

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES CLASE 1 EN AISLADOS CLÍNICOS
DE *Pseudomonas aeruginosa***

**Disertación previa a lo obtención del título de Licenciado en
Ciencias Biológicas**

ESMERALDA ZARIANA RODRÍGUEZ MAKHIBORODA

Quito, 2020

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Esmeralda Zariana Rodríguez Makhaboroda ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M. Sc. María Fernanda Yauri Bucheli
Directora de la Disertación
Quito, 21 enero de 2020

DEDICATORIA

A mi padre, Luis Rodríguez

“Jamás debes perder de vista el objetivo pese a todas las dificultades que existan.
Puedes tardar un poco más pero nunca perder la meta.”

“De las situaciones difíciles siempre aparecen oportunidades.”
Luis Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Luis Rodríguez y Svitlana Makhboroda por su gran apoyo a lo largo de toda mi vida, quienes gracias a sus valores inculcados he logrado ser la persona que soy ahora. A mi hermana Stefanía Rodríguez quien a su corta edad me enseña cosas nuevas. Su amor es el que me impulsa ser mejor cada día y ser un ejemplo a seguir para ella.

A Rubén Jarrín quien con amor, paciencia y risas ha logrado siempre motivarme en seguir adelante. Mi compañero de aventuras y de retos intelectuales.

A María Antonieta Ando por sus valiosos consejos.

A mis compañeros Duncan Coral, Camila Cilveti, Francisco, Joselyn, Kimberly por ser una ayuda incondicional. Por momentos inolvidables en el laboratorio.

A la Doctora Iliana Alcocer quien ha sido un gran apoyo intelectual, laboral y sentimental. Por todas sus enseñanzas y confianza depositada en mí. A Fernanda Yauri por su amistad durante esta experiencia. Y especialmente por transmitirme su conocimiento.

Y finalmente, a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento de este estudio a través de Proyectos PUCE.

TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN DE LA DISERTACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE ANEXOS.....	XI

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. METODOLOGÍA.....	12
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	12
4.2. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
4.3. IDENTIFICACION POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF).....	16
4.4. EXTRACCIÓN DE ADN.....	17
4.5. ELECTROFORESIS.....	18
4.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
4.7. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20

4.8. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ESTRUCTURA DE INTEGRONES CLASE 1.....	22
4.9. SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LA REGIÓN VARIABLE DE INTEGRONES CLASE 1.....	25
4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	26
5.2. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
5.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
5.4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
5.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ESTRUCTURA DE INTEGRONES CLASE 1	35
5.6. IDENTIFICACIÓN DE GENES ENCONTRADOS EN LA REGIÓN VARIABLE DE INTEGRONES CLASE 1.....	39
6. DISCUSIÓN.....	41
7. CONCLUSIONES.....	45
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
9. ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origen de obtención de los aislados clínicos de la especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
Figura 2. Aspecto de colonias típicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre placas de Agar Nutriente.....	27
Figura 3. Producción del pigmento pirocianina característico de la especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el medio selectivo Cetrimide observado bajo la luz UV.....	27
Figura 4. Prueba de oxidasa.....	28
Figura 5. Pruebas bioquímicas empleados en la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Figura 6. Gel representativo de la identificación molecular de la especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Figura 7. Antibiograma obtenido por el método de difusión por disco para la especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Figura 8. Interpretación de resultados de la sensibilidad a colistina mediante el Método de la gota.....	33
Figura 9. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos probados en la población total de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figura 10. Categorización de Multirresistencia (MDR), Resistencia Extendida (XDR) y Panresistencia (PDR) en la población de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Figura 11. Gel representativo de los productos de amplificación del gen <i>intl1</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Figura 12. Gel representativo de la amplificación de la región variable de integrones clase 1 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Figura 13. Gel representativo de la amplificación del gen <i>qacE 1</i> , codificante de enzimas que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario.....	37
Figura 14. Gel representativo de la amplificación del gen <i>sul1</i> , codificante de resistencia contra sulfonamidas.....	38
Figura 15. Porcentaje de presencia/ausencia del gen de la integrasa 1 (<i>intl1</i>) en la población total de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38

Figura 16. Porcentaje de presencia/ausencia de la Región Variable de integrones clase 1.....	39
Figura 17. Porcentaje de presencia de genes insertados en la región variable de integrones clase 1. adeniltrasnferasas (<i>aadA 6 - aadB</i>) y acetiltrasnferasas (<i>aacA 4</i>).....	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores empleados en la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y caracterización de integrones clase 1.....	19
Tabla 2. Reporte de identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por MALDI-TOF.....	30
Tabla 3. Resultados obtenidos a partir del análisis de secuencias por el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	40

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Mecanismos de virulencia empleados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Anexo 2. Codificación, fecha de colecta, datos demográficos y origen de los aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> empleados en el presente estudio.....	53
Anexo 3. Sensibilidad antimicrobiana obtenida en los aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55

1. RESUMEN

Los integrones clase 1 son plataformas genéticas que cumplen un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana a nivel mundial. Mediante reconocimiento, captura y expresión, son responsables de la acumulación continua de diversos genes de resistencia a antimicrobianos. Se caracterizan por tener movilidad si se encuentran asociados a transposones y/o plásmidos, facilitando su transferencia entre diversas especies de bacterias. El objetivo del presente estudio fue analizar la prevalencia de integrones clase 1 en 40 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas de dos laboratorios particulares de las ciudades de Quito y Loja durante los meses de enero a junio de 2018. La identificación de la especie se realizó por análisis de colonias aisladas sobre agar Cetrimide, pruebas bioquímicas, MALDI-TOF y caracterización molecular. La sensibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. La caracterización de integrones clase 1 se identificó los genes para integrasa 1 (*intI1*), región variable (5'CS – 3'CS), *qacE 1* y *sul1* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos. Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron secuenciados para la identificación de los genes encontrados en la región variable de los integrones detectados. La presencia de integrones clase 1 fue detectada en 11/40 (27,5 %) aislados clínicos analizados, de ellos 7/11 (63,64%) poseían región variable con genes casete. En la región variable se observó la presencia de genes que codifican enzimas de resistencia a aminoglucósidos como: *aadA(6)* (85,7 %) , *aacA(4)* (7,1 %) y *aadB* (7,1 %). De los 11 aislados que presentaron integrones clase 1, 5 fueron multirresistentes (45,5%), 2 presentaron resistencia extendida (18,2%) y 2 fueron panresistentes (18,2 %). Estos aislados presentaron alta resistencia a quinolonas (27,5%), carbapenémicos (17,5%) y aminoglucósidos (17,5%); y en menor porcentaje a monobactámicos (13%), cefalosporinas (9%), e inhibidores de -lactamasas (7,5%). Como conclusión, se determinó que los integrones clase 1 no son el principal mecanismo de resistencia entre los aislados analizados de *Pseudomonas aeruginosa*. La existencia de diferentes mecanismos de resistencia como producción de enzimas hidrolíticas, expresión de bombas de eflujo e

impermeabilidad de membrana podrían explicar la deficiente actividad antibiótica contra este tipo de aislados.

Palabras clave:

Integrones clase 1, multirresistente, panresistente, región variable, resistencia extendida.

2. ABSTRACT

Class 1 integrons are genetic platforms that play a fundamental role in worldwide antimicrobial resistance. They are abundant among bacterial isolates of clinical origin. Through recognition, capture and expression, these genetic structures are responsible for the continuous accumulation of various antimicrobial resistance genes. Class 1 integrons are characterized by mobility if they are associated with transposons and plasmids, facilitating their transfer between various species of bacteria. The objective of this study was to analyze the prevalence of class 1 integrons in 40 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from patients treated in health care centers in the cities of Quito and Loja during the months of January to June 2018. The species was identified by analysis of isolated colonies on Cefrimide agar, biochemical tests, MALDI-TOF and molecular characterization. Antimicrobial sensitivity was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method. The genes for integrase 1 (*intI1*), variable region (5'CS-3'CS), *qacE 1* and *sul1* were identified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. The amplification products obtained by PCR were sequenced for the identification of the genes found in the variable region of the detected integrons. The presence of class 1 integrons was detected in 11/40 (27.5%) analyzed clinical isolates, of which 7/11 (63.64%) had a variable region with cassette genes. In the variable region, genes encoding aminoglycoside resistance enzymes were characterized as: *aadA* (6), *aacA* (4) and *aadB*. The prevalence of the genes in the study was 85.7%, 7.1% and 7.1% respectively. Of the 11 isolates that presented class 1 integrons, 5 were multi-resistant (45.5%), 2 presented extended resistance (18.2%) and 2 pan-resistant (18.2%) defined with disc diffusion sensitivity tests. These isolates showed high resistance to quinolones (27.5%), carbapenems (17.5%) and aminoglycosides (17.5%); and in a lower percentage to monobactams (13%), cephalosporins (9%), and β -lactamase inhibitors (7.5%). Integrons are not the main mechanism of resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. It has different resistance mechanisms such as hydrolytic enzyme production, efflux pump expression and membrane impermeability.

Keywords:

Integrones class 1, extended resistance, multi-resistant, pan-resistant, variable region.

3. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son sustancias que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos. Son utilizados para tratar una amplia gama de enfermedades infecciosas causadas por bacterias en seres humanos y animales. Los antibióticos son considerados como una de las mayores contribuciones a la medicina en el siglo XX permitiendo el aumento de la expectativa y calidad de vida de la población (Medina, Paciel, Noceti y Rieppi, 2017). Sin embargo, el uso indiscriminado de estas sustancias en el tratamiento clínico de infecciones asociadas a bacterias, ha incrementado la resistencia a los antibióticos en los microbios. Esta es una de las principales preocupaciones en la actualidad y un dilema para el tratamiento futuro de las infecciones (Health Protection Agency, 2015).

Pseudomonas aeruginosa fue descrita por primera vez a finales del siglo XIX como una especie bacteriana distinta dentro del género *Pseudomonas*. La producción de la toxina piocianina, pigmentación característica de la bacteria notada en la coloración azul y verde en vendas, proporcionó el estímulo para que la farmacéutica Carle Gessard realizará el primer estudio científico en el año de 1882. A pesar de que en 1889 la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* de producir infecciones ya era conocido; no fue sino hasta el siglo XX que se consideró a esta especie como patógeno humano, especialmente en pacientes hospitalizados con sistemas de defensa deteriorados (Falkinham, Hilborn, Arduino, Pruden y Edwards, 2015).

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia Pseudomonadaceae. Se trata de un bacilo recto o ligeramente curvado Gram negativo, con un tamaño que oscila entre 0,5 - 1 μm de ancho por 1,5 - 4 μm de largo. Es mótil gracias a la presencia de un flagelo polar o varios en disposición lofótrica. En relación con su metabolismo, no fermentan la glucosa, contrario a las enterobacterias que si lo hacen (Pérez-Gallego, 2019). Es aerobia (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), y es positiva a las pruebas de catalasa y oxidasa (Sonderholm et al., 2017). Se caracteriza por producir una variedad de pigmentos como la piocina (color azul-verdoso) y la pioverdina (color amarillo-

verdoso) que presenta fluorescencia bajo la luz ultravioleta. Estas propiedades pueden usarse en la identificación temprana de estos microorganismo (Streeter y Katouli, 2016).

Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (donde es considerada un microorganismo poco patógeno), presente en el agua (ríos, lagos, depósitos, duchas, bañeras, piscinas, etc.), en los suelos húmedos, en los vegetales y en los materiales húmedos (alimentos, fómites) (Streeter y Katouli, 2016). También puede formar parte de la microbiota normal saprófita de las zonas húmedas de la piel (axilas, conducto auditivo, región perineal y mucosas). (Health Protection Agency, 2015).

Es capaz de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno para crecer en diversos ambientes (Sonderholm et al., 2017). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, pero pueden tolerar temperaturas de hasta 45 °C – 50 °C haciéndola idónea para persistir en ambientes marginales (Pérez-Gallego, 2019).

Las infecciones producidas por miembros del género *Pseudomonas*, muy pocas veces, son adquiridas en la comunidad por pacientes inmunocompetentes. Es decir, es un patógeno oportunista que rara vez causa enfermedad a individuos sanos. Sin embargo, presenta una capacidad de resistencia natural a múltiples antibióticos y versatilidad para permanecer en el ambiente y en diversos sustratos (como soluciones desinfectantes, jabones, material quirúrgico de uso común en hospitales, etc.) (Bellés Bellés, Seral García y Castillo García, 2017).

La capacidad de *P. aeruginosa* para infectar de forma eficiente radica en la gran variedad de factores de patogenicidad que posee. Estos mecanismos de virulencia comprenden dos grupos: factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana como flagelo, lipopolisacáridos, pili; y factores de patogenicidad secretados por la célula bacteriana como elastasas, proteasas, exotoxinas o pigmentos (Paz-Zarza et al., 2019). En el (Anexo 1) se observa con mayor detalle los mecanismos de virulencia empleados por *Pseudomonas aeruginosa* durante el proceso de infección.

La capacidad para persistir en condiciones medio ambientales adversas y los mecanismos de patogenicidad que posee, convierten a *P. aeruginosa* en una bacteria de interés en infecciones nosocomiales. Las enfermedades más comunes asociadas a la adquisición de estas bacterias son: neumonía, otitis externa, infecciones dérmicas, infecciones en heridas quirúrgicas, infecciones de válvulas cardíacas, sepsis, etc. (Pachori, Gothaiwai y Gandhi, 2019).

La transmisión de esta bacteria ocurre principalmente en pacientes que tienen el sistema inmune comprometido, y se produce a través del contacto, de la piel lesionada o las mucosas, con agua u objetos contaminados (instrumental quirúrgico, respiradores, catéteres e incluso las manos del personal sanitario) (Pérez-Gallego, 2019).

