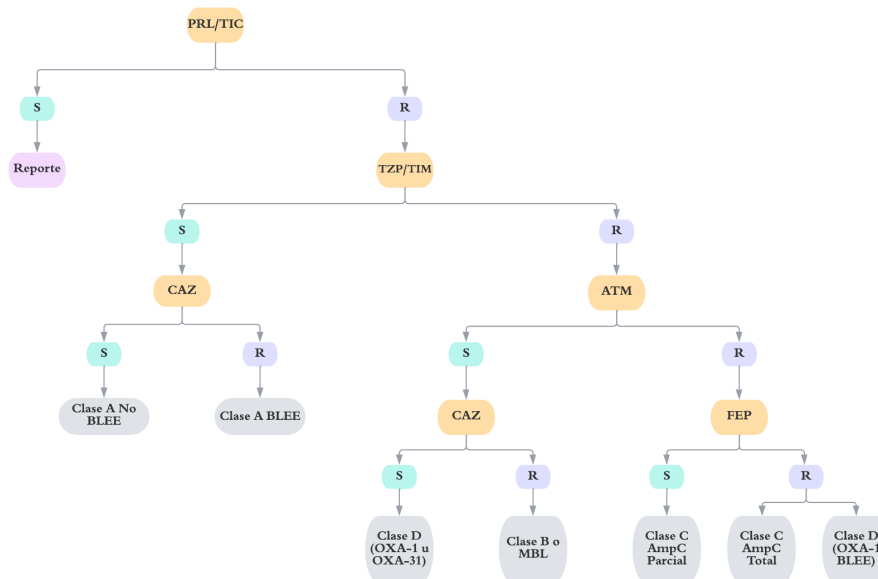
3.4.1 Fase uno: Selección de cepas de *Pseudomonas* para estudio

Las cepas de interés que se utilizaron estaban congeladas a -80°C en viales individuales. y se sembraron por medio de la técnica de agotamiento en agar Nutritivo y agar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas. Una vez verificada la viabilidad y pureza se realizó un frotis y coloración de Gram para lograr comprobar la presencia de bacilos Gram negativos. Asimismo, se realizaron pruebas bioquímicas (API® 20 NE) y enzimáticas para poder clasificar e identificar correctamente las bacterias.

3.4.3 Fase dos: Determinación del perfil fenotípico mediante el método de difusión en disco

Se realizó una suspensión de las colonias en solución salina estéril ajustada a una escala McFarland 0,5, posteriormente se sembró en tres direcciones en agar Müeller Hinton, y se distribuyeron los siguientes antibióticos: PRL, TZP, IMP, CAZ, KF, FEP, TIC, ATM, FOX, TIM, MER, TOB, CIP, CN, AK, NET, EDL, APB, ETP y CAZ/CLA y se incubó a 37°C por un periodo de 24 horas para medir la zona de inhibición de crecimiento (halo). La lectura e interpretación de los halos de inhibición se basa en los puntos de corte de acuerdo con CLSI: M100, 2023 (CLSI, 2023). Para la interpretación de acuerdo a la clasificación de Ambler se trabajó en base a la Figura 2

Figura 2 Diagrama de flujo para la identificación de clases según Ambler



Nota. PRL: piperacilina; TZP: piperacilina/ tazobactam; TIC: ticarcilina; TIM: ticarcilina/ácido clavulánico; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; ATM: aztreonam; S: sensible; R: resistente.
Fuente: Autoría propia.

3.4.4 Fase tres: Identificación genotípica de las especies de *Pseudomonas* spp.

El análisis molecular consistió en las siguientes fases: extracción del ADN, amplificación de los genes de resistencia y verificación de la presencia de los genes mediante electroforesis en gel de agarosa. Cada uno de estos ensayos se llevó a cabo en el laboratorio de investigación de la carrera de Laboratorio Clínico de la PUCE.

a *Extracción de ADN*

La extracción de ADN se realizó por medio del *PureLink™ Genomic DNA MiniKit Invitrogen by ThermoFisher* en el cual se suspendió las cepas en un microtubo de 1,5 mL que contenía agua estéril (concentración McFarland 0,5 a 1), para luego centrifugar a 13.500 r.p.m. por 2 minutos, el sobrenadante se descartó. El pellet que se obtuvo se le añadió 180µL del buffer de digestión más 20µL de proteinasa K, lo cual nos ayuda a lisar las células. Se incubó a 55°C por 2 horas, después se agregó 10µL de ARNase A, se mezcló por medio de vortex y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadió 200µL de buffer lysis/binding, se invirtió hasta tener una solución homogénea, se adicionó 200µL de etanol absoluto al 100% se agitó por 5 segundos. Toda la solución se traspasó a una columna (aproximadamente 600 µL), se centrifugó a 13.500 r.p.m. por 1 minuto, se lavó y desechó el sobrenadante que se almacena en la columna y posterior a ello, se colocó una nueva columna. Después del descarte se añadió 500 µL del Wash 1 y se centrifugó a 13.500 r.p.m. por 1 minuto, se desechó la columna y se colocó una nueva. Se lavó nuevamente con 500 µL del Wash 2 y se centrifugó a 13500 r.p.m. por 3 minuto, se desechó la columna y se colocó un microtubo de 1,5 mL nuevo y estéril, se colocó 100 µL buffer de elución se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 13.500 r.p.m. por 1 minuto. Por último, se desechó la columna superior y se obtuvo en el sobrenadante el material genético de interés para su análisis, determinando su pureza mediante el Nanodrop 2000 (Yamagishi et al., 2016).

b *Amplificación*

Para la amplificación de los genes deseados se preparó un tubo de reacción que contuvo siguiente: GoTaq® Green Master Mix, primers forward/reverse Tabla 6, agua molecular y el material genético extraído de las cepas. Se programó el termociclador de punto final de acuerdo con los ciclos correspondientes para cada gen, véase en el Anexo 1.

Tabla 6 Secuencia de los genes de *Pseudomonas* spp.

Clasificación Ambler	Gen	Primer	Secuencia	TM (°C)
Clase A	bla _{GES}	Ges F	ATGCGCTTCATTACGCAC	54
		Ges R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	
Clase B	bla _{SIM}	Sim F	TACAAGGGATTCCGGCATCG	59
		Sim R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
	bla _{VIM}	Vim F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	52
		Vim R	CGAATGCGCAGCACCAG	
Clase C	bla _{FOX}	FOX F	CTACAGTGCGGGTGGTTT	61
		FOX R	CTATTTGCGGCCAGGTGA	
Clase D	bla _{OXA-10}	OXA-10 F OXA-10 R	TCAACAAATCGCCAGAGAAG TCCCACACCAGAAAAACCAG	61

Fuente: (López Ramirez, 2016)

Por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% se realizó una corrida a 90 voltios, 30 minutos, y se reveló la presencia de los genes amplificados, a través de un transiluminador (PB-L, 2021).

3.4.5 Fase cuatro: Control de calidad de los procedimientos de laboratorio.

Se evaluaron las propiedades macroscópicas de los medios utilizados para el aislamiento de las cepas, con el control de crecimiento respectivo de la muestra de *Pseudomonas* spp. (ATCC 926467) revela así la actividad del antibiótico con respecto a la inhibición de crecimiento. El medio de cultivo para el método de difusión en disco se evaluó en una caja Petri para determinar el control de crecimiento en la incubadora a 37°C por 24 horas.

