

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE MEDICINA HUMANA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MEDICO CIRUJANO

“ASOCIACIÓN DE LA MULTIRRESISTENCIA ANTIMICROBIANA CON LA PRESENCIA DE INTEGRONES DE CLASE 1 Y 2 EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*”

Área de Investigación:
Microbiología

Autor (es):
Br. Menacho Albitres, Ambar Gianina

Jurado Evaluador:

Presidente: Córdova Paz Soldán, Ofelia Magdalena

Secretario: Castañeda Sabogal, Alex Napoleón

Vocal: Fernández Gómez, Víctor Javier

Asesor:
González Cabeza, José Guillermo

Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3022-9423>

TRUJILLO – PERÚ

2022

Fecha de sustentación: 2022/06/10

DEDICATORIA

Para mi amada madre Adely,

Mis adorados abuelos Alberto y Maura.

Mi querido compañero de vida Gerardo.

Mi querido y estimado amigo José González.

AGRADECIMIENTO

*A mi madre Adely Albitres Alva, por su apoyo
Incondicional, su motivación y sacrificio.*

*A mi querido y estimado maestro, asesor y amigo
Dr. José González Cabeza, por su confianza,
su conocimiento, su tiempo y apoyo en esta investigación.*

*A mi estimado amigo y biólogo Cristhian Sánchez,
Y a todos los integrantes del laboratorio
de Microbiología Molecular y Biotecnología de UPAO
Por ser en muchas ocasiones el soporte para mis dudas
Y por haber compartido su conocimiento conmigo.*

AGRADECIMIENTO DE FINANCIAMIENTO

La sustentación de la presente investigación es parte del segundo hito del proyecto de investigación N° 039-2019 FONDECYT-BM.IADT-AV “**Desarrollo de una Formulación (Coctel) de Baacteriófagos Líticos, en la Prevención y Biocontrol de *Pseudomonas aeruginosa* Multirresistente (PAMR) a Antimicrobianos, bajo condiciones in vito o in vivo**” el cual es un proyecto financiado por la Universidad privada Antenor Orrrego (UPAO), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica en coordinación con el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Concytec-Fondecyt) y Banco Mundial.



RESUMEN

Objetivo: La presencia de los integrones en el genoma bacteriano puede contribuir al aumento de bacterias multirresistentes. El presente estudio tiene como objetivo principal analizar la asociación entre los integrones de clase 1 y 2 con la multirresistencia antimicrobiana.

Material y Métodos: Para este fin se utilizaron 35 muestras de *P. aeruginosa* proporcionadas por el Hospital Belén de Trujillo, a las que se le realizó su respectiva comprobación fenotípica y genotípica, prueba de susceptibilidad mediante método de difusión en disco, la extracción de ADN y por último la detección de los genes: *Int1*, *Int2*, mediante PCR.

Resultados: De las 35 cepas de *P. aeruginosa*, 24 (68,6%) fueron MDR. *Int1* se detectó en un 51,4%; y el 67% correspondían al grupo de las MDR. Se identificaron correlaciones significativas entre el: *Int1* y la resistencia a ciprofloxacino, ofloxacino, meropenem, imipenem, tobramicina, gentamicina, piperacilina y aztreonam.

Conclusiones: El *int1* prevaleció en el grupo de los MDR y parece desempeñar un papel importante en la diseminación de genes de resistencia a múltiples fármacos, por lo que se podrían utilizar como marcadores para la identificación de aislamientos MDR y de esta manera realizar programas de vigilancia molecular para elegir la terapia adecuada y el manejo de las prácticas de control de infecciones.

Palabras claves: *Int1*, *Int2*, multirresistencia antimicrobiana, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Objective: The presence of integrons in the bacterial genome can contribute to the increase of multiresistant bacteria. The main objective of this study is to analyze the association between class 1 and 2 integrons with multiresistance.

Material and Methods: For this purpose, 35 samples of *P. aeruginosa* provided by the Hospital Belén de Trujillo were used, which underwent their respective phenotypic and genotypic verification, susceptibility test by disk diffusion method, DNA extraction and finally the detection of the genes: *Int1*, *Int2*, by means of PCR.

Results: Of the 35 *P. aeruginosa* strains, 24 (68.6%) were MDR. *Int1* was detected in 51.4%; and 68,6% corresponded to the MDR group. Significant correlations were identified between: *Int1* and resistance to ciprofloxacin, ofloxacin, meropenem, imipenem, tobramycin, gentamicin, piperacillin, and aztreonam.

Conclusions: The *int1* prevailed in the MDR group and seems to play an important role in the dissemination of multidrug resistance genes, so they could be used as markers for the identification of MDR isolates and thus perform molecular surveillance programs to choose appropriate therapy and management of infection control practices.

Keywords: *Int1*, *Int2*, antimicrobial multiresistance, *Pseudomonas aeruginosa*

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
II.	MATERIAL Y MÉTODOS	18
III.	RESULTADOS	31
IV.	DISCUSIÓN.....	43
V.	LIMITACIONES	47
VI.	CONCLUSIONES.....	47
VII.	RECOMENDACIONES	47
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
IX.	ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia genética del gen de la integrasa (intl1)	29
Figura 2. Amplificación del amplicón O - acetilasa de Pseudomonas aeruginosa mediante PCR.....	31
Figura 3. Resultado de los productos de amplificación de detección del gen intl1.	36
Figura 4. Resultado de los productos de amplificación de detección del gen intl2.	37
Figura 5. Resultado de los productos de amplificación de detección del gen intl1 e intl2.....	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores empleados en la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Tabla 2. Cebadores empleados en la identificación del int11 e int12.	26
Tabla 3. Caracterización de las cepas reactivadas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Tabla 4. Clasificación y frecuencia de cepas de <i>P. aeruginosa</i> por multirresistencia bacteriana.....	33
Tabla 5. Cepas de <i>P. aeruginosa</i> con la presencia de (int11 e int12) y su resistencia.	35
Tabla 6. Distribución de las clases de integrones en las muestras de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	39
Tabla 7. Presencia de integrones en los grupos de estudio de <i>P. aeruginosa</i> .	39
Tabla 8. Resultado de la relación entre el grupo de antimicrobianos y la presencia de integrones.....	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Estructura del intl1.....	52
Anexo 2. Origen de los aislados clínicos de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	53
Anexo 3. Codificación, fecha de colecta de muestra, datos demográficos y origen de los aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> empleados en el presente estudio.	54
Anexo 4. Categorías interpretativas y puntos de halos de inhibición según CLSI 2020.	55
Anexo 5. Antibiograma obtenido por método de difusión por disco para la especie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Anexo 6. Ficha técnica de los primers (intl1 – intl2) utilizados en el estudio, fabricados por Sigma-Aldrich.	59
Anexo 7. Aspecto de colonias típicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre placas de Agar cetrimide	60
Anexo 8. Prueba bioquímica (TSI) empleada en la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
Anexo 9. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos probados en la población total de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	62
Anexo 10. Sensibilidad antimicrobiana obtenida en los aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63

I. INTRODUCCIÓN

Se estima que la resistencia antimicrobiana (RAM) causará 10 millones de muertes en el mundo para el año 2050, y gran parte de éstas serán causadas por bacterias gramnegativas. (1) Como consecuencia del uso irracional de antimicrobianos a libre demanda; se está produciendo la aparición y propagación de bacterias resistentes y multirresistentes (MDR); adquiriendo varios mecanismos de adaptación bacteriana tales como, la producción de enzimas, alteración de vías metabólicas, alteración de la permeabilidad de membrana, variación genética; tales como mutaciones, reordenamiento de segmentos de ADN, plásmidos, integrones. (2) (3). Tal es el impacto de la multirresistencia que la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en el 2017 una lista de patógenos intrahospitalarios multirresistentes, para los que se necesita con urgencia nuevas alternativas terapéuticas; la mayor parte son patógenos gramnegativos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*). (4)

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria ambiental ubicua causante de numerosas infecciones oportunistas nosocomiales, que son epidemiológica y clínicamente relevantes debido a la dificultad para el tratamiento adecuado y oportuno, y también por su elevada transmisión de mecanismos de resistencia. Éstas pueden permanecer en el medio, produciendo recaídas en pacientes que se encuentran hospitalizados o en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), aumento su morbimortalidad, así mismo aumentado los costos sanitarios. (5) El uso generalizado de antibióticos es probablemente la principal razón del aumento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes (PAMR). De tal manera

esto se encuentra muy asociado con la plasticidad genética para sobrevivir que tiene *P. aeruginosa* a partir de la transferencia horizontal genes (THG).(6) En 1970, se determinó que la THG estaba mediada por distintos elementos genéticos, tales como: transposones, plásmidos y secuencias de inserción, capaces de transferir material genético de un organismo a otro mediante mecanismos como conjugación, transducción transformación. Para 1989, se descubrieron elementos genéticos relacionados a la inserción y transcripción de genes que fueron identificados como integrones por Strokes y Hall; y la definición actual fue introducida en 1995 por Hall y Collis (7). Se definen como elementos genéticos bacterianos que promueven la adquisición, expresión y movilización de genes de resistencia a antibióticos incrustados en cassettes de genes, otorgando ventajas selectivas a las bacterias. Se ha evidenciado que en casi la mitad del total de PAMR están presentes los integrones, tales como los genes que codifican las BLEE, carbapenemasas y aminoglucósidos.(9) Por lo tanto en la actualidad se conoce su íntima asociación como vectores de la multirresistencia a antimicrobianos, sobre todo en bacterias Gram – negativas.

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,(10) esto lo llevan a cabo gracias a su estructura que incluye: un gen codificante de integrasa (*intI*), un sitio adyacente de recombinación (*attI*) y un promotor de orientación externa (*Pc*) para los cassettes integrados en el sitio de *attI*, con capacidad de direccionar la transcripción de los genes capturados desde los cassettes genéticos(11,12), quienes comúnmente tienen un marco de lectura abierto (ORF) y un sitio reconocible por el *IntI* llamado *attC*, dentro de la estructura del integrón,

constituye la parte variable. (Anexo 1). Estos cassettes pueden existir como elementos circulares o DNA (Desoxyribo Nucleic Acid) circular libre; se pueden insertar en un integrón mediante una recombinación de sitio específico asociada al integrón para crear una forma lineal, en una orientación 3'; mediante la expresión de un promotor (Pc). (13) El objetivo más comúnmente seleccionado para la detección de un integrón mediante PCR en una bacteria específica, es el gen que codifica a la integrasa (*intl*), de la familia de tirosina recombinasa, que se encarga de catalizar la recombinación entre los sitios *attI* y/o *attC* (14), las secuencias de aminoácidos del gen (*Intl*) se utilizan como base para dividir a los integrones en "clases", los que llevan *intl1* se define como "clase 1", *intl2* como "clase 2", *intl3* como "clase 3", etc. (15)(24)(33). Los integrones de clase 1 son los más extendidos y clínicamente importantes, ya que se han detectado de 22 – 59% en las bacterias gramnegativas MDR (6,18). Por esto constituye el modelo de investigación principal. Éstos están compuestos por 2 elementos conservados, uno que es el *intl* y *attI*, y un promotor que codifica a los genes *Sull* y *qacEΔI* que brindan resistencia a las sulfamidas y a los agentes de amonio cuaternario, también están asociados a transposones derivados de *Tn402*. (17)

Los integrones de clase 2 son menos comunes y han mostrado una alta estabilidad en sus matrices de cassettes de genes: *dfrA1 – sat2 – aadA1*, asociados con los genes de codifican resistencia a trimetoprima – sulfametoxazol y estreptomicina(36). Usualmente están asociados principalmente con transposones *Tn7*. Los de clase 3 se cree que también se encuentra en un transposón *Tn402* y son menos prevalentes. Las otras dos clases de integrones se han encontrado en la resistencia a trimetoprima en *Vibrio* especies. (10)