Las bacterias contienen elementos genéticos que permiten la transferencia horizontal de determinantes de resistencia a antibióticos entre diferentes especies o géneros. Esto conlleva a la diseminación de la resistencia antibiótica y favorece el intercambio génico entre especies intrahospitalarias (Roldán, 2018).

Poco tiempo después de las primeras terapias antibióticas empleadas, en 1950, para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos, se observó el desarrollo de resistencia a más de una familia de antibióticos (Mishekar, Shahcheraghi, Azizi, Solgi y Badmasti, 2018).

Sin embargo, el mayor motivo de la aparición de multiresistencia se debió a que los microorganismos adquirieron resistencia a partir de la transferencia horizontal de genes. En 1970, se determinó que este proceso estaba mediado por diferentes elementos móviles como: plásmidos, transposones y secuencias de inserción, capaces de transferir el material genético de un organismo a otro mediante mecanismos como conjugación, transducción y transformación. Para 1980, elementos genéticos relacionados a la inserción y eliminación de genes fueron identificados como integrones (Mohr, 2016).

Los integrones son sistemas de recombinación sitio-específicas que permiten a las bacterias adaptarse y evolucionar rápidamente a través del

almacenamiento y la expresión de nuevos genes. Estos elementos genéticos dinámicos se presentan particularmente entre patógenos bacterianos Gram negativos. Se pueden distinguir diferentes clases de integrones en función de la homología relativa de la proteína que expresan; es decir, son clasificados según la integrasa (*intl*) que codifican (Roldán, 2018).

Hay 5 clases de integrones "móviles" asociados con resistencia antibiótica. Las clases 1, 2 y 3 generalmente son recuperados de contextos clínicos. Los integrones clase 4 y 5 poseen un rol menor en la resistencia a antibióticos. Los integrones están unidos físicamente a un elemento móvil, que puede ser un transposón y/o un plásmido (Gillings, 2017).

El origen del integrón clínico clase 1 se dió cuando un integrón residente en el cromosoma de una betaproteobacteria ambiental fue capturado por un transposón *Tn402*. Así, se generó una estructura híbrida que combinó la capacidad de los integrones de reclutar conjuntos de genes casete ambientales con la movilidad del transposón *Tn402* (Chen et al., 2014).

La estructura mínima de un integrón incluye: un gen codificante de la integrasa (*intl*), un sitio adyacente de recombinación (*attI*) que difiere en la estructura y tamaños con sus homólogos. Este sitio es reconocido por la integrasa y dos promotores divergentes (Pc, P2), orientados para la expresión de los genes capturados. La integrasa es una tirosina recombinasa sitio-específica que cataliza la integración y escisión de los genes casete (Roldán, 2018).

A continuación de la región central, en el extremo 3' del integrón, se encuentra una región conservada en la que se ubica el gen *qacE 1*, determinante de resistencia a compuestos de amonio cuaternario, presentes en la composición de antisépticos y desinfectantes. Los compuestos de amonio cuaternario se usaron por primera vez como desinfectantes hospitalarios a principios de la década de los 30, antes del uso clínico de antibióticos (Helal y Khan, 2015).

Las bacterias que poseen integrones tienen la posibilidad de incorporar genes que se encuentran en el citoplasma bacteriano. La secuencia de ADN que contiene uno o dos marcos abiertos de lectura (ORF) carece de promotores y está flanqueada por elementos de 59 pares de bases se denomina gen en casete (Gillings, 2017).

Los genes en casete constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles involucrados mayormente en la supervivencia del organismo hospedador. Estos elementos están formados por un sitio de recombinación específica denominado sitio *attC* o elemento de 59 pares de bases (pb) localizado en el extremo 3' del gen. Los genes en casete se integran por recombinación sitio-específica entre *attI* y *attC*, en un proceso mediado por la integrasa (Sunde, Simonsen, Slettemeas, Böckerman y Norström, 2015)

Aunque se considera que los genes casete son elementos móviles, no codifican enzimas u otros productos involucrados en su propia movilización, es decir, los casetes de resistencia carecen de región reguladora. Para lograr la transcripción de su secuencia codificante, el casete debe estar insertado en el integrón (Ebrahimpour et al., 2018).

El tamaño de los genes en casete es variado y depende de la proteína que codifique. Los más de 80 genes en casete descritos confieren resistencia a casi todas las familias de antibióticos (-lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima, sulfamidas, cloranfenicol, rifampicina, lincosaminas, macrólidos, quinolonas), además de conferir resistencia a desinfectantes y antisépticos (Gillings, 2017).

Los genes casete no son parte necesaria de los integrones, pero forman parte de ellos una vez que son integrados. De esta manera, los integrones pueden adquirir nuevos determinantes de virulencia, de resistencia a antibióticos, o nuevas funciones metabólicas. Esto brinda a la bacteria hospedadora una amplia versatilidad para adaptarse a nuevas condiciones de supervivencia (Ebrahimpour et al., 2018).

Completa la región constante y final de los integrones clase 1 el gen *sul1* que determina la resistencia a sulfonamidas (antibióticos bacteriostáticos) y una zona de lectura abierta *orf5*, cuya función se desconoce hasta el momento (Sunde et al., 2015).

En base a esto, los objetivos del presente estudio fueron:

3.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar y caracterizar la presencia de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Identificar mediante pruebas bioquímicas y por espectrometría de masas (MALDI-TOF) la especie *Pseudomonas aeruginosa*.
- 3.2.2. Identificar genóticamente la especie *Pseudomonas aeruginosa* por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando cebadores específicos para la especie.
- 3.2.3. Determinar la sensibilidad antibiótica de los aislados clínicos obtenidos de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 3.2.4. Detectar la presencia de integrones clase 1 mediante la amplificación del gen de la integrasa 1 (*intI1*) por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).
- 3.2.5. Amplificar la región variable (5'CS - 3'CS) de los aislados positivos a la amplificación del gen de la integrasa 1 de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 3.2.6. Caracterizar los genes que conforman la región variable de integrones clase 1 mediante secuenciamiento de los productos de amplificación obtenidos.

4. METODOLOGÍA

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el presente estudio se analizaron 40 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* proporcionados por dos laboratorios particulares de las ciudades de Quito y Loja. El periodo de obtención de los aislados bacterianos fue de enero a junio del 2018. Los aislados fueron tomados a partir de pacientes que presentaron diversas patologías infecciosas (Anexo 2).

Los aislados bacterianos fueron trasladados en medio de transporte Stuart al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas, en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los aislados obtenidos fueron transferidos a tubos que contenían 5 mL de infusión cerebro corazón (de las siglas en inglés "Brain Heart Infusion"- BHI) e incubadas a 37 °C durante 18 - 24 horas. Después del crecimiento en caldo, las bacterias fueron transferidas a placas Petri que contenían agar MacConkey. Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 37 °C durante 18 - 24 horas.

4.2 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Los aislados donados por los laboratorios participantes proporcionaron la identificación de la especie. Sin embargo, se realizó la reidentificación para descartar la presencia de aislados con contaminantes adquiridos durante el traslado.

Se aislaron colonias mediante inoculación en placas Petri de agar Cetrimide, a partir del crecimiento bacteriano obtenidos previamente en placas de agar MacConkey. Posteriormente, se realizó la identificación bioquímica respectiva a la especie en base a su perfil de degradación de sustratos.

Para la identificación bioquímica de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó la prueba de producción de citocromo oxidasa mediante el uso de tiras de oxidasa

(Hardy Diagnostics OxiStrips™). Las tiras de papel absorbente impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina se oxidan por la presencia de citocromo-oxidasa y oxígeno molecular. El procedimiento para desarrollar la prueba de oxidasa consistió en impregnar una parte de la zona de la tira reactiva con una pequeña cantidad de colonias aisladas escogida. En el transcurso de dos minutos, la zona impregnada mostró un viraje de incoloro a un color azul-violeta. Este cambio reveló la presencia de indofenol. Un cambio en la coloración de la tira diagnóstica reveló un ensayo positivo característico para *P. aeruginosa* (Akintui, 2018).

Solo aquellas colonias que resultaron positivas a la prueba de oxidasa fueron sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas que identificaron de manera preliminar a *Pseudomonas aeruginosa*: TSI (“Triple azúcar hierro”), MIO (“Motilidad Indol Ornitina”), MILI (“Motilidad Indol Lisina”).

TSI es un medio de cultivo sólido que sirve para orientar la identificación inicial de los bacilos Gram negativos. Esta prueba bioquímica evidencia la fermentación o no de los tres azúcares presentes en el medio (sacarosa, dextrosa y lactosa), también revela la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y la producción o no de gas (Alcocer, 2020).

Esta prueba bioquímica está compuesta por cuatro derivados proteicos que forman un agar muy nutritivo: extracto de levadura, extracto de carne, peptona y proteosa peptona. También contiene rojo de fenol, sulfato ferroso de amonio, tiosulfato de sodio, cloruro de sodio y agar (Alcocer, 2020).

El indicador de pH (rojo de fenol) en presencia de pequeñas cantidades de ácidos, producidos por la fermentación de los azúcares, cambia el medio de color rojo a color amarillo. Si no ocurre fermentación, el medio se alcaliniza por el uso de las peptonas, cambiando a un color rojo-naranja o rojo fuerte.

La prueba bioquímica TSI se realizó inoculando una colonia aislada con ayuda de una aguja bacteriológica. Mediante picada profunda en la base y estría superficial en el ápice inclinado se realizó la transferencia de la colonia bacteriana

aislada. La interpretación del resultado de la prueba divide a los microorganismos en 3 categorías:

Primera categoría: Si el microorganismo es capaz de utilizar solamente la glucosa se observará una coloración rojiza en el ápice y una coloración amarilla en la base del medio. Esto se da por la baja concentración de glucosa en el medio (0,1%) que fue utilizada en su totalidad a las 18 horas. Posterior a esto, el microorganismo utilizó las peptonas presentes en el medio para su crecimiento y liberó amonio (NH_3), alcalinizando el ápice del medio. Debido a que la fermentación en la base del medio de cultivo produce ácidos más estables que la oxidación, la base mantendrá su color amarillo. La lectura de la prueba será: K/A significa ápice alcalino y acidez en la base (Alcocer, 2020).

Segunda categoría: Si el microorganismo fue capaz de utilizar los 3 azúcares presentes en el medio, acidificó el ápice y la base del mismo. La sucrosa y lactosa se encuentran en una concentración 10 veces mayor a la glucosa, por lo cual al acabar las reservas de glucosa la bacteria tendrá muchos azúcares para seguir utilizándolos, dando una coloración amarilla a todo el medio. La lectura de la prueba será: A/A significa ápice ácido y acidez en la base (Alcocer, 2020).

Tercera categoría: No fermentadores de glucosa. El microorganismo no es capaz de utilizar los azúcares presentes en el medio. No hay formación de ácidos, pero existe formación de aminas por la utilización de las peptonas, volviendo al ápice del medio de color rojo intenso y la base del tubo sin cambio o puede alcalinizarse también, quedando todo el tubo rojo. La lectura de la prueba será: K/K significa ápice alcalino / fondo alcalino o neutro (Alcocer, 2020).

Algunos microorganismos son capaces de producir gas (CO_2 y H_2) durante la fermentación de los azúcares, que se determina por la formación de burbujas o el desplazamiento del agar. Por otro lado, las bacterias capaces de producir sulfuro de hidrógeno (H_2S) que se presenta como un gas incoloro, toman el azufre del tiosulfato de sodio presente en el medio, el cual reacciona con el sulfato ferroso de amonio, produciendo sulfuro de hierro que se evidencia por la presencia de un precipitado negro.

La siguiente prueba, MIO, es un medio nutritivo compuesto por glucosa, extracto de levadura, peptona, tripteína, clorhidrato de L-ornitina, púrpura de bromocresol y agar. Ayuda a la identificación de microorganismos en base a la movilidad, producción de indol y actividad de la enzima ornitina carboxilasa (Alcocer, 2020).

La prueba se realizó a partir de un cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando una aguja bacteriológica mediante punción profunda en línea recta en un tubo que contenía agar no inclinado MIO.

La capacidad de la bacteria de moverse se observó por la turbidez presente en el medio o si hay un crecimiento grueso alrededor de la línea de inoculación. *P. aeruginosa* presentó motilidad gracias a la presencia de un flagelo o varios en posición polar.

La tripteína es una fuente de triptófano para evidenciar la presencia de la enzima triptofanasa. Esta enzima degrada el triptófano por desaminación liberando indol, ácido pirúvico, amoníaco. El indol es incoloro, por tanto, para visualizar su presencia es necesario el uso de un reactivo revelador. En este caso, se aplicó 4 gotas de reactivo de Kovacs que tiene p-dimetilaminobenzaldehído. El grupo aldehído de este compuesto reacciona generando un producto de color rojo en forma de anillo en la superficie del agar, revelando un resultado positivo. *P. aeruginosa* es negativo para esta prueba (Alcocer, 2020).

Finalmente, la ornitina determina si la bacteria es capaz de descarboxilar el aminoácido, es decir, si posee la enzima ornitina descarboxilasa. En ese caso, esta podrá actuar una vez que el medio haya sido acidificado por la fermentación de la glucosa, el pH del medio baja y el indicador púrpura de bromo cresol cambia la coloración a un tono amarillo. El pH ácido brinda las condiciones óptimas para el funcionamiento de la enzima alcalinizando nuevamente el medio el cual tornará a morado. La coloración púrpura en el medio revela un resultado positivo en esta prueba propia de *P. aeruginosa* (Alcocer, 2020).

La prueba MILI, de igual manera que la prueba MIO, determina la motilidad y la producción de indol de un microorganismo. MILI demuestra la producción de la enzima lisina descarboxilasa. Empleando el agar semisólido MILI, su procedimiento es el mismo que se describe anteriormente para la prueba MIO.

