



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría En Química Clínica Diagnóstica

“Estandarización de la técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) acoplado a nanopartículas de oro coloidal para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos en muestras de ADN de aislamientos clínicos”

Opción de titulación

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

QFB, Scarlette Dlydia Beltrán Hidalgo

Dirigido por:

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez

Centro Universitario

Querétaro, Querétaro.

Fecha: Noviembre, 2020.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Dedicado a mis padres y hermanos.

En memoria de mi hermano Humberto Raúl Beltrán Hidalgo.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

RESUMEN

La infección ocasionada por *P. aeruginosa*, resistente a carbapenémicos, causan miles de muertes en pacientes críticos, por no tener un tratamiento adecuado. Las técnicas de detección de este microorganismo, así como su sensibilidad a estos antibióticos son tardadas e inoportunas. Uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los carbapenémicos es la producción de la enzima imipenemasa, codificada por el gen *bla_{IMP}*. La detección molecular del gen *bla_{IMP}* por PCR es rápida, sin embargo, requiere de equipos sofisticados y personal especializado. En el año 2000, Notomi y col. describieron la técnica LAMP, la cual permite la amplificación de ADN con alta especificidad, sensibilidad, rapidez y sin el uso de equipo costoso. Recientemente se reportó el diagnóstico *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos mediante la técnica LAMP basada en el gen de *bla_{IMP}* (Kim y et al., 2016), analizado mediante una corrida electroforética. Por ello, el objetivo de este estudio fue implementar la técnica de LAMP acoplada a nanopartículas de oro (AuNP), para la detección visual del gen *bla_{IMP}* en muestras de ADN de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos de aislamientos clínicos. El resultado mostró que la reacción de LAMP se llevó a una temperatura óptima de 60 ° C durante 35 min. La detección de amplificación se realizó mediante la hibridación de una sonda de ADN monocatenario acopladas a AuNP, complementaria al ADN diana, seguida de agregación de partículas inducida por sal para visualizar el un cambio colorimétrico. Los resultados nos muestran que la unión del gen *bla_{IMP}* a la sonda en las AuNP causó un cambio de color de rosa a gris, visible a simple vista a 10 min de incubación con 400 mM de NaCl. El ensayo de LAMP/AuNP fue un método específico para el gen *bla_{IMP}* en *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, en comparación con el colorante HNB que causo falsos positivos. En conclusión, la técnica de LAMP acoplada a las AuNP es una alternativa de la técnica LAMP como un método visual, rápida, simple y específico para la detección de la amplificación del gen de resistencia bacteriana *bla_{IMP}* en muestras de ADN de *P. aeruginosa* de aislamientos clínicos.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia a carbapenémicos, *bla_{IMP}*, Imipenem, LAMP, nanopartículas de oro.

ABSTRACT

Carbapenem-resistant *P. aeruginosa* Infections causes thousands of death in critically ill patients, due to deficiency of treatment. The detection of sensitivity to these antibiotics are time very consuming and inconvenient. One of the most important mechanisms of carbapenem resistance is the production of the enzyme imipenemase, encoded by the *bla_{IMP}* gene. The molecular detection of the *bla_{IMP}* gene by PCR is rapid, however, it requires sophisticated equipment and specialized staff. In 2000, Notomi et al. described the LAMP technique, which allows DNA amplification with high specificity, sensitivity and speed. The rapid diagnosis of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* has been achieved using LAMP based on the *bla_{IMP}* gene (Kim, et al., 2016), however, it results in an amplified product that requires an electrophoretic run. Therefore, the objective of this study was to implement the LAMP technique coupled to gold nanoparticles (AuNP), for the visual detection of the *bla_{IMP}* gene in DNA samples of *P. aeruginosa* carbapenem-resistant from clinical isolates. According to the methodology, the LAMP reaction was set up at 60 ° C for 35 min. Detection of DNA signals was performed with hybridization of a single-stranded DNA probe, coupled to AuNP, complementary to the target DNA, followed by salt-induced particle aggregation to visualize a colorimetric change. The results show us that the binding of the *bla_{IMP}* gene with the probe in the AuNP caused a color change from pink to gray, visible to the naked eye after 10 minutes of incubation with 400 mM NaCl. The LAMP / AuNP assay was a specific method for the *bla_{IMP}* gene in *P. aeruginosa* carbapenem-resistant, compared to the HNB dye that caused false positives. In conclusion, the LAMP technique coupled to AuNP has proven to be a rapid, simple and specific visual technique in the amplification of the *bla_{IMP}* bacterial resistance gene in *P. aeruginosa* DNA samples.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant, *bla_{IMP}*, Imipenem, LAMP, goldnanoparticles.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
MARCO TEÓRICO.....	1
1.2 PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.3 ANTECEDENTES.....	3
1.3.1 Infecciones Asociadas en la Atención de la Salud (IAAS)	3
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.3.2.1 Generalidades	5
1.3.2.2 Epidemiología.....	7
1.3.2.3 Virulencia	8
1.3.2.4 Tratamiento para infecciones por <i>P. aeruginosa</i>	10
1.3.2.4.1 Resistencia a antibióticos	11
1.3.2.5 Betalactámicos.....	12
1.3.2.5.1 Mecanismo de acción de betalactámicos	14
1.3.2.5.2 Mecanismos de resistencia a betalactámicos.....	16
1.3.2.6 Carbapenémicos	17
1.3.2.6.1 Mecanismo de acción de carbapenémicos	18
1.3.2.6.2 Epidemiología de resistencia a carbapenémicos.....	19
1.3.2.6.3 Resistencia a carbapenémicos	20
1.3.2.6.3.1 Betalactamasas.....	21
1.3.2.6.4..... Técnicas de diagnóstico para la resistencia a carbapenémicos.....	24
1.3.3 Amplificación isotérmica mediada por horquillas	26
1.3.3.1 <i>Bst</i> ADN polimerasa	30
1.3.3.2 Ventajas de la técnica LAMP	31
1.3.3.3 Aplicaciones de LAMP	32

1.3.3.4	Detección de amplificación.....	35
1.3.3.4.1	Nanopartículas de oro	37
1.3.3.4.2	Detección colorimétrica de ADN por AuNP.....	41
1.4	JUSTIFICACIÓN.....	43
1.5	HIPOTESIS.....	44
1.6	OBJETIVOS.....	45
1.6.1	Objetivo general.....	45
1.6.2	Objetivos particulares	45
MATERIALES Y MÉTODOS		46
1.7	DISEÑO	46
1.7.1	Definición del universo.....	46
1.7.2	Tamaño de muestra.....	46
1.7.3	Variables de inclusión, exclusión y eliminación	46
1.7.4	Definición de variables y unidades de medida.....	46
1.8	METODOLOGÍA	47
1.8.1	Amplificar el gen <i>bla_{IMP}</i> a partir ADN de <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a carbapenémicos.....	47
1.8.1.1	Ácidos nucleicos.....	47
1.8.1.2	Cebadores para la amplificación del gen <i>bla_{IMP}</i>	48
1.8.1.3	Amplificación del gen <i>bla_{IMP}</i>	49
1.8.2	Aplicar la técnica LAMP para la amplificación del gen <i>bla_{IMP}</i> a partir de ADN de <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a carbapenémicos.	51
1.8.2.1	Reacción LAMP para el gen <i>bla_{IMP}</i>	51
1.8.3	Desarrollar la detección visual de amplificación por LAMP acoplado a nanopartículas de oro, del gen <i>bla_{IMP}</i> a partir de ADN de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> con resistencia a carbapenémicos.	53
1.8.3.1	Sonda complementaria al producto de LAMP	53
1.8.3.2	Preparación la sonda	53
1.8.3.3	Acoplamiento covalente de sondas a las AuNP	53
1.8.3.4	Espectrofotometría UV – Vis de las AuNP	54

1.8.3.5 Hibridación y detección de productos de LAMP	54
1.9 BIOÉTICA	55
1.9.1 Bioseguridad en el laboratorio	56
1.10 RESULTADOS Y DISCUSIONES	58
1.10.1 Amplificar el gen <i>bla</i> _{AMP} a partir ADN de <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a carbapenémicos.....	59
1.10.2 Detección del gen <i>bla</i> _{AMP} a partir de ADN de <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a carbapenémicos mediante la técnica LAMP.	63
1.10.3 Desarrollar la detección visual de amplificación por LAMP acoplado a nanopartículas de oro, del gen <i>bla</i> _{AMP} a partir de ADN de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> con resistencia a carbapenémicos.	70
1.11 CONCLUSION	80
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	81
ANEXOS	105

ÍNDICE DE CUADROS

1. Estructura general de betalactámicos	13
2. Características de <i>Bst</i> polimerasa y <i>Taq</i> polimerasa.	30
3. Variables y unidades de medida del diseño.	46
4. Diseños de cebadores LAMP para la detección del gen <i>bla</i> _{IMP}	48
5. Concentraciones de reactivos para PCR.	49
6. Temperaturas de amplificación por PCR.....	49
7. Concentraciones de los reactivos para LAMP.....	51
8. Análisis bioinformático de cebadores de LAMP para el gen <i>bla</i> _{IMP}	60

Dirección General de Bibliotecas de la UNQ

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Etapas de formación de la pared celular en bacterias Gram negativas.	15
2. Mecanismo de acción de los betalactámicos	16
3. Esquema de la unión de los cebadores al ADN	27
4. Principio de la técnica de LAMP	30
5. Diseño de cebadores para la técnica de LAMP para el gen <i>bla_{IMP}</i> en las secuencias de nucleótidos de ADN de <i>P. aeruginosa</i> y su ubicación dentro del genoma.	35
6. Modelo estructural de una nanopartícula en solución coloidal	38
7. Representación de la estabilización de AuNP, de tipo estérica (A), electroestática (B) y electroestática - estérica (C).	39
8. Esquema de la oscilación del plasmón superficial para una esfera de oro	40
9. Visualización colorimétrica de diluciones de productos de reacción LAMP con colorante HNB	52
10. Detección del gen <i>bla_{IMP}</i> en <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a carbapenémicos mediante la técnica de PCR	61
11. Gradiente de temperatura para la amplificación del gen <i>bla_{IMP}</i> de <i>P. aeruginosa</i> mediante la técnica de PCR	62
12. Amplificación del gen <i>bla_{IMP}</i> de muestras de ADN de <i>P. aeruginosa</i> mediante la técnica de PCR	63
13. Electroforesis en gel de agarosa para producto de LAMP del gen <i>bla_{IMP}</i>	64
14. Gradiente de temperatura para la amplificación del gen <i>bla_{IMP}</i> de <i>P. aeruginosa</i> mediante la técnica de LAMP	65
15. Optimización del tiempo de reacción de LAMP utilizando una plantilla de ADN de <i>P. aeruginosa</i> resistente a imipenem portador del gen <i>bla_{IMP}</i> a diferentes concentraciones	66
16. Amplificación del gen <i>bla_{IMP}</i> de muestras de ADN de <i>P. aeruginosa</i> mediante la técnica de LAMP	67
17. Detección visual de amplificación del gen <i>bla_{IMP}</i> por la técnica de LAMP con HNB	69

18. Espectros de absorción UV - Vis de las AuNP donadas. A) AuNP desnudas, B) AuNP + PEG ditiol.	71
19. Espectro de absorción UV - Vis del complejo de AuNP - PEG – ADN	72
20. Fotografías de AuNP-PEG-Ditiol adicionado con sal e incubación a 60 ° C por 10 min	73
21. Optimización del efecto de las concentraciones de NaCl en AuNP- ADN, sin plantilla.	75
22. Optimización del efecto de las concentraciones de NaCl en AuNP- ADN y plantilla de ADN.....	76
23. Comparación de la electroforesis en gel de agarosa para la detección de productos LAMP y las fotografías el ensayo basado en AuNP.	78

Dirección General de Bibliotecas de la UNQ

MARCO TEÓRICO

1.2 PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bacterias resistentes a múltiples fármacos se han extendido por todo el mundo convirtiéndose en un problema de salud pública. La infección invasiva por *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) a menudo es mortal en ausencia de un tratamiento antibiótico adecuado (Miyoshi-Akiyama *et al.* , 2017). Debido a la diseminación de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos, por la producción de la enzima β -Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE, o ESBL por sus siglas en inglés), el siguiente grupo de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones son los carbapenémicos; sin embargo, durante la última década se han reportado resistencia a ellos (Gong *et al.* , 2018; Palmore & Henderson, 2014). La incidencia de cepas resistentes a carbapenémicos, entre los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, ha ido aumentando constantemente en los últimos años. Los carbapenémicos son antibióticos de la familia de los β -lactámicos que se considera la opción óptima de tratamiento para las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples fármacos (Li *et al.* , 2006).