CAPITULO IV

4.1 RESULTADOS

Se analizaron 64 cepas almacenadas y conservadas en el cepario de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador con aparente identificación de *Pseudomonas* spp., de las cuales se realizó una coloración Gram, oxidasa y pruebas bioquímicas (API® 20 NE) para así poder confirmar género y especie de cada una. Se evidenció que la totalidad de los viales no correspondía al 100% de *Pseudomonas* spp. Por lo tanto, la identificación y distribución porcentual de las cepas por género y especie se visualiza en la Tabla 7.

Tabla 7 Identificación de las cepas almacenadas en el cepario de la carrera de Laboratorio Clínico

Familia	Género y Especie	Porcentaje
<i>Pseudomonadaceae</i> 73,4% (47/64)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40,6%
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25,0%
	<i>Pseudomonas putida</i>	7,8%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,8%
<i>Enterobacteriaceae</i> 25,0% (16/64)	<i>Enterobacter spp.</i>	4,7%
	<i>Enterobacter cloacae</i>	4,7%
	<i>Chryseumona indologenes</i>	3,1%
	<i>Shigella spp.</i>	3,1%
	<i>Proteus mirabilis</i>	1,6%
<i>Moraxellaceae</i> 1,6% (1/64)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,6%
Total de cepas:		100%

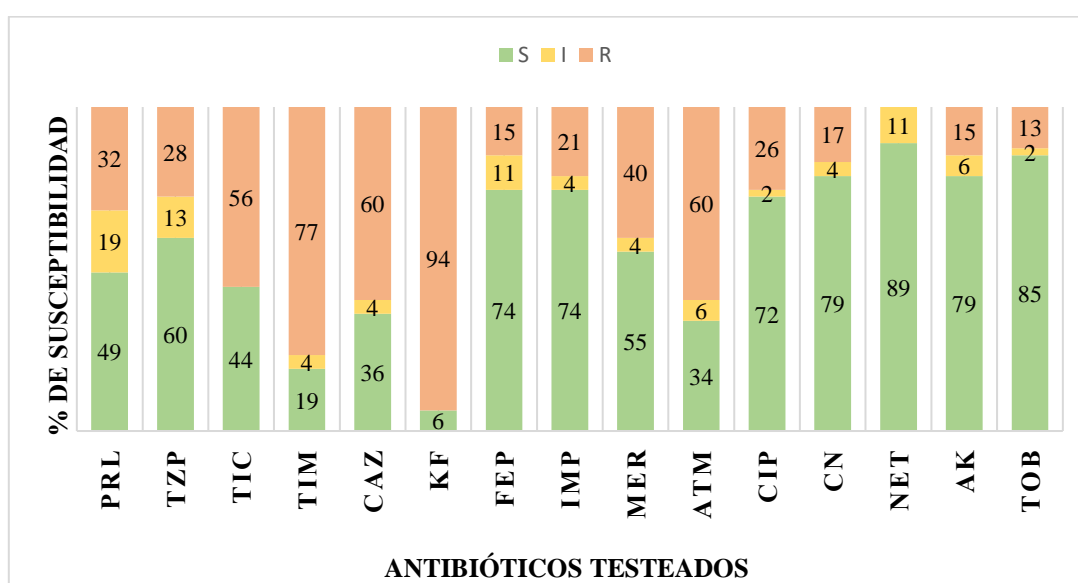
Fuente: Autoría propia

Se señala que el porcentaje de la cepa de interés es el 73,4 % (47/64). Por el contrario, el restante no fue considerado apto para el estudio. Posterior, se ejecutó la técnica molecular de PCR de punto final, con genes detallados en la Tabla 6, y se demuestra la presencia y ausencia mediante una corrida electroforética.

4.1.2 Identificación del perfil de susceptibilidad por medio del método de difusión en disco de las cepas aisladas en el cepario

Se identificaron las cepas fenotípicamente por medio de la coloración Gram, pruebas enzimáticas y API® 20 NE (pruebas bioquímicas). El análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos en conjunto con la medición de los halos de inhibición comparado con los puntos de corte de susceptibilidad de acuerdo con las normas establecidas por el CLSI M:100, 2023 y se describió como sensible, intermedio y resistente, que se detalla en la figura 3.

Figura 3 Porcentaje de susceptibilidad de antibiograma



Nota. PRL: piperacilina; TZP: piperacilina/ tazobactam; TIC: ticarcilina; TIM: ticarcilina/ácido clavulánico; CAZ: ceftazidima, KF: cefalotina, FEP: cefepima; IMP: imipenem; MER: meropenem; ATM: aztreonam; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; NET: netilmicina; AK: amikacina; TOB: tobramicina; S: sensible; I: intermedio; R: resistente. Fuente: Autoría propia.

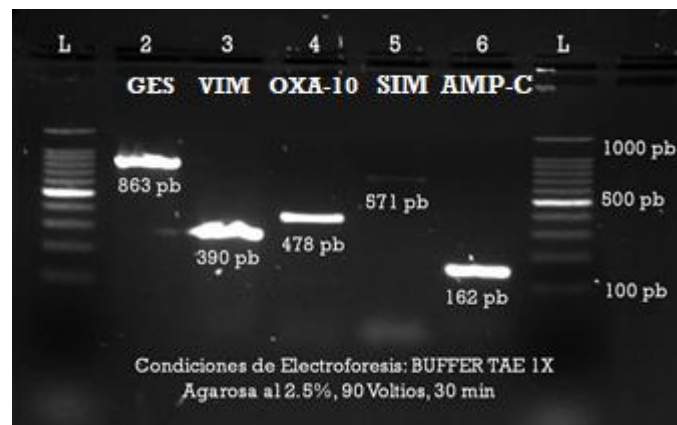
A continuación, para la lectura interpretativa se logró evidenciar la predominancia de las resistencias de las siguientes familias: penicilinas TIM (77%) y TIC (56%), cefalosporinas CAZ (60%) y KF (94%) y monobactámicos ATM (60%). En cuanto a la susceptibilidad: el inhibidor de β -lactamasas como TZP (60%), aminoglucósidos TOB (85%), AK y CN (79%), fluoroquinolona CIP (72%), carbapenémico IMP (74%) y cefalosporinas FEP (74%). Para describir la clase a la cual pertenece cada cepa de *Pseudomonas* spp. se determinó por medio de la relación de sensibilidad y resistencia en conjunto con el diagrama de flujo de la Figura 2 que indica la clasificación categórica de cada una.

Una vez interpretado el antibiograma nos planteamos la clasificación según Ambler en la cual se detallan las funciones de los mecanismos de interacción enzima sustrato y secuencia de aminoácidos de las enzimas β -lactamasas, donde se distinguen cuatro clases descritas como: A, B, C y D. En la distribución porcentual fenotípica apoyada en la Figura 2 se obtiene como resultado el 38% correspondiente a la Clase A el 17%, Clase B el 10%, Clase C el 9%, Clase D 26% pertenece a cepas de reporte por su sensibilidad a la PRL/ TIC.

4.1.3 Identificación molecular de los genes de resistencia en cepas de *Pseudomonas* spp. del cepario mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular se extrajo el ADN del 73,4% de cepas de *Pseudomonas* spp. seguida la amplificación de las cadenas de ADN y genes de resistencia para visualizar la presencia y ausencia del producto examinado en estudio mediante una corrida electroforética como se observa en la Figura 4. El 25,53% (12/47) cepas de reporte no se les realizó la identificación molecular por la susceptibilidad a los antibióticos usados.