El crecimiento bacteriano acidifica el medio debido a la fermentación de la glucosa, tornándolo de color amarillo gracias al indicador púrpura de bromo cresol. De igual manera, el pH ácido brinda las condiciones óptimas para el funcionamiento de la enzima (lisina descarboxilasa). Al descarboxilarse la lisina, ésta se transforma en la diamina cadaverina que alcaliniza nuevamente el pH y provoca una coloración púrpura en todo el medio de cultivo (Alcocer, 2020).

Aquellos microorganismos que no posean la enzima lisina descarboxilasa, darán como resultado una coloración amarillenta en el medio de cultivo, y puede ser de tonalidad púrpura o roja en el centímetro superior por el uso de las peptonas. La coloración púrpura en el medio de cultivo revela un resultado positivo propio de *P. aeruginosa*.

La especie *Pseudomonas aeruginosa* se confirmó mediante incubación y la habilidad de crecimiento en caldo Infusión Cerebro Corazón - BHI (Difco™) a una temperatura de 43 °C durante 18-24 horas.

4.3 IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)

Los 40 aislados bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* fueron identificados mediante espectrometría de masas mediante la metodología MALDI-TOF (Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization Time-Of -Flight mass spectrometry) o desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (Singhal, Kumar, Kanaujia y Viridi, 2015). El análisis se llevó a cabo en el Centro de Investigación Microbiológica – CIM ubicado en la ciudad de Guayaquil.

Los aislados confirmados fenotípicamente como *Pseudomonas aeruginosa* fueron incubados en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) a 35 °C por 18

horas. Se adicionó 30 % de glicerol estéril al medio de cultivo con crecimiento bacteriano. Se realizaron 4 copias en alícuotas de 1mL en tubos de microcentrifuga estériles de 1,5 mL. Las copias se almacenaron a 4 °C, -20 °C y -80°C. Adicionalmente, los aislados fueron incubados a 35 °C durante 18 horas en tubos de ensayo 10 x 120 mm con tapa hermética de caucho que contenían 5 mL de agar nutriente. Se colocó una etiqueta a cada tubo con datos como: especie, número CB-QCA, procedencia y fecha de almacenamiento. Los aislados con tapa hermética de caucho se almacenaron a 20 °C.

4.4 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN total de cada aislado microbiano fue utilizado para todas las pruebas moleculares posteriores. Para la obtención del ADN se utilizó el kit comercial de extracción Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA) y se siguió las especificaciones del fabricante.

Las bacterias que fueron congeladas a -20 °C fueron sembradas en caldo BHI y posteriormente se incubó a 37 °C por 18 - 24 horas. Para su activación cada aislado fue sembrado en placas de agar nutriente por medio de estrías discontinuas para la obtención de colonias aisladas. De las colonias obtenidas, se seleccionaron cuatro a cinco que fueron transferidas a 5 mL de caldo de enriquecimiento digerido de soja y caseína Tryptic Soy Broth (TSB) e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Alrededor de 1,5 mL de cultivo fue transferido a un tubo de microcentrifuga estéril y se centrifugó a máxima velocidad (60,000g) por dos minutos. El sobrenadante obtenido fue descartado para conservar el precipitado bacteriano. A éste se adicionó 600µL de Solución de Lisis Nuclear para resuspender el precipitado. Esta combinación fue incubada a 80 °C por 5 minutos; posteriormente se lo dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos y por último se añadió 3µL de solución de RNasa que fue incubado por una hora a 37 °C.

A continuación, se agregó 200 µL de solución de precipitado de proteína y después se homogenizó con ayuda de un vórtex. La mezcla se dejó reposar en hielo durante 5 minutos y fue centrifugada a 60,000g por 3 minutos. Se recogió el

sobrenadante en un nuevo tubo de microcentrífuga estéril que contenía 600 µL de isopropanol. Esto fue incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente la mezcla fue centrifugada a 60,000 g durante 2 minutos. Se descartó el precipitado y se resuspendió agregando 600 µl de etanol al 70 %. Se centrifugó la muestra durante 2 minutos a 60,000 g y se eliminó el etanol remanente. El pellet obtenido se dejó secar al aire. A continuación, el pellet de ADN fue rehidratado con 100 µl de solución de rehidratación durante una hora a 60 °C o a 4 °C por toda la noche.

4.5 ELECTROFORESIS

La calidad del ADN obtenido fue analizada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% disueltos en tampón Tris Base 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 12,5 mM, (TBE 0,5X). La electroforesis se realizó aplicando 100 voltios por 60 minutos en una cámara de electroforesis Gel XL Ultra V-2 (Labnet), conteniendo tampón TBE 0,5 X. La tinción se realizó con SYBR® Gold 10.000x (Invitrogen). Para la visualización del gel, se empleó el sistema de captura de imagen Molecular Imager® Gel Doc TM XR+ (BIO-RAD).

4.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE *Pseudomonas aeruginosa*

La identificación genotípica de la especie *Pseudomonas aeruginosa* se realizó a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se emplearon cebadores que caracterizan a la especie descritos por S Spilker, Coenye, Vandamme, y LiPuma (2004) detallados en la (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores empleados en la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* y caracterización de integrones clase 1

Cebador	Secuencia 5' 3'	Temperatura de annealing	Amplicón (pb)*	Referencia
PA-SS PA-SS	GGGGGATCTTCGGACCTCA TCCTTAGAGTGCCACCCG	57 °C	956	Spilker et al. (2004)
<i>Int1</i> F <i>Int1</i> R	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC	52,5 °C	270	Adesoji et al. (2015)
hep58 hep59	TCATGGCTTGTTATGACTGT GTAGGGCTTATTATGCACGC	54,5 °C	Variable	Odumosu et al. (2016)
<i>sul1</i> forward <i>sul1</i> reverse	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	62 °C	433	Wang et al. (2014)
<i>qacE</i> 1 F <i>qacE</i> 1 R	TAGCGAGGGCTTTACTAAGC TAGCGAGGGCTTTACTAAGC	51,9 °C	300	Helal y Khan, (2015)

***pb**: pares de bases; **A**, adenina; **T**, timina; **C**, citocina; **G**, guanina

Las reacciones de amplificación del gen empleado en la identificación de la especie se llevaron a cabo en volúmenes de reacción de 25 µL que contenían: 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix – Promega; 9,5 µL de agua de grado molecular, 1 µL de cada uno de los cebadores y 1 µL de ADN. Se empleó la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* como control positivo, y como control negativo se utilizó agua grado molecular. La amplificación se realizó en el Termociclador de Gradiente MultiGene™ de la empresa LabNet Internacional. El programa de amplificación consistió de una denaturalización inicial a 95 ° C durante 2 minutos, se completaron 30 ciclos, cada uno a 95 °C por 1 minuto, a 57° C de temperatura de anillamiento por 1 minuto y a 72 ° C por 1 minuto. Se aplicó una extensión final a 72 °C de 5 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% disuelta en tampón: 44,5 mM de Tris Base, 44,5 mM de ácido bórico y 12,5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (TBE 0,5X). La electroforesis se realizó en la cámara de electroforesis Gel XL Ultra V-2 (Labnet) aplicando 100 voltios por 60 minutos en tampón TBE 0,5 X. La tinción se realizó con SYBR® Gold 10.000x (Invitrogen). Para la visualización del gel, se empleó el sistema de captura Molecular Imager® Gel Doc TM XR+ (BIO-RAD). Como marcador de peso molecular se utilizó 1 µL de DNA Ladder (Invitrogen) de 100 pb.

4.7 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Para determinar el perfil de sensibilidad antimicrobiana de cada aislado se empleó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer a través de la interpretación del tamaño del halo de inhibición obtenido. La técnica se realizó siguiendo las normas del CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute; Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, 2019).

Para obtener datos confiables se distribuyó asépticamente, mediante un dispensador, suficiente cantidad de medio de cultivo Mueller-Hinton Agar (Difco™) en una caja Petri hasta obtener una capa de 4 mm de espesor. Se dejó solidificar y secar completamente durante 1 hora aproximadamente antes de usarlas.

Siguiendo el manual de pruebas de Cavalieri et al. (2005) se determinó la escala de McFarland. A partir de cada cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* con 16 a 18 horas de incubación en Agar Nutriente, se tomó dos o más colonias y se transfirieron a 5 mL de Caldo Mueller-Hinton. Se ajustó la concentración del inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland que corresponde a 1×10^8 UFC/ml. Se introdujo un hisopo estéril en la dilución y se eliminó el exceso rotando varias veces contra la pared del tubo. Se sembró el inóculo sobre toda la superficie de las placas de Mueller-Hinton Agar, sin dejar ninguna zona libre. Esto se logró deslizando el hisopo sobre la superficie del agar, rotando la placa 60 grados cada vez y al final por la periferia de la placa. Se repitió tres veces para conseguir una siembra uniforme. Se dejó secar la placa por un periodo de 3 a 5 minutos antes de colocar los discos de antibióticos a ser probados.

Se evaluaron un total de 9 de los 10 antibióticos bajo este método de acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud: amikacina (30 µg), gentamicina (10 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), piperaciclina/tazobactam (10 µg) y ciprofloxacina (5 µg) o levofloxacina (5 µg). El antibiótico restante, colistina (10 µg), se evaluó bajo el Método de gota, técnica correspondiente para este antibiótico,

Se colocaron los discos de antibióticos sobre el agar utilizando pinzas estériles. Los discos fueron espaciados de manera que la distancia con pared de la placa fue de 15 mm y entre ellos de 30 mm. Así se evitó producir superposición de los halos de inhibición obtenidos. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 37 °C por 18 horas.

Después de 18 horas de incubación se determinó el diámetro de las zonas de completa inhibición con ayuda de una regla. Los resultados fueron clasificados mediante la tabla de categorías sensible (S), intermedia (I) y resistente (R) para *Pseudomonas aeruginosa* a partir de la guía proporcionada por el CLSI, 2019.

Para determinar la sensibilidad a Colistina, último antibiótico recomendado por la OMS. Se realizó la prueba de Método de la gota siguiendo el protocolo adaptado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), 2019.

La prueba consistió en agregar una gota de 10 µL de una solución de colistín sulfato a una concentración de 16 µg/mL sobre la superficie de placas de agar Mueller Hinton. Previamente las placas de agar Mueller Hinton fueron hisopadas con *Pseudomonas aeruginosa* equivalente al 0,5 McFarland.

La solución de colistín sulfato a 16 µg/mL de concentración consistió en suspender 8 discos de colistina (10 µg) en 5mL de caldo Mueller Hinton ajustado en cationes (CAMHB). Se dejó reposar durante 1 hora y se desechó los discos. Se sembró el inóculo de *P. aeruginosa*, equivalente al 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), sobre toda la superficie de las placas de Mueller-Hinton. Se dejó secar por 15 minutos. Finalmente se agregó una gota de 10 µL de la solución preparada de colistín sulfato a 16 µg/mL sobre la superficie inoculada de Mueller Hinton. Las placas fueron incubadas de 16 a 18 horas a 35 °C.

Para la interpretación de resultados se observó la presencia o ausencia de halo de inhibición.

Colistina sensible: presencia de halo de inhibición de cualquier diámetro.

Colistina resistente: ausencia de halo de inhibición.

4.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ESTRUCTURA DE INTEGRONES CLASE 1

En los 40 aislados se realizó la amplificación de los genes codificantes de la enzima integrasa 1 (*intl1*), *qacE 1* y *sul1*. Estos genes son propios de la estructura del integrón clase 1. El volumen final de las reacciones de PCR fue de 25 µL que contenía: 12,5 µL de GoTaq® Master Mix (Promega), 0,5 µL de cada cebador (forward- reverse), 10,5 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN.

Las reacciones de amplificación se realizaron en el Termociclador de Gradiente MultiGene™ (modelo TC9600-G-) de la empresa LabNet Internacional. La reacción de amplificación empleó las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 1 minuto, temperatura de apareamiento de los cebadores correspondiente (tabla 1) durante 1 minuto,

extensión a 72 °C – durante 1 minuto, se programó 35 ciclos, - y por último se realizó una extensión final a 72 °C – durante 5 minutos.

Para realizar la caracterización de los integrones clase 1 se utilizaron cebadores específicos para detectar la presencia del gen de la integrasa tipo 1 (*intI1*) descritos por (Adesoji, Ogunjobi y Olatoye, 2015), el cual comprende el segmento conservado 5' de la estructura del integrón clase 1. En aquellos aislados que fueron positivos para el gen de la integrasa tipo 1 se determinó la región variable mediante cebadores específicos. Los cebadores utilizados son complementarios a dos segmentos conservados en el integrón clase 1 que delimitan la región variable (Odumosu, Adeniyi y Chandra, 2016).

Por último, para determinar el segmento conservado 3', se utilizaron cebadores específicos para los genes *qacE 1* y *sul1* descritos por (Wang et al., 2014), (Helal y Khan, 2015) en su respectivo orden (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores empleados en la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* y caracterización de integrones clase 1

Cebador	Secuencia 5' 3'	Temperatura de annealing	Amplicón (pb)*	Referencia
PA-SS PA-SS	GGGGGATCTTCGGACCTCA TCCTTAGAGTGCCCACCCG	57 °C	956	Spilker et al. (2004)
<i>Int1</i> F <i>Int1</i> R	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC	52,5 °C	270	Adesoji et al. (2015)
hep58 hep59	TCATGGCTTGTTATGACTGT GTAGGGCTTATTATGCACGC	54,5 °C	Variable	Odumosu et al. (2016)
<i>sul1</i> forward <i>sul1</i> reverse	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	62 °C	433	Wang et al. (2014)
<i>qacE</i> 1 F <i>qacE</i> 1 R	TAGCGAGGGCTTTACTAAGC TAGCGAGGGCTTTACTAAGC	51,9 °C	300	Helal y Khan, (2015)

***pb**: pares de bases; **A**, adenina; **T**, timina; **C**, citocina; **G**, guanina.

4.9 SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LA REGIÓN VARIABLE DE INTEGRONES CLASE 1

La purificación y secuenciamiento de los productos de amplificación obtenidos de la región variable de integrones clase 1 fue desarrollada por la empresa MACROGEN Inc., Corea del Sur. Las secuencias recibidas fueron analizadas con el programa GENEIOUS® Prime 2019, versión 2019.2.1 y el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esto permitió identificar la composición de genes casete encontrados en la región variable de los integrones.