Sobre la movilidad de los integrones distribuida en organismos clínicos, se ha considerado una preocupación importante de la resistencia clínica a los antimicrobianos, ya que está fuertemente asociado a elementos móviles (transposones o plásmidos). El integrón clase 1 se ha considerado como un elemento genético potencialmente móvil y comúnmente se encuentra en plásmidos para facilitar la transferencia mediada por conjugación, ya que son capaces de transferirse a otros integrones o a sitios secundarios en el genoma bacteriano, a su vez pueden compartirse incluso entre diferentes bacterias. (10)(20). Se han identificado más de 130 cassettes genéticos diferentes que albergan varios genes de resistencia a antibióticos (21), que brindan resistencia a la mayoría de los grupos de antibióticos, tales como: aminoglucósidos, B – lactámicos, cloranfenicol, estreptomicina, rifampicina, fosfomicina, eritromicina, lincomicina, quinolonas y antisépticos de amonio cuaternario. (10)

Para su identificación y monitorización se necesitan métodos fiables como la PCR; que permitan detectar molecularmente a la integrasa. (22) Un estudio realizado por María del Rosario, et al (Bolivia, 2007), demostró la relación entre la presencia de integrones clase 1 y 2 y la resistencia a antimicrobianos en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante PCR, dichas cepas procedían de diferentes laboratorios y centros hospitalarios. Dónde los resultados fueron que el 29.27% de los aislados, llevaba integrones clase 1, el 12,20% integrones de clase 2; y el 17.07%se identificaron los integrones 1 y 2. (23)

Rodulfo et al (Venezuela, 2018), realizó un estudio de los factores de virulencia e integrones asociados con fenotipo MDR y extremadamente multidrogorresistente (XDR) en cepas nosocomiales de *Pseudomonas aeruginosa* mediante PCR, dónde se obtuvo como resultados al *intl1* en un

36,8% de las cepas y la frecuencia se asoció con la resistencia en cepas MDR.
(24)

Zarei- Yazdeli et al (Irán, 2018) realizó un estudio de prevalencia sobre los integrones de clase 1, 2 y 3 de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes usando PCR en Yazd, Irán. Es un estudio descriptivo que se realizó aislando 144 muestras clínicas de *P. aeruginosa*, mediante PCR se detectó integrones de clase 1, 2 y 3 utilizando cebadores de genes *intl1*, *intl2* e *intl3*; los resultados fueron: la prueba de susceptibilidad mostró que el 75% fueron MDR y la resistencia más baja se observó en ciprofloxacino (48,6%) y la mayor resistencia fue en gentamicina (63,2%). Además, se identificó que el 82.6% de los aislados presentaron integrones 1 o 2.(25)

Rodríguez Makhaboroda et al (Quito – Ecuador, 2020) En su Tesis realizó Caracterización de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Obtuvo de 35 aislados clínicos de laboratorios particulares, mediante caracterización molecular por PCR encontró al *intl1* en 11/35 (27,5%). De los 11 aislados 5 fueron MDR (45.5%), y 2 presentaron resistencia extendida (18,2%) y 2 fueron panresistentes (18,2%). Presentaron además alta resistencia a quinolonas (27,5%), carbapenémicos (17,5%) y aminoglucósidos (17,5%) y en menor porcentaje a monobactámicos (13%)(26).

Shahram Mobaraki et al. (Irán – 2018). En su investigación sobre la Presencia de integrones de clase 1, 2 y 3 en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo de resistencia a múltiples fármacos recolectados de hospitales de la ciudad de Tabriz. Se recolectó 200 muestras clínicas. La prueba de susceptibilidad a los antibióticos se realizó mediante el método de difusión en disco y la presencia de integrones se analizó mediante PCR. Como resultados

obtuvo: 98% de aislamientos fueron resistentes a cefotaxima. 53% fueron XDR, 27,5% de los aislamientos fueron resistentes a más de 8 grupos de antibióticos. 27.5% fueron positivos para integrón tipo 1; 51% para integrón de tipo 2 y 15% para tipo 3. La resistencia de aminoglucósidos fue el gen más común albergado para los integrones(27).

Hasta la actualidad, no se han realizado estudios en Perú sobre la presencia de integrones en *P. aeruginosa*; pero si, en *E. coli*. Riveros Ramirez et al. Lima – Perú (2019) realizaron un estudio sobre integrones en *Escherichia coli* provenientes de niños menores de dos años con diarreas y bacteriemia. En los que detectaron al integrón de clase 1 en aislados de bacteremia en un 31% (22/70). Se detectaron 12 cassettes genéticos de clase 1 y 3 de clase 2, y les confirieron resistencia a los aminoglucósidos (aadA1, aadA2, aadA5), a gentamicina /tobramicina / kanamicina, trimetropim, cloranfenicol y 1 ORF (marco de lectura abierto). Sólo en integrones de clase 2 se indentificaron tres cassettes genéticos de estreptotricina acetiltrasnferasa (sat 1,2 y 3) que confieren resistencia a estreptotricina. La mayoría de los aislados con integrones 1 y 2 fueron multirresistentes. Por lo que concluyeron que las *E. coli* provenientes de heces y sangre en niños peruanos presentaron multirresistencia y albergaban a los integrones de clase 1 y 2 con diferentes cassettes de resistencia.(28)

En el Perú, los antibióticos son prescritos con frecuencia, y en la actualidad los hospitales tienen un suministro limitado de fármacos para terapias infecciosas, en conjunto con la resistencia antimicrobiana ha hecho que el tratamiento se vuelva una tarea desafiante para el médico que debe brindar terapias racionales y basadas en evidencias para mejorar la salud de los pacientes .(29) Por lo tanto, es esencial utilizar prácticas de manejo y vigilancia epidemiológica para

optimizar el uso de antibióticos (PROA) más controlado, preferiblemente basadas en resultados de antibiograma y los métodos moleculares para detectar a éstos elementos genéticos codificadores de resistencia a antibióticos, para de esa manera diseñar estrategias terapéuticas adecuadas para el control de estos organismos.(30).

Enunciado del problema:

¿Existe asociación entre la multirresistencia con la presencia de integrones de clase 1 y 2 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras clínicas del Hospital Belén del periodo 2018?

Hipótesis

Hipótesis nula (H₀): No existe asociación entre la multirresistencia y la presencia de integrones de clase 1 y 2 en cepas *Pseudomonas aeruginosa*.

Hipótesis alterna (H_a): Existe asociación entre el multirresistencia y la presencia de integrones de clase 1 y 2 en cepas *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivos

Objetivo general:

Detectar la presencia de integrones de clase 1 y 2 en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* y asociarlos con la multirresistencia antimicrobiana.

Objetivos específicos:

Determinar los patrones de resistencia y susceptibilidad a antibióticos en las cepas de estudio.

Identificar y caracterizar a los genes codificantes de los integrones 1 y 2 de cepas de PAMR.

Determinar la asociación del patrón de resistencia de los grupos de antimicrobianos con la presencia de integrones de clase 1 y 2

II. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Diseño de Estudio:

Estudio experimental básico, prospectivo y analítico.

b. Población, muestra y muestreo:

POBLACIÓN DE ESTUDIO:

En el presente estudio se analizaron 35 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* de muestras clínicas proporcionadas por el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la UPAO, a su vez provenientes del Hospital Belén de Trujillo, de pacientes que presentaron diversas patologías infecciosas en el año 2018. (Anexo 2 y 3).

Criterios de inclusión:

- Cepas de *P. aeruginosa* provenientes de diferentes muestras clínicas de pacientes con patologías infecciosas (esputo, sangre, orina, piel).
- Cepas de *P. aeruginosa* productoras de pigmentos al crecimiento en agar cetrimide.
- Cepas que presentan alcalinidad en el agar triple sugar iron (TSI).
- Molecularmente evidencian el gen de acetilasa específica para *P. aeruginosa*
- Deben mostrar un perfil de sensibilidad a los siguientes antibióticos: ciprofloxacino, tobramicina, meropenem, Piperacilina – Tazobactam, Ceftazidima, amikacina, gentamicina, imipenem, ofloxacino, cefepime.
- DNA bacteriano que se evidencie los pb establecidos en la investigación que correspondan al gen del *intl1* e *intl2*.

Criterios de exclusión

- Amplicones de resultado de PCR de *Pseudomonas aeruginosa* que presenten diferente tamaño de pares de bases a los presentados por el control utilizado ATTC 27853.
- Amplicones de resultado de PCR para el gen del integrón de clase 1 y 2 que presenten diferente tamaño al descrito.

d. Procedimientos y técnicas

COMPROBACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Las cepas donadas del Hospital Belén de Trujillo fueron proporcionadas con su respectiva identificación y antibiograma. Sin embargo, se realizó una reidentificación para descartar alguna cepa contaminada adquirida en el traslado.

COMPROBACIÓN DE CEPAS EN AGAR LB, CETRIMIDE Y TSI

Inicialmente se aislaron las cepas mediante inoculación para la comprobación de cada una usando un medio nutritivo de enriquecimiento Luria Bertani (LB), las cuales se dejó incubar por 12 horas a 37°. Al día siguiente se realizó el aislamiento en un agar selectivo Agar Cetrímide por 24 horas a 37°. Posteriormente se realizó la comprobación bioquímica en medio TSI, ésta se realizó inoculando una colonia aislada con la ayuda de un asa bacteriológica. Mediante una extracción profunda en la base y estría superficial en el ápice inclinado. (Alcoccer, 2020).

COMPROBACIÓN GENOTÍPICA DE LAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS CEPAS

Posterior a la comprobación de todas las cepas con su respectivo patrón de resistencia, se procedió a realizar un over night en caldo nutritivo de enriquecimiento Luria Bertani

(LB), se incubó a 37° por 12 horas para proceder a la extracción del ADN.

Luego las células bacterianas se recogieron por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 minutos el proceso se realizó 2 veces.

Posteriormente se procedió a eliminar el sobrenadante mediante una micropipeta estéril. A continuación, se agregó 100 μ l de agua Mili Q para resuspender. A continuación, pasaron a centrifugar las muestras a 11.000 r.p.m. en 3 min en 3 minutos.

Posteriormente con una micropipeta extrajimos el sobrenadante, que es el que contiene el ADN y se empleará para la realización de PCR. Luego de la extracción del ADN cada cepa rotulada en los tubos de eppendorf plástico rotulado. (Rodulfo H, 2019).

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE *Pseudomonas aeruginosa*.

Para comprobar genéticamente las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante PCR, se utilizaron los iniciadores descritos por Hyeon Jin Choi y colaboradores (2020) detallados en la (tabla 1).

Tabla 1. Cebadores empleados en la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

Cebador	Secuencia 5' 3'	Annealing (°C)	Gen Target	Tamaño del amplicón (pb)*	Referencia
PA431CF PA431CR	CTGGGTCGAAAGGTGGTTGTTATC GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC	63	O – gen acetilasa	242	Liu M, 2020

*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 20 μL que contenían: 10 μL de Dream Taq Hot Start PCR Máster Mix (2X) – Thermo Scientific, 1 μL de cada cebador, 5 μL de ADN y 3 μL de agua molecular. Se empleó la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* como control positivo. Las condiciones de amplificación fueron: la desnaturalización inicial a 95° por 3 minutos, se completaron 35 ciclos, cada uno a 95°C por 1 minuto, hibridación a 63° por 30 segundos, y la elongación a 72° por 1 minuto. La extensión final a 72° por 10 minutos.

Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en la cámara de electroforesis aplicando 70 voltios por 40 minutos. Para la visualización del gel, se empleó un marcador de peso molecular 1 kpb de la marca Thermo Scientific. Las condiciones de amplificación fueron: la desnaturalización inicial a 95° por 3 minutos, se completaron 35 ciclos, cada uno a 95°C por 1 minuto, hibridación a 63° por 30 segundos, y la elongación a 72° por 1 minuto. La extensión final a 72° por 10 minutos. (Liu M, 2020)

**PATRÓN DE RESISTENCIA MEDIANTE DIFUSIÓN DISCO –
PLACA (recomendaciones del Clinical and Laboratory
Standards Institute (CLSI))**

Se procedió a realizar el antibiograma, mediante el método de difusión en disco de Kirby – Bauer de acuerdo con las directrices del CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute; Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, (2020) (47). Los discos incluían colistina sulfato (10ug), Ciprofloxacino (5ug), Aztreonam (30 ug), Tobramicina (10ug), Meropenem (10ug), Piperacilina Tazobactam (110ug), Ceftazidime (30ug), Amikacina (30ug), Gentamicina (10ug), Imipenem (10ug), Piperacilina (100ug), Ofloxacina (5ug), Cefepime (30ug)(33). (Anexo 4 y 5).

DETECCIÓN DE *intl1* e *intl2* MEDIANTE PCR

En los aislados se realizó la amplificación de genes codificantes de la enzima integrasa 1 (*intl1*) (Figura1) y la integrasa (*intl2*) (tabla 2). Para ello se utilizaron los siguientes cebadores, según Gonzáles y colaboradores (2004) y fabricados por Sigma-Aldrich. (Anexo 6).

Tabla 2.Cebadores empleados en la identificación del *intl1* e *intl2*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Annealing (°C)	Gen target	Tamaño de amplicón(pb)	Referencia
<i>Intl1 F</i>	ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG	63	<i>intl1</i>	892	Manzur, 2007
<i>Intl 1 R</i>	GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGC				
<i>Intl2 F</i>	GCAAATGAAGTGCAACGC	63	<i>intl2</i>	467	Manzur, 2007
<i>Intl2 R</i>	ACACGCTTGCTAACGATG				

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

Para ambos integrones las condiciones fueron las mismas descritas por (Manzur S, 2007): Las concentraciones finales de la mezcla para la PCR fueron de 20 μ L: 10 μ L de Dream Taq Hot Start PCR Máster Mix (2X) – Thermo Scientific, 1 μ L de IntA UP, 1 μ L de IntB LP; 5 μ L de muestra de ADN; 3 μ L de H₂O Miliq.

Las reacciones de amplificación se realizaron en 2 ciclos iniciales de desnaturalización de 95° 3 minutos y otro de 95° 30seg. Hibridación 63° 30seg, elongación 72° 1 minuto y extensión final de 70° en 10 minutos. Luego, las condiciones de amplificación fueron: la desnaturalización inicial a 95° por 3 minutos, se completaron 35 ciclos, cada uno a 95°C por 1 minuto, hibridación a 63° por 30 segundos, y la elongación a 72° por 1 minuto. La extensión final a 72° por 10 minutos. Los productos se observaron con luz ultravioleta mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X; el cual fue previamente colocado 5 ul de Bromuro de etidio, para ambos *intl 1* e *intl 2*. La mezcla se realizó con 2ul de muestra de DNA, Se usó 1 ul del marcador de peso molecular de 1Kb DNA de la marca Ladder Thermo Scientific GeneRuler y 8 ul de H₂O destilada.

Se procede a colocar en los pocillos de agarosa, a un voltaje de 70 V, durante aproximadamente 50 minutos.

Las bandas de amplificación se visualizaron mediante transiluminador de luz ultravioleta. (Manzur S.,2007).

Figura 1. Secuencia genética del gen de la integrasa (*intI1*)

Up Primer: IntA Up

5': **ATCATC**GTCGTAGAGACGTCGG: 3'

Rv primer: IntB Lp

3': **GTCAAG**TTCTGGACCAGTTGC 5'

```

1   tgtcgttttc agaagacggc tgcactgaac gtcagaagcc gactgacta tagcagcggg
61  ggggttgat ccatcaggca acgacgggct gctgccggcc atcagcggac gcagggagga
121 ctttccgcaa cgggcccgttc gatgcggcac cgatggcctt cgcgagggg tagtgaatcc
181 gccaggattg acttgcgctg ccctacctct cactagttag gggcggcagc gcatcaagcg
241 gtgagcgcac tccggcaccg ccaactttca gcacatgctt gtaaATCATC GTCGTAGAGA
301 CGTCGGAATG GCCGAGCAGA TCCTGCACGG TTCGAATGTC GTAACCGCTG CCGAGCAAGG
361 CCGTCGCGAA CGAGTGGCGG AGGGTGTGCG GTGTGGCGGG CTTCGTGATG CCTGCTTGT
421 CTACGGCACG TTTGAAGGCG CGCTGAAAGG TCTGGTCATA CATGTGATGG CGACGCACGA
481 CACCGCTCCG TGGATCGGTC GAATGCGTGT GCTGCGCAA AACCCAGAAC CACGGCCAGG
541 AATGCCCGGC GCGCGGATAC TTCCGCTCAA GGGCGTCGGG AAGCGCAACG CCGCTGCGGC
601 CCTCGGCCTG GTCCTTCAGC CAACATGCCC GTGCACGCGA CAGCTGCTCG CGCAGGCTGG
661 GTGCCAAGCT CTCGGGTAAC ATCAAGGCCG GATCCTTGGA GCCCTTGCCC TCCCGCACGA
721 TGATCGTGCC GTGATCGAAA TCCAGATCCT TGACCCGCAG TTGCAAACCC TCACTGATCC
781 GCATGCCCGT TCCATACAGA AGCTGGGCGA ACAAACGATG CTCGCCTTCC AGAAAACCGA
841 GGATGCGAAC CACTTCATCC GGGGTGAGCA CCACCGGCAA GCGCCGCGAC GGCCGAGGTC
901 TTCCGATCTC CTGAAGCCAG GGCAGATCCG TGCACAGCAC CTTGCCGTAG AAGAACAGCA
961 AGGCCGCCAA TGCCTGACGA TGGTGGAGA CCGAAACCTT GCGCTCGTTC GCCAGCCAGG
1021 ACAGAAATGC CTCGACTTCC CTGCTGCCCA AGGTTGCCGG GTGACGCACA CCGTGAAAC
1081 GGATGAAGGC ACGAACCAG TGGACATAAG CCTGTTCCGT TCGTAAGCTG TAATGCAAGT
1141 AGCGTATGCG CTCAGTCAAG GTTCTGGACC AGTTGCgaac gcagcggtagg taacggcgca
1201 cagtggcggg tttcatggct tgttatgact gttttttgt acagtctatg cctcgggcat

```

e. Plan de análisis de datos

Se utilizó el paquete Estadístico IBM SPSS Statistics 25.

Estadística Descriptiva:

Los resultados se presentan con frecuencias absolutas y porcentuales (Tablas cruzadas). Gráficos de barras comparativos.

Estadística Analítica

Para el análisis estadístico, las muestras se dividieron en dos grupos; el grupo de los MDR y No MDR. Se realizó la prueba de chi cuadrado, para determinar la significancia estadística, con un nivel de confianza al 95% y se consideraron a los valores estadísticamente significativos si $p < 0.05$.

f. Aspectos éticos

Se cumplieron con los principios básico de ética; justicia, beneficencia y no maleficencia. Se respetaron los datos brindados por el informe de microbiología de las muestras brindadas por el Hospital Belén de Trujillo, sin modificar o adulterar su contenido, respetando el art. 93. Se conservó el anonimato del paciente del que se recolectó la muestra respetando el art. 95 del código de Ética y Deontología del Colegio Médico del Perú. (34,35)

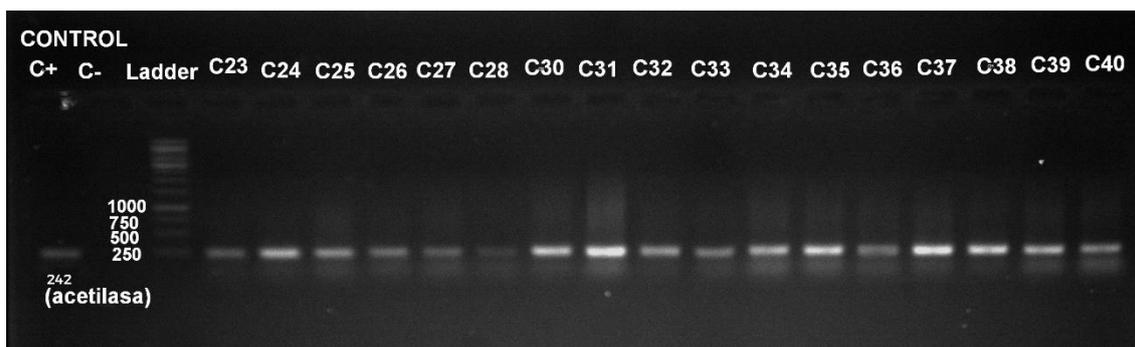
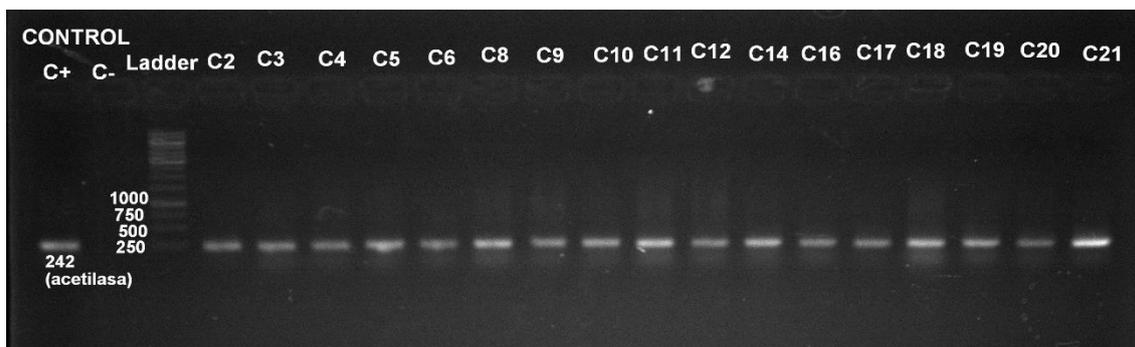
III. RESULTADOS

a. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Las 35 cepas utilizadas para el estudio presentaron características fenotípicas (Anexo 7 y 8) y genotípicas (Figura 2), confirmando ser del género *P. aeruginosa*.

En la (tabla 3) se muestra los resultados de la caracterización de las *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 2. Amplificación del amplicón O - acetilasa de *Pseudomonas aeruginosa* mediante PCR.



***Ladder**, marcador de peso molecular (1000pb); (Thermo Scientific), representan bandas de aproximadamente 242 pb, que es el tamaño del amplicón esperado.

Tabla 3. Caracterización de las cepas reactivadas de *Pseudomonas aeruginosa*.

CEPAS	ESPECIE	FICHA TÉCNICA	Cultivo en Agar cetrimide	Formación de pigmentos	Comprobación en TSI	Presencia de gen O - acetilasa
503	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
504	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
505	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
506	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
509	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
510	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
511	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
512	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
513	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
514	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
515	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
516	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
517	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
518	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
519	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
520	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
521	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
522	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
523	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
524	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
525	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
526	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
527	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
528	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
529	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
530	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
532	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
533	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
534	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
535	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
536	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
537	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
538	<i>P. aeruginosa</i>	NO	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
539	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO
540	<i>P. aeruginosa</i>	SI	POSITIVO	POSITIVO	ALK	POSITIVO

*TSI: Trigle Sugar Iron Agar. * ALK: alcalosis

b. DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Las 35 cepas se clasificaron en 2 grupos: los MDR, fueron los que presentaron resistencia a más de 3 grupos de antimicrobianos; y No MDR: resistencia a menos de 3 grupos de antimicrobianos. Al realizar el antibiograma, 24 (68,6%) correspondieron a MDR; y 11 (31,4%) a No MDR, (tabla 4).