Figura 4 Corrida electroforética

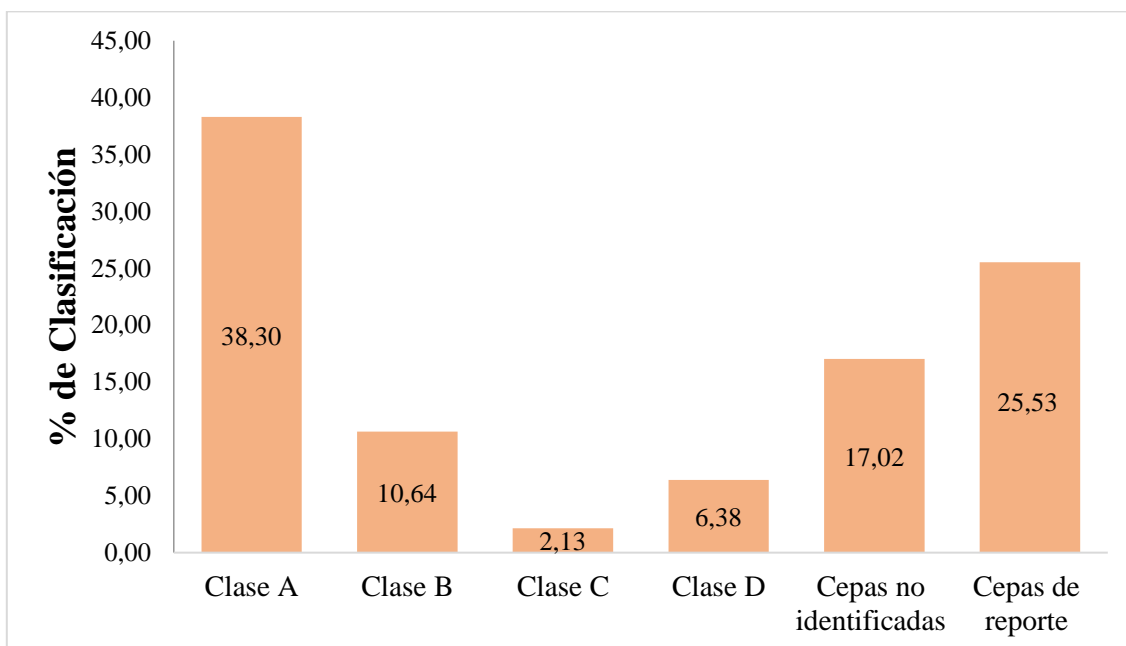


Fuente: Autoría propia

Se corroboró el peso molecular del *bl*GES, *bl*VIM, *bl*OXA-10, *bl*SIM y *bl*FOX con el 100bp DNA Ladder de Promega como se observa en la Figura 4. Se siguió los protocolos referentes al Anexo 1.

En la Tabla 6 se evidencia la clasificación de Ambler por sus genes correspondientes. Obteniéndose los siguientes resultados como se observan en la Figura 5.

Figura 5 Porcentaje de cepas identificadas por clase



Fuente: Autoría propia

Cada clasificación se subdivide en diferentes genes, en cuanto a la Clase A/ BLEE se obtuvo únicamente el gen *bla_{GES}* (38,30%); Clase B/ MBL con *bla_{VIM}* (2,13%), *bla_{SIM}* (8,51%); Clase C/ Amp-C solamente se consiguió el gen *bla_{FOX}*; (2,13%) y por último la Clase D/ OXA con el gen *bla_{OXA-10}* (6,38%) como se observa en la Figura 5. Con respecto al 17,02% (8/47) corresponden a cepas no identificadas genotípicamente. Concerniente al 25,53% son cepas de reporte que muestran susceptibilidad a las primeras líneas de tratamiento antibiótico.

4.1.4 Determinación de la frecuencia de los genes de resistencia en cepas de *Pseudomonas* spp. obtenidas a partir de aislados conservados en el cepario mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la Tabla 8 se señalan los datos obtenidos por el programa SPSS en cuanto a la frecuencia y porcentaje de las clases y sus genes de resistencia con la totalidad de las cepas. Se debe agregar que, se correlaciona directamente con los datos que se extrajeron en la figura 5.

Tabla 8 Frecuencia de genes y clases

GENES Y CLASES			
Clases	Genes	Frecuencia	Porcentaje %
Clase A	GES	18	38,3
Clase B	SIM	4	8,5
	VIM	1	2,1
Clase C	FOX	1	2,1
Clase D	OXA-10	3	6,4
Reporte		12	25,5
No Identificadas		8	17,0
Total		47	100,0

Fuente: Autoría propia.

En la presente Tabla 9 se visualiza la asociación de las variables, la primera corresponde a clases y genes de resistencia, la segunda las cepas como *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*, las categorías analizadas fueron estadísticamente significativas con un valor $p=0,013$, y se establece una relación directa entre las dos variables.

Tabla 9 Correlación de los genes con las cepas

		CEPAS			Total	Valor P
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>		
Clase A	GES	Recuento	11	1	6	0,013
		%	42,3%	20,0%	37,5%	
Clase B	SIM	Recuento	4	0	0	
		%	15,4%	0,0%	0,0%	
	VIM	Recuento	0	0	1	
		%	0,0%	0,0%	6,3%	
Clase C	FOX	Recuento	0	0	1	
		%	0,0%	0,0%	6,3%	
Clase D	OXA-10	Recuento	3	0	0	
		%	11,5%	0,0%	0,0%	
Reporte		Recuento	6	0	6	
		%	23,1%	0,0%	37,5%	
No Identificadas		Recuento	2	4	2	
		%	7,7%	80,0%	12,5%	
Total		Recuento	26	5	16	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Nota. Se muestra la población estudiada. La variable es estadísticamente significativa presenta ($p < 0,05$). Fuente: Autoría propia.

De esta manera, los resultados en las cepas de *P. aeruginosa* fueron los siguientes de clase A el 42,3% (11/18); seguido de clase B para gen bla_{SIM} con un 15,4% (4/5) y clase D con un 11,5% (3/3). En *P. fluorescens* se obtuvo un 6,3% (1/5) para la clase B gen bla_{VIM} y clase C respectivamente. Aquellas 25.5% (12/47) cepas que manifestaron sensibilidad a todos los antibióticos se les asignó directo a reporte, a pesar de ello se les realizó las pruebas bioquímicas para determinar su género-especie y existe relevancia en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*. Para el 17% (8/47) cepas que no fueron identificadas genotípicamente en nuestro trabajo, se sugiere analizar nuevos genes a futuro. Por otro lado, el desconocimiento o falla en las técnicas de interpretación del antibiograma provoca una incorrecta identificación de los patrones de resistencia y genera un aumento de casos con respecto a *Pseudomonas* spp.

CAPITULO V

5.1 DISCUSIÓN

Las *Pseudomonas* spp. son bacterias que se encuentran con gran facilidad en medios hospitalarios, por este motivo las infecciones pueden ser sanguíneas, pulmonares, vías urinarias, epidérmicas, entre otras. El peligro se extiende cuando el paciente se encuentra en la unidad de cuidados intensivos y recibe ayuda de equipos de ventilación mecánica, catéteres urinarios, heridas y demás factores de riesgo (CDC, 2019).