4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis porcentual de los resultados obtenidos fue realizado en el programa Microsoft Excel 2016.

5. RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los 40 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* fueron tomados a partir de pacientes que presentaron diversas patologías infecciosas (Figura 1).

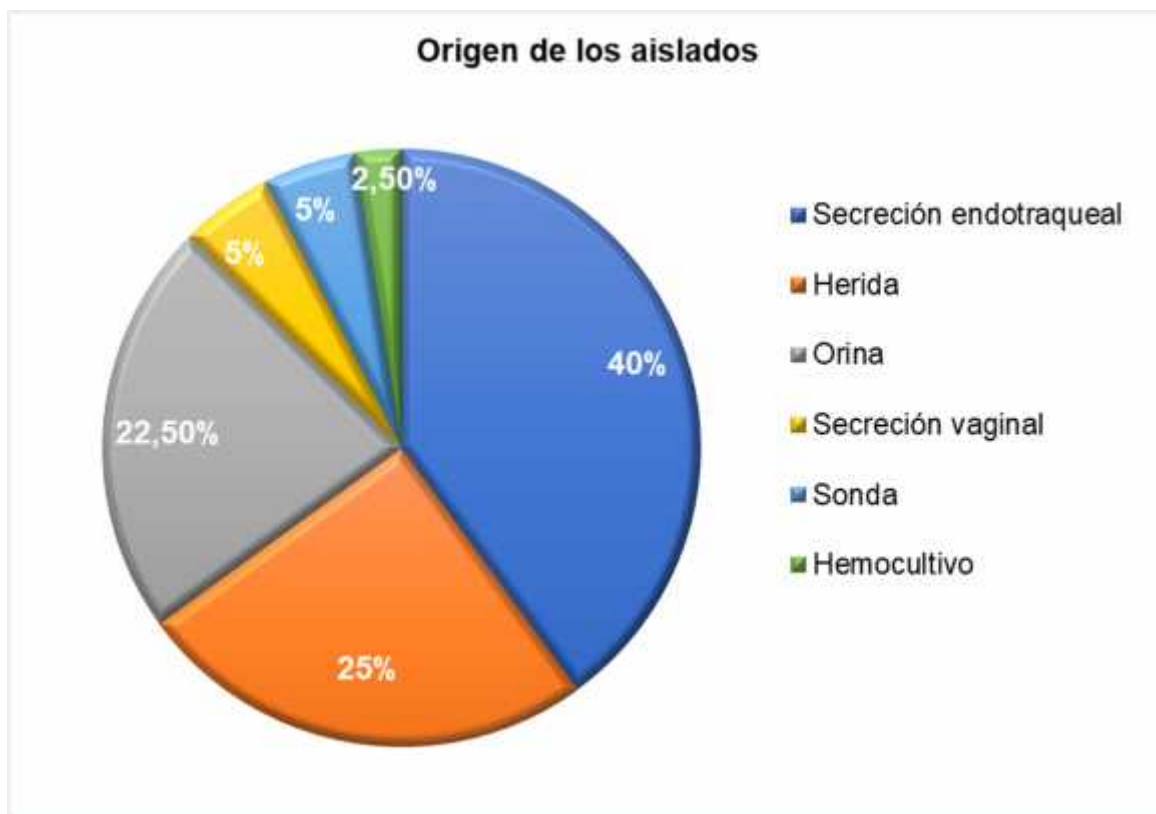


Figura 1. Origen de obtención de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

5.2 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

A partir del crecimiento de *P. aeruginosa* sobre el medio agar Nutriente se seleccionaron colonias de *P. aeruginosa* con características morfológicas propias de la bacteria, como: crecimiento de colonias redondas, lisas, de bordes regulares. (Figura 2). La producción de pigmento verde amarillento en la mayoría de los casos (vista bajo luz UV) y con presencia de un característico olor frutal se confirmó en el medio selectivo agar Cetrimide (Figura 3).



© Pedro Barba

Figura 2. Aspecto de colonias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre placas de Agar Nutriente.

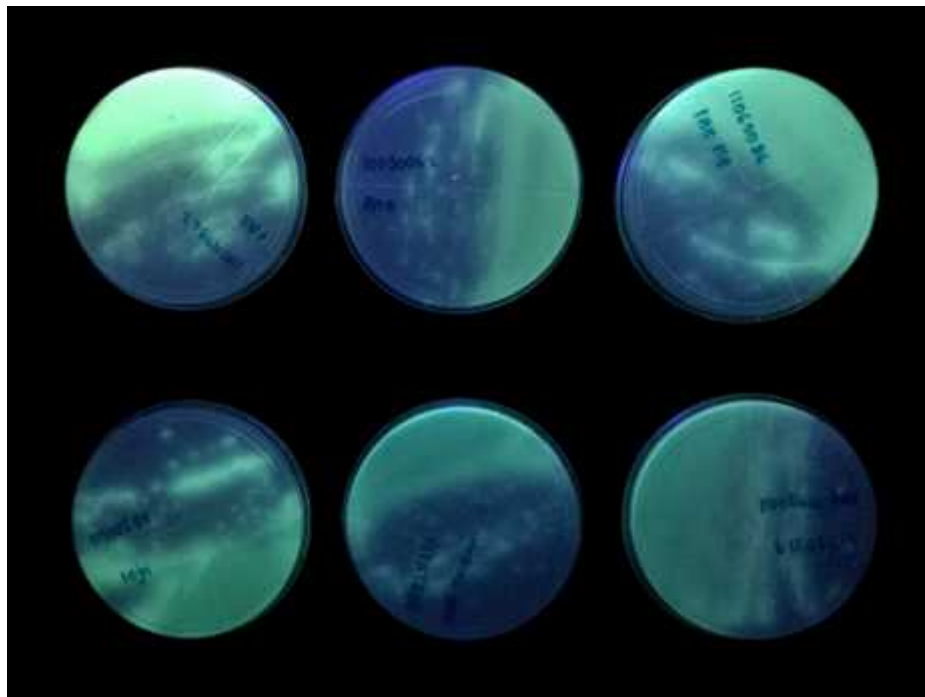


Figura 3. Producción del pigmento piocianina característico de la especie *Pseudomonas aeruginosa* en el medio selectivo Cetrimide observado bajo la luz UV.

Los 40 aislados presentaron un resultado positivo al realizar la prueba de oxidasa. Estos revelaron un cambio de incoloro a azul-violeta (Figura 4).



Figura 4. Prueba de oxidasa. La mancha de coloración azul - violeta en la tira evidencia la producción de la enzima citocromo oxidasa, revelando una prueba positiva para *Pseudomonas aeruginosa*.

Con la prueba TSI se observó la ausencia de fermentación en el ápice y base del tubo, identificada por la coloración rojo intenso. La prueba no mostró la producción de gas (CO_2) ni la reducción del tiosulfato sódico a hidrógeno de sulfuro. Esto se demostró por la inexistencia de coloración negra en el medio de cultivo.

En la prueba de MIO se observó un crecimiento grueso alrededor de la línea de inoculación revelando la capacidad de movilidad de la bacteria. No se evidenció la presencia de indol porque no se generó un producto de color rojo en forma de anillo en la superficie del agar después de usar el reactivo revelador. Finalmente, se evidenció la actividad enzimática ornitina carboxilasa que alcalinizó nuevamente el medio, que se reflejó con la presencia de la coloración púrpura en todo el medio de cultivo. Esto fue revelado por el indicador de pH bromo cresol.

La prueba MILI también se confirmó la motilidad y la incapacidad de producir indol al adicionar el reactivo revelador Kovacs. El funcionamiento de la enzima lisina descarboxilasa se manifestó por la coloración púrpura presente en todo el medio, generado por el indicador de pH bromo cresol (Figura 5).

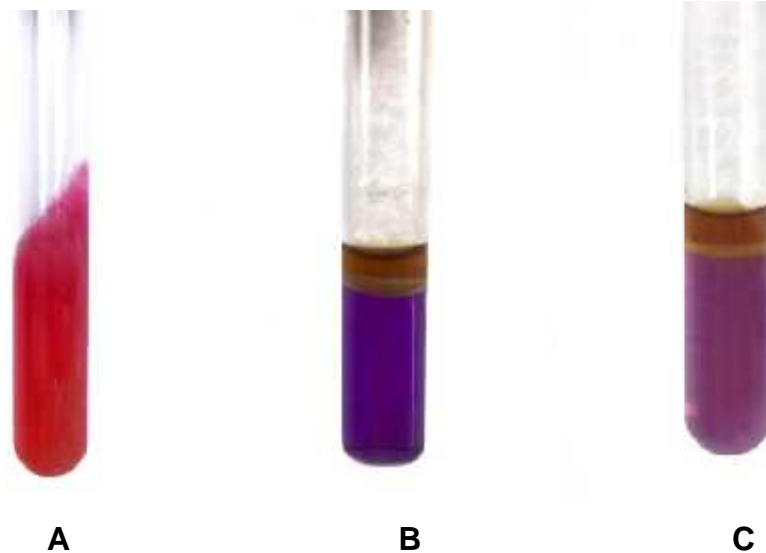


Figura 5. Pruebas bioquímicas empleados en la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. A: prueba TSI (triple azúcar y hierro), no fermentación de azúcares (K/K), H₂S y CO₂ negativos; **B:** prueba MIO (motilidad, indol y ornitina) motilidad y ornitina descarboxilasa positivos, indol negativo; **C:** prueba MILI (motilidad, indol y lisina) motilidad y descarboxilasa de lisina positivos, indol negativo.

Los resultados obtenidos en la identificación de los aislados por pruebas bioquímicas convencionales y MALDI-TOF coincidieron a nivel de género y especie en un 100 % (Tabla 2)

Tabla 2. Reporte de la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* por MALDI-TOF

Código CB-QCA*	Código MALDI- TOF*	Identificación	Score
5395	5397	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2109
5396	5398	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2284
5397	5399	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2249
5398	5400	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2385
5399	5403	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2302
5400	5404	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2266
5401	5405	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2202
5402	5411	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2252
5403	5514	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2226
5404	5515	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2259
5405	5516	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2000
5406	5517	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2208
5407	5518	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2351
5408	5519	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2209
5409	5520	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2326
5411	5522	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2224
5412	5523	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2000
5514	5524	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2236
5515	5525	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2362
5516	5526	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2224
5517	5527	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2001
5518	5528	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2374
5519	5529	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2290
5520	5530	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2474
5521	5531	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2428
5522	5532	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2449
5523	5533	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2279

***CB-QCA:** Colección Bacteriana – Quito Católica; **MALDI-TOF:** Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.

Tabla 2. Reporte de la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* por MALDI-TOF

Código CB-QCA*	Código MALDI- TOF*	Identificación	Score
5524	5534	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2362
5525	5535	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2267
5526	5536	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2278
5527	5622	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2179
5528	5623	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2370
5529	5624	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2169
5530	5625	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2085
5531	5626	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2401

***CB-QCA:** Colección Bacteriana – Quito Católica; **MALDI-TOF:** Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.

5.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE *Pseudomonas aeruginosa*

Los 40 (100%) aislados analizados fueron confirmados como *Pseudomonas aeruginosa*, a nivel molecular.

Los amplicones obtenidos se visualizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa. Se evidenció un fragmento aproximado de 956 pb, en relación al marcador de peso molecular. Los amplicones obtenidos corresponden al tamaño reportado según los cebadores utilizados. Esto corrobora la especie bacteriana *P. aeruginosa* (Figura 6).



Figura 6. Gel representativo de la identificación molecular de la especie *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular (100 pb); (+) control positivo; (-) control negativo. Las canaletas 5395 a la 5411 presentan bandas de aproximadamente 956 pb, correspondientes al tamaño del amplicón esperado.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Pseudomonas aeruginosa*

En cada antibiograma se determinó el diámetro de las zonas de completa inhibición con ayuda de una regla a los antibióticos: amikacina, gentamicina, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina o *levofloxacina (Figura 7). Posteriormente fueron clasificados mediante categorías en: sensible (S), intermedia (I) y resistente (R) para *Pseudomonas aeruginosa* a partir de la guía proporcionada por el CLSI, 2019.

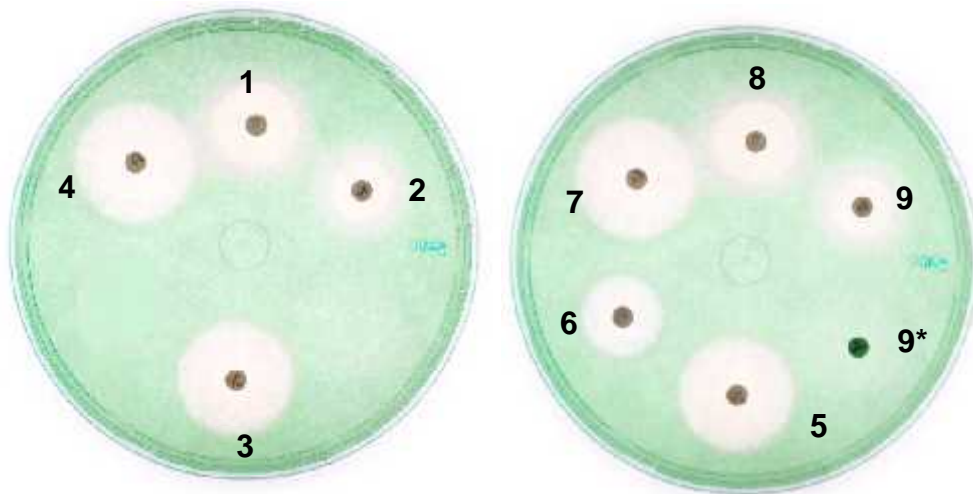


Figura 7. Antibiograma obtenido por el método difusión por disco para la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Los discos de antibióticos empleados fueron: **1**, amikacina; **2**, gentamicina; **3**, ceftazidima; **4**, cefepima; **5**, aztreonam; **6**, imipenem; **7**, meropenem; **8**, piperacilina/tazobactam; **9**, ciprofloxacina o *levofloxacina.