Tabla 4. Clasificación y frecuencia de cepas de *P. aeruginosa* por multirresistencia bacteriana.

Resistencia	Frecuencia	Porcentaje	Frec. Acumulativa	Porc. Acumulativa
MDR	24	68,6%	24	68,6%
NO MDR	11	31,4%	35	100,0%
Total	35	100%		

Consecuencia de la valoración de la susceptibilidad, en el (Anexo 9) se observa que de la colección de *P. aeruginosa*, presentaron una mayor resistencia frente a aminoglucósidos (gentamicina y tobramicina) y a carbapenems (imipenem y meropenem) ambos con un 71,4%.

c. DETECCIÓN DE INTEGRONES EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

De las 35 cepas ensayadas, 21 revelaron la presencia del (*Int1*), a través de una banda de 892 pb (Figura 3); de las cepas que sólo tuvieron el *int1* fueron: 16 (67%) del grupo MDR y del grupo no MDR: fueron 2 (18%), exceptuando a las que se encontraron en ambos integrones. (Tabla 5)

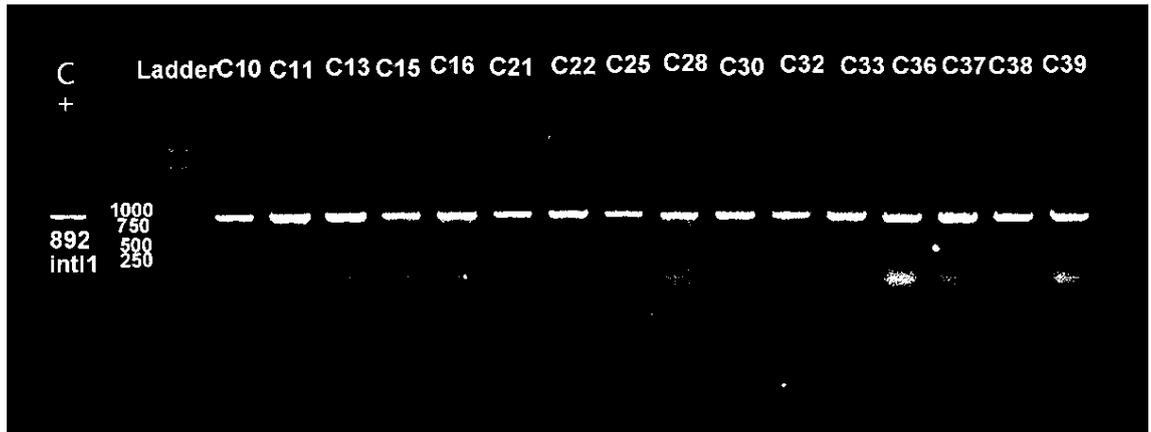
En 5 cepas se logró la obtención del amplicón de 467 pb (Figura 4) correspondiente *Int2*, las cuales 2 se presentaron en el grupo MDR. Finalmente se evidenciaron 3 cepas que obtuvieron ambos integrones: 1 se evidenció en el grupo de las MDR y 2 en No MDR. (Figura 5)

Tabla 5. Cepas de *P. aeruginosa* con la presencia de (int1 e int2) y su resistencia.

CEPAS	Presencia de <i>int1</i>	Presencia de <i>int2</i>	RESISTENCIA
503	X	X	MDR
504	X	✓	MDR
505	✓	X	MDR
506	X	X	NO MDR
509	✓	✓	NO MDR
510	✓	X	NO MDR
511	✓	X	MDR
512	X	X	MDR
513	✓	X	MDR
514	X	X	NO MDR
515	✓	X	MDR
516	✓	X	MDR
517	X	X	MDR
518	X	X	NO MDR
519	X	✓	MDR
520	✓	✓	NO MDR
521	✓	X	MDR
522	✓	X	NO MDR
523	X	X	NO MDR
524	X	X	NO MDR
525	✓	X	MDR
526	X	X	MDR
527	X	X	NO MDR
528	✓	X	MDR
529	✓	X	MDR
530	✓	X	MDR
532	✓	X	MDR
533	✓	X	MDR
534	X	X	MDR
535	✓	✓	MDR
536	✓	X	MDR
537	✓	X	MDR
538	✓	X	MDR
539	✓	X	MDR
540	X	X	NO MDR

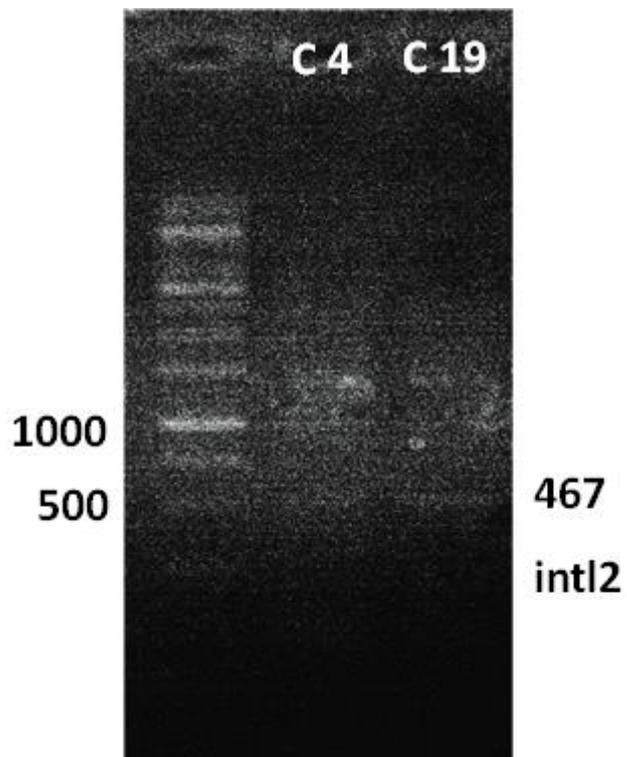
*Int1: gen de integrón 1 * Int2: gen de integrón 1.

Figura 3. Resultado de los productos de amplificación de detección del gen *intl1*.



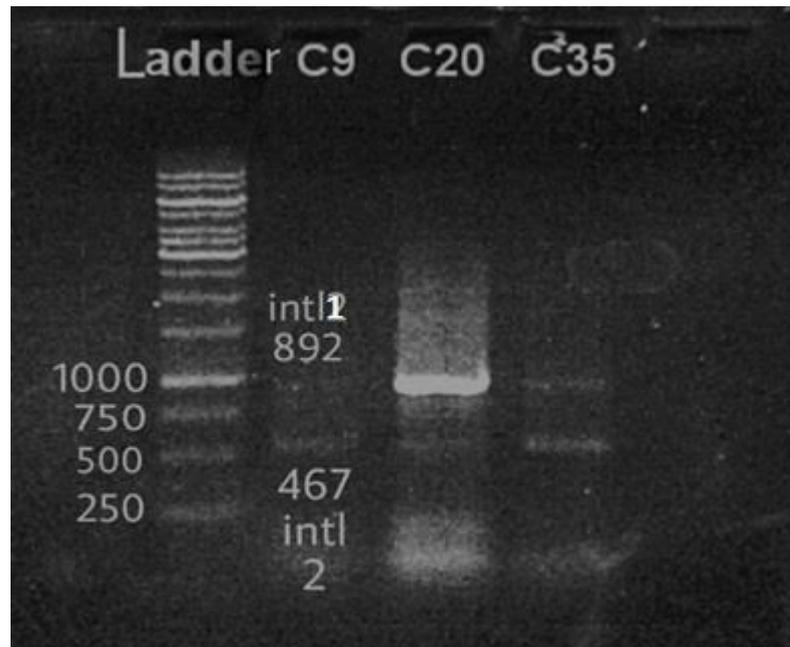
Carril 1 control +, carril 3 ladder de 1 kb. Carril 4 muestra 10. Carril 5, muestra 11. Carril 6, muestra 13. Carril 7, muestra 15. Carril 8, muestra 16. Carril 9, muestra 21. Carril 10, muestra 22. Carril 11, muestra 25. Carril 12, muestra 28. Carril 13, muestra 30. Carril 14, muestra 32. Carril 15, muestra 33. Carril 16, muestra 36. Carril 17, muestra 37. Carril 18, muestra 39.

Figura 4. Resultado de los productos de amplificación de detección del gen *intl2*.



*Resultado de los productos de amplificación de la detección del intl2 y
Carril 1: Ladder: 1kb. Carril 2: muestra 4. Carril 3: muestra 19.*

Figura 5. Resultado de los productos de amplificación de detección del gen *intl1* e *intl2*



Resultado de los productos de amplificación de la detección del *intl1* y *intl2*. Carril 1: Ladder: 1kb. Carril 2: muestra 9. Carril 3: muestra 20. Carril 4: muestra 35.

d. DISTRIBUCIÓN DE LOS INTEGRONES EN LAS 35 MUESTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Durante el análisis de la presencia de los integrones se observó que éstos no son excluyentes entre las cepas testadas; en 18 (51,4%) de ellas se detectó el *Int1*, en 2 (5,7%) cepas se detectó solamente el *intl2*, en 3 (8,6%) cepas ambos integrones, mientras que 12 (34,3%) de ellas adolecieron de este tipo de integrones. (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de las clases de integrones en las muestras de *P. aeruginosa*.

Integrón	Frecuencia	Porcentaje	Frec. Acumulativa	Porc. Acumulativa
Ningún	12	34,3%	12	34,3%
<i>Int1</i>	18	51,4%	30	85,7%
<i>Int2</i>	2	5,7%	32	91,4%
Ambos	3	8,6%	35	100,0%
Total	35	100,0%		

e. ASOCIACIÓN DE LA MULTIRRESISTENCIA (MDR) CON LA PRESENCIA DE INTEGRONES (*int1*, *int2*) EN *Pseudomonas aeruginosa*

De las 24 cepas MDR, 16 presentan el *int1*, 2 el *int2*, 1 ambos, y 5 carecían de integrones.

De las 11 cepas No MDR, 2 presentaron el *int1*, no hubo presencia del *int2*, 2 presentaron ambos y 7 carecían de integrones. (Tabla 7)

La presencia de integrones tuvo una asociación significativa en el grupo de los MDR ($p < 0,05$), también se asoció estadísticamente al *int1* en el grupo de los MDR ($p < 0,05$). (Tabla 8)

Tabla 7. Presencia de integrones en los grupos de estudio de *P. aeruginosa*.

Frecuencia	Pct. Col	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	Ambos	Ningún	Total
MULTIRRESISTENCIA	MDR	16	2	1	5	24
	No MDR	2	0	2	7	11
		67%	8%	4%	21%	
		18%	0%	18%	64%	
Total		18	2	3	12	35

$$\chi^2 = 10,12$$

$$p=0,0$$

Tabla 8. Asociación del *int1* con la multirresistencia

Multirresistencia	<i>Int1</i>		Total
	SI	No	
MDR	16	8	24
No MDR	2	9	11
Total	18	12	35
$\chi^2 = 7,09$			$p=0,007$

f. PATRÓN DE RESISTENCIA DE LOS GRUPOS DE ANTIMICROBIANOS Y LA PRESENCIA DE INTEGRONES

Realizamos el antibiograma y la susceptibilidad a las 35 cepas, basándonos en las directrices del CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute; Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, (2020) (Anexo 10). Clasificando de esta manera el patrón de susceptibilidad de las *Pseudomonas aeruginosa* frente a los antimicrobianos utilizados, en dos grupos: resistentes y sensibles (Tabla 8).