En los 90's se descubrió la primera metalo- β -lactamasa, la enzima imipenemasa (IMP), codificada por el gen *bla_{IMP}* en *P. aeruginosa*, que le confería resistencia a carbapenémicos, particularmente a imipenem; el antibiótico de elección entre esta familia de antibióticos (Watanabe, 1991). Esta enzima muestra altas actividades hidrolíticas a antibióticos β -lactámicos de primera línea como penicilinas y cefalosporinas, incluso a carbapenémicos como imipenem (Walsh, Toleman, Poirel, & Nordmann, 2005). A partir su identificación, el gen *bla_{IMP}* se ha detectado en todo el mundo, siendo un mecanismo prevalente de resistencia a nivel mundial (Hong *et al.* , 2015).

La identificación rápida y confiable de la resistencia a los medicamentos es esencial para garantizar que el uso de antibióticos sea apropiado. El cultivo convencional sigue siendo el método para evaluar la resistencia a los antibióticos a

pesar de ser lento, requerir equipos de laboratorio sofisticados, control de calidad y producir resultados ambiguos. Además, el número de bacterias inoculadas afecta la concentración mínima inhibitoria del fármaco (CMI) (Bratu, Landman, Alam, Tolentino, & Quale, 2005). Recientemente se han desarrollado varios métodos moleculares basados en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para la detección del gen *bla_{IMP}* (McCracken *et al.*, 2019; Riccio *et al.*, 2000), estos ensayos facilitan la detección sensible y específica, pero requieren equipos especializados y costosos. En el año 2016 se desarrolló en Corea una prueba para la detección de *bla_{IMP}* basada en la técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (Loop-mediated isothermal amplification, en inglés, LAMP) (Kim, Kim, Lee, Yoon, & Yong, 2016). LAMP es una técnica de detección de ácidos nucleicos rápida y sencilla que se basa en la *Bst* polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de cadena en condiciones isotérmicas mediada por horquillas que se forman dado por cuatro cebadores específicos, lo que permite una alta sensibilidad y especificidad, sin la necesidad de equipos sofisticados, ni personal especializado (Notomi *et al.*, 2000). Se han utilizado distintos métodos de detección de la amplificación de ADN en esta técnica (Tomita, Mori, Kanda, & Notomi, 2008), no obstante, algunos de estos aumentan el tiempo y equipos necesarios para la obtención del resultado. Es por ello que actualmente se propone el uso de nanopartículas de oro (AuNP) acopladas con ADN monocatenario, para mejorar la detección en productos de LAMP por su alta especificidad, sensibilidad y una fácil interpretación visual por cambio colorimétrico (Arunrut *et al.*, 2016; Manajit, Longyant, Sithigorngul, & Chaivisuthangkura, 2018). Aun cuando la efectividad de identificar la resistencia a carbapenémicos ha sido probada a través del gen *bla_{IMP}* en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en Asia, es de nuestro interés utilizar esta técnica acoplada a un AuNP para la identificación visual de la presencia de este gen en ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos obtenidas en la región.

1.3 ANTECEDENTES

1.3.1 Infecciones Asociadas en la Atención de la Salud (IAAS)

Las IAAS son un problema de salud pública de gran trascendencia económica y social, se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad, lo que se traduce en un incremento en los días de hospitalización y costos de atención. Las IAAS son aquellas que se contraen en los establecimientos de salud (hospitales, clínicas, etc.) y por definición se presentan posterior a 48 horas de la admisión del paciente al hospital (Esposito & De Simone, 2017). Son causadas principalmente por un grupo de bacterias identificado bajo el acrónimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.*), bacterias oportunistas que se caracterizan por sobrevivir en las superficies, dispositivos médicos y por su alto grado de resistencia a antimicrobianos (OMS, 2011).

Según encuestas nacionales recientes de prevalencia de IAAS y datos de los programas de seguimiento de la bacteriemia hospitalaria de varios países europeos, se estima que estas infecciones afectan en promedio, a 1 de cada 20 pacientes hospitalizados, lo que corresponde a un total anual de 4.1 millones de pacientes; de estos aproximadamente 37,000 pacientes fallecen cada año en la Unión Europea por estas infecciones (OPS, 2012; Palmore & Henderson, 2014). Con frecuencia, las IAAS son difíciles de tratar porque son causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos (Giedraitienė, Vitkauskienė, Naginienė, & Pavilonis, 2011). En la Región de las Américas, los datos de Canadá indican que se contraen unas 220,000 infecciones hospitalarias anuales, que dan lugar a 8,000 muertes ($\approx 4\%$) relacionadas con esa causa (Zoutman *et al.*, 2003). En América Latina, se desconoce la prevalencia de enfermedad producida por estas infecciones. Los datos de los que se dispone son de trabajos puntuales, que reflejan situaciones específicas de los servicios de salud en algunos países como Argentina, Colombia, Brasil, entre otros, sin embargo, no hay datos nacionales oficiales; otros países tienen datos de los servicios de salud y datos nacionales; y en otros no realiza

vigilancia epidemiológica estructurada de las IAAS en los servicios de salud ni a nivel nacional. Esta diversidad de la información no permite evaluar el impacto de las acciones en la región (OPS & OMS, 2017).

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) es un sistema de vigilancia nacional epidemiológica, prevención y control de las infecciones intrahospitalarias, que se basa en una Norma Oficial Mexicana (NOM-045-SSA2-2005). El informe de la RHOVE en 2015, notificó 61,969 IAAS, donde de las 385 instituciones adscritas, solo 378 (98.2%) hizo al menos una captura de IAAS en el año. La mayor proporción de infecciones notificadas fueron bacteriemia (24.0%), neumonía (20.7%) e infección de vías urinarias (15.7%). Del total de IAAS notificadas, solo en el 56.3% (34,884) se logró identificar el agente etiológico; entre ellos los principales fueron: *Escherichia coli* (18.8%), *P. aeruginosa* (12.4%) y *Klebsiella pneumoniae* (9.5%). La bacteria *P. aeruginosa* ocupa el primer lugar de microorganismos identificados en unidades de terapia intensiva de adultos y niños. Además, es el agente etiológico más frecuente de infección del torrente sanguíneo, neumonía, infecciones; de vías urinarias, del sitio quirúrgico, de piel y tejidos blandos asociadas a la atención de la salud. Este patógeno representa el tercer lugar en causar de brotes en el país y es responsable del 10 al 15% de las infecciones nosocomiales en todo el mundo (Blanc, Petignat, Janin, Bille, & Francioli, 1998). La mortalidad de las IAAS que estas bacterias pueden causar, supera el 50% a nivel mundial, dado por la amplia resistencia a fármacos (Guimarães, Donalisio, Santiago, & Freire, 2011).

1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

El descubrimiento del género bacteriano *Pseudomonas* fue descrito por primera vez a finales del siglo XIX por el profesor Walter Migula del Instituto Karlsruhe en Alemania. El inicio del término "*Pseudomonas*" hace referencia etimológicamente a unas "falsas unidades o monadas" (Palleroni, 2010). El término "*aeruginosa*" surgió del investigador Schroeter en el año de 1872, éste hacía alusión a los colores

que la bacteria mostraba en ciertas condiciones de cultivo, un color similar como el cobre oxidado (verde azulado). Shroeter publicó que esto era debido a un pigmento soluble en agua, del cual posteriormente se conocería como piocianina (Hugh & Leifson, 1964).

Según su taxonomía, *P. aeruginosa* es una bacteria perteneciente al dominio Bacteria, siendo del filo Proteobacteria, en la clase Gamma Proteobacteria, a la Orden *Pseudomonadales* y a la familia *Pseudomonadaceae*. Debido a la estructura de su envoltura celular, forma parte del grupo de bacterias Gram negativas. Palleroni en 1973, reporta la clasificación genotípica basada en la secuenciación de la subunidad 16S del ARNr, en la que se analizó y dividió al género *Pseudomonas* en cinco subgrupos y sólo las especies más representativas del grupo 1 estarían dentro del género original, mientras que las otras terminarían siendo incluidas en otros géneros bacterianos como *Burkholderia*, *Xanthomonas* y *Comamonas* (Palleroni, *et al.* , 1973). La secuencia genómica de *Pseudomonas* contiene 5,770 fragmentos de lectura abiertos, de los cuales aproximadamente el 10% codifica para proteínas involucradas en procesos reguladores en la transcripción (Stover *et al.* , 2000).

1.3.2.1 Generalidades

P. aeruginosa es un patógeno ubicuo, oportunista y persistente en el medio ambiente. Es un bacilo recto con forma de bastón aproximadamente de 0,5-1 µm de diámetro y de 1,5-5 µm de largo. Según las pruebas bioquímicas para la identificación de esta bacteria es que es oxidasa y catalasa positiva. Se considera a esta especie como aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios aerobios con el oxígeno como aceptor final de electrones y medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones. Además, cuenta con un flagelo polar que le confiere la motilidad. Esta les permite responder a estímulos químicos (quimiotaxis), así como localizar substratos en bajas concentraciones (Barnaby Whitman, 2015). Se caracteriza por ser parte

del grupo de no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno, como acetato y amoníaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares (Strateva & Yordanov, 2009).

El crecimiento de *P. aeruginosa* presenta un brillo metálico y olor a fruta o tortilla. En cultivo celular secreta diversos pigmentos como piocianina, pioverdina, fluoresceína y piorrubina. Una característica muy común de esta especie es la producción de pigmentos fluorescentes bajo la luz ultravioleta de longitud de onda baja (254 nm), sobre todo en medios con limitación de hierro, por otro lado, en presencia de hierro, las colonias crecen grises. La pioverdina es un pigmento fluorescente de color amarillo-verdoso considerado el principal tipo de sideróforo de las especies de *Pseudomonas* (Elliott, Simoska, Karasik, Shear, & Stevenson, 2017).

Este bacilo, en el medio ambiente, puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua, superficies y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos; tiene como reservorios naturales: aguas residuales, animales, suelos húmedos, vegetación y el hombre (en regiones húmedas como las axilas, conducto auditivo externo, región inguinal y algunas mucosas). Pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos con elevado contenido de sales (Sousa Mesquita, Soares-Castro, & Santos, 2013). Su temperatura óptima de crecimiento es 37 grados Celsius ($^{\circ}$ C), sin embargo, puede crecer en un rango de temperaturas que van desde los 20 $^{\circ}$ C hasta los 50 $^{\circ}$ C. *P. aeruginosa* no crece en condiciones ácidas (pH 4.5 o menor) prefiere un pH neutro (pH de 8) (Murray, 2006). Crece en agar McConkey, como no fermentadores de lactosa. Cuando crecen en medio líquido se puede observar la formación de una película superficial, que refleja de este microorganismo por las condiciones aerobias. Puede degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno gas. El género *Pseudomonas* es muy versátil nutritivamente, y algunas especies pueden utilizar carbohidratos, alcoholes y

aminoácidos como fuente de carbón (N. Palleroni, Benner, Krieg, Staley, & Garrity, 2005).