Para la interpretación de resultados de la sensibilidad de colistina se observó la presencia o ausencia de halo de inhibición:

Colistina sensible: presencia de halo de inhibición de cualquier diámetro.

Colistina resistente: ausencia de halo de inhibición (Figura 8).

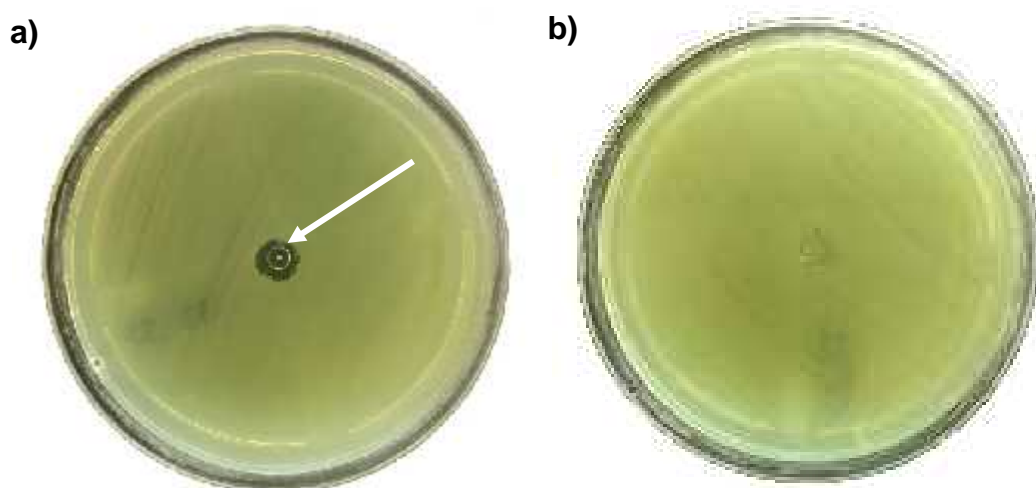


Figura 8. Interpretación de resultados de la sensibilidad a Colistina mediante el Método de la gota. (a) Colistina sensible debido a la presencia de halo de inhibición. **(b)** Colistina resistencia debido a la ausencia de halo de inhibición.

Seguendo la guía del CLSI, 2019 para *P. aeruginosa*, el número de aislados registrados como resistentes a amikacina fueron 7/40 (17,5 %), a gentamicina 7/40 (17,5 %), a ceftazidima 4/40 (10 %), a cefepima 3/40 (7,5 %), a aztreonam 5/40 (13 %), a imipenem 7/40 (17,5 %), a meropenem 7/40 (17,5 %), a piperacilina/tazobactam 3/40 (7,5 %), a ciprofloxacina 10/40 (25 %), a levofloxacina 12/40 (30 %) y a colistina 8/40 (20 %).

El número de aislados registrados con sensibilidad intermedia fue: 2/40 (5 %) a gentamicina, 3/40 (7,5 %) a cefepima, 5/40 (12,55 %) a aztreonam, 4/40 (10 %) a piperacilina/tazobactam, 4/40 (10 %) a ciprofloxacina y 6/40 (15 %) a levofloxacina. Ningún aislado reportó sensibilidad intermedia a amikacina, ceftazidima, imipenem, meropenem y colistina.

Por último, el número de aislados registrados como sensibles a amikacina fueron 33/40 (82,5 %), 31/40 (77,5 %) a gentamicina, 36/40 (90 %) a ceftazidima, 34/40 (85 %) a cefepima, 30/40 (75 %) a aztreonam, 33/40 (82,5 %) a imipenem, 33/40 (82,5 %) a meropenem, 33/40 (82,5 %) a piperacilina/tazobactam, 26/40 (65 %) a ciprofloxacina, 22/40 (55 %) a levofloxacina y 32/40 (80 %) a colistina (Figura 9).

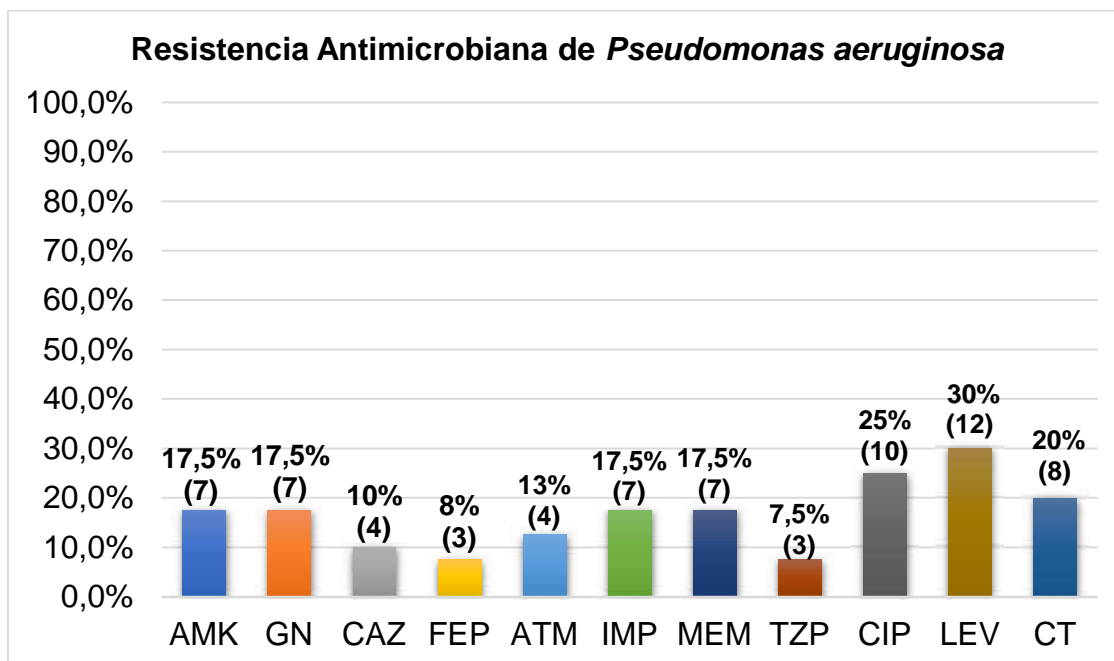


Figura 9. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos probados en la población total de *Pseudomonas aeruginosa*. AMK, Amikacina; GN, Gentamicina; CAZ,

Ceftazidima; FEP, Cefepima; ATM, Aztreonam; IMP, Imipenem; MEM, Meropenem; TZP, Piperacilina/tazobactam; CIP, Ciprofloxacina; LEV, Levofloxacina; CT, Colistina.

Según las reglas de definición de resistencia de la OMS, 2019 para *Pseudomonas aeruginosa*, de los 40 aislados, 6/40 (15 %) presentaron multirresistencia (MDR) (3 de los 10 tipos de antimicrobianos probados), 2/40 (5 %) presentaron resistencia extendida (XDR) (8 o 9 de los 10 tipos de antibióticos) y 2/40 (5 %) presentaron panresistencia (PDR) (resistencia a todos antimicrobianos utilizados). Los 30/40 (75 %) aislados restantes mostraron un fenotipo de sensibilidad absoluta a los antibióticos testeados (Figura 10).

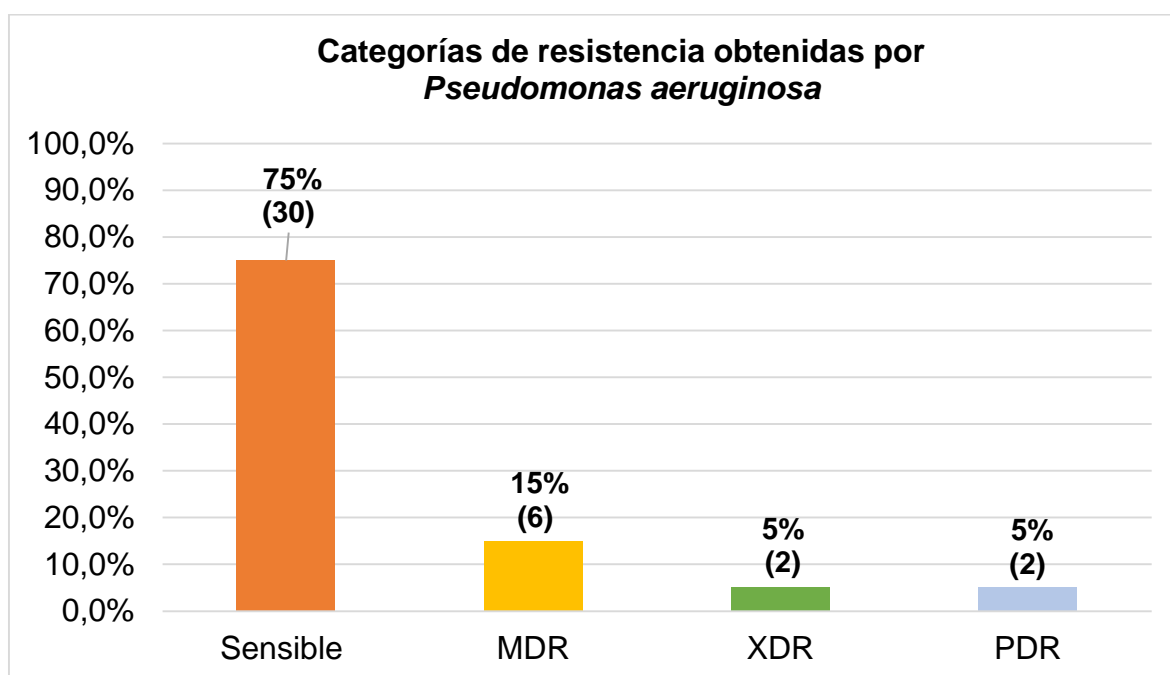


Figura 10. Categorización de Multirresistencia (MDR), Resistencia Extendida (XDR) y Panresistencia (PDR) en la población de *Pseudomonas aeruginosa*

5.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ESTRUCTURA DE INTEGRONES CLASE 1

Se analizó la presencia de integrones clase 1 en los 40 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*.

Únicamente 11/40 (27,5 %) aislados amplificaron el gen de la integrasa tipo 1 (*intl1*) propio del segmento conservado 5' y los genes (*qacE* - *sul1*) para el segmento conservado 3' (Figura 15). La amplificación mostró fragmentos de 270 pb, 300 pb y 433 pb, que corresponden al tamaño de los genes analizados (Figura 11; Figura 13; Figura 14). Dentro de estos 11 aislados, 7 (64,3 %) aislados fueron positivos a la amplificación de la región variable (Figura 12; Figura 16). 3 aislados presentaron un integrón vacío, es decir, carentes de casetes génicos en su región variable y uno no mostró tener ninguna de las estructuras antes mencionadas.

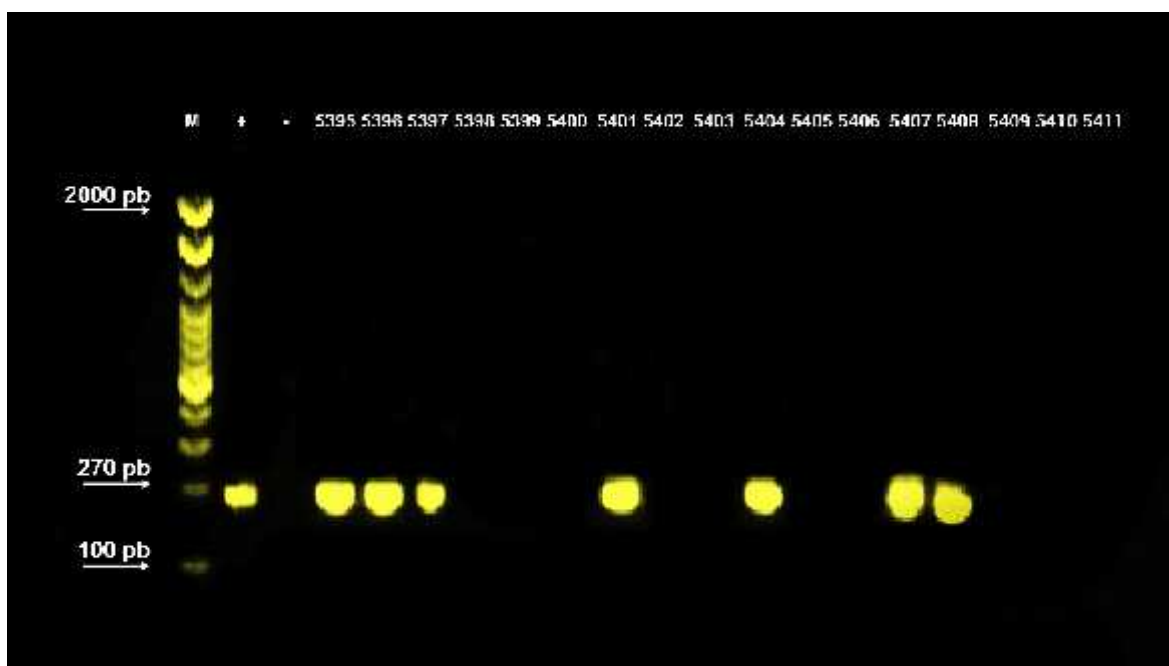


Figura 11. Gel representativo de los productos de amplificación del gen *intl1* en *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular (100 pb); (+) control positivo; (-) control negativo. Las canaletas 5395 a la 5411 presentan bandas de aproximadamente 270 pb, correspondientes al gen (*intl1*) de la integrasa 1.