Los grupos de antimicrobianos que utilizamos en las pruebas fueron las quinolonas, carbapenems, aminoglucósidos, cefalosporina de 3^{era} y 4^{ta} generación, penicilinas y monobactámicos.

El patrón de susceptibilidad fue asociado a la presencia de integrones, los cuales están descritos en la tabla 12. Observamos que el *int1* fue el prevalente en el grupo de los resistentes. El *int1* estuvo presente en un 63% en las resistentes a ciprofloxacino; 60% en resistentes a ofloxacino; 67% en resistentes meropenem, 62% en resistentes imipenem, 68% resistentes a tobramicina, 94% resistentes a amikacina, 68% resistentes

a gentamicina, 94% resistentes a ceftazidima, 94% resistentes a cefepime; 84% resistentes a piperacilina; 94% resistentes a piperacilina – tazobactam; 100% resistentes a aztreonam. En el grupo de los sensibles, se detectó el *int1* en una población muy reducida de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Sobre la correlación significativa entre el *int1* y el grupo de los resistentes en cepas de *P. aeruginosa*; con un 95% de confianza y un ($p < 0.05$) se obtuvo los siguientes resultados para, el ciprofloxacino ($p = 0.05$), imipenem ($p = 0.04$); tobramicina ($p = 0.001$) y gentamicina ($p = 0.001$). Por lo tanto, podríamos mencionar que el *int1* está asociado estadísticamente con la resistencia en los grupos de antimicrobianos mencionados.

Tabla 9. Resultado de la relación entre el grupo de antimicrobianos y la presencia de integrones.

ANTIMICROBIANOS	PATRON DE SUSCEPTIBILIDAD	Int1	Int2	Ambos	Ningún	Total	TOTAL	Chi cuadrado
CIPROFLOXACINO	RESISTENTES	15	2	1	6	24	35	p=0,05
	SENSIBLES	3	0	2	6	11		
OFLOXACINO	RESISTENTES	15	2	2	6	25	35	p=0,10
	SENSIBLES	3	0	1	6	10		
MEROPENEM	RESISTENTES	16	2	0	6	24	35	p=0,09
	SENSIBLES	4	0	3	4	11		
IMIPENEM	RESISTENTES	16	2	1	7	26	35	p=0,04
	SENSIBLES	2	0	2	5	9		
TOBRAMICINA	RESISTENTES	17	2	1	5	25	35	p=0,001
	SENSIBLES	1	0	2	7	10		
AMIKACINA	RESISTENTES	17	0	1	0	18	35	p=1,6
	SENSIBLES	1	2	2	12	17		
GENTAMICINA	RESISTENTES	17	2	1	5	25	35	p=0,001
	SENSIBLES	1	0	2	7	10		
CEFTAZIDIMA	RESISTENTES	15	0	1	0	16	35	p=4,28
	SENSIBLES	3	2	2	12	19		
CEFEPIME	RESISTENTES	15	0	1	0	16	35	P=3,84
	SENSIBLES	3	2	2	12	19		
PIPERACILINA	RESISTENTES	16	1	1	1	19	35	p=2,35
	SENSIBLES	2	1	2	11	16		
PIPERACILINA-TAZOBACTAM	RESISTENTES	15	0	1	0	16	35	p=4,28
	SENSIBLES	3	2	2	12	19		
AZTREONAM	RESISTENTES	12	0	0	0	12	35	p=3,28
	SENSIBLES	6	2	3	12	23		

IV. DISCUSIÓN

Los integrones garantizan a las *Pseudomonas aeruginosa* una respuesta rápida y “bajo demanda” a las tensiones ambientales, que impulsan una adaptación y una consecuente evolución bacteriana, por eso son los actores clave en la diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos.

El uso inadecuado de antimicrobianos ha impulsado a la evolución de las bacterias intrahospitalarias multirresistentes, creando un problema de salud pública mundial; esto ha venido generando como consecuencia un aumento de la morbilidad y mortalidad en infecciones intrahospitalarias, (Joao Botelho et al. 2019). En los resultados obtenidos, (tabla 6) muestran que más del 50% de *P. aeruginosa* eran multirresistentes y más del 50% de éstas presentaron el *intl1*, evidenciando su asociación. Además, el *intl1* fue el más detectado frente al *intl2* (tabla7). Se ha evidenciado que en más del 15% de bacterias gram – negativas MDR poseen integrones, y la mayoría son integrón de clase 1 (Mi liu, et al. 2020), está ampliamente distribuido en patógenos de entornos clínicos (denominados integrones de clase 1 “clínicos), se encuentran incrustados en diversos transposones y plásmidos conjugativos, lo que les permite su rápida diseminación a través de la THG, extendiéndose en casi todas las gram – negativas (Gillings et al. 2008). La característica del integrón de clase 1, es que comparte una secuencia de *intl1* altamente conservada. (Gilling et al 2015). Esto implica que un solo evento de transposición fue el evento

inicial para dar lugar a su propagación con éxito en diversas especies bacterianas y ahora universalmente presentes en las bacterias nosocomiales MDR, evidenciándose una adquisición de más de 130 genes de resistencia relacionados con aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol, macrólidos, sulfonamidas, desinfectantes. Botín de Céline (2018). Se ha evidenciado su presencia en diferentes plásmidos y en transposones ancestrales, tales como, el *Tn 21* y *Tn 402* y sus derivados, que han tenido una participación central en la diseminación mundial de genes de resistencia. (Liebert CA, et al. 2010) Ha habido diversos reportes del *intl1* en *Pseudomonas aeruginosa* como un factor importante para la aparición de cepas MDR, como los datos obtenidos por Ebrahimpour (2018) que detectó al *intl1* predominante en cepas *P. aeruginosa* multirresistentes, así mismo Ahmadian (2020), obtuvo reportes similares, donde el 30% de *P. aeruginosa* que tenían el *intl1*, el 43,3% fueron multirresistentes.

Se evidenció que el *intl1* estuvo presente en todos los grupos que fueron resistentes a los antimicrobianos utilizados en este estudio (Tabla 12) Esto se demuestra porque el gen que codifica a la integrasa del *intl1*, puede proporcionar una “adaptación según demanda”, Escudero et al. (2015). Esta hipótesis planteada, menciona que una bacteria que tiene en su genoma el *intl1* tiene la capacidad de reorganizar los casetes genéticos en entornos estresantes, que les permite optimizar su expresión y maximizar su aptitud: se pueden adelantar casetes útiles para garantizar la máxima expresión, mientras

que los casetes innecesarios se pueden mantener al final de la matriz como memoria almacenada. El objetivo de esta reorganización de casetes le confiere a la integrasa el poder de adaptarse rápidamente a nuevos desafíos contra los antimicrobianos, aumentando su capacidad para adquirir nuevos casetes de genes de resistencia. Por lo tanto, con los resultados obtenidos, podemos inferir que la presencia de los integrones aceleran la evolución de la multirresistencia a los antimicrobianos; por esta razón, en lo analizado se evidenció la presencia del *int1* en todos los grupos resistentes a antimicrobianos utilizados como las quinolonas, aminoglucósidos, carbapenems, aminoglucósidos, cefalosporinas y penicilinas.

De otro lado, el *int1* estuvo presente en más del 60% de las cepas multirresistentes a aminoglucósidos y carbapenems (que fue el grupo que presentó mayor porcentaje de resistencia frente a los demás). Esto se corrobora con Meletis et al (2018) que demostró que los patógenos nosocomiales Gram negativos resistentes a carbapenems, vienen acumulando diversos genes de resistencia encontrados en *intl*, dentro de las familias de las metalo – β - lactamasas más comunes, incluyen la metalo – β - lactamasas 1 de Nueva Delhi (NDM-1), que son las carbapenemasas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem; los genes que codifican a estas enzimas a menudo se encuentran dentro de los integrones. En Ecuador (INSPI, 2019) se ha reportado un aumento de la resistencia de PAMR a carbapenémicos: imipenem, meropenem; teniendo como principal mecanismo de resistencia, la transferencia horizontal de genes. Así mismo; en un estudio de

secuenciación efectuado por Mahjabeen Khan (2020), se evidenció la presencia de genes que condicionan resistencia frente a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenems transportados por el *int1*.

También obtuvimos como resultado, que en el grupo de las multirresistentes había muestras que no presentaron ningún integrón, indicando que dicha resistencia son independientes a la presencia de integrones; este resultado es coincidente con el estudio realizado por Berhane y Meniyamer (2015), dónde concluyen que no siempre la presencia de integrones está relacionada a la multirresistencia de una bacteria; además de ello se sugiere considerar la presencia de otros elementos genéticos como transposones o plásmidos, etc, como responsables de la multirresistencia.

Además, obtuvimos la presencia del *int1* en el grupo de los No MDR, esto es interesante, y lo menciona Leila Ahmadian et al. 2020 en su estudio, que encontró un pequeño porcentaje que obtuvo el *int1* y eran cepas no MDR, por lo que lo asoció como un factor de riesgo para esa *P. aeruginosa* de presentar posteriormente la multirresistencia.

V. LIMITACIONES

La principal limitación es no contar con la secuenciación de los genes de resistencia, ya que realizarlo es muy costoso.

VI. CONCLUSIONES

- a. De las 35 cepas de *P. aeruginosa*, 24 (68,6%) fueron multirresistentes, de las cuales el 67% estuvieron asociadas con la presencia del *int1*.
- b. Se obtuvo un 65.7% de cepas, las cuales demostraron ser poseedoras del *int1* e *int2*; mientras que un 21% no presentaron ninguno de los integrones.
- c. La presencia del *int1* e *int2*, con el patrón de susceptibilidad, se evidenció que el *int1* estuvo presente en todas bacterias resistentes.

VII. RECOMENDACIONES

- i. Se debería realizar la secuenciación de los genes de resistencia asociados a cada uno de los integrones estudiados.
- ii. Se sugiere realizar estudios moleculares con el propósito de predecir el comportamiento de las resistencias a futuro.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allcock S, Young EH, Holmes M, Gurdasani D, Dougan G, Sandhu MS, et al. Antimicrobial resistance in human populations: challenges and opportunities. *Glob Health Epidemiol Genomics* [Internet]. 10 de mayo de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5732576/>
2. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 8 de abril de 2021;72(7):e169-83.
3. Elkhatib WF, Khalil MAF, Ashour HM. Integrons and Antiseptic Resistance Genes Mediate Resistance of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Intensive Care Unit Patients with Wound Infections. *Curr Mol Med*. 2019;19(4):286-93.
4. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Mol Basel Switz*. 16 de marzo de 2020;25(6).
5. Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic area: comparison with global data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. julio de 2018;37(7):1211-20.
6. Hosseini SMJ, Naeini NS, Khaledi A, Daymad SF, Esmaili D. Evaluate the Relationship Between Class 1 Integrons and Drug Resistance Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Open Microbiol J*. 30 de noviembre de 2016;10:188-96.
7. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*. febrero de 1995;15(4):593-600.
8. Gillings MR. Integrons: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. junio de 2014;78(2):257-77.
9. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev*. 18 de septiembre de 2019;32(4).