1.3.2.2 Epidemiología

Las capacidades para persistir en condiciones medio ambientales adversas y los mecanismos de patogenicidad que posee, han convertido a *P. aeruginosa* en uno de los principales microorganismos relacionados con las infecciones intrahospitalarias, responsable aproximadamente de 10 a 15% de IAAS mundiales (Strateva & Yordanov, 2009). Se le considera la quinta causa más frecuente en las infecciones a nivel mundial, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitio quirúrgico y el séptimo responsable de sepsis (Pereira, Rosa, & Cardoso, 2015). Este patógeno afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos como en el caso de pacientes quemados o que tienen fibrosis quística (Elliott *et al.* , 2017).

En México se ha establecido la Norma Oficial Mexicana 045 (NOM-045-SSA2-2015) para la vigilancia, prevención y control de las IAAS donde se incluyen criterios que los establecimientos de salud públicos y privados deben de cumplir con respecto al diagnóstico, prevención y control de neumonías, infecciones de vías urinarias, bacteriemias e infecciones de heridas quirúrgicas. Las IAAS no se distribuyen de manera homogénea en un hospital, ya que por ejemplo en las unidades de cuidados intensivos el riesgo de presentarlas es 5 a 10 veces mayor en comparación con otras zonas del hospital; esto se debe a que ahí los pacientes necesitan, por lo general, estancias hospitalarias prolongadas y múltiples dispositivos médicos invasivos como catéteres, sondas, tubos endotraqueales (Custovic *et al.* , 2014), incrementando con esto la morbilidad, la mortalidad y los costos médicos (Mythri & Kashinath, 2014). Sin embargo, la infección ya establecida depende principalmente del estado del sistema inmunológico del paciente. Particularmente hay colonización por *Pseudomonas*, gracias a su patogenicidad, en

individuos hospitalizados o inmunodeprimidos, que incluyen pacientes alcohólicos y diabéticos, pero en especial en los pacientes que reciben tratamiento antibiótico. La inmunodeficiencia del huésped, en combinación con la alta resistencia antibiótica, hace que el tratamiento sea un serio reto médico (Puerta-García A. y Mateos-Rodríguez F., 2010).

1.3.2.3 Virulencia

P. aeruginosa, posee diversos mecanismos mediante los cuales es capaz de promover la colonización e invasión al hospedero dependiendo de las condiciones de pH, temperatura, disponibilidad de hierro, oxígeno y factores inmunológicos del huésped. Entre ellos tenemos factores intrínsecos celulares como lo son el pili, las adhesinas no fimbriales, el flagelo, la cápsula, la variación en antígenos de superficie, la unión e internalización a células M (enterocitos), la proteasa de IgA, sideróforos, piocianina, exotoxina A, lipopolisacáridos y exopolisacáridos (Pier GB, 2010; Sadikot, Blackwell, Christman, & Prince, 2005). *P. aeruginosa* no experimenta reproducción sexual como las células eucariontes, que es lo que permite intercambiar ADN, sin embargo, tienen como principal mecanismo la transferencia horizontal de genes, en donde las bacterias vecinas pueden desarrollar ciertas características dadas por el ADN que se les donó, como resistencia a algún antibiótico que tiene implicaciones de relevancia médica (Holt *et al.*, 2015). Además, algunas bacterias tienen la capacidad de sintetizar una capa adicional compuesta por polisacáridos llamada cápsula; que la protege de la respuesta inflamatoria del hospedero, esto es, la activación del complemento y la muerte mediada por fagocitosis. La cápsula por sí misma es menos probable que sea opsonizada por C3b y la bacteria no puede ser ingerida por los fagocitos (Guerrero, 2014). El lipopolisacárido de esta bacteria está compuesto de lípido A, que actúa como exotoxina produciendo un proceso inflamatorio tan intenso que puede llegar a desencadenar un choque séptico en el hospedero (Tamayo, Ryan, McCoy, & Gunn, 2002).

También cuenta con diversos mecanismos de virulencia extracelulares como el sistema de secreción tipo III compuesto por la exoenzima S (ExoS), exoenzima T (ExoT), exoenzima U (ExoU), exoenzima Y (ExoY); producen por otra parte, exoenzimas como la ureasa, la gelatinasa, la lipasa y la desoxirribonucleasa, las cuales actúan permitiendo la sobrevivencia de la bacteria dentro del órgano hospedero (Głowacka, Zakowska, Naylor, Niemcewicz, & Bielawska-Drózd, 2018). *P. aeruginosa* es capaz de secretar varias proteasas como la proteasa alcalina y la proteasa IV; enzimas capaces de degradar múltiples proteínas inmunoreguladoras, incluyendo las proteínas surfactantes A y D, el complemento, inmunoglobulinas, factores de coagulación y péptidos antibacterianos. Cabe mencionar que los efectos patogénicos de esta bacteria son ampliamente estudiados en el tracto respiratorio por jugar un papel importante en los mecanismos de infección, al degradar tejido de vasos sanguíneos y alveolos pulmonares. Sin embargo, en particular debido a la proteasa alcalina y proteasa IV también causa infecciones corneales y queratitis (Kipnis, Sawa, & Wiener-Kronish, 2006; Malloy, Veldhuizen, Thibodeaux, O'Callaghan, & Wright, 2005; Pier GB, 2010; Rumbaugh, Griswold, & Hamood, 2000).

Algunas especies de *Pseudomonas* poseen una capa externa de alginato que les permite evadir la fagocitosis, este polímero lineal aniónico es de vital importancia en la formación del biofilm (o biopelículas) (Hay, Gatland, Campisano, Jordens, & Rehm, 2009); la producción de biofilm, es la síntesis de una matriz extracelular compuesta de extra polisacárido que protege a una superficie de bacterias en un ambiente biótico o abiótico y les confiere resistencia a antibióticos (Costerton, 2001). La mayor parte de los biofilms producidos *in vivo* por la *Pseudomonas* contienen canales de agua y sustancias extracelulares poliméricas. Davies y colaboradores en el 2002, demostraron que la formación de biofilm en *P. aeruginosa* están implicados dos sistemas diferentes de señalización célula a célula: *lasR-lasI* y *rhlR-rhlI*. Una vez conseguida una densidad suficiente de población bacteriana, estas señales alcanzan las concentraciones requeridas para activar los genes implicados en la diferenciación del biofilm. Clásicamente, los biofilms *in vitro* se dividen en 3

estadios: 1) adherencia, 2) maduración, y 3) dispersión (Sauer, Camper, Ehrlich, Costerton, & Davies, 2002). Dentro de esta matriz existen sistemas de comunicación intercelular llamados “*Quorum sensing*” que se encargan de producir en las bacterias autoinductores de expresión genética que regula la virulencia, la simbiosis, la motilidad y formación de biofilms (Miller & Bassler, 2001). *P. aeruginosa* posee 3 sistemas *Quorum sensing*, dos de ellos basados en N-acyl-lactona homoserina, el tercer sistema 2-akyl-4-quinolona (Coggan & Wolfgang, 2012). Esta bacteria frecuentemente produce biofilms en: quemaduras, heridas crónicas y en los alveolos de los pacientes con fibrosis quística (Han & Mallampalli, 2015). Por lo general, cuando se vuelve patógena, principalmente causa infecciones en la piel, cloroniquia, neumonía, otitis externas y queratitis. En los individuos inmunocomprometidos (quemados, neutropénicos, en heridas quirúrgicas, pacientes transplantados, pacientes con cáncer, diabéticos), tiende a ser una de las principales causas de infecciones nosocomiales como neumonías, ectima gangrenoso, meningitis, infecciones de heridas quirúrgicas, endocarditis, sepsis, entre otras (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo, 2016).

1.3.2.4 Tratamiento para infecciones por *P. aeruginosa*

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. El tratamiento para *P. aeruginosa*, es bastante complejo debido al gran número de mecanismos de resistencia que puede desarrollar; lo recomendable es realizar un antibiograma para poder elegir el tratamiento más adecuado (OMS, 2018). Sin embargo, hay algunos antimicrobianos cuya actividad frente a este microorganismo no se investiga por ser intrínsecamente resistente a ellos, ya sea por falta de dianas susceptibles o por existencia de genes que codifican para sustancias o estructuras que las protegen de moléculas tóxicas o en este caso, antimicrobianos. Por ejemplo, las aminopenicilinas, amoxicilina/ácido clavulánico, las cefalosporinas de primera, segunda y algunas de tercera generación como la cefotaxima. A día de hoy se recomienda incluir en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana las penicilinas antipseudomónicas (piperacilina ± tazobactam),

cefalosporinas de tercera (ceftazidima) y cuarta generación (cefepima), carbapenemas, aztreonam, aminoglucósidos (tobramicina, amikacina) y fluoroquinolonas (Bravo-Burguillos & Jiménez Cid, 2018). Cabe destacar que el uso indiscriminado de antibióticos ha incrementado la frecuencia de bacterias resistentes a los mismos (Palmore & Henderson, 2014).

1.3.2.4.1 Resistencia a antibióticos

Los mecanismos de resistencia a los medicamentos se dividen en varias categorías amplias, incluida la inactivación o alteración del fármaco, modificación de los sitios u objetivos de unión del fármaco, cambios en la permeabilidad celular que resulta en la acumulación intracelular reducida de fármacos y formación de biopelículas (Li & Nikaido, 2004; Wilson, 2014; Wright, 2005).

Las bacterias pueden ser resistentes a una o más a clases de antibióticos, lo que se le conoce como multirresistencia bacteriana; esto afecta el tratamiento y al pronóstico del paciente en casos de IAAS. Estas infecciones usualmente son causadas por patógenos oportunistas que han adquirido o desarrollado por presión selectiva, un grado alto de multirresistencia a diversos antimicrobianos (multi-drogo resistente, MDR, por sus siglas en ingles), ambas características facilitan la colonización y posterior infección de pacientes hospitalizados multi-tratados y con estancias prolongadas que han desarrollado resistencia a múltiples antimicrobianos (Fauci *et al.* , 2018), que son capaces de ocasionar brotes, particularmente en el caso de las bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (OMS, 2017). La vigilancia epidemiológica de las IAAS en México, la RHOVE, en el 2015 identificó una alta prevalencia de microorganismos con elevados perfiles de resistencia: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* con fenotipos compatibles con producción BLEEs (Betalactamasas de Espectro

Extendido); *P. aeruginosa* resistente a cefalosporinas (ceftriaxona, 38.1%, n=3,653), quinolonas (ciprofloxacino, 18%) y carbapenémicos (imipenem, 10.5%), entre otras. Cabe destacar que todos estos grupos de antibióticos pertenecen a la familia de betalactámicos, antimicrobianos que generalmente se prescriben para infecciones por bacterias Gram negativas resistentes (Duytschaever, Huys, Boulanger, De Boeck, & Vandamme, 2013).

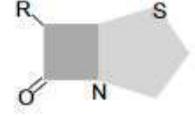
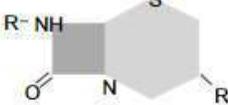
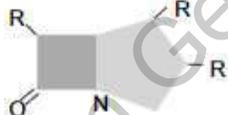
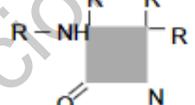
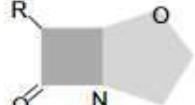
1.3.2.5 Betalactámicos

El uso de antibióticos betalactámicos ha sido la elección contra bacterias desde el descubrimiento de la penicilina que se atribuye a Alexander Fleming, en septiembre de 1928, donde observó que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se inhibía ante la presencia del hongo *Penicillium notatum* (Fleming, 1929). Desde entonces se ha ido modificando la estructura de este antimicrobiano para bacterias que han ido adquiriendo resistencia. Sin embargo, las diferentes clasificaciones de antibióticos betalactámicos, han llegado a quedar en desuso por la producción de betalactamasas en las bacterias Gram negativas (Suárez & Gudiol, 2009).

La presencia del anillo betalactámico define químicamente a la familia de antibióticos betalactámicos. Además, este anillo determina el mecanismo de acción, la inhibición de la síntesis de la pared celular, la escasa toxicidad directa cuando actúa sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula eucariota animal, y el principal mecanismo de resistencia, la producción de las betalactamasas, de esta gran familia de antibióticos. No obstante, para que el betalactámico sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales u otros anillos. La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas. En el Cuadro 1, está

representada la estructura del anillo betalactámico y el anillo secundario que al unirse forman el núcleo betalactámico que es el que define el grupo de antibióticos al que pertenecen. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas (Suárez & Gudiol, 2009).