Es conocido mundialmente que el perfil de patogenia de *Pseudomonas* spp. dispone de un genoma complejo y una alta capacidad de mutación que le confiere la supervivencia y cambios en sus factores de virulencia como: biofilm de exopolisacáridos que le concede la adherencia entre bacterias y cambios en su estructura genómica que se transfiere por plásmidos y fimbrias que le permiten colonizar (Spagnolo et al., 2021).

Los sistemas de eflujo en *Pseudomonas* spp. para los aminoglucósidos se ve afectado por la sobreexpresión de las bombas MexXY-OprM, y MexXY-OprA que le brinda a la bacteria un color verdoso en sus colonias gracias a la pioverdina y referente a Ikarashi et al., (2021) adquiere mayor resistencia a varias familias de fármacos, considerado mientras exista una deficiencia del MexXY la colonia tendrá producción mayor de pioverdina. En general, los genes encargados de codificar las bombas de eflujo son de carácter cromosómico y las proteínas comprenden conservados de glicina, aspartato, prolina y otros elementos hidrofóbicos. En conjunto todos estos elementos le atribuyen a la bacteria una barrera de evasión para que un medicamento cumpla con su función (Pachori et al., 2019). En el genoma interno de *Pseudomonas* spp. existe la presencia del *ampC* que codifica bombas de flujo como MexXY, MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN de la familia RND, todos estos son compuestos de proteínas adaptadoras periplásmicas como el MexA, MexX, MexC y MexE, transportador de división celular como MexB, MexY, MexD y MexF y factor de membrana formador de canales como los OprM, OprJ u OprN (Lorusso et al., 2022).

Según Tarafdar et al., (2020) indica que el 87,5% (42/48) de su estudio presentó el gen bla_{GES} con elevada resistencia a los β-lactámicos en *Pseudomonas* spp, son comunes en este conjunto de bacterias donde se detectan grandes mutaciones presentes por la codificación de plásmidos e integrones. Estos genes se encargan de hidrolizar antibióticos tales como penicilinas y

cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos y carbapenémicos que se pueden inhibir por el tazobactam y ácido clavulánico, por lo tanto, se deduce que la producción del gen bla_{GES} produce a futuro resistencia al IMP (95,83%) y MER (93,75%). Por otra parte, conforme a Haghghi y Goli, (2022) el 83,72% del gen bla_{GES} expone resistencia futura a carbapenémicos con IMP (64,51%) y MER (67,56%). Asimismo, los datos obtenidos en el trabajo fueron 38,30% (18/47) de cepas que presentan el gen bla_{GES}, en el caso de la resistencia al IMP y MER se logró conseguir un 21% y 40% respectivamente, se detalla que las cepas aisladas carecen de una elevada resistencia a carbapenémicos. La combinación más importante es la producción de una β - lactamasa y la disminución de la permeabilidad de la membrana externa por la pérdida de porinas. Los artículos de Tarafdar et al., (2020) y Haghghi y Goli, (2022) señalan que los porcentajes de resistencia en antibióticos carbapenémicos sobrepasan el 60% de la totalidad de sus muestras. De acuerdo con nuestra investigación y artículos indagados, se llega a la determinación que el bla_{GES} es uno de los genes con más prevalencia a nivel mundial el cual puede provocar un riesgo a futuro por la resistencia a primeras líneas de tratamiento antibiótico.

Con respecto a los datos recolectados del análisis se observó que un 10,64% (5/47) son cepas que presentaron bla_{SIM} (4/47) y bla_{VIM} (1/47) que se clasifican como MBL por medio de la resistencia: PIP, TZP y CAZ y susceptibilidad en el ATM, con 32%, 28%, 60% y 34%. Según, Tahmasebi et al., (2020) señala que la clase B expone un 34,23% de resistencia, y se detalla al gen bla_{SIM} con una estructura similar que manifiesta convergencia en lugar de divergencia de una determinada secuencia de un ancestro en común, que se establece por medio de la identificación de residuos de nucleótidos que pueden estar o no conservados u alineados. Con respecto al bla_{VIM} es uno de los genes predominantes, y se establecen con la resistencia del 100% en CAZ y ATM. En consideración a Nasser et al., (2020), presenta un 32,3% de presencia de genes asociados al MBL y los antibióticos ligados a esta clase exhiben resistencia en CAZ (77,5%), ATM (26,5%) y TZP (54,1%). Por lo tanto, dichos genes juegan un papel importante en la producción de enzimas del tipo β -lactamasas que con el tiempo forman biofilms, brotes esporádicos que provocan diseminación de mutaciones y clones de alto riesgo. En consecuencia, las dos referencias usadas logran un porcentaje similar a la presencia de los genes relacionados con la clase MBL y en cuanto al proyecto se evidencia una cantidad mínima de cepas con genes como bla_{VIM} y bla_{SIM}; asimismo, el TZP y ATM en el trabajo presenta un valor menor en comparación con Nasser et al., (2020) y valores muy similares en la resistencia al CAZ.

Referente a la Clase C, según Abdelrahman et al., (2021) presenta 34% de positividad en *Pseudomonas* spp. productoras de Amp-C que especifica una asociación significativa con la producción de enzimas β -lactamasas. En Sudán se han vuelto ineficaces para tratar esta bacteria, ya que inicialmente no era identificada de manera correcta. La resistencia se especifica con CIP (28,8%), CN (19%), IMP (10%), CAZ (57,5%), CL (88,8%), AMX (100%), AMC (100%) y CTX (88,8%) todo provocado a causa de estas cefalosporinas cromosómicas reguladas por el gen *ampR* de expresión constante, median la resistencia a cefasloporinas de amplio espectro y cefamicinas, hidrolizan en menor cantidad los monobactámicos, FEP y carbapenémicos, por ello se obtiene porcentajes mínimos en la resistencia bacteriana. Otra referencia significativa corresponde a Ullah et al., (2017) que manifiesta un 12,5% de aislados con genes procedentes del Amp-C, en este caso usaron el método de Sanders con CTX y Amp-C para identificar cepas productoras de β -lactamasas Amp-C por medio de la existencia de sobreexpuesto entre estos dos fármacos, a su vez para el porcentaje de resistencia por antibiótico no se halló datos conclusos. En el ensayo se evidenció tan solo el 2,13% (1/47) que expone el gen *bla_{FOX}* y con respecto al perfil de susceptibilidad de los antibióticos se presenta una resistencia en: CIP (26%), CN (17%), IMP (21%) y CAZ (60%); comparado con Abdelrahman et al., (2021) los demás fármacos no fueron testeados en el estudio. El gen determinado pertenece al grupo de Amp-C, codificado por plásmidos, y otorga resistencia a los medicamentos combinados (β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas), así se demuestra un alto potencial de atenuación asociada a diferentes características que se relaciona con la patogenia de la bacteria. Y se determina que, por el tamaño de nuestra muestra, el porcentaje final encontrado no es tan elevado en comparación con las referencias analizadas.