10. De R, Mukhopadhyay AK, Dutta S. Molecular Analysis of Selected Resistance Determinants in Diarrheal Fecal Samples Collected From Kolkata, India Reveals an Abundance of Resistance Genes and the Potential Role of the Microbiota in Its Dissemination. *Front Public Health*. 2020;8:61.
11. Salimizadeh Z, Hashemi Karouei SM, Hosseini F. Dissemination of Class 1 Integron among Different Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Med Lab J*. 10 de julio de 2018;12(4):36-42.
12. Barrantes K, Achí R. The importance of integrons for development and propagation of resistance in *Shigella*: the case of Latin America. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol*. diciembre de 2016;47(4):800-6.
13. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. abril de 2004;10(4):272-88.
14. Michael CA, Labbate M. Gene cassette transcription in a large integron-associated array. *BMC Genet*. 15 de septiembre de 2010;11:82.
15. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol*. julio de 2007;15(7):301-9.
16. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Biskri L, Bouige P, Mazel D. Comparative analysis of superintegrons: engineering extensive genetic diversity in the *Vibrionaceae*. *Genome Res*. marzo de 2003;13(3):428-42.
17. Huyan J, Tian Z, Zhang Y, Zhang H, Shi Y, Gillings MR, et al. Dynamics of class 1 integrons in aerobic biofilm reactors spiked with antibiotics. *Environ Int*. julio de 2020;140:105816.
18. Rojas-Adrianzén C, Pereyra-Elías R, Mayta-Tristán P. Prevalencia y factores asociados a la compra de antimicrobianos sin receta médica, Perú 2016. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. septiembre de 2018;35:400-8.
19. Mendes Moreira A, Couvé-Deacon E, Bousquet P, Chainier D, Jové T, Ploy MC, et al. Proteae: a reservoir of class 2 integrons? *J Antimicrob Chemother*. 1 de junio de 2019;74(6):1560-2.
20. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2018;31(4).

21. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* julio de 2009;33(4):757-84.
22. Li Y, Yang L, Fu J, Yan M, Chen D, Zhang L. Genotyping and high flux sequencing of the bacterial pathogenic elements - integrons. *Microb Pathog.* marzo de 2018;116:22-5.
23. Manzur Soria M del R, Bustamante Z, Gonzales G. PRESENCIA DE INTEGRONES Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*. *Gac Médica Boliv.* 2007;30(1):5-12.
24. Rodolfo H, Arcia A, Hernández A, Michelli E, Martínez DDV, Guzmán M, et al. Virulence factors and integrons are associated with MDR and XDR phenotypes in nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a Venezuelan university hospital. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2019;61:e20.
25. Zarei-Yazdeli M, Eslami G, Zandi H, Kiani M, Barzegar K, Alipanah H, et al. Prevalence of class 1, 2 and 3 integrons among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Yazd, Iran. *Iran J Microbiol.* octubre de 2018;10(5):300-6.
26. Makhboroda R, Zariana E. Caracterización de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. 9 de junio de 2020. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/18002>
27. Mobaraki S, Aghazadeh M, Soroush Barhaghi MH, Yousef Memar M, Goli HR, Gholizadeh P, et al. Prevalence of integrons 1, 2, 3 associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Northwest of Iran. *BioMedicine.* Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5825915/>
28. Riveros Ramirez MD. Identificación y caracterización de integrones asociados a la resistencia antimicrobiana, en aislados de *Escherichia coli* provenientes de niños menores de dos años con diarrea y bacteremia de Lima, Perú. Univ Nac Mayor San Marcos
29. Angles-Yanqui E, Huaranga-Marcelo J, Sacsquispe-Contreras R, Pampa-Espinoza L. Panorama de las carbapenemasas en Perú. *Rev Panam Salud Pública* Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7498286/>
30. Hernández A, Yagüe G, Vázquez EG, Simón M, Parrado LM, Canteras M, et al. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente

- incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. Rev Esp Quimioter. abril de 2018;31(2):123-30.
32. Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. Rev Panam Salud Pública. 22 de agosto de 2019;43:e65.
 33. Gholizadeh P, Maftoon H, Aghazadeh M, Asgharzadeh M, Kafil HS. Current opinions in the infection control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae species and Pseudomonas aeruginosa. Rev Med Microbiol. julio de 2017;28(3):97-103.
 34. Ortiz Cabanillas P. Acerca del Código de Ética y Deontología del Colegio Médico del Perú: fundamentos teóricos. Acta Médica Peru. enero de 2008;25(1):46-7
 35. WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Estructura típica del integrón de clase 1

Anexo 1. Estructura del *intI1*

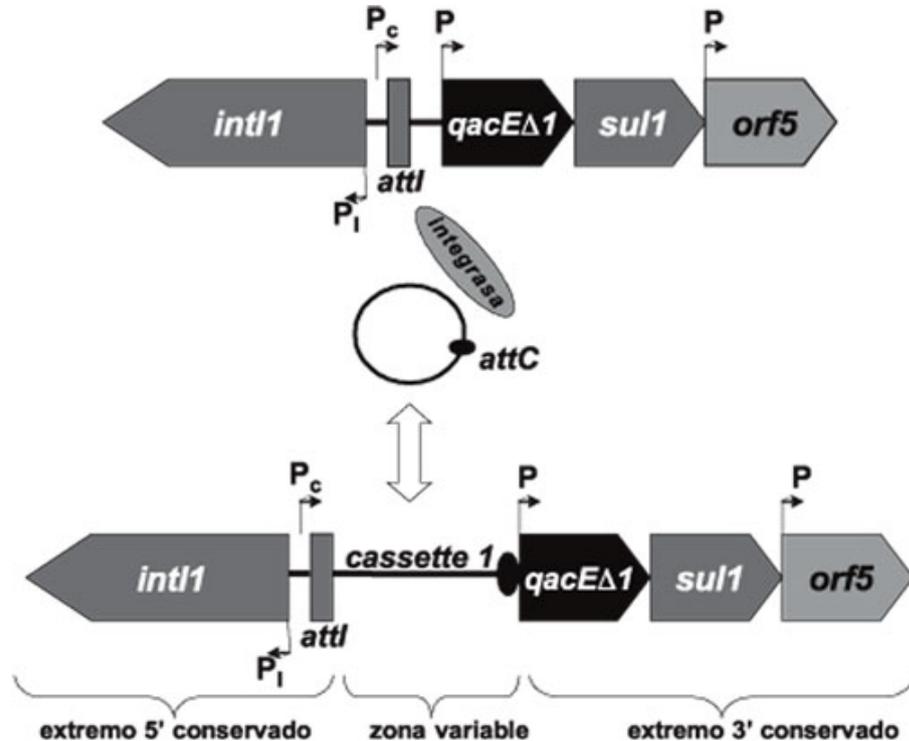
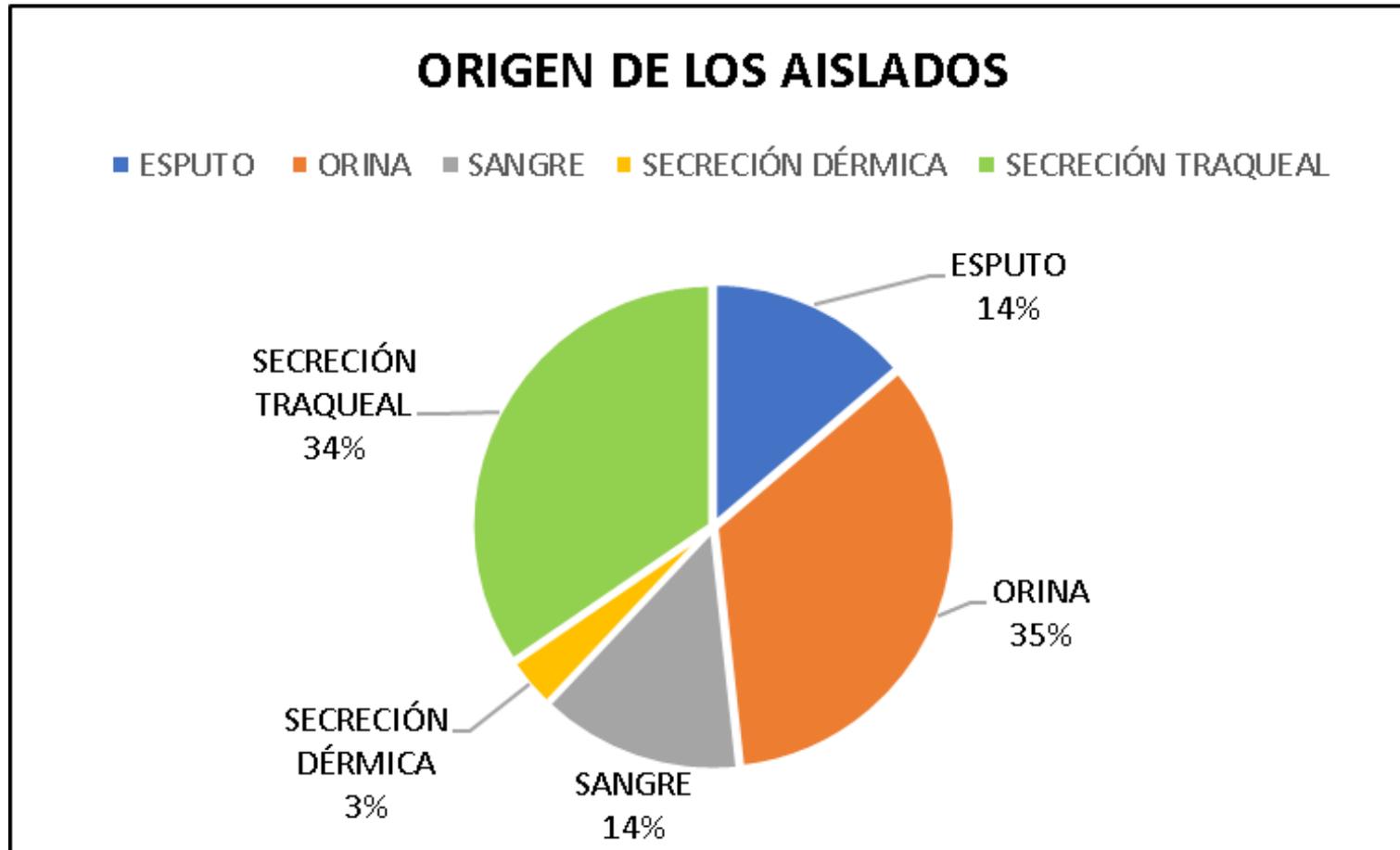


Figura 1. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. *intI1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados; P_I : promotor que transcribe la integrasa; P_c : promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados. *attC*: sitio de recombinación del *cassette* genético (esquema no dibujado a escala).

ESTRUCTURA DEL INTEGRÓN DE CLASE 1 (imagen extraída de: González

R G, Mella M S, Zemelman Z R, Bello T H, Domínguez Y M. *Integrones y cassettes genéticos de resistencia*).

Anexo 2. Origen de los aislados clínicos de *Pseudomona aeruginosa*.



Anexo 3. Codificación, fecha de colecta de muestra, datos demográficos y origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* empleados en el presente estudio.

CB	Código Hospital	Fecha Muestra	Sexo paciente	Origen de los aislados
CB-501	08740418	25/04/2018	M	Orina
CB-502	05550718	22/07/2018	F	Orina
CB-503	02720518	11/05/2018	F	Secreción dérmica
CB-504	05040718	20/07/2018	M	Orina
CB-505	08410418	24/04/2018	F	Secreción traqueal
CB-508	09200518	31/05/2018	F	Sangre
CB-509	04111118	14/11/2018	F	Secreción traqueal
CB-510	03691118	12/11/2018	F	Secreción traqueal
CB-511	02761118	11/11/2018	F	Sangre
CB-512	10030319	27/03/2018	M	Secreción traqueal
CB-516	02800918	10/09/2018	F	Secreción traqueal
CB-517	07060518	24/05/2018	M	Esputo
CB-518	08770918	28/09/2018	F	Sangre
CB-519	05590718	19/07/2018	F	Secreción traqueal
CB-520	05960518	18/05/2018	F	Orina

***CB-**: Colección Bacteriana; **F**: Femenino; **M**: Masculino

Anexo 4. Categorías interpretativas y puntos de halos de inhibición según CLSI 2020.