Figura 12. Gel representativo de la amplificación de la región variable de integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular (100 pb); (+) control positivo; (-) control negativo. Los aislados positivos presentaron una banda aproximadamente 1300 pb.



Figura 13. Gel representativo de la amplificación del gen *qacE 1*, codificante de enzimas que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario. M, marcador de peso molecular (100 pb); (+) control positivo; (-) control negativo. Las canaletas 5395 a la 5522 presentan bandas de aproximadamente 300 pb, correspondientes al gen *qacE 1*.

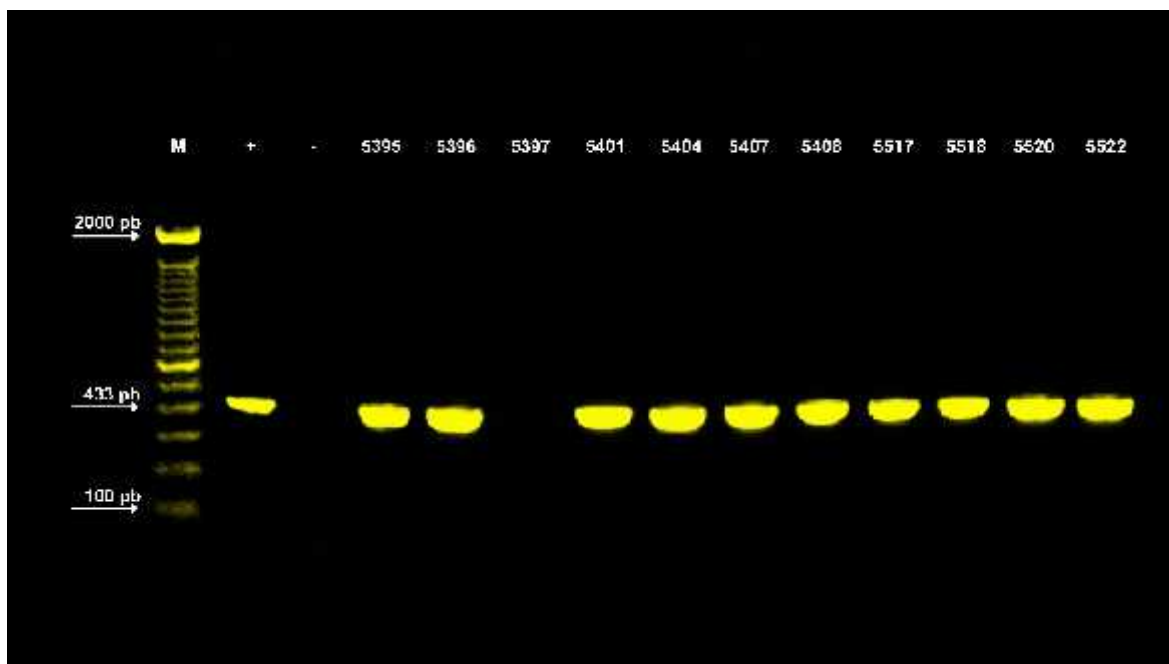


Figura 14. Gel representativo de la amplificación del gen *sul1*, codificante de resistencia a sulfonamidas. M, marcador de peso molecular (100 pb); (+) control positivo; (-) control negativo. Las canaletas 5395 a la 5522 presentan bandas de aproximadamente 433 pb, correspondientes al gen *sul1*.

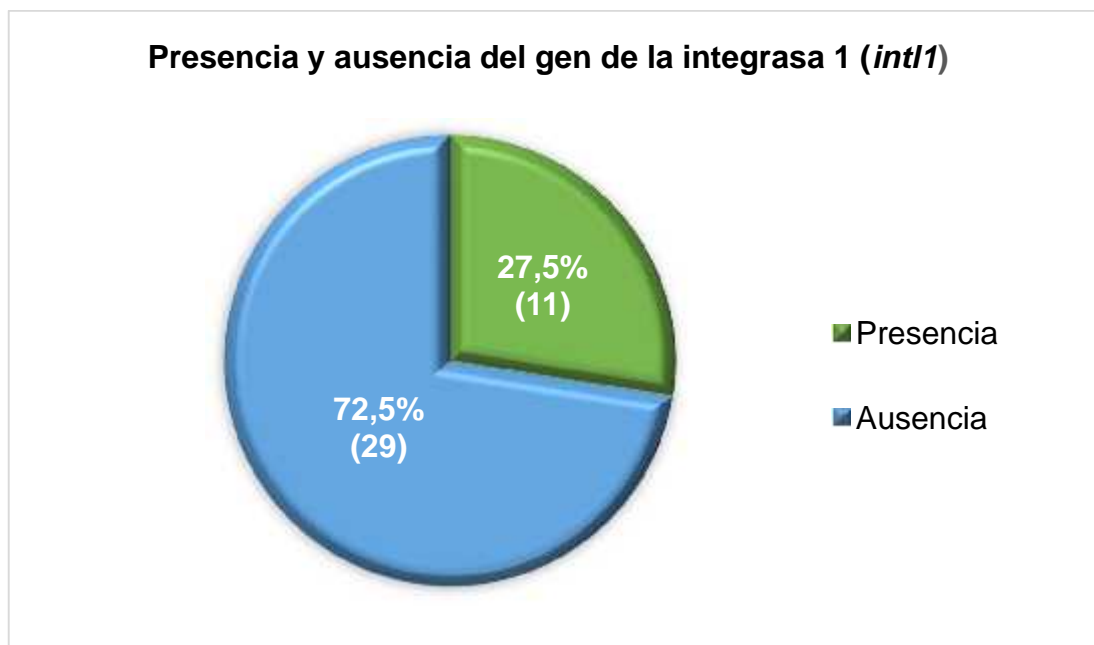


Figura 15. Porcentaje de presencia/ausencia del gen de la integrasa 1 (*intI1*) en la población total de *Pseudomonas aeruginosa*

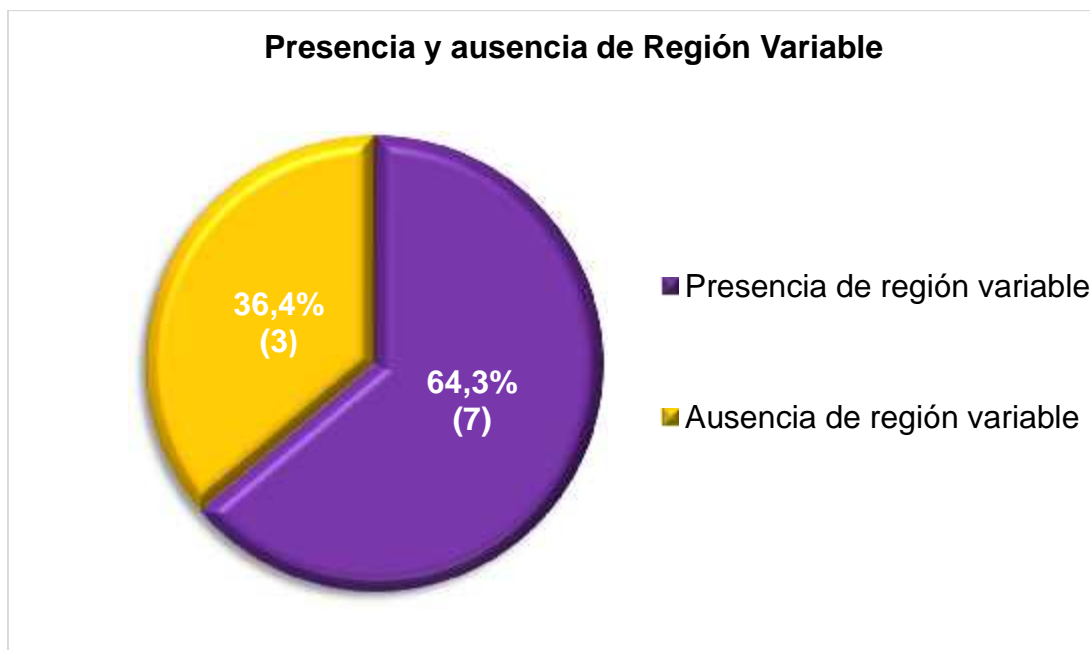


Figura 16. Porcentaje de presencia/ausencia de la Región Variable de integrones clase 1

5.6 IDENTIFICACIÓN DE GENES ENCONTRADOS EN LA REGIÓN VARIABLE DE INTEGRONES CLASE 1

La determinación de genes se realizó comparando cada una de las secuencias obtenidas en los 7 aislados, con las secuencias existentes en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los genes identificados fueron elegidos en base al porcentaje de cobertura e identidad provista por el Centro de Información.

La comparación reveló un grado de similitud con otros organismos. Los siguientes genes codificaron para enzimas de resistencia a aminoglucósidos como: *aadA*(6), *aacA*(4) y *aadB*. La prevalencia de los genes en el estudio fue de 85,7 %, 7,1 % y 7,1 % respectivamente. El detalle de los aislados con su respectivo número de accesoión se describe en la (Tabla 3) (Figura 17).

Tabla 3. Resultados obtenidos a partir del análisis de secuencias por el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Aislados CB-QCA*	Genes encontrados	Número de accesión	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad
5395	<i>aadA6</i> *	AF140629	99,68%	99,7%
5401	<i>aadA6</i>	AF140629	99,83%	100%
5408	<i>aadA6</i>	FJ695218	100%	99,4%
5517	<i>aadB - aacA4</i> *	AY139594	100%	99,5%
5518	<i>aadA6</i>	FJ695218	100%	99,9%
5520	<i>aadA6</i>	KP713392	100%	99,8%
5522	<i>aadA6</i>	KP713392	100%	99,9%

*CB-QCA: Colección Bacteriana - Quito Católica; **aadA* – *aadB*: adeniltransferasas; **aacA*: acetiltransferasas.

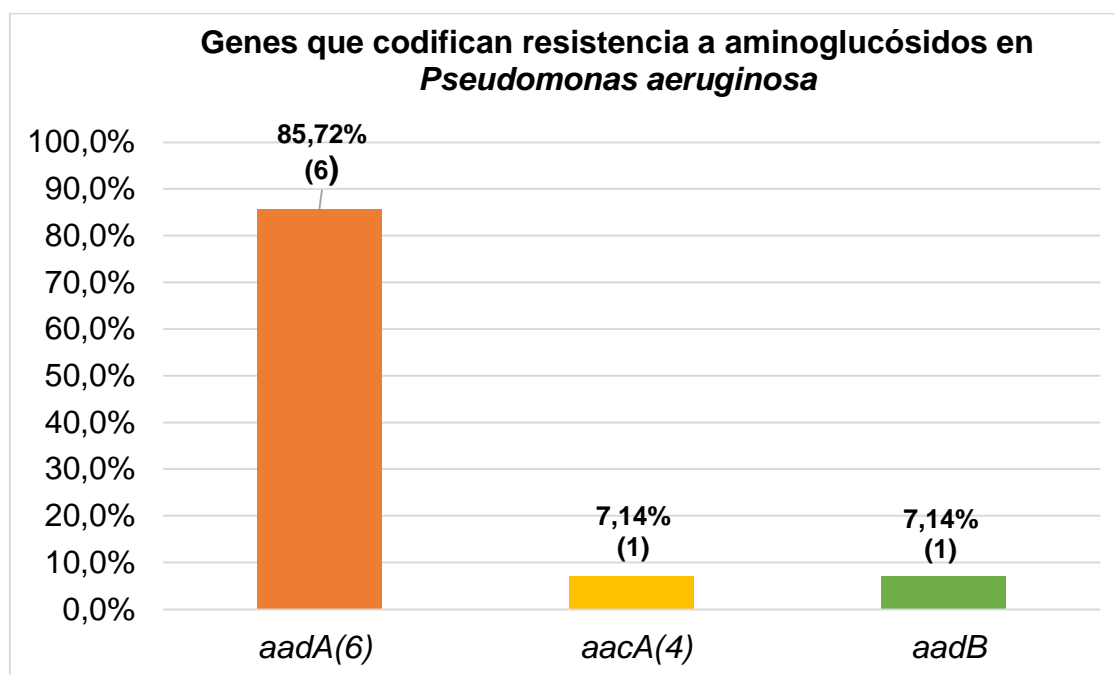


Figura 17. Porcentaje de presencia de genes insertados en la región variable de integrones clase 1. adeniltrasnferasas (*aadA* 6 - *aadB*) y acetiltransferasas (*aacA* 4).

6. DISCUSIÓN

Las infecciones asociadas al cuidado de la salud son causas importantes de mortalidad en los hospitales de América Latina (Fernández Merjildo, García Apac, Zegarra Piérola y Granados Bullon, 2017). En Ecuador, un estudio realizado en octubre del 2013 a enero del 2015 reportó que la neumonía nosocomial (asociada a la ventilación mecánica) es la infección nosocomial más frecuente en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Yepez et al., 2017). En este trabajo se observó una alta frecuencia de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en secreciones endotraqueales en 16/40 (40 %) aislados de la población total. Estos datos coinciden con lo reportado por otros países de Latinoamérica como Colombia y Perú (Fernandez Merjildo et al., 2017; Yepez et al., 2017; Tubon y David, 2017).

En la población de estudio existe una mayor presencia de aislados obtenidos a partir de pacientes del género femenino con 55 % y menor presencia en cuanto al género masculino con 45 %. Datos similares se evidencian en trabajos reportados por (Roldan, 2018) con 60 % y (Buehrle et al., 2017) con 56 %.