Con respecto a la Clase D, Ullah et al., (2017) indica que los aislamientos MDR de *Pseudomonas* spp. son significativas de una amenaza emergente para la salud pública por su precoz incremento a las resistencias a los antibióticos como las β -lactamasas en Pakistán con un total de 69,6% (71) cepas que fueron determinadas como productora de β -lactamasas. En base al artículo indagado el gen *bla_{OXA-10}* fue detectado en un 11,26% (8/71) y demuestra un vigoroso patrón de resistencia a la CIP, CTX, CRO, ATM, AMC, DO y CL; además expone una correlación de resistencia con el IMP. Siendo así, Sorour et al., (2008) menciona que el 40,9% del gen *bla_{OXA-10}* y muestra una resistencia considerable en CAZ, ATM, FEP y CTX con 94,7%, 63,2%, 36,8% y 79% respectivamente. Del mismo modo, los datos obtenidos en la tesis señalan que el 6,38% (3/47) son cepas que presentaron el gen *bla_{OXA}* y se asocia con una resistencia absoluta a todas las familias de los antibióticos testeados como: penicilinas,

carbapenémicos, cefalosporinas, monobactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas mismo que se relacionan con los antibióticos del artículo analizado de (Ullah et al., 2017). Sin embargo, son codificados por plásmidos e integrones con espectro hidrolítico desigual, derivados de las β -lactamasas de tipo OXA con espectro reducido mutante, además de ello en las *Pseudomonas* spp. se han encontrado genes derivados del grupo 1 de OXA's y BLEE's que usan enzimas de restricción como PvuII, HaeII y HhaI que le confieren a la bacteria un sin número de resistencia a los medicamentos y así le permite vivir a expensas del huésped.

Finalmente, de acuerdo con la delimitación genotípica existen 17,02% (8/47) correspondiente a cepas no identificadas molecularmente, sin embargo, fenotípicamente pertenecen a la familia de las *Pseudomonas* spp. y conforme a la clasificación según Ambler el 10,64% (5/47) de estas cepas son Clase C y el 6,38% (3/47) coincide con la Clase D. Lo cual puede significar que la ausencia de la amplificación de dichas cepas se dio por la carencia de los genes testeados.

Eventualmente, se plantearía la hipótesis de que las cepas del tipo OXA, pueden presentar variantes de OXA-1 y OXA-35, ya que este último establece el 96% de similitud en aminoácidos y revela menor resistencia a los antibióticos (Ullah et al., 2017). En relación con la Clase C otro de los más prevalente puede englobar al gen Amp-C y sus derivados (Nasser et al., 2020)

Según Haghghi y Goli, (2022), la relación del bla_{GES} indica un $p < 0,05$ y muestran resistencia a los β -lactámicos y Tahmasebi et al., (2020) señala que bla_{VIM} mantiene un valor $p = 0,009$ y bla_{SIM} con $p = 0,049$, tiene relación directa con el bla_{GIM} y elevada prevalencia de estos en cepas productoras de β -lactamasas. (Rafiee et al., 2014) menciona que el bla_{FOX} tiene relación con el fenotipo del Amp-C determinado por una prueba de disco y el gen como tal con un valor $p < 0,05$. Por consiguiente, Nitz et al., (2021) expone que el bla_{OXA} posee disminución del halo de inhibición a FOX, TZP, FEP, CAZ y un valor $p < 0,05$. Respecto a las frecuencias analizadas en el estudio por medio del SPSS en relación de las cepas con las clases y genes de resistencia se registra una estadística significativa con valor $p = 0,013$ y se establece una relación directa entre las dos variables categóricas. Para finalizar, es importante mencionar que *P. aeruginosa* es prevalente en la clase A (bla_{GES}), clase B (bla_{SIM}) y clase D (bla_{OXA}); para *P. fluorescens* es frecuente la clase B (bla_{VIM}) y clase C (bla_{FOX}).

5.2 CONCLUSIONES

El CLSI M:100, 2023 es una guía práctica para la obtención de datos de referencia de mecanismos de resistencia y puntos de corte, de cada antibiótico por grupo bacteriano e identificación fenotípica.

Asimismo, se concluye que el bla_{GES} es más predominante en el presente trabajo, es decir, que se despliega por genes codificantes de enzimas β -lactamasas y desarrolla resistencia para fármacos β -lactámicos y carbapenémicos. Para las demás clases (B, C y D) la prevalencia no es significativa por la baja resistencia a dichos antibióticos.

Una vez analizada la resistencia a las carbapenemasas en *Pseudomonas* spp. se desarrolla la combinación de los mecanismos simultáneos como la pérdida de porinas junto con la producción de β lactamasas y biofilms

Se concluye que los datos que se asociaron entre las variables de expresión fenotípica y genes de resistencia de las cepas de *Pseudomonas* spp. afirman una relación representativa para la suposición de la correlación de variables y el valor p confirmaría que son estadísticamente significativas.

5.3 RECOMENDACIONES

Se recomienda un adecuado almacenamiento e identificación de las cepas, ya que dentro de nuestro proyecto encontramos otros tipos de enterobacterias en conjunto con *Pseudomonas* spp. esto podría afectar en futuras investigaciones y la viabilidad de las cepas a estudiar.

Se sugiere el uso apropiado de la guía del CLSI M:100, 2023 para poder analizar los puntos de corte establecidos e interpretar correctamente cada antibiótico. De la misma forma, hay que tener presente que no todos los mecanismos de resistencia identificados en el antibiograma son definitivos y se recomienda el uso de pruebas complementarias que aseguren la caracterización de la bacteria.

Para la técnica de PCR en punto final, se recomienda estandarizar la temperatura de Melting (TM) para cada gen usado, para adquirir bandas visibles en el gel de electroforesis.

Por último, para aquellas cepas que no fueron identificadas con ninguno de los genes testados, pero si fenotípicamente, se recomienda probar con otros genes de relevancia clínica para la Clase D (OXA´s) y Clase C (Amp-C) ya que pueden existir variaciones genéticas.

5.4 BIBLIOGRAFIA

- Abdelrahman, D. N., Taha, A. A., Dafaallah, M. M., Mohammed, A. A., Hussein, A. R. M. E., Hashim, A. I., Hamedelnil, Y. F., y Altayb, H. N. (2021). β -lactamases (bla TEM, bla SHV, bla CTXM-1, bla VEB, bla OXA-1) and class C β -lactamases gene frequency in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical specimens in Khartoum State, Sudan: a cross sectional study [version 3; peer review: 2 approve. *F1000Research*, 9, 1-16. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.24818.3>
- Ali, D. O., y M.A.Nagla, M. (2020). Molecular Detection of bla OXA-48 Gene Encoding Carbapenem Resistance *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Khartoum State Hospitals, Sudan. *Department of Medical Microbiology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Al-Neelain University, Khartoum, Sudan*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.22.20137034>
- Alonso, B., Fernández-Barat, L., Di Domenico, E. G., Marín, M., Cercenado, E., Merino, I., de Pablos, M., Muñoz, P., y Guembe, M. (2020). Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 909. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05534-1>
- Arca-Suárez, J., Lasarte-Monterrubio, C., Rodiño-Janeiro, B. K., Cabot, G., Vázquez-Ucha, J. C., Rodríguez-Iglesias, M., Galán-Sánchez, F., Beceiro, A., González-Bello, C., Oliver, A., y Bou, G. (2021). Molecular mechanisms driving the in vivo development of OXA-10-mediated resistance to ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam during treatment of XDR *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 91-100. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA396>
- Balouiri, M., Sadiki, M., y Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righ, E., y Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *NIH*, 7. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Becton, D. and C. (2014). *B BBL Nutrient Agar*. Becton, Dickinson and Company. www.bd.com/ds.
- Becton Dickinson. (2014a). BD MacConkey II Agar. *Becton Dickinson GmbH* . <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>
- Becton Dickinson. (2014b). *Gram Stain Kits y reactivos*. Becton Dickinson . <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/gram.pdf>
- Becton Dickinson GmbH. (2017). *BD Mueller Hinton II Agar*. Becton Dickinson GmbH. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774>
- Bhargava, H. (2020). *Pseudomonas Infection*. WebMed. <https://www.webmd.com/a-to-z-guides/pseudomonas-infection>
- Biggers, A. (2018). *Pseudomonas infections: What to know*. MedicalNewsToday. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/322386>
- Botelho, J., Grosso, F., y Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug resistance updates: reviews and*

commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 44.
<https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2019.07.002>