Cuadro 1. Estructura general de betalactámicos. Adaptado de Suárez & Gudiol, 2009.

Anillo betalactámico 	Anillo secundario	Anillo betalactámico + Anillo secundario = Núcleo betalactámico	GRUPO ANTIBIÓTICO
	Anillo tiazolidínico	Ácido amino-6 penicilánico	Penicilinas
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7 α -cefalosporínico	Cefalosporinas
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	Carbapenémicos
	Ninguno	Monobactamo	Monobactámico
	Anillo Oxazolidínico	Clavamo / oxapenamo	Ácido clavulánico

1.3.2.5.1 Mecanismo de acción de betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana (K. F. Kong, Schneper, & Mathee, 2010). La pared bacteriana es una estructura que envuelve las bacterias de todos los géneros; se sitúa por fuera de la membrana citoplásmica y está compuesta principalmente por una proteína llamada peptidoglucano. En las bacterias Gram positivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es esta proteína. Las bacterias Gram negativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas, y de una capa interna delgada de peptidoglucano. El esqueleto del peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla (Prescott, Harley, & Klein, 2002). Los diferentes componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplásmica al espacio que hay entre ésta y la pared celular (espacio periplásmico), donde se van ensamblando hasta formar la estructura en el punto 4 de la Figura 1. La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales), para lo que se necesita la acción de unas enzimas que se localizan en ese espacio periplásmico, llamadas de forma genérica transpeptidasas. El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular (Figura. 2). Es por eso que estas enzimas se llaman también PBP, así fue como se descubrieron (penicillin binding protein 'proteína ligada a la penicilina'). Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión oncótica. Por tanto, para que actúen los betalactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que éste es el momento en que se sintetiza la pared celular (Suárez & Gudiol, 2009).

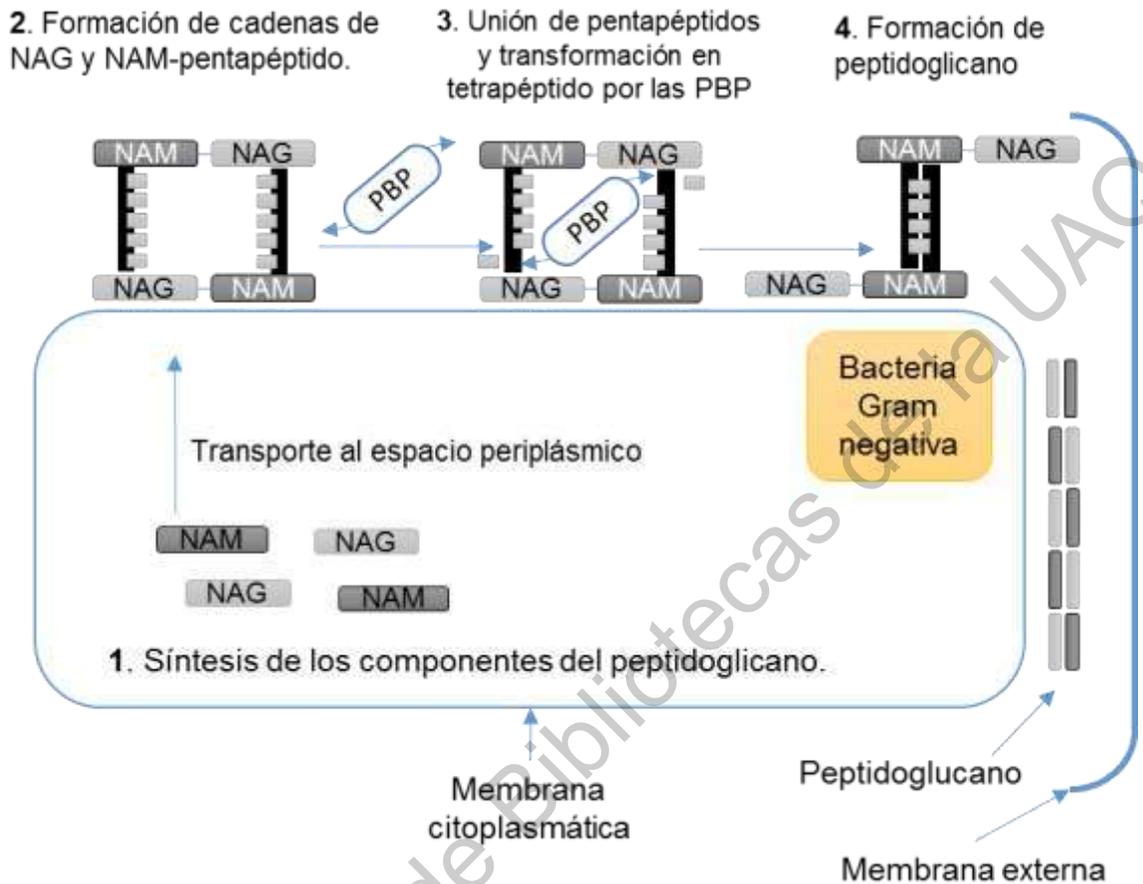


Figura 1. Etapas de formación de la pared celular en bacterias Gram negativas. 1. Síntesis de los componentes del peptidoglicano y su transporte al espacio periplásmico. 2. Formación de las cadenas de NAG y NAM en estructura de pentapéptido, 3. Acción de las enzimas PBP, con su unión a la porción terminal del pentapéptido y la transformación a tetrapéptido, 4. Formación del peptidoglicano. NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein. Adaptado de Suárez & Gudiol, 2009.

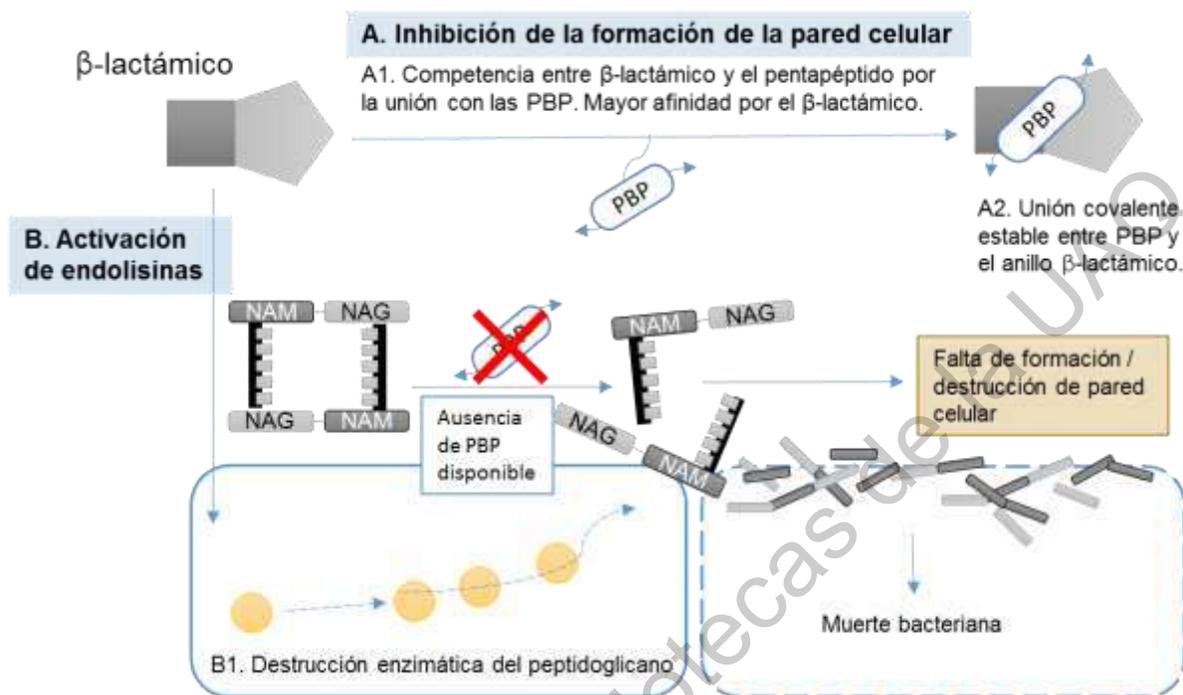


Figura 2. Mecanismo de acción de los betalactámicos. A. inhibición de la formación de la pared celular, A1. Por la sustitución del betalactámico y el pentapéptido a la unión de la enzima PBP, A2. Unión covalente entre PBP y el anillo betalactámico, B. activación de endolisinas, B1. Destrucción enzimática del peptidoglicano, por falta de formación / destrucción de la pared celular, que conlleva a la muerte bacteriana. NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein. Adaptado de Suárez & Gudiol, 2009.

1.3.2.5.2 Mecanismos de resistencia a betalactámicos

El espectro antimicrobiano de la penicilina G abarcaba inicialmente los cocos Gram positivos, los cocos Gram negativos, así como las espiroquetas y algunos bacilos Gram negativos anaerobios. La producción de derivados semisintéticos a partir de la molécula nativa permitió disponer de preparados activos por vía oral (penicilina V, aminopenicilinas), con resistencia a las betalactamasas (penicilinas antiestafilocócicas), mayor capacidad de penetración en las bacterias Gram

negativas (aminopenicilinas) o incluso con actividad antipseudomónica (ureidopenicilinas y carboxipenicilinas) (A. Wright, 1999). El mecanismo de resistencia adaptativo más importante frente a los betalactámicos es la producción de betalactamasas por parte de algunos microorganismos (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *enterobacterias* como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Shigella* y *Bacteroides spp.*, etc.) (Tafur, Torres, & Villegas, 2009). Otros microorganismos, como *Klebsiella pneumoniae*, producen betalactamasas de forma natural, por lo que son resistentes a las penicilinas naturales de forma intrínseca (Peña *et al.* , 2001). Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico, de modo que el antibiótico no puede ejercer su acción (Ramón *et al.* , 2007). Los inhibidores de las betalactamasas son moléculas con una afinidad elevada frente a estas betalactamasas, a las que se unen irreversiblemente, evitando así la inactivación del antibiótico betalactámico. Los efectos que se consiguen es la restauración de la actividad original del antibiótico sobre los microorganismos que se han hecho resistentes por la producción de betalactamasas y la ampliación del espectro de aquellos que las producen de forma natural. Todos los inhibidores de betalactamasas usados en la práctica son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, que tienen estructura betalactámica, pero poseen una actividad antibacteriana mínima; normalmente se prescriben en conjunto con antibióticos betalactámicos para ampliar su eficiencia (Duytschaever *et al.* , 2013). Sin embargo, a pesar de la sinergia de estos medicamentos, la resistencia bacteriana ante antibióticos betalactámicos por la producción de betalactamasas, sigue en aumento y es de preocupación médica mundial (Bravo-Burquillos & Jiménez Cid, 2018).

1.3.2.6 Carbapenémicos

Los carbapenémicos son los antimicrobianos betalactámicos de más amplio espectro, actividad y resistencia a las betalactamasas, incluidas las BLEE. Derivan del anillo carbapenem y se dividen en dos grupos según tengan o no actividad frente a *P. aeruginosa*, perteneciendo al primero imipenem, meropenem y doripenem y al

segundo ertapenem (Sobhan Ghafourian, Sadeghifard, Soheili, & Sekawi, 2015). Del primer grupo, el que se utilizó inicialmente en clínica fue imipenem.

Imipenem tiene actividad *in vitro* tan amplia que muestra excelente efecto antimicrobiano frente a aerobios Gram positivos, aerobios Gram negativos incluidas *Brucella*, enterobacterias productoras de BLEE (CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) entre 1-8 mg/L). Asimismo, es activo frente a *Listeria monocitogenes*, *Nocardia* y *Bacillus*, y la gran mayoría de anaerobios (Safdar & Armstrong, 2003). Se hidroliza por una dihidropeptidasa a nivel del túbulo proximal, por lo que tiene que administrarse en combinación con cilastatina como inhibidor de dicha peptidasa. Tiene una vida media corta, 1 horas, por lo que su administración debe hacerse a dosis de 500-1000 mg / 6 horas. Consigue elevadas concentraciones plasmáticas y tisulares para la mayoría de infecciones graves, incluidas las causadas por BGN resistentes a cefalosporinas y aminoglucósidos. Su principal efecto tóxico son las convulsiones, en especial si se administra en dosis altas y/o el paciente tiene insuficiencia renal o enfermedad del Sistema Nervioso Central (SNC) (Morales, 2003).