La identificación fenotípica de los 40 aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas y MALDI-TOF para *P. aeruginosa*. Según Singhal et al., (2015), la identificación por MALDI-TOF tiene un alto porcentaje de especificidad en la identificación de especies bacterianas. La prueba molecular utilizó un par de cebadores específicos (PASS) (Spilker et al., 2004) que confirmó a la especie *P. aeruginosa*. Según Oteo, Bou, Chaves y Oliver (2017) los métodos moleculares son más rápidos y específicos que los métodos fenotípicos de identificación ya que detecta secuencias específicas de ADN. En el estudio hubo coincidencia completa entre las técnicas fenotípicas y genotípicas empleadas en la identificación de la especie *P. aeruginosa*.

Con el perfil fenotípico de sensibilidad antibiótica obtenido por método de difusión en disco se pudo observar, dentro de los 40 aislados analizados, que los porcentajes más altos de resistencia fueron a levofloxacin 12 (30 %), ciprofloxacina 10 (25 %), colistina 8 (20 %), imipenem 7 (17,5 %), meropenem 7

(17,5 %), amikacina 7 (17,5 %), gentamicina 7 (17,5%), aztreonam 5 (13 %), ceftazidima 4 (10 %), cefepima 3 (7,5 %), piperacilina/tazobactam 3 (7,5 %).

Como informa Rehman, Patrick y Lamont (2019), la ciprofloxacina es un agente antimicrobiano utilizado para tratar una gran variedad de infecciones bacterianas, incluidas aquellas causadas por *P. aeruginosa*. Siendo la fluoroquinolona más eficaz en el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria, su amplio uso ha causado que aislados de *P. aeruginosa* incrementen rápidamente su resistencia contra este antibiótico. A nivel internacional, (Rehman et al., 2019; Peng, Cao, Ng, y Hill, 2017) reporta incrementos de resistencia a fluoroquinolonas en un 30 % y 40 % en el Reino Unido y Estados Unidos respectivamente. Su informe indica que más de la mitad de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* fueron resistentes a la ciprofloxacina. En Latinoamérica, un reporte generado en 2019 por la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) notifica el incremento de brotes multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* en la Región de las Américas (OPS, 2019).

Del año 2018 al 2019, la (OPS, 2019 y; CDC, 2019) informaron acerca de una serie brotes provenientes del Hospital Grand View de Tijuana (México). Las infecciones fueron causadas por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* altamente resistente a los antibióticos, en específico, resistente a los carbapenémicos. Esta información coincide con los resultados obtenidos en este estudio. A nivel nacional, un informe realizado por el (INSPI, 2019) durante un censo del año 2014 hasta el 2017, reportó un aumento de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los carbapenémicos: imipenem y meropenem, lo que concuerda con los porcentajes obtenidos en este estudio. Por otro lado, en el mismo estudio se menciona la reducción de resistencia de *P. aeruginosa* a antibióticos de primera línea como: ceftazidima, cefepima y piperacilina/tazobactam que corrobora los bajos porcentajes obtenidos.

La problemática en la espera del surgimiento de nuevos fármacos ha obligado al empleo de moléculas en desuso (Medina et al, 2017). La colistina resurgió como un último recurso antibiótico frente a infecciones causadas por

patógenos resistentes como *Pseudomonas aeruginosa*. En el presente trabajo, 8/40 aislados (20%) de la población analizada fueron resistente a la colistina. Este número es similar a la resistencia reportada para los carbapenémicos imipenen y meropenem. El resultado obtenido no se ajusta con la bibliografía consultada (Khorvash, Yazdani, Shabani y Soudi, 2017) en la que la colistina es el antimicrobiano menos resistente contra *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, este resultado coincide con el informe realizado por Medina et al., (2017), donde informa que el aumento en el uso irresponsable de tratamientos de última línea ha incrementado la emergencia de la resistencia. El estudio propone la actualización de la información disponible que garantice el uso seguro de este tipo de opciones. En el estudio, además, se reporta la aparición de resistencia a colistina codificada en plásmidos, es decir en elementos móviles transferibles, lo que supone su fácil y eficiente propagación.

La adquisición de genes de resistencia por transferencia genético horizontal desempeña un papel crucial en la evolución de las bacterias. En la presente investigación, 11/40 (27,5 %) aislados de *P. aeruginosa* fueron positivos a la presencia de integrones clase 1. Es decir, menos de la mitad presentaron el gen de la integrasa 1 (*intl1*). Esto se ajusta con los datos reportados en el estudio de Ebrahimpour et al., (2018) donde en una población de 100 aislados de la especie *P. aeruginosa*, 30% de la población analizada presentó integrones clase 1.

Las diferencias observadas entre aislados con presencia y ausencia de integrón clase 1 fueron significativas. Se obtuvo porcentajes más altos de resistencia a los antibióticos entre los aislamientos integrón positivos en comparación con los aislamientos integrón negativos. Las tasas más altas de resistencia a antibióticos en aislamientos positivos para integrón clase 1 pertenecen a los antimicrobianos de las siguientes familias: quinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos. Mientras que, para los antibióticos pertenecientes al grupo de cefalosporinas, monobactámicos e inhibidores de β -lactamasas, se evidenciaron los niveles más bajos de resistencia, los resultados del presente estudio concuerdan con la información proporcionada por Ebrahimpour et al., 2018.

Sin embargo, en este trabajo se encontró una cepa multirresistente que no presenta integrón. Según los autores, Berhane y Meniyamer (2015) no siempre la característica de multirresistencia que presenta una bacteria está relacionada a la presencia de integrones clase 1. Los estudios sugieren considerar la presencia de otros elementos genéticos o mecanismos de resistencia (Anexo 9).

El mecanismo más importante de resistencia a los aminoglucósidos es la inactivación enzimática del antibiótico mediada por las enzimas acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (ANT o AAD) y fosfotransferasas (APH) (Guzman et al., 2016). En el presente estudio, el secuenciamiento de 7 regiones variables de integrones clase 1 mostró tres diferentes genes casete codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) que incluyen: *aadA6* (85,7 %), *aacA4* (7,1 %) y *aadB* (7,1 %). Pérez – Gallego, (2019) menciona que un mayor porcentaje (20 %) de los aislamientos de *P. aeruginosa* presenta resistencia a los aminoglucósidos de tipo acetiltransferasas (AAC) y en menor porcentaje por adeniltransferasas (ANT), lo cual no concuerda con los porcentajes obtenidos. Esto se debe a que los casetes génicos *aadA* pueden permanecer en un integrón aun cuando no exista presión selectiva o cese el uso de los antibióticos respectivos (Wang et al., 2019).

Sin embargo, (ANT) junto a (AAC) representa el determinante más común de resistencia a aminoglucósidos dependiente de enzima en *P. aeruginosa*, ambos asociados a menudo con integrones (Pérez, 2014). Al igual que en el trabajo de Mirshekar et al., (2018) el análisis mostró altas tasas de integrones clase 1 con un repertorio de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Las EMAs son a menudo codificadas por genes localizados en elementos móviles como plásmidos, transposones e integrones; los cuales también albergan genes de resistencia adicionales a diversos compuestos (Guzman et al., 2016; Moreno, 2014).

Por lo tanto, los mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* puede no estar asociado únicamente con integrones clase 1 (Berhane y Meniyamer, 2015).

7. CONCLUSIONES

- 7.1. Todos los aislados fueron confirmados, a través de pruebas fenotípicas y genotípicas, positivos a la especie como *Pseudomonas aeruginosa*.
- 7.2. El perfil fenotípico de sensibilidad antibiótica obtenido por método de difusión en disco demostró que los porcentajes más altos de resistencia fueron a los antibióticos levofloxacin (30 %) y ciprofloxacina (25 %), miembros de la familia de las fluoroquinolonas.
- 7.3. Los aislamientos positivos a la presencia de integrones clase 1 presentaron proporciones bajas.
- 7.4. Los genes casete más prevalentes insertados en la región variable fueron los que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs): adeniltransferasas (*aadA*, *aadB*) y acetiltransferasas (*aacA*).
- 7.5. La multiresistencia que presenta *Pseudomonas aeruginosa* no está relacionada a la presencia de integrones clase 1.
- 7.6. La combinación de la resistencia inherente a la especie, su capacidad de adquirir resistencia y sus mecanismos adaptativos convierten a *Pseudomonas aeruginosa* en una bacteria problemática.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adesoji, A. T., Ogunjobi, A. A. y Olatoye, I. O. (2015). Molecular characterization of selected multidrug resistant *Pseudomonas* from water distribution systems in southwestern Nigeria. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0102-4>

Akintui, M., Alcántara, H., Alva, A., Castillo, H., Huayán, J. y Llenque, L. (2018). *Pseudomonas fluorescens* de suelos agrícolas degradadora del herbicida ácido 2, 4 Diclorofenoxiacético. *Revista REBIOLEST*, 3(2), 9-13. Recuperado de <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/1699/1676>

Alcocer, I. (2020). Manual de laboratorio de Microbiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador pp90.

Bellés Bellés, A., Seral García, C. P. y Castillo García, F. J. (2017). *Epidemiología y caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenems en Pseudomonas aeruginosa de muestras clínicas y de portadores fecales* (Tesis doctoral) Universidad de Zaragoza, España.

Berhane, N. y Meniyamer, T. (2015). Prevalence of class 1 and ii integrons in multi-drug resistant bacteria isolated from Keha and Shinta Rivers in Gondar town, North West Ethiopia. Recuperado de <http://www.bti.org.in/wp-content/uploads/2016/08/BTI-8.4.2.pdf>

Buehrle, D. J., Shields, R. K., Clarke, L. G., Potoski, B. A., Clancy, C. J. y Nguyen, M. H. (2017). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(1), e01243-16. DOI:10.1128/AAC.01243-16

Cavalieri, S., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Soutter, R. y Spiegel, C. (2015). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. In *Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*.

Chen, Z., Fang, H., Wang, L., Sun, F., Wang, Y., Yin, Z. y Zhou, D. (2014). IMP-1 encoded by a novel Tn 402-like class 1 integron in clinical *Achromobacter xylosoxidans*, China. *Scientific reports*, 4(1), 1-7. DOI:10.1128/AAC.01243-16

Ebrahimpour, M., Nikokar, I., Ghasemi, Y., Sedigh Ebrahim-Saraie, H., Araghian, A., Farahbakhsh, M. y Ghassabi, F. (2018). Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from wastewaters of a burn center in Northern Iran. *Ann Ig*, 30(2), 112-119. <https://doi.org/10.7416/ai.2018.2202>

Falkinham, J. O., Hilborn, E. D., Arduino, M. J., Pruden, A. y Edwards, M. A. (2015). Epidemiology and ecology of opportunistic premise plumbing pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Health Perspectives*, 123(8), 749–758. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408692>

Fernández Merjildo, D., García Apac, C., Zegarra Piérola, J. y Granados Bullon, L. (2017). Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de secreción endotraqueal en la unidad de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, 2016. *Revista Medica Herediana*, 28(4), 236-241. <https://doi.org/10.20453/rmh.v28i4.3223>

Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 257–277. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00056-13>

Gillings, M. R. (2017). Class 1 integrons as invasive species. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.002>

Guzmán, M., Guzmán, F., Salazar, E., Albarado, L., Rodulfo, H. y de Donato, M. (2016). Identificación de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos en cepas intrahospitalarias de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36(1), 10-15. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562016000100004

Health protection agency. (2015). Identification of *Pseudomonas* species and other Non-Glucose Fermenters. *UK Standards for Microbiology Investigations*, (3), 1–41. <https://doi.org/ID7>

Helal, Z. H. y Khan, M. I. (2015). QacE and QacE 1 Genes and Their Correlation to Antibiotics and Biocides Resistance *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Biomedical Sciences*, 7(2), 52-62. <https://doi.org/10.5099/aj150200052>

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). (2019). *Colistin drop test (método de la gota)*. Recuperado de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/06/Protocolo-COLISTIN-DROP-TEST.pdf>

Khorvash, F., Yazdani, M., Shabani, S. y Soudi, A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*-producing metallo-β-lactamases (VIM, IMP, SME, and AIM) in the clinical isolates of intensive care units, a university hospital in Isfahan, Iran. *Advanced biomedical research*, 6. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.219412>

Medina, J., Paciel, D., Noceti, O. y Rieppi, G. (2017). Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. *Revista Médica del Uruguay*, 33(3), 79-114. <https://doi.org/10.29193/rmu.33.3.5>

Mirshekar, M., Shahcheraghi, F., Azizi, O., Solgi, H. y Badmasti, F. (2018). Diversity of class 1 integrons, and disruption of *carO* and *dacD* by insertion sequences among *Acinetobacter baumannii* isolates in Tehran, Iran. *Microbial Drug Resistance*, 24(4), 359-366 <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0152>

Mohr, K. I. (2016). History of antibiotics research. In *How to Overcome the Antibiotic Crisis*. pp. 237-272). Recuperado de https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2016_499

Moreno, E. V. (2014). *Caracterización molecular y epidemiológica de aislamientos clínicos de "Pseudomonas aeruginosa" multirresistente* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.

Odumosu, B. T., Adeniyi, B. A. y Chandra, R. (2016). Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 12(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-29>

Oteo, J., Bou, G., Chaves, F. y Oliver, A. (2017). Microbiological methods for surveillance of carrier status of multiresistant bacteria. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*, 35(10), 667-675.

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>

Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G. y Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>

Peng, J., Cao, J., Ng, F. M. y Hill, J. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* develops Ciprofloxacin resistance from low to high level with distinctive proteome changes. *Journal of proteomics*, 152, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.005>

Pérez, V. E. (2014). *Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas de Pseudomonas aeruginosa de diferentes orígenes* (Tesis doctoral). Universidad de La Rioja, España.