Table 2B-1. *Pseudomonas aeruginosa* (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
O	Piperacillin	100 µg	≥21	15–20 ^A	≤14	≤16	32–64 ^A	≥128	(6) Breakpoints for piperacillin (alone or with tazobactam) are based on a piperacillin dosage regimen of at least 3 g administered every 6 h.
β-LACTAM COMBINATION AGENTS									
A	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	15–20 ^A	≤14	≤16/4	32/4–64/4 ^A	≥128/4	(7) Breakpoints for piperacillin (alone or with tazobactam) are based on a piperacillin dosage regimen of at least 3 g administered every 6 h.
B	Ceftazidime-avibactam	30/20 µg	≥21	–	≤20	≤8/4	–	≥16/4	(8) Breakpoints are based on a dosage regimen of 2.5 g (2 g ceftazidime + 0.5 g avibactam) administered every 8 h over 2 h.
B	Ceftolozane-tazobactam	30/10 µg	≥21	17–20 ^A	≤16	≤4/4	8/4 ^A	≥16/4	(9) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1.5 g administered every 8 h.
O	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥24	16–23 ^A	≤15	≤16/2	32/2–64/2 ^A	≥128/2	(10) Breakpoints for ticarcillin (alone or with clavulanate) are based on a ticarcillin dosage regimen of at least 3 g administered every 6 h.
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
A	Ceftazidime	30 µg	≥18	15–17 ^A	≤14	≤8	16 ^A	≥32	(11) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1 g administered every 6 h or 2 g administered every 8 h.
B	Cefepime	30 µg	≥18	15–17 ^A	≤14	≤8	16 ^A	≥32	(12) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1 g administered every 8 h or 2 g administered every 12 h.
Inv.	Cefiderocol	30 µg	≥18	13–17 ^A	≤12	≤4	8 ^A	≥16	(13) Breakpoints are based on a dosage regimen of 2 g every 8 h administered over 3 h.
MONOBACTAMS									
B	Aztreonam	30 µg	≥22	16–21 ^A	≤15	≤8	16 ^A	≥32	(14) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1 g administered every 6 h or 2 g administered every 8 h.

Table 2B-1. *Pseudomonas aeruginosa* (Continued)

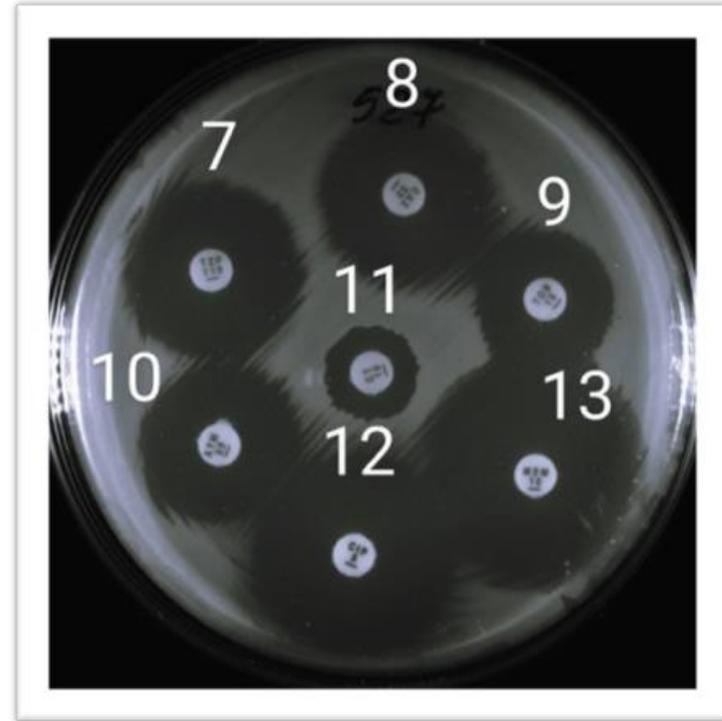
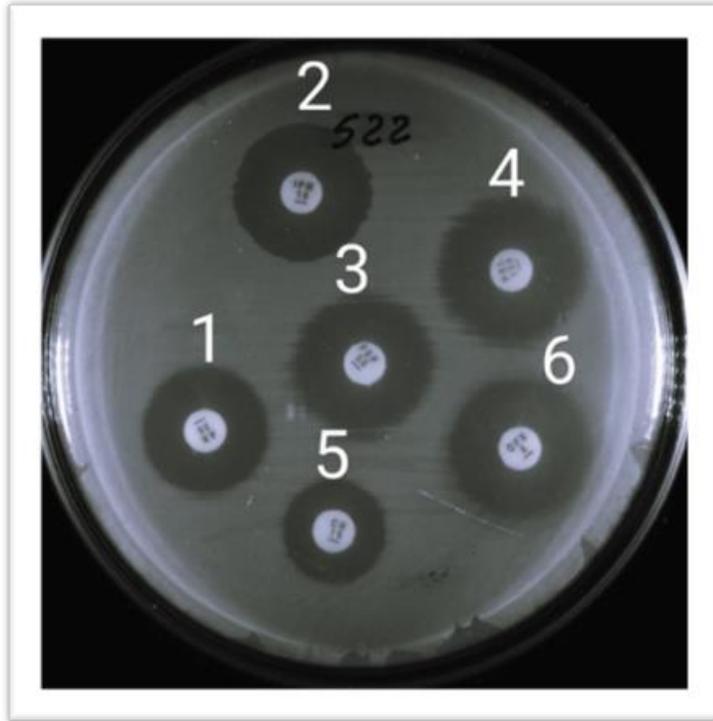
Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
CARBAPENEMS									
B	Doripenem	10 µg	≥19	16–18 ^A	≤15	≤2	4 ^A	≥8	(15) Breakpoints for doripenem are based on a dosage regimen of 500 mg administered every 8 h.
B	Imipenem	10 µg	≥19	16–18 ^A	≤15	≤2	4 ^A	≥8	(16) Breakpoints for imipenem are based on a dosage regimen of 1 g administered every 8 h or 500 mg administered every 6 h.
B	Meropenem	10 µg	≥19	16–18 ^A	≤15	≤2	4 ^A	≥8	(17) Breakpoints for meropenem are based on a dosage regimen of 1 g administered every 8 h.
LIPOPEPTIDES									
(18) WARNING: Clinical and PK-PD data demonstrate colistin and polymyxin B have limited clinical efficacy, even if an intermediate result is obtained. Alternative agents are strongly preferred. Colistin and polymyxin B should be used in combination with one or more active antimicrobial agents. Consultation with an infectious diseases specialist is recommended.									
O	Colistin or polymyxin B	–	–	–	–	–	≤2	≥4	(19) Colistin (methanesulfonate) should be given with a loading dose and maximum renally adjusted doses (see International Consensus Guidelines ⁴).
		–	–	–	–	–	≤2	≥4	(20) Polymyxin B should be given with a loading dose and maximum recommended doses (see International Consensus Guidelines ⁴).

Table 2B-1. *Pseudomonas aeruginosa* (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
AMINOGLYCOSIDES									
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13–14 ^A	≤12	≤4	8 ^A	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13–14 ^A	≤12	≤4	8 ^A	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17	15–16 ^A	≤14	≤16	32 ^A	≥64	
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13–14 ^A	≤12	≤8	16 ^A	≥32	
FLUOROQUINOLONES									
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥25	19–24 ^A	≤18	≤0.5	1 ^A	≥2	(23) Breakpoints are based on a dosage regimen of 400 mg IV administered every 8 h.
B	Levofloxacin	5 µg	≥22	15–21 ^A	≤14	≤1	2 ^A	≥4	(24) Breakpoints are based on a dosage regimen of 750 mg administered every 24 h.
O	Lomefloxacin	10 µg	≥22	19–21 ^A	≤18	≤2	4 ^A	≥8	(25) For testing and reporting of urinary tract isolates only.
O	Norfloxacin	10 µg	≥17	13–16	≤12	≤4	8	≥16	See comment (25).
O	Ofloxacin	5 µg	≥16	13–15 ^A	≤12	≤2	4 ^A	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15–17 ^A	≤14	≤2	4 ^A	≥8	

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; **CAT**, colistin agar test; **CBDE**, colistin broth disk elution; I, intermediate; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; **PK-PD**, pharmacokinetic-pharmacodynamic; QC, quality control; R, resistant; S, susceptible.

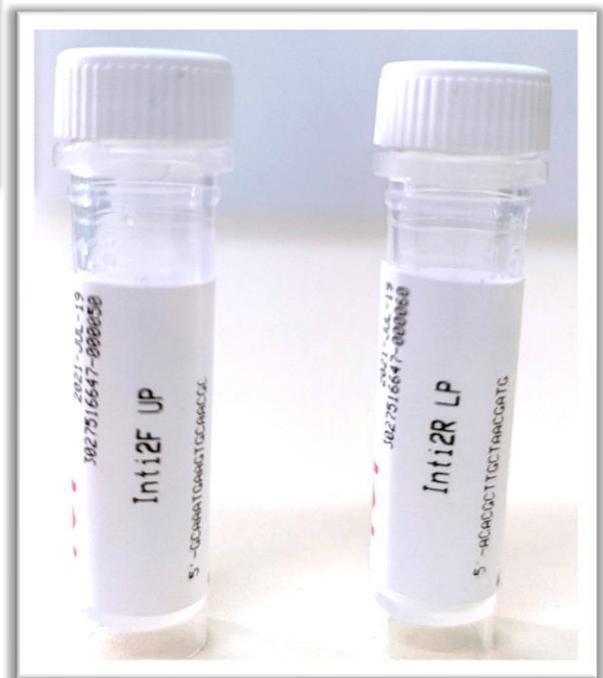
Anexo 5. Antibiograma obtenido por método de difusión por disco para la especie de *Pseudomonas aeruginosa*



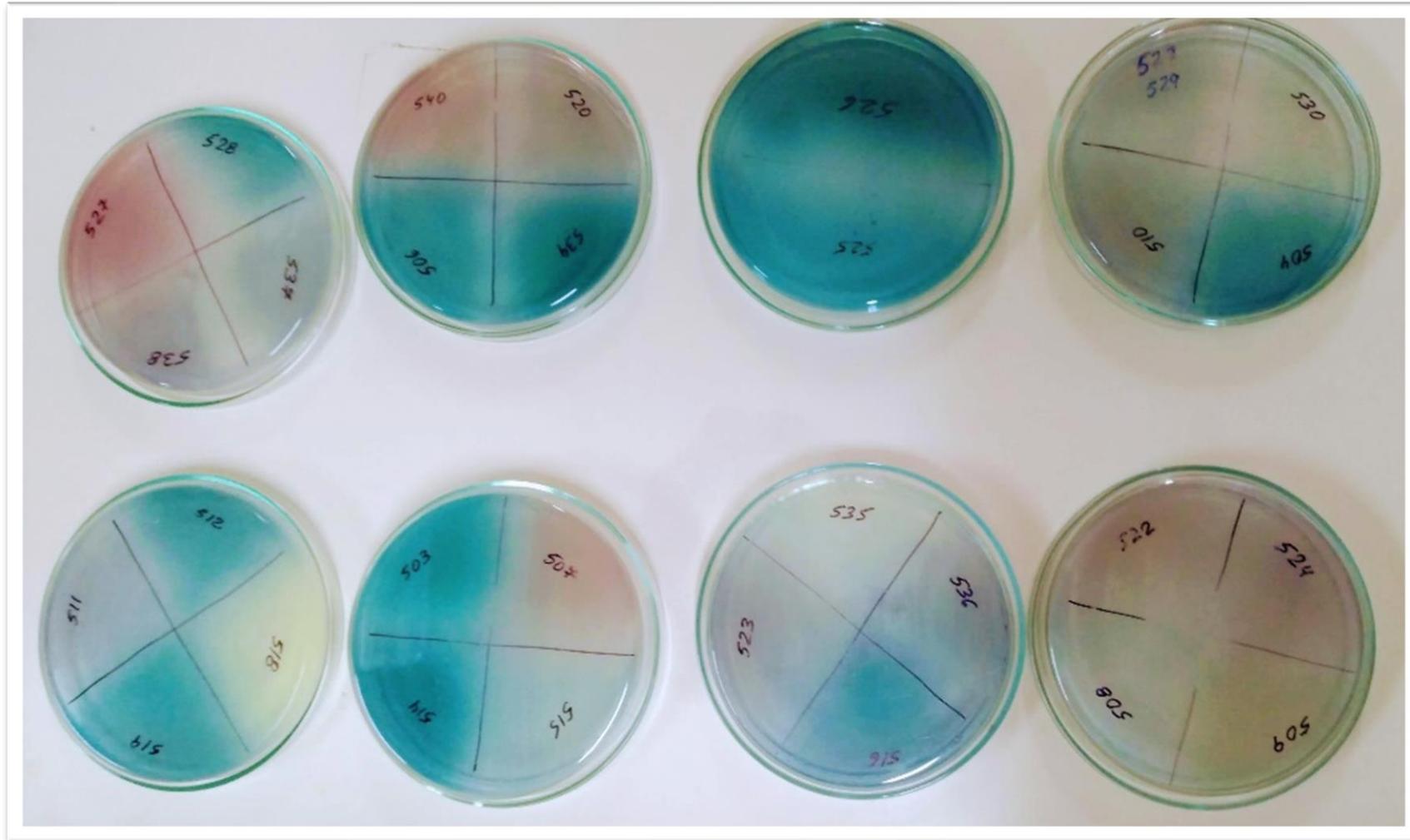
Los discos de antibióticos empleados fueron: **1**, amikacina; **2**, Imipenem; **3**, cefepime; **4**, piperacilina; **5**, gentamicina; **6**, ofloxacino; **7**, piperacilina-tazobactam; **8**, ceftazidima; **9**, tobramicina; **10**, aztreonam; **11**, colistina; **12**, ciprofloxacino; **13**, meropenem.