- Bronze, M. S. (2020). *Pseudomonas aeruginosa Infections Treatment & Management*. MedScape. <https://emedicine.medscape.com/article/226748-medication#:~:text=Pseudomonas infection can be treated,in conjunction with an aminoglycoside.>
- Bui, T., y Preuss, C. (2022). Cephalosporins . *Pubmed* . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/#:~:text=Cephalosporins are beta-lactam antimicrobials,%2C meningitis%2C and other infections.>
- Calderón, L., Fontalvo, L., Ariza, B., y Trespacios, A. (2019). *Perfil de susceptibilidad in vitro de Pseudomonas aeruginosa frente a ceftolozane/tazobactam* [Pontificia Universidad Javeriana]. [https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/43139/Escrito final trabajo de grado CeftolozaneTazobactam Pseudomonas aeruginosa.pdf?sequence=5&isAllowed=y](https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/43139/Escrito%20final%20trabajo%20de%20grado%20CeftolozaneTazobactam%20Pseudomonas%20aeruginosa.pdf?sequence=5&isAllowed=y)
- Carroll, K., Morse, S., Mietzner, T., y Miller, S. (2016). *Pseudomonas y Acinetobacter*. En *Microbiología Médica* (27.ª ed., pp. 245-249). Mc Graw Hill.
- CDC. (2019). Healthcare-associated Infections *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. *Centers for Disease Control and Prevention*, 1-2. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html#print>
- CDC. (2021). *Antibiotic / antimicrobial resistance*. CDC. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Cercenado, E., y Cantón, R. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *SEIMC*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Cerlioli, M., Batailler, C., Conrad, A., Roux, S., Perpoint, T., Becker, A., Triffault-Fillit, C., Lustig, S., Fessy, M.-H., Laurent, F., Valour, F., Chidiac, C., y Ferry, T. (2020). *Pseudomonas aeruginosa Implant-Associated Bone and Joint Infections: Experience in a Regional Reference Center in France*. *Frontiers in Medicine*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.513242>
- Chiu, S. (2022). *Pseudomonas Keratitis*. American Academy of Ophthalmology. https://eyewiki.aaao.org/Pseudomonas_Keratitis
- CLSI. (2023). *M100 Performance Standards for Antimicrobial*.
- Curvalin. (2010). *Antibiogram* . Eska Publishing .
- Elnour, S., Mohamed, R., Alobied, A., Hussien, W. M., Saeed, M. I., Fernandez, R., y Silva, D. (2018). blaOXA-48 Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Sudan. *Journal of Advances in Microbiology*, 10(4), 1-5. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2018/34964>
- Espinoza Pesantez, D. I., y Esparza Sanchez, G. F. (2021). Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista chilena de infectología*, 38(1), 69-80. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100069>

- Espinoza Pesantez, D. I., German, F., y Sanchez, E. (2021). Enzymatic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, clinical and laboratory aspects. *Rev Chilena Infectología*, 38(1), 69-80. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182021000100069>
- Eyebé, S., Nana-Djeunga, H. C., Guewo-Fokeng, M., Wafeu, G. S., Vouking, M. Z., Massoda, S., Evina, C. D., Zoumabo, A. C., Ongolo-Zogo, P., y Zahar, J.-R. (2022). Risk factors for colonization and infection with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit: protocol for a systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews*, 11(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s13643-022-02143-8>
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., y 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>
- Gajamer, V. R., Bhattacharjee, A., Paul, D., Ingti, B., Sarkar, A., Kapil, J., Singh, A. K., Pradhan, N., y Tiwari, H. K. (2020). High prevalence of carbapenemase, AmpC β -lactamase and aminoglycoside resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-positive uropathogens from Northern India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.029>
- García-Betancur, J. C., Appel, T. M., Esparza, G., Gales, A. C., Levy-Hara, G., Cornistein, W., Vega, S., Nuñez, D., Cuellar, L., Bavestrello, L., Castañeda-Méndez, P. F., Villalobos-Vindas, J. M., y Villegas, M. V. (2021). Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 19(2), 197-213. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>
- Gómez, C., Lucía, A., Castro, L., Pérez De Gonzalez, M., Lucía, M., y Jiménez, N. (2015). Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(1), 27-34. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112005000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Haghighi, S., y Goli, H. R. (2022). High prevalence of blaVEB, blaGES and blaPER genes in beta-lactam resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *AIMS Microbiology*, 8(2), 153-166. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022013>
- HiMedia Laboratories. (2011). Nutrient Agar M001. En *HiMedia Laboratories Pvt. Limited.*, www.himedialabs.com
- HiMedia Laboratories. (2012). *MacConkey Agar*. <https://himedialabs.com/TD/M081B.pdf>
- Højby, N., Ciofu, O., y Bjarnsholt, T. (2015). *Pseudomonas*. En D. W. W. James H. Jorgensen, Karen C. Carroll, Guido Funke, Michael A. Pfaller, Marie Louise Landry, Sandra S. Richter (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition (11th ed., pp. 774-790).
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlíb, L., Luquee, S., Gómez-Zorrillab, S., Benito, N., y Grau, S. (2019). Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *American Society for Microbiology.*, 32. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31462403/>
- Hujer, A. M., Bethel, C. R., Taracila, M. A., Marshall, S. H., Rojas, L. J., Winkler, M. L., Painter, R. E., Domitrovic, T. N., Watkins, R. R., Abdelhamed, A. M., D'Souza, R., Mack, A. R., White, R. C., Clarke, T., Fouts, D. E., Jacobs, M. R., Young, K., y Bonomo, R. A. (2022). Imipenem/Relebactam Resistance in Clinical Isolates of Extensively Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Inhibitor-Resistant β -Lactamases and Their