1.3.2.6.1 Mecanismo de acción de carbapenémicos

Los carbapenémicos inhiben la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación uniéndose a residuos de serina de peptidasas situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática denominadas PBP (penicillin binding protein, proteínas que fijan penicilinas). La pared celular se debilita y la bacteria normalmente se lisa. Por ello, son bactericidas (Kim *et al.* , 2014).

Para ejercer su acción deben atravesar la pared celular para acceder a las PBP, lo que es fácil en Grampositivos pero más complicado en Gram negativos. Sus características estructurales les permiten acceder a las PBP de las bacterias Gram negativas a través de las porinas de la membrana externa. En *P. aeruginosa* imipenem emplea exclusivamente la vía de la OprD mientras que meropenem y doripenem emplean ésta y, además, otras porinas (Georges *et al.* , 2006).

1.3.2.6.2 Epidemiología de resistencia a carbapenémicos

Las tasas de resistencia al carbapenem en bacilos Gram negativos han aumentado gradualmente en todo el mundo durante los últimos 10 años y varían geográficamente (Kim *et al.* , 2014; Youn Jeong *et al.* , 2012). Estudios en los Estados Unidos, han informado tasas de resistencia a carbapenémicos de aproximadamente 34% a 62.6% en pacientes hospitalizados (Kallen, Hidron, Patel, & Srinivasan, 2010; Sievert *et al.* , 2013). Informes de la National Healthcare Safety Network (NHSN) en los Estados Unidos han demostrado un aumento del 33% de resistencia en 2006 a 2007 a > 60% de 2009 a 2010 entre aislamientos de *P. aeruginosa* (Sievert *et al.* , 2013); además reportaron que *A. baumannii* (62.6%) y *P. aeruginosa* (26.1%) fueron las especies más resistentes a estos antibióticos. Las tasas de resistencia entre la especie de *Pseudomonas* en la mayoría de los países oscilan entre el 10 y el 50% y se ha informado que pueden ser tan bajas como el 3.3% en Canadá hasta llegar a > 50% en Rusia, el suroeste de Asia y América del Sur (D. J. Hong *et al.* , 2015). Un estudio reciente de Irán mostró resistencia al imipenem en el 68% de los aislamientos en *P. aeruginosa* de pacientes hospitalizados con quemaduras, estos con producción de metalo- β -lactamasa (MBL) fenotípicamente detectable en el 94% de estos aislamientos (Saderi, Lotfalipour, Owlia, & Salimi, 2010). En el sur de Estados Unidos se demostraron las tasas más altas de resistencia a carbapenem del 35%, 26% y 19%, a imipenem, meropenem, y doripenem, respectivamente (Morrow *et al.* , 2013). Estos aumentos en la resistencia se pueden atribuir a múltiples factores, como el mayor uso de antibióticos de amplio espectro (incluidos los carbapenems), el uso de dispositivos médicos permanentes, un aumento en el huésped inmunocomprometido poblaciones y la adquisición de carbapenemasas (Denys, Callister, & Dowzicky, 2013).

1.3.2.6.3 Resistencia a carbapenémicos

Desde la década de los 80s se han establecido los carbapenémicos como primera línea de tratamiento para *P. aeruginosa*, como meropenem, imipenem, doripenem y ertapenem (Gong *et al.* , 2018). Entre los diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, la producción de carbapenemasas es uno de los mecanismos más importantes por los cuales *P. aeruginosa* adquiere resistencia a los carbapenémicos. Los mecanismos de resistencia al carbapenem se pueden clasificar en: deficiencia de la membrana externa de porina OprD, la producción bacteriana de carbapenemasas, o la sobreexpresión de la bomba de eflujo (Lister, Wolter, & Hanson, 2009). Sin embargo, la resistencia al carbapenem en *P. aeruginosa* se asocia con mayor frecuencia con deficiencia de OprD y con menos frecuencia con la liberación de carbapenemasas por el patógeno (Bradford, 2001).

La proteína OprD transporta de manera pasiva aminoácidos a través de la membrana bacteriana, también es capaz de transportar carbapenémicos, debido a esto, entre menos expresión haya de dicha porina, mayor resistencia a carbapenémicos mostrará la *Pseudomonas* (Carmeli, Troillet, Eliopoulos, & Samore, 1999). La sobre expresión de MexA-OprM y la supresión de OprD son los principales mecanismos de resistencia a carbapenémicos, sin embargo no son los únicos (Maseda, Yoneyama, & Nakae, 2000). La resistencia al imipenem está dada por la pérdida de la porina OprD (outer membrane porine protein, inicialmente llamada porina D2) y a la actividad de la betalactamasa AmpC, así como por el incremento del sistema efflux MexAB-OprM (Hammami, Ghazzi, Burghoffer, Arlet, & Redjeb, 2009). La proteína MexB es una bomba localizada en la membrana citoplasmática; la proteína OprM es una porina que forma poros comunicantes del interior al exterior de la bacteria y la proteína MexA une a las otras dos. La sobreexpresión de estas 3 proteínas produce un incremento en la concentración mínima inhibitoria para penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol y quinolonas. Este complejo proteico tiene la facilidad de remover moléculas anfipáticas de las membranas celulares lo que conlleva a la desorganización de la membrana celular (Shannon, King, & Phillips, 1982).

Se han identificado muchas carbapenemasas en *P. aeruginosa*, que incluyen: variantes de KPC y GES de Ambler clase A, metalo- β -lactamasas (MBL) de tipo IMP, VIM, SPM, GD, NDM y FIM de Ambler clase B, y enzimas variantes OXA de Ambler clase D (Hong *et al.* , 2015). Existen varios tipos de metalo- β -lactamasas producida por *Pseudomonas* que le confieren resistencia a los carbapenémicos entre las cuales se encuentran: Imipenemasa (IMP), integrón codificado de Verona para metalo- β -lactamasas (VIM), Imipenemasa alemana (GIM), metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM), Imipenemasa de Florencia (FIM). Las más notables de las metalo- β -lactamasas adquiridas, son las enzimas de tipo IMP y VIM, se detectaron por primera vez a principios de la década de 1990 (Lauretti *et al.* , 1999; Watanabe *et al.* , 1991). Posteriormente, se han informado muchos tipos adicionales de MBL adquiridas, incluidas las enzimas de tipo SPM, GIM, SIM, KHM, NDM, AIM, DIM, SMB, TMB y FIM (Wachino *et al.* , 2011). Dado que la aparición de todos estos genes de resistencia a carbapenémicos es transferible y móvil, por ser mediada por plásmidos, crea un alto potencial para que se dé una rápida propagación a la resistencia a carbapenémicos (Shenoy *et al.* , 2018).

1.3.2.6.3.1 Betalactamasas

El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos en bacilos Gram negativos es la producción de betalactamasas. Los genes de resistencia a los antimicrobianos pueden ser transportados en el cromosoma bacteriano, en plásmidos o en transposones (Giedraitienė *et al.* , 2011). La continua descripción de nuevas betalactamasas ha creado problemas en su clasificación y nomenclatura. Actualmente se conocen más de 890 enzimas (Dandachi, Fayad, El-Bazzal, Daoud, & Rolain, 2018). Bush en el año 1989 propuso una clasificación basada en la actividad enzimática o afinidad de las enzimas por diferentes sustratos y su sensibilidad a la acción inhibitoria por el ácido clavulánico. Esta clasificación fue revisada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros y actualizada en 2010 por Bush y Jacoby. Por otro lado, Ambler en 1980 propuso una clasificación en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia de aminoácidos de las

betalactamasas en la que distinguen cuatro clases de enzimas designados como A, B, C y D. Tanto la clasificación de Bush y Jacoby como la de Ambler están correlacionadas (Bush & Bradford, 2016). De entre todas las betalactamasas descritas hasta el momento, caben destacar por su interés e implicaciones clínicas las siguientes: 1) Betalactamasas de espectro extendido (grupos 2be, 2ber y 2de de la clasificación de Bush y Jacoby: enzimas tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA). 2) Betalactamasas resistentes a los inhibidores (grupo 2br: enzimas tipo TEM y SHV). 3) Betalactamasas tipo AmpC (grupo 1: enzimas tipo LAT, MIR, CMY y FOX). 4) Carbapenemasas (grupos 2f, 2df y 3: enzimas tipo VIM IMP, IMI, KPC, NDM y OXA).

Las betalactamasas resistentes a la inhibición de los inhibidores de betalactamasas se denominan IRT (inhibitor-resistant (TEM) mutant) porque en su mayoría derivan de TEM-1 y TEM-2, estas enzimas pertenecen a la clase A de Ambler. Algunas oxacilinasas (como la OXA-1), se caracterizan por conferir resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas siendo insensibles a la acción de los inhibidores de betalactamasa y, en su gran mayoría, no tienen actividad sobre el resto de betalactámicos (Laudy *et al.*, 2017). Dentro del grupo de bacterias productoras de betalactamasas se encuentran las llamadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Ramón *et al.*, 2007). Las BLEE son enzimas mediadas por plásmidos, producidas por los bacilos Gram negativos que son capaces de inactivar a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, que tienen efecto sobre los monobactam (aztreonam), es decir, son resistentes a todos los antibióticos betalactámicos con la excepción de los carbapenémicos, las cefamicinas y a las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (Kong *et al.*, 2010).

La producción de metalo- β -lactamasas se desarrolló en las bacterias como mecanismo de resistencia derivado del uso de carbapenémicos y cefalosporinas, se ha convertido en un problema en los pacientes hospitalizados, se han descrito una gran diversidad de metalo- β -lactamasas, entre los genes que codifican estas enzimas podemos encontrar a la familia IMP, a la familia VIM; así como enzimas asociadas con la resistencia a aminoglucósidos, las cuales se encuentran en

integrone clase 1. Este grupo de genes (integrone) son conocidos por esta característica, que acarrea resistencia para varios grupos de antibióticos (Garza-Ramos *et al.* , 2010). A pesar de esto los antibióticos carbapenémicos se han considerado los β -lactámicos más potentes contra los bacilos Gram negativos MDR, incluido *P. aeruginosa*, debido a su alta afinidad con las proteínas de unión a la penicilina (PBP), la estabilidad frente a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y la permeabilidad de membranas externas bacterianas (Esposito & De Simone, 2017).

1.3.2.6.3.1.1 Gen *bla*_{IMP}

El gen *bla*_{IMP} codifica para una enzima betalactamasa tipo IMP. La enzima imipenemasa fue identificada por primera vez en un aislado de *P. aeruginosa*, en 1988 y se encontró en un integrón de clase 1 ubicado en un plásmido conjugativo que se sugiere, se transfiere de manera horizontal entre bacterias Gram negativas (Watanabe *et al.* , 1991). Las enzimas de tipo IMP se dividen en varios subgrupos, y el porcentaje de identidad de aminoácidos dentro de estos subgrupos varía del 90% al 99%, mostrando actividades hidrolíticas muy similares entre ellos (Walsh *et al.* , 2005).