Anexo 6. Ficha técnica de los primers (int11 – int12) utilizados en el estudio, fabricados por Sigma-Aldrich.

Batch #	Oligo Name	Oligo #	Len	Pur	Scale	MW	Tm°	µg/OD	OD	µg	nmol	Epsilon 10(Mcm)	Dimer	2ndry	GC %	µl for 100µM	Sequence(5'-3')
VD09711579	OaPA F1	3027516647-000010	24	DST	0.05	7455	68.2	32.1	14.09	453.5	60.8	231.7	No	None	50	608	CTGGGTCGAAAGGTGGTTGTTATC
VD09711580	OaPA R1	3027516647-000020	20	DST	0.05	6206	76.9	34.1	11.86	405.1	65.3	181.7	No	None	75	652	GCGGCTGGTGC GGCTGAGTC
VD09711581	IntA UP	3027516647-000030	22	DST	0.05	6775	67.4	30.9	11.69	361.7	53.4	219.1	No	Strong	54.5	533	ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG
VD09711582	IntB LP	3027516647-000040	22	DST	0.05	6766	67.0	32.4	10.88	353.2	52.2	208.4	No	Weak	54.5	522	GTC AAGGTTCTGGAC CAGTTGC
VD09711583	Int12F UP	3027516647-000050	18	DST	0.05	5542	63.1	30.5	10.40	317.6	57.3	181.6	No	Weak	50	573	GCAAAATGAAGTGCACGCG
VD09711584	Int12R LP	3027516647-000060	18	DST	0.05	5484	60.1	31.8	10.26	327.1	59.7	172.1	No	None	50	596	ACACGGTTGCTAACGATG



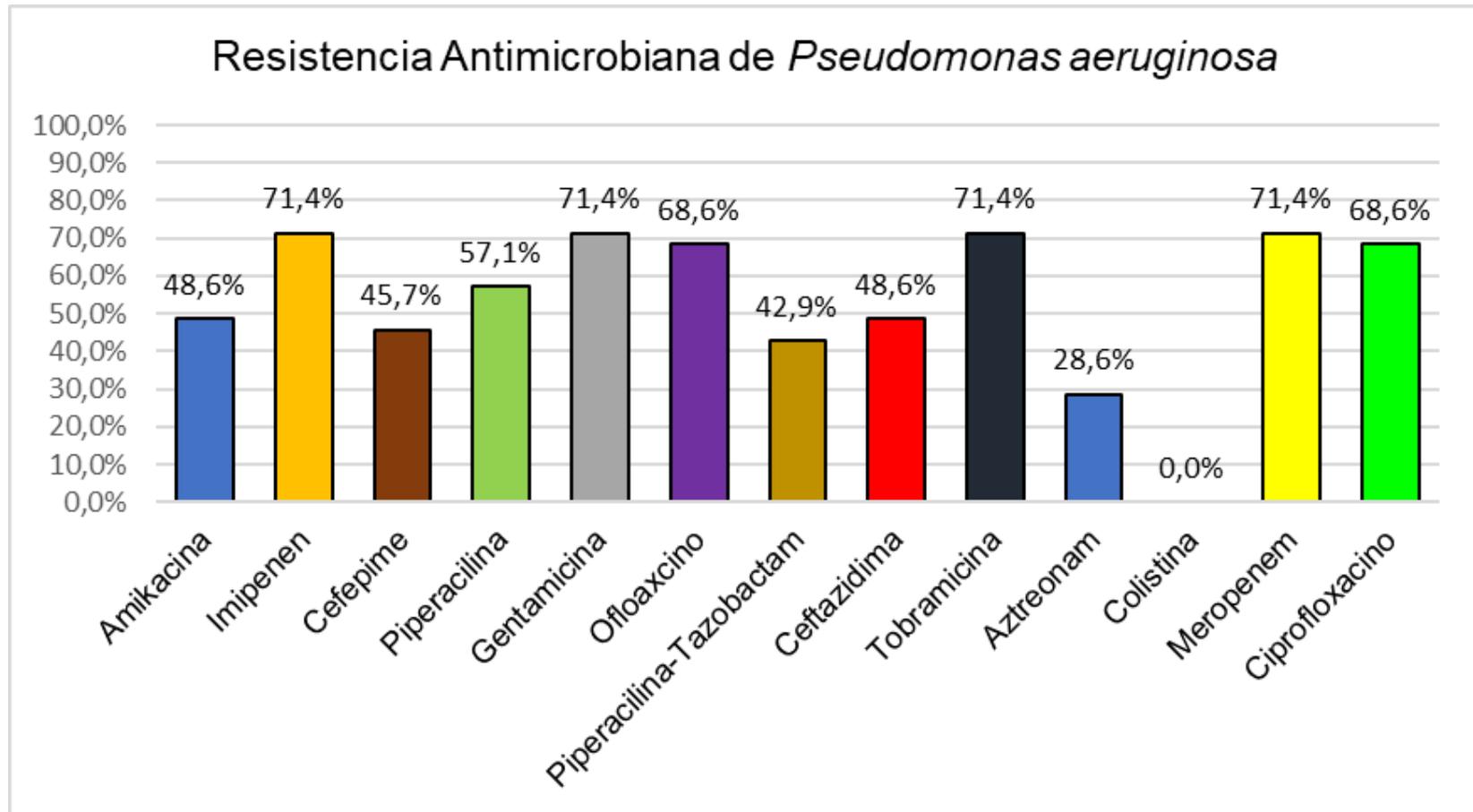
Anexo 7. Aspecto de colonias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre placas de Agar cetrimide



Anexo 8. Prueba bioquímica (TSI) empleada en la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*



Anexo 9. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos probados en la población total de *Pseudomonas aeruginosa*.



Anexo 10.Sensibilidad antimicrobiana obtenida en los aislados clínicos de Pseudomonas aeruginosa

ANTIBIÓTICOS

Código	TOB*		MEM*		TZP*		CAZ*		AMK*		GN*		IMP*		PIP*		OFL*		FEP*	
	Diámetro (mm)	Interpretación																		
503	6	R	13	R	21	S	21	S	18	S	6	S	8	R	15	R	6	R	20	S
504	6	R	14	R	21	S	24	S	20	S	6	S	10	R	16	R	6	R	23	S
505	6	R	6	R	12	R	6	R	8	R	6	S	6	R	8	R	6	R	6	R
506	20	S	15	R	25	S	26	S	21	S	15	S	12	R	25	S	14	S	21	S
509	22	S	28	S	24	S	25	S	20	S	16	S	23	S	24	S	14	S	21	S
510	6	R	29	S	26	S	25	S	15	S	6	S	24	S	21	S	21	S	22	S
511	6	R	6	R	9	R	6	R	6	R	6	S	6	R	10	R	6	R	6	R
512	6	R	11	R	22	S	24	S	18	S	6	R	12	R	19	S	6	R	20	S
513	6	R	6	R	15	R	6	R	6	R	6	S	6	R	6	R	6	R	6	R
514	21	S	36	S	30	S	26	S	20	S	15	S	25	S	30	S	6	R	22	S
515	6	S	15	R	20	S	6	R	14	R	6	S	10	R	15	R	14	S	15	S
516	11	R	14	R	14	R	25	S	13	R	6	S	28	S	15	R	6	R	11	S
517	6	R	20	S	26	S	25	S	20	S	6	S	15	R	23	S	10	S	24	S
518	20	S	15	R	26	S	25	S	21	S	15	S	15	R	25	S	25	S	24	S

***TOB**: tobramicina; **MEM**, Meropenem; **TZP**, piperacilina/tazobactam; **CAZ**, Ceftazidima **AMK**, Amikacina; **GN**, Gentamicina; **IMP**, Imipenem **PIP**: piperacilina; **OFL** ofloxacina; **FEP**, Cefepima; **R**, Resistente; **S**, Sensible.

ANTIBIÓTICOS

Código	TOB*		MEM*		TZP*		CAZ*		AMK*		GN*		IMP*		PIP*		OFL*		FEP*	
	Diámetro (mm)	Interpretación																		
519	6	R	14	R	21	S	20	S	18	S	6	R	10	R	15	R	6	R	20	S
520	21	S	31	S	27	S	25	S	23	S	19	S	24	S	25	S	26	S	25	S
521	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
522	21	S	31	S	26	S	24	S	21	S	15	S	22	S	22	S	24	S	21	S
523	21	S	34	S	27	S	27	S	22	S	18	S	25	S	26	S	25	S	25	S
524	22	S	26	S	25	S	23	S	16	S	16	S	21	S	20	S	14	S	15	S
525	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R
526	6	R	14	R	23	S	21	S	21	S	6	R	15	R	18	S	6	R	20	S
527	20	S	30	S	25	S	25	S	22	S	18	S	24	S	25	S	24	S	25	S
528	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	6	R	6	R
529	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R
530	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R
532	6	R	6	R	14	R	6	R	8	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R
533	6	R	6	R	15	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
534	6	R	15	R	23	S	20	S	20	S	6	R	11	R	24	S	6	R	24	S
535	6	R	6	R	14	R	6	R	13	R	6	R	12	R	14	R	6	R	6	R
536	6	R	6	R	20	S	6	R	6	R	6	R	6	R	15	R	6	R	6	R
537	6	R	6	R	12	R	6	R	6	R	6	R	6	R	12	R	6	R	6	R
538	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	6	R	15	R	6	R	6	R
539	6	R	6	R	13	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
540	22	S	28	S	24	S	22	S	22	S	18	S	24	S	22	S	23	S	23	S

*TOB: tobramicina, MEM, Meropenem; TZP, piperacilina/tazobactam; CAZ, Ceftazidima AMK, Amikacina; GN, Gentamicina; IMP, Imipenem; PIP: piperacilina; OFL ofloxacina; FEP, Cefepima. R, Resistente; S, Sensible.