- Increasing Importance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(5). <https://doi.org/10.1128/aac.01790-21>
- Iglewski, B. H. (1996). Pseudomonas. En *Medical Microbiology*. Universidad de Texas en Galveston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>
- Ikarashi, K., Kutsuna, R., Tomida, J., Kawamura, Y., y Morita, Y. (2021). Overexpression of the mexxy multidrug efflux system correlates with deficient pyoverdine production in pseudomonas aeruginosa. *Antibiotics*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060658>
- Jáuregui-Rojas Paola, Vásquez-Tirado Gustavo, Rodríguez-Montoya Ronald, y Albínez-Pérez Julio. (2021). Factores de riesgo para infección por pseudomonas aeruginosa multirresistente en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica de la unidad de cuidados intensivos. Estudio multicéntrico. *REVISTA DEL CUERPO MÉDICO DEL HNAAA*, 14(1), 13-17. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/02/1354892/gimircm-v14-n1-2021_pag13-17.pdf
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., y McClean, S. (2021). Pseudomonas aeruginosa: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Khanna, N., y Gerriets, V. (2022). Beta Lactamase Inhibitors. *Pubmed* . [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557592/#:~:text=Beta-lactamase inhibitors are medications,enormous global public health challenge.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557592/#:~:text=Beta-lactamase%20inhibitors%20are%20medications,enormous%20global%20public%20health%20challenge.)
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., y Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- Labarca, J. A., Salles, M. J. C., Seas, C., y Guzmán-Blanco, M. (2014). Carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in the nosocomial setting in Latin America. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-17. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940494>
- LaBauve, A. E., y Wargo, M. J. (2012). Growth and Laboratory Maintenance of Pseudomonas aeruginosa. *Current Protocols in Microbiology*, 25(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>
- Lamas Ferreiro, J. L., Álvarez Otero, J., González González, L., Novoa Lamazares, L., Arca Blanco, A., Bermúdez Sanjurjo, J. R., Rodríguez Conde, I., Fernández Soneira, M., y de la Fuente Aguado, J. (2017). Pseudomonas aeruginosa urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. *PLOS ONE*, 12(5), e0178178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178178>
- Lister, P. D., Wolter, D. J., y 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 Ramirez, I. (2016). Fenotipo y genotipo de resistencia de Pseudomonas aeruginosa causantes de infecciones nosocomiales. *BUAP*. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/14440>

- Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Barroso, C. D. N., Tuon, F. F., y Faoro, H. (2022). Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232415779>
- Lu, S., Tian, Q., Zhao, W., y Hu, B. (2017). Evaluation of the Potential of five Housekeeping Genes for Identification of Quarantine *Pseudomonas syringae*. *Journal of Phytopathology*, 165(2), 73-81. <https://doi.org/10.1111/jph.12538>
- Martínez Martínez, L., y Pascual Hernández, Á. (2017). Mecanismos de resistencia a las carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*. *Control Calidad SEIMC*. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/psaeru.pdf>
- Memon, N. (2021). *How do monobactams work?* . RxList . https://www.rxlist.com/how_do_monobactams_work/drug-class.htm
- Memon, N., y Khan, S. (2021). *How do carbapenems work?* . RxList . https://www.rxlist.com/how_do_carbapenems_work/drug-class.htm
- Micek, S. T., Lloyd, A. E., Ritchie, D. J., Reichley, R. M., Fraser, V. J., y Kollef, M. H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1306-1311. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1306-1311.2005>
- Mohamed, H. M. A., Alnasser, S. M., Abd-Elhafeez, H. H., Alotaibi, M., Batiha, G. E.-S., y Younis, W. (2022). Detection of β -Lactamase Resistance and Biofilm Genes in *Pseudomonas* Species Isolated from Chickens. *Microorganisms*, 10(10), 1975. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101975>
- MSP. (2018). *Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública reporte de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018*. MSP. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
- Muro, M. (2018). *Carbapenemasas: un mecanismo de resistencia bacteriana frente las carbapenemas, antibioticos de último recurso* [Universidad Complutense]. http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MANUELA_MURO_DE_ZARO_ALCALA.pdf
- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2017). *Pseudomonas* y bacterias relacionadas. En *Microbiología Médica* (8.^a ed., pp. 272-286). Elsevier.
- Nasser, M., Ogaili, M., Palwe, S., y Kharat, A. S. (2020). Molecular detection of extended spectrum β -lactamases, metallo β -lactamases, and Amp-C β -lactamase genes expressed by multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from patients with burn/wound infections. *Burns Open*, 4(4), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.burnso.2020.07.003>
- Newman, J. W., Floyd, R. V., y Fothergill, J. L. (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiology Letters*, 364(15). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx124>
- NHS. (2015). UK Standards for Microbiology Investigations Identification of *Pseudomonas* species and other NonGlucose Fermenters. *NHS*, 17(3), 1-41. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/422699/ID_17i3.pdf
- NHS. (2022). *Antibiotics*. NHS. <https://www.nhs.uk/conditions/antibiotics/>

- Nirvia Margot Cuaical Ramos, Yerismar Andreina Delgado Borrero, Yelli María Anzola Anzola, y Daniel Marcano Zamora. (2012). Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(2). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000200004
- Nitz, F., Melo, B. O., Silva, L. C. N., Monteiro, A. de S., Marques, S. G., Monteiro-Neto, V., Gomes, R. de J., Turri, A. D. S., y Conceição, P. C. (2021). Molecular Detection of Drug-Resistance Genes of blaOXA-23-blaOXA-51 and mcr-1 in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *MDPI*, 1-17.
- NMDOH. (2018). *Manual for Investigation and Control of Selected Communicable Diseases in New Mexico*. Department of Health, Epidemiology and Response Division, Infectious Disease Epidemiology Bureau. <https://www.nmhealth.org/publication/view/general/5123/>
- 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., y Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *SciELO*, 70(2). <http://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v70n2/v70n2a10.pdf>
- Oliver, C. J., y Nicolau, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *ELSEVIER*, 1, 19-28. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)
- OMS. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. OMS. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Pachori, P., Gothwal, R., y 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>
- Pandey, N., y Cascella, M. (2022). Beta Lactam Antibiotics. *NIH*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., y 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>
- PB-L. (2021). *Master mix PCR (pto final)*. Productos Biológicos. <http://www.pb-l.com.ar/productos/ea04-master-mix-pcr/>
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., y Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Quereshi, S. (2020). *How is the ear affected by Pseudomonas (P) aeruginosa infection?* Medscape. <https://www.medscape.com/answers/226748-63471/how-is-the-ear-affected-by-pseudomonas-p-aeruginosa-infection>

- Rafiee, R., Eftekhari, F., Tabatabaei, S. A., y Tehrani, D. M. (2014). Prevalence of Extended-Spectrum and Metallo β -Lactamase Production in AmpC β -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Burns. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(9). <https://doi.org/10.5812/JJM.16436>
- Ramphal, R., Balloy, V., Jyot, J., Verma, A., Si-Tahar, M., y Chignard, M. (2008). Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the Lung Requires the Recognition of Either Lipopolysaccharide or Flagellin. *The Journal of Immunology*, 181(1), 586-592. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.586>
- Rogers, G. (2019). *Pseudomonas Infections*. HealthLine. <https://www.healthline.com/health/pseudomonas-infections>
- Sandoval, E. (2014). *Antibiograma en el laboratorio*. AgroColun. <https://agrocolun.cl/antibiograma-en-el-laboratorio-agropecuario/>
- Sanz Cervera, S. A. (2010). *Prácticas de Microbiología*.
- Smith, M. (2022). *Polymerase chain reaction (PCR)*. NIH. [https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction#:~:text=Polymerase chain reaction \(abbreviated PCR,be studied in greater detail.](https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction#:~:text=Polymerase chain reaction (abbreviated PCR,be studied in greater detail.)
- Smith, W., Bardin, E., Cameron, L., Edmondson, C. L., Farrant, K. V., Martin, I., Murphy, R. A., Soren, O., Turnbull, A. R., y Wierre-Gore, N. (2017). Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS*, 364(14). <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/femsle/fnx121>
- Solórzano, J. W. P., y Parrales, V. E. P. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* y su evolución de resistencia a los antibióticos en un hospital de segundo nivel en Portoviejo, Ecuador. *QhaliKay*, 5(2), 50-56. <file:///C:/Users/HP/Downloads/3002-61-12060-1-10-20210516.pdf>
- Sorour, A. E., Wali, I. E., y El-Hodaky, S. K. (2008). OXA-Type-Beta-lactamases Among Extended-Spectrum-Cephalosporin Non-susceptible *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates Collected from a Large Teaching Hospital in Cairo. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 17(4).
- Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L. N. E., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., y Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- Spagnolo, A. M., Sartini, M., y Cristina, M. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Reviews in Medical Microbiology*, 32(3), 169-175. <https://doi.org/10.1097/mrm.0000000000000271>
- Street, T., Schmidt, S. T., y Hermelin, D. (2022). *Antimicrobial Susceptibility: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels*. Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/2103786-overview?pa=rOBA11N0uZhjg0bJO6bD2AgpF2o0ma5fK6AeuJMPuepOQ4%2B%2BoTWGQm%2Be5C5zB%2BCc43mU9jd%2B1DtnxY47OmyybA%3D%3D>. Accedido en Noviembre 2019.