Existen 51 variantes de esta enzima, de los cuales en México únicamente se han aislado la IMP-15 e IMP-18 (Garza-Ramos *et al.* , 2010; Garza-Ramos *et al.* , 2008). En México se ha visto un incremento en las cepas de *P. aeruginosa* productoras de betalactamasas entre las que se encuentran como las más prevalentes: IMP-15, IMP-18, VIM-2, carbapenemasas clase A GES-20 (Ulises Garza-Ramos *et al.* , 2015). El gen que codifica para IMP-15 fue por primera vez descrito en una cepa en Tailandia; posteriormente fue descrita una cepa que expresaba IMP-15 en Kentucky en un paciente que primeramente había sido tratado en México y coincidió totalmente con una cepa descrita en Guadalajara (Sader *et al.* , 2007). La betalactamasa IMP-15 fue identificada como una clona endémica

intrahospitalaria en algunos hospitales a lo largo del país (Garza-Ramos *et al.* , 2010); sin embargo la clona IMP-18 sólo se ha aislado en dos hospitales del país (Garza-Ramos *et al.* , 2008; Sánchez-Martínez *et al.* , 2010).

1.3.2.6.4 Técnicas de diagnóstico para la resistencia a carbapenémicos

La identificación rápida y confiable de la resistencia a los medicamentos es esencial para garantizar que el uso de antibióticos sea apropiado. El cultivo convencional sigue siendo el estándar de oro para evaluar la resistencia a los antibióticos a pesar de ser lento, requerir equipos de laboratorio sofisticados y control de calidad, y producir resultados ambiguos. Además, el número de bacterias inoculadas afecta la concentración inhibitoria mínima del fármaco (CMI) (Bratu *et al.* , 2005). La técnica de referencia estándar para determinar la susceptibilidad a los carbapenémicos, dado por metalo- β -lactamasas, es la difusión por disco (método cualitativo); y Etest (método cuantitativo), que consiste en una expansión de la técnica de difusión en disco pero se utiliza una tira de plástico no poroso; al llevar el mismo protocolo estas dos técnicas proporcionan resultados de 18 a 24 h, pero se ven obstaculizados por una pobre especificidad (Hindler & Humphries, 2013; Tan & Ng, 2007). Varios autores también han sugerido varias modificaciones de las pruebas de disco combinadas (ya sea de imipenem o meropenem en combinación con varios compuestos inhibidores de clase B (EDTA o DPA) para probar la susceptibilidad, pero estos han sido validados en estudios de investigación únicamente (Espino Hernández, ÁlvarezVarela, Zayas T, & Contreras Alarcón, 2010).

Las pruebas colorimétricas han funcionado mejor en *P. aeruginosa* que en *Acinetobacter*, y son probablemente las pruebas con mejor especificidad comprobada en este momento. Sin embargo, ninguna prueba parece

suficientemente específica para ser utilizado como prueba independiente sin confirmación molecular (Calvo, Canton, Fernandez, Mirelis, & Navarro, 2011). También se ha empleado la microdilución en caldo, que consiste en la incubación del microorganismo en Caldo Mueller Hinton (CMH) y el antibiótico, a distinta concentración; el inconveniente de esta técnica es que requiere atención y un largo tiempo (24 horas) para realizarla (Hindler & Humphries, 2013).

Actualmente, CLSI (por sus siglas en inglés de Clinical and Laboratory Standards Institute) no recomienda las pruebas para la detección de carbapenemasas en aislamientos clínicos a parte de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tradicionales para la atención al paciente. El razonamiento es que la mayoría de los productores de carbapenemasas serán capturados dentro de los puntos de ruptura de resistencia actuales, y la detección de un mecanismo de resistencia no proporciona ninguna información adicional para el manejo del paciente. Por otro lado, CLSI reconoce que la detección de productores de carbapenemasas es importante para fines epidemiológicos y de control de infecciones. Algunos expertos en β -lactamasa no están de acuerdo y apoyan las pruebas de resistencia tanto para las medidas de control de infecciones como para las pruebas de diagnóstico de rutina (CLSI, 2015; Viau *et al.* , 2016). En consecuencia, EUCAST (por sus siglas en inglés de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ha propuesto el uso de puntos de corte epidemiológicos seguidos por la detección fenotípica de carbapenemasas entre las *Enterobacteriaceae* para prevenir la propagación y aislamientos fenotípicamente resistentes con CIM debajo del límite de resistencia que transporta elementos transmisibles que podrían propagarse aún más a las bacterias susceptibles (Kim *et al.* , 2013).

Adicionalmente de las pruebas bioquímicas, los ensayos convencionales basados en técnicas moleculares como PCR han sido empleadas para la detección de genes de metalo β -lactamasas, pero requieren laboratorios bien equipados

(Nusrat *et al.* , 2019). Sin embargo, esta técnica es muy costosa por los equipos que utiliza, las instalaciones que requiere y el personal necesita estar capacitado o especializado en la técnica, además de un tiempo mínimo de seis horas para una resolución. Ni la PCR convencional ni la PCR en tiempo real pueden identificar genotipos productores de carbapenemasas, y la secuenciación directa del ADN es esencial para hacerlo. Para contrarrestar estas desventajas Notomi en el 2000 ideó la amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) que amplifica el ADN con alta especificidad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas.

1.3.3 Amplificación isotérmica mediada por horquillas

LAMP (por sus siglas en inglés de Loop-mediated isothermal amplification) fue desarrollada en el año 2000. Es un método de amplificación de ácidos nucleicos simple, rápido, específico y rentable (Notomi *et al.* , 2000). Se basa en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento, la *Bst* ADN polimerasa, y en el uso de cuatro iniciadores diseñados específicamente para reconocer entre seis a ocho regiones distintas en el gen diana. El proceso de reacción avanza a una temperatura constante utilizando la reacción de desplazamiento de cadena (Mori, Nagamine, Tomita, & Notomi, 2001). La amplificación y detección del gen se puede completar en una sola etapa, incubando la mezcla de muestras, cebadores, ADN polimerasa y sustratos a temperatura constante de aproximadamente 65 ° C, esto proporciona una alta eficiencia de amplificación de 9-10x¹⁰ veces en 15-60 minutos. Debido a su alta especificidad, la presencia de un producto amplificado puede indicar la presencia del gen diana (Parida, Sannarangaiah, Dash, Rao, & Morita, 2008). La amplificación se puede hacer con plantillas de ARN siguiendo el mismo procedimiento que con las plantillas de ADN, simplemente mediante la adición de transcriptasa inversa (Bartolone, Tree, Conway, Chancellor, & Lamb, 2018).

LAMP es una técnica que amplifica ADN con gran especificidad, selectividad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas y utiliza un sistema de dos pares de

cebadores que se pueden observar en la Figura 3: dos internos – Forward Inner Primer (FIP, por sus siglas en inglés de cebador interno hacia delante, en español) y Back Inner Primer (BIP, por sus siglas en inglés, cebador interno hacia atrás, en español) – y dos externos, F3 y B3, capaces de reconocer el ADN diana. Se designan seis regiones distintas en el ADN objetivo, etiquetadas como F3, F2, F1, B1c, B2c y B3 desde el extremo de 5'. Como c representa una secuencia complementaria, la secuencia F1c es complementaria a la secuencia F1 y así sucesivamente. FIP (BIP) es un cebador híbrido que consiste en la secuencia F1c (B1c) y la secuencia F2 (B2), respectivamente. Adicionalmente pueden utilizar otros dos cebadores ubicados entre los cebadores FIP y BIP que son complementarios a una región, se ha demostrado que estos favorecen a la formación de los productos de la horquilla de amplificación. Esto propicia que la amplificación sea muy rápida y específica (Parida, Sannarangaiah, Dash, Rao, & Morita, 2008).

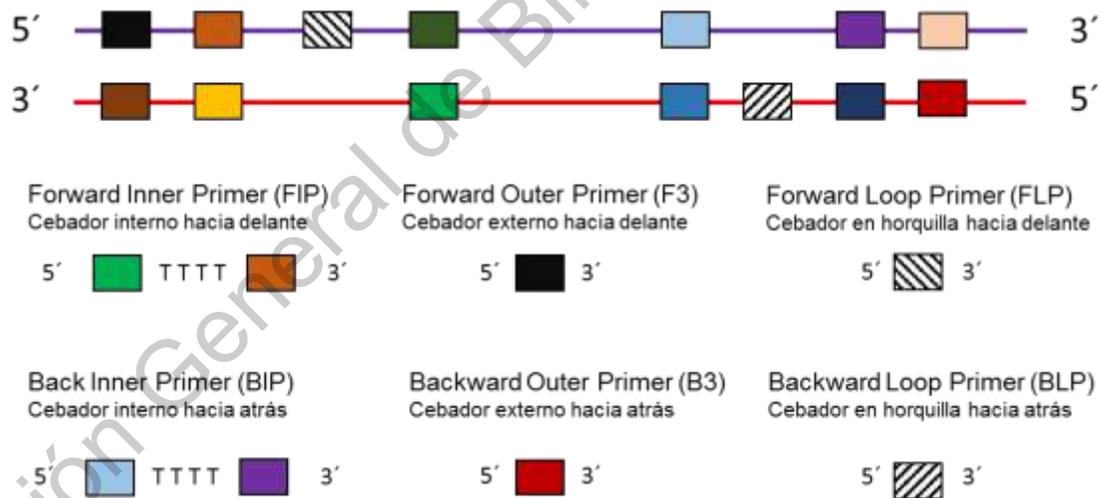


Figura 3. Esquema de la unión de los cebadores al ADN. Los cebadores externos F3 y B3 son complementarios a las secuencias de ADN F3c y B3c, respectivamente. El cebador interno FIP (BIP) contiene la secuencia F1c (B1c), un espaciador TTTT y la secuencia F2 (B2), respectivamente. FLP y BLP, se unirán a la región complementaria entre F1c y F2c; B1c y B2c, respectivamente (Parida *et al.*, 2008).

La amplificación se lleva a cabo en dos pasos: no cíclico y cíclicos (Ushikubo, 2004). El no cíclico consiste en que los cebadores inician su acción en dirección 5' a 3'. Los cebadores externos F3 y B3 delimitan una región de interés del ADN, desplazando a las cadenas de ADN recién sintetizadas y liberando el ADN diana. La síntesis de ADN iniciada a partir de FIP procede de la siguiente manera. La región F2 se acopla a la región F2c en el ADN objetivo e inicia la amplificación (Figura 4A). La *Bst* polimerasa actúa como helicasa permitiendo que se abra la doble hebra y se realice la polimerización. El cebador F3 se acopla a la región F3c en el ADN objetivo, y tiene lugar la síntesis de ADN de desplazamiento de cadena. La cadena de ADN alargada de FIP se reemplaza y se libera. La cadena sencilla liberada forma una estructura de horquilla en su extremo de 5' (estructura 4, Figura 4B). La síntesis de ADN continúa con el ADN de una sola hebra como plantilla, y los cebadores BIP y B3, de la misma manera que se describió anteriormente para FIP, para generar la estructura 5 (Figura 4B), que posee la estructura de bucle en ambos extremos (estructura principal), esta hebra es la que servirá como la estructura principal para la posterior síntesis de ADN (Figura 4B).

La etapa de amplificación cíclica (Figura 4C) se lleva a cabo en la estructura principal, donde interactúa la región F1 del extremo 3' nuevamente con el cebador FIP, sobre la región F2c. Al pasar por varias etapas, se genera la estructura 7, que es complementaria a la estructura 5, y la estructura 5 se produce a partir de la estructura 8 en una reacción similar a la que se originó en las estructuras 5–7. Específicamente, las estructuras intermedias 9 y 10 se producen a partir de las estructuras 6 y 8, respectivamente. Las estructuras 9 y 10 luego forman las estructuras 11 y 12, respectivamente y así consecutivamente. También se producen estructuras más alargadas que en el transcurso de la polimerización las secuencias sintetizadas van adquiriendo una forma de coliflor (Notomi *et al.* , 2000). La acumulación de esta estructura es la que nos indica la presencia del ADN diana, en diferentes métodos de detección (Parida *et al.* , 2008).