Pérez-Gallego, M. (2019). *Conexión entre metabolismo del peptidoglicano, resistencia a beta-lactámicos y virulencia en Pseudomonas aeruginosa* (Tesis doctoral). Universitat de les Illes Balears, Palma, España

Rehman, A., Patrick, W. M. y Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in pseudomonas aeruginosa: New approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 1–10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000873>

Roldán, L. (2018). *Resistencia a antimicrobianos y virulencia en cepas no-clínicas de Pseudomonas aeruginosa.* (Tesis doctoral). Universidad de La Rioja, Logroño, España.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. y Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791.

Sonderholm, M., Kragh, K. N., Koren, K., Jakobsen, T. H., Darch, S. E., Alhede, M. y Bjarnsholt, T. (2017). Pseudomonas aeruginosa aggregate formation in an alginate bead model system exhibits in vivo-like characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(9),113-1. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-17>

Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P. y LiPuma, J. J. (2004). PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*, 42(5), 2074-2079. DOI:10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004

Streeter, K. y Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infection, Epidemiology and Medicine*, 2(1), 25–32. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.2.1.25>

Sunde, M., Simonsen, G. S., Slettemeås, J. S., Böckerman, I. y Norström, M. (2015). Integron, plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* from humans and food included in the Norwegian antimicrobial resistance monitoring programs. *PLoS One*, 10(6).

Tubón, U. y David, C. (2017). *Determinación de bacteria pseudomona aeruginosa en el área de hospitalización varones y mujeres, del hospital general docente Ambato y su relación con infecciones nosocomiales* (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias de la Salud-Carrera de Laboratorio Clínico).

Wang, N., Yang, X., Jiao, S., Zhang, J., Ye, B. y Gao, S. (2014). Sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in soils fertilized with manures from Jiangsu Province, Southeastern China. *PloS one*, 9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0112626

Wang, S., He, W., Sun, W., Zhang, J., Chang, Y., Chen, D. y Murchie, A. I. (2019). Integron-derived aminoglycoside-sensing riboswitches control aminoglycoside acetyltransferase resistance gene expression. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(6), e00236-19.

Yepez, E. S., Bovera, M. M., Rosenthal, V. D., Flores, H. A. G., Pazmiño, L., Valencia, F. y Delgado, V. (2017). Device-associated infection rates, mortality, length of stay and bacterial resistance in intensive care units in Ecuador: International Nosocomial Infection Control Consortium's findings. *World journal of biological chemistry*, 8(1), 95.

9. ANEXOS

Anexo 1. Mecanismos de virulencia empleados por *Pseudomonas aeruginosa*

COMPONENTES ESTRUCTURALES	TOXINAS/ENZIMAS
Estructura del biofilm	Alginato Ramnolípidos
Evasión inmune	Elastasas Proteasas
Resistencia a antibióticos	Enzimas modificantes Bombas de expulsión
Citotoxicidad	Ácido cianhídrico Exotoxina A T3SS* Piocianina
Captación de hierro	Proteasas Sideróforos
Motilidad	Flagelos T4SS* pili

***T3SS**: sistema de secreción de tipo III; ***T4SS**: sistema de secreción de tipo

Anexo 2. Codificación, fecha de colecta, datos demográficos y origen de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* empleados en el presente estudio

CÓDIGO PUCE	Código Hospitalario	Fecha colecta PUCE	Sexo del paciente	Cuidad	Origen de los aislados
CB-QCA 5395	6250762	4/9/2018	F*	Quito	Herida
CB-QCA 5396	6270745	4/9/2018	F	Quito	Punta sonda Vesical
CB-QCA 5397	7270727	4/9/2018	F	Quito	Herida de pie
CB-QCA 5398	8020353	4/9/2018	F	Quito	Escara
CB-QCA 5399	8030165	4/9/2018	F	Quito	Secreción traqueal
CB-QCA 5400	8030735	4/9/2018	M*	Quito	Tubo endotraqueal
CB-QCA 5401	8060323	4/9/2018	M	Quito	Secreción traqueal
CB-QCA 5402	8070339	4/9/2018	M	Quito	Orina
CB-QCA 5403	8098012	4/9/2018	M	Quito	Secreción traqueal
CB-QCA 5404	8140738	4/9/2018	M	Quito	Sonda
CB-QCA 5405	8160348	4/9/2018	F	Quito	Secreción traqueal
CB-QCA 5406	8240155	4/9/2018	M	Quito	Secreción traqueal
CB-QCA 5407	8270024	4/9/2018	M	Quito	Orina
CB-QCA 5408	8270762	4/9/2018	M	Quito	Orina
CB-QCA 5409	8310339	4/9/2018	F	Quito	Herida
CB-QCA 5410	8310340	4/9/2018	F	Quito	Herida
CB-QCA 5411	9010092	4/9/2018	F	Quito	Secreción faríngea
CB-QCA 5514	9140335	9/11/2018	M	Quito	Herida de pierna
CB-QCA 5515	9140345	9/11/2018	F	Quito	Secreción vaginal
CB-QCA 5516	9190744	9/11/2018	F	Quito	Orina
CB-QCA 5517	9250316	9/11/2018	F	Quito	Rodilla
CB-QCA 5518	9271849	9/11/2018	M	Quito	Orina

***CB-QCA:** Colección Bacteriana-Quito Católica; **F:** Femenino; **M:** Masculino

Anexo 2. Codificación, fecha de colecta, datos demográficos y origen de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* empleados en el presente estudio

CÓDIGO PUCE	Código Hospitalario	Fecha colecta PUCE	Sexo del paciente	Cuidad	Origen de los aislados
CB-QCA 5519	9280042	9/11/2018	M	Quito	Secreción faríngea
CB-QCA 5520	9280386	9/11/2018	F	Quito	Orina
CB-QCA 5521	10030324	9/11/2018	F	Quito	Secreción traqueal
CB-QCA 5522	10040562	9/11/2018	M	Quito	Pierna
CB-QCA 5523	10050062	9/11/2018	F	Quito	Orina
CB-QCA 5524	10130026	9/11/2018	F	Quito	Tubo endotraqueal
CB-QCA 5525	10190733	9/11/2018	F	Quito	Espujo
CB-QCA 5526	10220333	9/11/2018	M	Quito	Secreción traqueal
CB-QCA 5527	10220334	9/11/2018	M	Quito	Secreción traqueal
CB-QCA 5528	10290744	9/11/2018	F	Quito	Orina
CB-QCA 5529	10300628	9/11/2018	M	Quito	Secreción faríngea
CB-QCA 5530	11060086	9/11/2018	M	Quito	Úlcera pie izquierdo
CB-QCA 5531	11079607	9/11/2018	F	Quito	Orina
CB-QCA 5532	1	9/11/2018	M	Loja	Tubo endotraqueal
CB-QCA 5533	2	9/11/2018	F	Loja	Tubo endotraqueal
CB-QCA 5534	3	9/11/2018	M	Loja	Hemocultivo
CB-QCA 5535	4	9/11/2018	F	Loja	Herida de pierna
CB-QCA 5536	5	9/11/2018	F	Loja	Secreción vaginal

***CB-QCA:** Colección Bacteriana - Quito Católica; **F:** Femenino; **M:** Masculino

Anexo 3. Sensibilidad antimicrobiana obtenida en los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Código CB-QCA	ANTIBIÓTICOS																					
	AMK*		GN*		CAZ*		FEP*		ATM*		IMP*		MEM*		TZP*		CIP*		LEV*		CT*	
	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Halo de inhibición	Interpretación
5395	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	10	R	6	R	6	R	A	R
5396	6	R	14	I	10	R	15	I	20	I	6	R	6	R	19	I	6	R	6	R	A	R
5397	26	S	20	S	34	S	27	S	27	S	27	S	35	S	30	S	26	S	21	I	P	S
5398	23	S	17	S	30	S	33	S	26	S	28	S	36	S	31	S	32	S	29	S	P	S
5399	24	S	18	S	32	S	32	S	27	S	32	S	33	S	33	S	34	S	29	S	P	S
5400	24	S	17	S	32	S	34	S	28	S	30	S	34	S	33	S	34	S	29	S	P	S
5401	18	S	6	R	18	S	19	S	17	I	6	R	6	R	20	I	14	I	6	R	P	S
5402	19	S	6	R	21	S	22	S	18	I	6	R	6	R	22	S	10	R	6	R	A	R
5403	20	S	15	S	28	S	30	S	29	S	31	S	35	S	31	S	37	S	32	S	P	S
5404	6	R	13	I	10	R	16	I	23	S	6	R	6	R	20	I	6	R	6	R	A	R
5405	21	S	17	S	28	S	28	S	25	S	28	S	35	S	30	S	34	S	27	S	P	S
5406	25	S	20	S	30	S	27	S	30	S	27	S	28	S	30	S	19	I	15	I	P	S
5407	6	R	15	S	13	R	16	I	26	S	6	R	6	R	22	S	6	R	6	R	A	R
5408	6	R	6	R	23	S	6	R	14	R	33	S	28	S	10	R	6	R	6	R	A	R

***AMK**, Amikacina; **ATM**, Aztreonam; **CAZ**, Ceftazidima; **CIP**, Ciprofloxacina; **CT**, Colistina; **FEP**, Cefepima; **GN**, Gentamicina; **IMP**, Imipenem; **LEV**, Levofloxacina; **MEM**, Meropenem; **TZP**, piperacilina/tazobactam; **R**, Resistente; **I**, Intermedio; **S**, Sensible; **A**, Ausente; **P**, Presente

Anexo 3. Sensibilidad antimicrobiana obtenida en los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Código CB-QCA	ANTIBIÓTICOS																					
	AMK*		GN*		CAZ*		FEP*		ATM*		IMP*		MEM*		TZP*		CIP*		LEV*		CT*	
	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Halo de inhibición	Interpretación
5409	25	S	20	S	32	S	33	S	29	S	31	S	31	S	34	S	36	S	30	S	P	S
5410	27	S	22	S	32	S	35	S	27	S	28	S	30	S	33	S	35	S	28	S	P	S
5411	23	S	19	S	29	S	30	S	26	S	27	S	35	S	26	S	35	S	29	S	P	S
5514	24	S	19	S	32	S	34	S	29	S	30	S	38	S	33	S	37	S	30	S	P	S
5515	30	S	25	S	31	S	36	S	32	S	34	S	37	S	32	S	21	I	17	I	P	S
5516	23	S	18	S	30	S	25	S	27	S	28	S	38	S	33	S	29	S	23	S	P	S
5517	21	S	6	R	30	S	30	S	24	S	23	S	31	S	30	S	6	R	6	R	A	R
5518	6	R	6	R	22	S	13	R	13	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6	R	P	S
5519	23	S	19	S	28	S	30	S	28	S	27	S	36	S	31	S	34	S	28	S	P	S
5520	20	S	16	S	30	S	25	S	26	S	30	S	35	S	32	S	12	R	6	R	P	S
5521	23	S	18	S	24	S	26	S	17	I	28	S	30	S	24	S	26	S	19	I	P	S
5522	11	R	6	R	20	S	20	S	20	I	34	S	27	S	17	I	6	R	6	R	A	R
5523	21	S	16	S	28	S	30	S	26	S	28	S	33	S	31	S	32	S	26	S	P	S
5524	23	S	19	S	27	S	29	S	25	S	25	S	33	S	29	S	32	S	26	S	P	S

***AMK**, Amikacina; **ATM**, Aztreonam; **CAZ**, Ceftazidima; **CIP**, Ciprofloxacina; **CT**, Colistina; **FEP**, Cefepima; **GN**, Gentamicina; **IMP**, Imipenem; **LEV**, Levofloxacina; **MEM**, Meropenem; **TZP**, piperacilina/tazobactam; **R**, Resistente; **I**, Intermedio; **S**, Sensible; **A**, Ausente; **P**, Presente

Anexo 3. Sensibilidad antimicrobiana obtenida en los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Código CB-QCA	ANTIBIÓTICOS																					
	AMK*		GN*		CAZ*		FEP*		ATM*		IMP*		MEM*		TZP*		CIP*		LEV*		CT*	
	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Halo de inhibición	Interpretación
5525	25	S	21	S	28	S	25	S	35	S	39	S	40	S	35	S	30	S	24	S	P	S
5526	24	S	19	S	27	S	28	S	15	R	27	S	28	S	25	S	26	S	19	I	P	S
5527	22	S	17	S	24	S	24	S	14	R	27	S	31	S	25	S	26	S	18	I	P	S
5528	23	S	18	S	31	S	25	S	34	S	31	S	40	S	35	S	22	I	10	R	P	S
5529	24	S	19	S	29	S	30	S	24	S	27	S	34	S	31	S	35	S	27	S	P	S
5530	24	S	19	S	30	S	32	S	27	S	28	S	29	S	31	S	33	S	26	S	P	S
5531	27	S	22	S	20	S	35	S	29	S	27	S	28	S	31	S	34	S	27	S	P	S
5532	23	S	18	S	20	S	28	S	26	S	27	S	32	S	31	S	32	S	26	S	P	S
5533	23	S	18	S	30	S	24	S	28	S	27	S	28	S	30	S	28	S	21	S	P	S
5534	22	S	18	S	29	S	30	S	25	S	35	S	34	S	29	S	32	S	26	S	P	S
5535	22	S	17	S	28	S	30	S	26	S	34	S	35	S	28	S	31	S	26	S	P	S
5536	22	S	19	S	30	S	24	S	29	S	28	S	29	S	31	S	29	S	22	S	P	S

***AMK**, Amikacina; **ATM**, Aztreonam; **CAZ**, Ceftazidima; **CIP**, Ciprofloxacina; **CT**, Colistina; **FEP**, Cefepima; **GN**, Gentamicina; **IMP**, Imipenem; **LEV**, Levofloxacina; **MEM**, Meropenem; **TZP**, piperacilina/tazobactam; **R**, Resistente; **I**, Intermedio; **S**, Sensible; **A**, Ausente; **P**, Presente