- Tahmasebi, H., Dehbashi, S., Alikhani, M. Y., Porbaran, M., y Arabestani, M. R. (2020). Prevalence and molecular typing of Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* with adhesion factors: A descriptive analysis of burn wounds isolates from Iran. *Gene Reports*, 21(August), 100853. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100853>
- Tankeshwar, A. (2022). *Modified Kirby-Bauer Disc Diffusion Method*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/antimicrobial-susceptibility-testing-procedure-modified-kirby-bauer-method/>
- Tanriverdi Cayci, Y., Biyik, İ., y Birinci, A. (2022). VIM, NDM, IMP, GES, SPM, GIM, SIM Metallobetalactamases in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Turkish University Hospital. *Journal of Archives in Military Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.5812/jamm-118712>
- Tarafdar, F., Jafari, B., y Azimi, T. (2020). Evaluating the antimicrobial resistance patterns and molecular frequency of bla_{oxa}-48 and bla_{GES-2} genes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burn wound infection in Tehran, Iran. *PubMed*, 37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7394744/>
- Tickler, I. A., Torre, J. C. G. D. La, Alvarado, L., Obradovich, A. E., y Tenover, F. C. (2022). Mechanisms of carbapenemase-mediated resistance among high-risk *Pseudomonas aeruginosa* lineages in Peru. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 31, 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.08.018>
- Tripathi, N., y Sapra, A. (2021). Gram Staining. *PubMed*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Ullah, W., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S., y Rehman, Z. (2017). CTX-M-15 and OXA-10 beta lactamases in multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: First report from Pakistan. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.039>
- Vazquez-Pertejo, M. T. (2020). *Pruebas inmunológicas para las enfermedades infecciosas - Enfermedades infecciosas*. Manual MSD Versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/diagnostico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-inmunologicas-para-las-enfermedades-infecciosas>
- Verma, N., Prahraj, A. K., Mishra, B., Behera, B., y Gupta, K. (2019). Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* by phenotypic and genotypic methods in a tertiary care hospital of East India. *Journal of laboratory physicians*, 11(4), 287-291. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_136_19
- Vila, J., y Marco, F. (2010). Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10), 726-736. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.001>
- Voor in 't holt, A. F., Severin, J. A., Hagenaars, M. B. H., de Goeij, I., Gommers, D., y Vos, M. C. (2018). VIM-positive *Pseudomonas aeruginosa* in a large tertiary care hospital: matched case-control studies and a network analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0325-1>
- Wagener, B. M., Hu, R., Wu, S., Pittet, J.-F., Ding, Q., y Che, P. (2021). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors in Cytoskeletal Dysregulation and Lung Barrier Dysfunction. *Toxins*, 13(11), 776. <https://doi.org/10.3390/toxins13110776>

- Wu, B. (2021). *Pseudomonas skin infections*. DermNet NZ. <https://dermnetnz.org/topics/pseudomonas-skin-infections#:~:text=Pseudomonas species are Gram-negative,bacteria are invasive and toxigenic>.
- Yamagishi, J., Sato, Y., Shinozaki, N., Tsuboi, A., Nagasaki, M., y Yamashita, R. (2016). Comparison of Boiling and Robotics Automation Method in DNA Extraction for Metagenomic Sequencing of Human Oral Microbes. *PubMed*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154389>
- Yip Derek, y Geerriets Valerie. (2022). Penicilin. *Pubmed*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554560/?report=printable>
- Zerón, A. (2010). Biotipos, fenotipos y genotipos. ¿De qué tipo somos? . *Periodontología*, 1(1), 1-8. www.medigraphic.org.mx

5.5 ANEXOS

Anexo 1 Protocolo de PCR para la detección de genes de resistencia para *Pseudomonas* spp.

GES = 863pb				
	Co		Cf	Vo (µl)
Taq	2	x	1	6,25
PF	10	uM	0,4	0,5
PR	10	uM	0,4	0,5
H₂O	-	-	-	3,25
DNA	-	-	-	2
	Vf			12,5

VIM = 390pb				
	Co		Cf	Vo (µl)
Taq	2	x	1	6,25
PF	10	uM	0,4	0,5
PR	10	uM	0,4	0,5
H₂O	-	-	-	3,25
DNA	-	-	-	2
	Vf			12,5

SIM = 571pb				
	Co		Cf	Vo (µl)
Taq	2	x	1	6,25
PF	10	uM	0,4	0,5
PR	10	uM	0,4	0,5
H₂O	-	-	-	3,25
DNA	-	-	-	2
	Vf			12,5

FOX= 162pb				
	Co		Cf	Vo (µl)
Taq	2	x	1	6,25
PF	10	uM	0,4	0,5
PR	10	uM	0,4	0,5
H₂O	-	-	-	3,25
DNA	-	-	-	2
	Vf			12,5

OXA-10 = 478pb				
	Co		Cf	Vo (µl)
Taq	2	x	1	6,25
PF	10	uM	0,4	0,5
PR	10	uM	0,4	0,5
H₂O	-	-	-	3,25
DNA	-	-	-	2
	Vf			12,5

Fuente: Autoría propia

Protocolo PCR GES				
Denaturación inicial	94°	5	min	1 ciclo
Denaturación	94°	30	seg	35 ciclos
Hibridación	<u>54°</u>	30	seg	
Elongación	72°	30	seg	
Elongación final	72°	10	min	1 ciclo

Protocolo PCR VIM				
Denaturación inicial	94°	5	min	1 ciclo
Denaturación	94°	30	seg	30 ciclos
Hibridación	<u>59°</u>	30	seg	
Elongación	72°	30	seg	
Elongación final	72°	10	min	1 ciclo

Protocolo PCR SIM				
Denaturación inicial	94°	5	min	1 ciclo
Denaturación	94°	30	seg	30 ciclos
Hibridación	<u>52°</u>	30	seg	
Elongación	72°	30	seg	
Elongación final	72°	10	min	1 ciclo

Protocolo PCR FOX				
Denaturación inicial	94°	5	min	1 ciclo
Denaturación	94°	30	seg	30 ciclos
Hibridación	<u>61°</u>	30	seg	
Elongación	72°	30	seg	
Elongación final	72°	10	min	1 ciclo

Protocolo PCR OXA 10				
Denaturación inicial	94°	5	min	1 ciclo
Denaturación	94°	30	seg	30 ciclos
Hibridación	<u>61°</u>	30	seg	
Elongación	72°	30	seg	
Elongación final	72°	10	min	1 ciclo