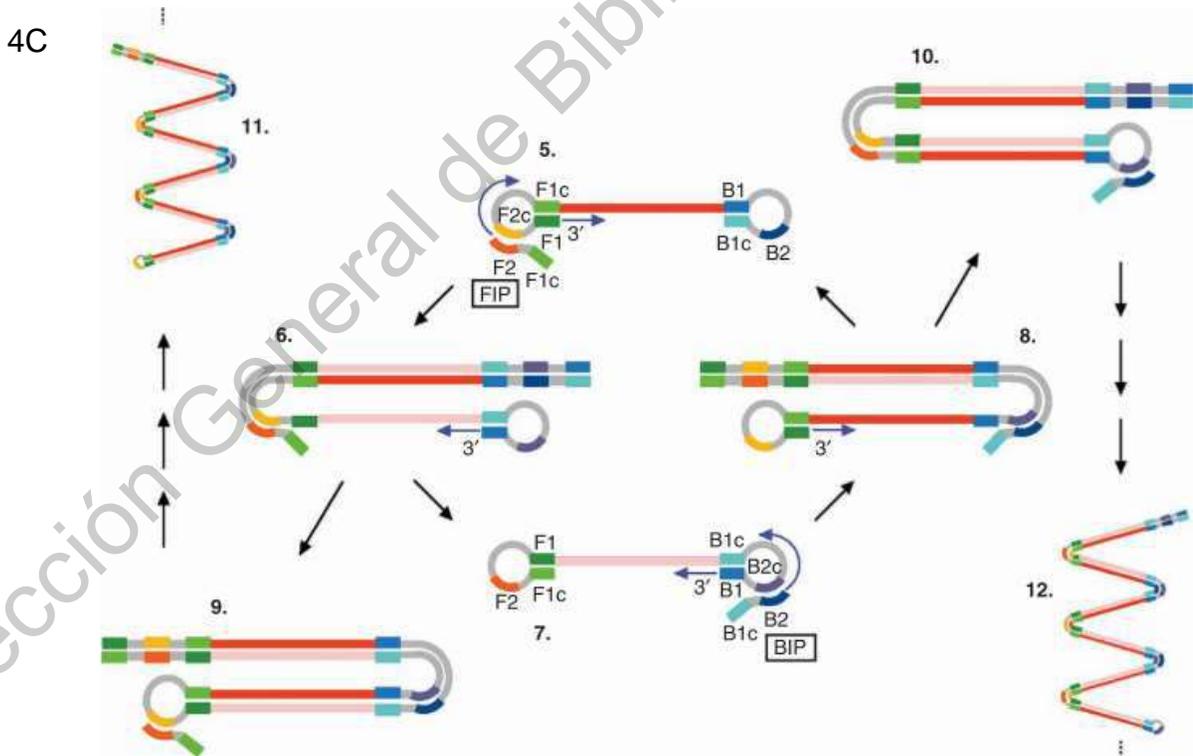
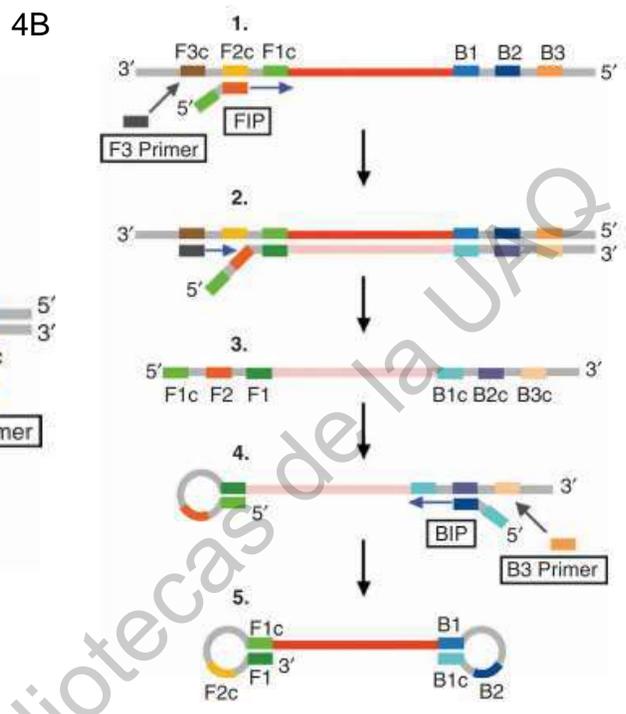
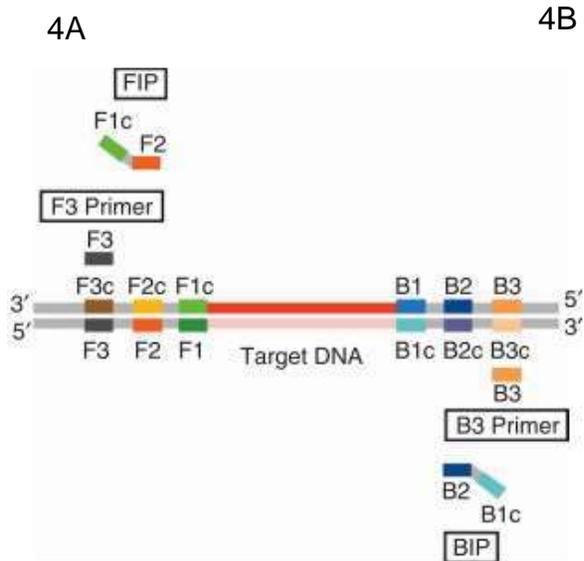


Figura 4. Principio de la técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP). A, B y C, representan secuencia de pasos en la amplificación de LAMP. Tomado de Tomita, Mori, Kanda, & Notomi, 2008.

1.3.3.1 *Bst* ADN polimerasa

La clave principal de técnica de LAMP es la ADN polimerasa que se utiliza. Proviene de la bacteria *Bacillus stearothermophilus*. Esta forma parte crucial de la amplificación es su capacidad de desplazamiento de cadena, lo que la convierte en un candidato ideal para la amplificación isotérmica. Su temperatura óptima de 60-65 ° C, se inactiva a 80°C y se almacena generalmente a -20 ° C (Notomi *et al.* , 2000). La ADN polimerasa de *Bst* tiene actividad de helicasa 5' a 3' dependiente de doble cadena, esto significa que son enzimas que funcionan escindiendo nucleótidos uno a uno de una cadena polinucleotídica, van a catalizar una reacción de hidrólisis que rompe los enlaces fosfodiéster en el extremo 5'. La *Bst* polimerasa actúa también como helicasa lo que ocasiona que la doble hebra se abra y pueda seguir añadiendo nucleótidos a la cadena nueva (Aliotta *et al.*, 1996). En el Cuadro 2 se definen todas las características de la *Bst* polimerasa, que le dan muchas ventajas en comparación con la Taq ADN polimerasa que se utiliza en nuestro estándar de oro, el PCR.

Cuadro 2. Características de *Bst* polimerasa y Taq polimerasa.

Propiedades	<i>Bst</i> ADN polimerasa	Taq ADN polimerasa
Origen	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
Polimerización del ADN	5' a 3'	5' a 3'
Cebadores	Requerido	Requerido
Desplazamiento de hebra	Si	No
Desnaturalización previa	No requiere	Requerido
Temperatura de reacción	60 - 65 °C	70 – 75 °C
Inactivación por calor	80 ° C	No aplica

1.3.3.2 Ventajas de la técnica LAMP

Las características y ventajas de la técnica de LAMP es que es rápida, simple, rentable y específica. Es una técnica que se puede llevar a cabo en 60 minutos ya que no hay necesidad de un paso previo para desnaturalizar las cadenas bicatenarias en una forma de cadena simple. Su límite de detección es de unas pocas copias, siendo comparable al de la PCR. Es una técnica simple, los productos son una mezcla de ADN de tallo-horquilla con varios tamaños de estructuras similares a tallo y coliflor con múltiples horquillas inducidos por alineación entre repeticiones invertidas alternativamente de la secuencia objetivo en la misma cadena, las cuales permitiría su simple, fácil y selectiva detección. Es rentable porque toda la reacción de amplificación tiene lugar continuamente bajo condiciones isotérmicas, LAMP no requiere reactivos especiales ni equipos sofisticados, tampoco de personal especializado como en la PCR. Además tiene una especificidad de amplificación extremadamente alta porque al diseñar cuatro cebadores que reconocen seis regiones distintas, el método LAMP puede amplificar el gen diana, lo que nos da una especificidad muy alta, resolviendo en parte el problema general de los antecedentes asociados con todos los métodos de

amplificación de ácidos nucleicos (Mori & Notomi, 2009). Otra ventaja es que, Kaneko en el 2007 encontró que LAMP, no es susceptible a la influencia de diferentes componentes en muestras clínicas, por lo que no es necesaria la purificación del ADN de la muestra, en contraste con PCR.

En general LAMP es simple y fácil de realizar una vez que se preparan los cebadores apropiados, que requieren solo cuatro cebadores, una ADN polimerasa y un baño de agua de laboratorio regular o un bloque de calor para la reacción. Sin embargo, por ser una técnica de amplificación de ADN, hay necesidades de electricidad, de almacenamiento adecuado, de eliminación de desechos, y de control de temperatura en entornos de almacenamiento donde las temperaturas exceden las recomendaciones del fabricante (Wong, Othman, Lau, Radu, & Chee, 2018).

1.3.3.3 Aplicaciones de LAMP

Recientemente la técnica LAMP es de amplia utilidad en la clínica para la detección de microorganismos que afectan al humano y que podrían estar asociados con las IAAS. Este método detecta patógenos respiratorios, como *Streptococcus pneumoniae* (Seki *et al.* , 2005), *Bordetella pertussis* (Kamachi, Moriuchi, Hiramatsu, Otsuka, & Shibayama, 2017) y *Klebsiella pneumoniae* resistente al carbapenémicos (Solanki *et al.* , 2013). Asimismo la OMS sugiere, la detección de *Mycobacterium tuberculosis* a través de esta técnica, como una prueba de diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar en pacientes con signos y síntomas compatibles con la enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Por otra parte, LAMP también se ha diseñado para diagnosticar patógenos asociados con enfermedades transmitidas por los alimentos, para ejemplo, *Salmonella typhi* (Fan, Du, Kan, & Yan, 2015) y *Helicobacter pylori* (Yari *et al.* , 2016). Otros ejemplos de uso de LAMP incluyen *Neisseria meningitidis* (Lee *et al.* , 2015), *Listeria monocytogenes* (Birmipa, Kalogeropoulos, Kokkinos, & Vantarakis, 2015). LAMP también se formuló eficazmente contra varias *Pseudomonas*

aeruginosa y *Acinetobacter baumannii* resistentes a múltiples fármacos (Kim *et al.* , 2016).

La alta utilidad del ensayo LAMP demuestra su potencial para la detección molecular precisa y para diferenciar los patógenos que infectan a humanos. LAMP se utilizó para la detección de una amplia gama de virus, por ejemplo, adenovirus (Ziros, Kokkinos, Allard, & Vantarakis, 2015), varicella zoster (Kobayashi, Yagami, Suzuki, Yoshikawa, & Matsunaga, 2014), y citomegalovirus (X. Wang *et al.* , 2015). Los hepatovirus como la hepatitis B (Zhao, Liu, Li, & Sun, 2016) también pueden detectarse mediante la técnica LAMP. Los resultados mostraron que el ensayo LAMP es prometedor para los diagnósticos de hepatitis. Los parásitos protozoarios son igualmente dañinos para los humanos y son una de las principales causas de muerte en el mundo.

Enfermedades parasitarias también han sido detectadas por varios autores mediante el uso de LAMP para el diagnóstico de malaria a partir de *Plasmodium spp.* (Britton *et al.* , 2016; Lau, Lai, Fong, Jelip, & Mahmud, 2016; Y. Wang *et al.* , 2017). Estos estudios proporcionan ejemplos de cómo se puede implementar el LAMP en la detección directa de campo (Poole *et al.* , 2015). Asimismo una investigación realizada por Nzelu *et al.* , en el 2016 para la detección de *Leishmania*, mostró que LAMP era eficiente para detectar la densidad del parásito de *Leishmania* cuando está es muy baja, especialmente durante la etapa de infección temprana (Nzelu *et al.* , 2016). Hubo una serie de prácticas significativas informadas de LAMP, donde se mostró que LAMP es al menos 1000 veces más sensible que la PCR convencional (Wong *et al.* , 2018).

Por otra parte, la detección rutinaria de hongos es laboriosa y costosa. Sin embargo, con la técnica de LAMP se llevó a cabo exitosamente un estudio reciente para detectar una amplia gama de hongos, incluidos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Mucor racemosus* (Nakayama *et al.* , 2017). LAMP requiere cantidades minúsculas de ADN para la detección de patógenos con una alta sensibilidad y un manejo sencillo; estas cualidades hacen que LAMP sea

adecuado para todas las gamas de aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades transmisibles (Nakashima *et al.* , 2014; Singh *et al.* , 2015).

En el año 2016, Kim junto con colaboradores describieron y estandarizaron la técnica LAMP para la identificación del gen *bla_{IMP}* en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, se incluyeron como controles negativos bacterias resistentes a múltiples fármacos sin el gen *bla_{IMP}*, según se determinó utilizando el método de PCR que ellos diseñaron. Examinaron un aislado que portaban el gen *bla_{IMP}*, *Pseudomonas aeruginosa* confirmado por PCR, y lo utilizaron como control positivo, cabe destacar que todas las especies bacterianas fueron obtenidas de aislados clínicos, particularmente esputo. En sus resultados se utilizaron 120 aislados susceptibles (n= 20) y resistentes a carbapenémicos (n=100) de *P. aeruginosa* y 99 aislados susceptibles (n= 24) y resistentes a carbapenémicos (n= 75) de *A. baumannii*, se mostró que solo uno aislados *Pseudomonas aeruginosa* y ningún aislado de *Acinetobacter baumannii*, contenían el gen *bla_{IMP}* comprobado por la técnica de LAMP y PCR. Se justificó este resultado junto con otros trabajos que este gen no juega un rol importante en la resistencia a carbapenémicos en Corea. Este grupo de investigadores eligieron concentración de 2 mM MgSO₄ y la temperatura de 63 ° C como las condiciones más óptimas debido a la mayor actividad de la *Bst* polimerasa. Cabe destacar que el tiempo mínimo de reacción fue de 35 minutos y posteriormente la reacción fue desactivada a 95 ° C. En la Figura 5 se muestra el diseño de los cebadores que utilizaron estos autores para el ensayo de LAMP; están basados en el genoma completo de *P. aeruginosa* NCGM2.S1 (GenBank ID: AP012280.1). Para la especificidad se basaron en un aislado clínico con el gen *bla_{IMP}* como control positivo, y se utilizó la detección de la amplificación en gel de agarosa al 1.5%. La sensibilidad de los cebadores en la detección LAMP del gen *bla_{IMP}*, se realizó con ADN genómico purificado del aislado clínico (control positivo) y se sometió a diluciones seriadas de 8 veces (10 ng / µL a 1 pg / µL). El límite de detección del ensayo LAMP para el *gen bla_{IMP}* fue de 100 pg / µL, que fue igual de sensible que la PCR convencional.

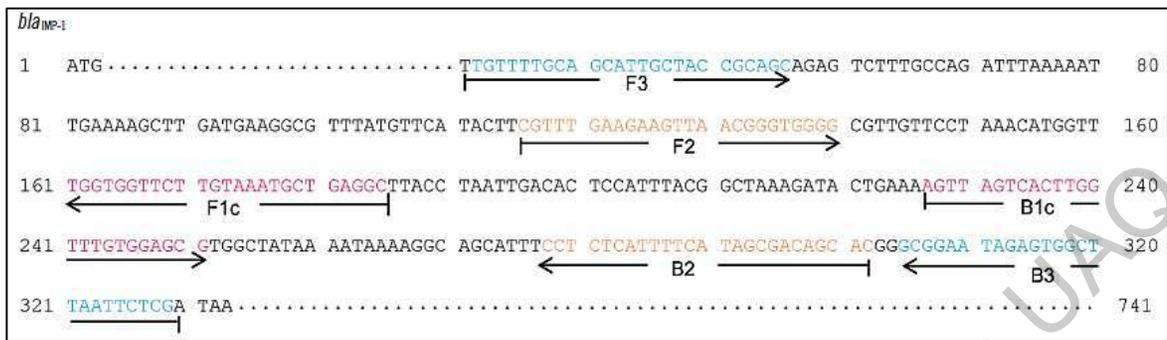


Figura 5. Diseño de cebadores para la técnica de LAMP para el gen *bla_{IMP}* en las secuencias de nucleótidos de ADN de *P. aeruginosa* y su ubicación dentro del genoma. Los cebadores internos hacia adelante y hacia atrás son las secuencias complementarias F1c y B1c indicada de color rosa, y las secuencias F2 y B2 en color amarillo. Los cebadores externos hacia adelante y hacia atrás son F3 y B3, indicados de color amarillo. Tomado de Kim *et al.* 2016.

1.3.3.4 Detección de amplificación

Se han desarrollado distintos tipos de detección de la amplificación del gen diana en la técnica de LAMP. Desde sus inicios el ADN amplificado isotérmicamente se puede visualizar mediante electroforesis en gel; sin embargo desde entonces se ha buscado que LAMP sea fácil de interpretar y así, dejar de utilizar equipos que hacen más caras las técnicas moleculares; por lo tanto, distintos autores han propuesto nuevas técnicas de visualización (Tomita *et al.*, 2008). La detección indirecta de los subproductos de reacción se basa en la formación de pirofosfato liberado mediante la incorporación de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) en la cadena de ADN durante la polimerización. La cantidad de pirofosfato generado en las reacciones LAMP es muy alta y forma un complejo estable con iones metálicos bivalentes como el magnesio, calcio o manganeso (Mori *et al.*, 2001). El pirofosfato precipita con magnesio a concentraciones superiores a 0,5 mM y puede medirse cuantitativamente en términos de turbidez u observarse a simple vista como un granulado después de la centrifugación (Mori, Kitao, Tomita, & Notomi, 2004). Otro método, basado en la disminución de la concentración de magnesio causada por su

unión al pirofosfato, es el colorante azul de hidroxinaftol (HNB). HNB cambia de color violeta a azul cielo cuando se agotan los iones libres de magnesio (Goto & Honda, 2009). Por otro lado, se ha utilizado la calceína, porque al estar en combinación con iones de manganeso libres, éste se une fuertemente al pirofosfato recién formado de la reacción de amplificación, en consecuencia se unen en complejo, la calceína y el magnesio libre, lo que resulta en una fluorescencia verde brillante después de la excitación con luz visible o UV. En luz visible, un cambio de color de naranja a amarillo-verde también se puede observar a simple vista después de una amplificación exitosa, sin embargo esta puede ser no detectable a simple vista (Tomita, Mori, Kanda, & Notomi, 2008).

Una alternativa a estas técnicas de detección indirecta es la detección directa de ADN amplificado mediante la intercalación de colorantes. SYBR Green emite una señal de fluorescencia fuerte al unirse al ADN bicatenario, se usa principalmente en LAMP para la detección del punto final al agregarlo a la mezcla de reacción después de la reacción de amplificación, sin embargo, el cambio de color de naranja a verde no es lo suficientemente significativo como para observarlo a simple vista bajo la luz ambiental cuando se amplificó la cantidad muy pequeña de ADN objetivo. Por lo tanto, a veces se requiere una caja de irradiación UV para una mejor evaluación (Hong *et al.*, 2012).

En la amplificación de ácido nucleico, cuando una ADN polimerasa incorpora un desoxinucleósido trifosfato en la cadena de ADN naciente, los subproductos liberados incluyen un resto de pirofosfato y un ion hidrógeno. Esta característica se utilizó como un método rápido de detección acoplado a la amplificación de ADN mediante el uso de colorantes indicadores sensibles al pH, para medir directamente los iones de hidrógeno liberados durante la incorporación de nucleótidos en lugar de depender de mediciones indirectas como los tintes fluorescentes (Tanner, Zhang, & Evans, 2015).

También se han desarrollado nuevas técnicas de visualización más específicas que pueden detectar la amplificación a través de sondas complementarias al producto de amplificación, como las que se acoplan a

nanopartículas de oro coloidal y las tiras reactivas. En la actualidad, las tiras reactivas es la técnica basada en una membrana que se ha aplicado para la detección de diversos patógenos debido a su conveniencia, rapidez y facilidad para los usuarios. Sin embargo, el tratamiento de la membrana debe ser muy minucioso para minimizar la interferencia de un previo uso (Rodríguez, 2016; Wang, 2006). Las nanopartículas de oro se han utilizado en la detección, donde las moléculas conjugadas actúan como receptores que reconocen la molécula objetivo y luego pueden visualizarse fácilmente mediante el cambio de color del complejo objetivo sin ninguna instrumentación costosa o compleja (Elghanian, Storhoff, Mucic, Letsinger, & Mirkin, 1997).

1.3.3.4.1 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNP) son agrupaciones de átomos de oro de un tamaño que oscila entre 1 y 100 nanómetros (nm), es decir, la milmillonésima parte de un metro. Las AuNP destacan entre los nanomateriales porque exhiben excelentes propiedades físicas y químicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico (Auffan *et al.*, 2009). Una AuNP sintetizada en fase líquida (oro coloidal) se comprende por tres dominios: el dominio I son los átomos de oro internos con una estructura cristalina bien definida (átomos centrales), el dominio II son las capas de átomos expuestas a la superficie (átomos superficiales) y el dominio III es una capa de ligandos orgánicos y surfactantes (Figura 6) (Pluchery, 2012). Mientras que los átomos centrales definen la estructura, los átomos superficiales determinan la actividad catalítica y los agentes protectores establecen el comportamiento químico del oro coloidal (Jadzinsky, 2007).

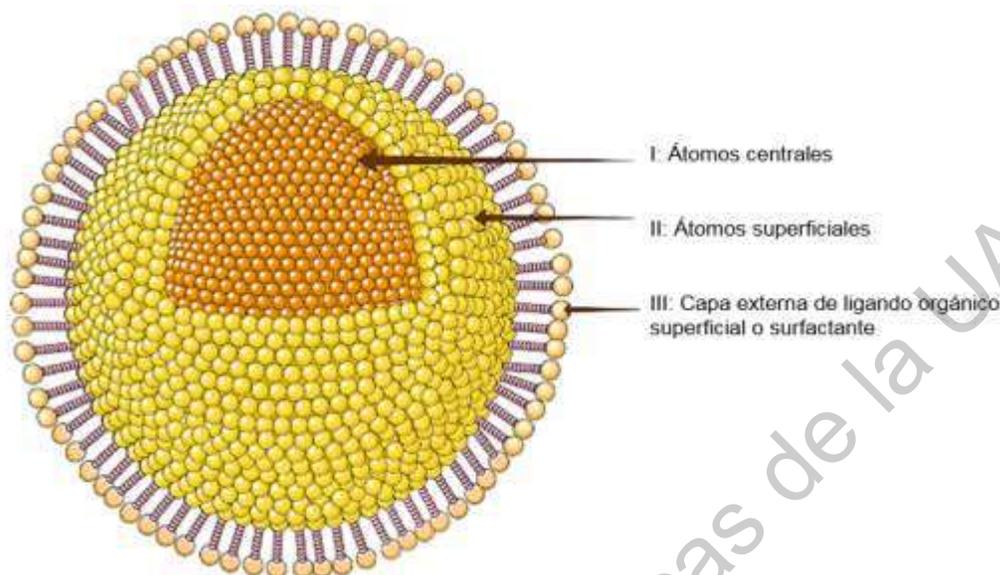


Figura 6. Modelo estructural de una nanopartícula en solución coloidal.

Adaptado de Darweesh, 2019.

La estabilidad de un coloide de oro está fuertemente relacionado a sus características superficiales. Cuando las AuNP no se encuentran estables, tienden a agregarse y a formar aglomerados, esto se debe principalmente a dos fuerzas: electroestática y estérica (Glomm, 2005).

La agregación de las nanopartículas, mediada por fuerzas de Van der Waals, se puede evitar cuando existen cargas superficiales en la AuNP, otorgando estabilidad electroestática. Tal estabilidad es sensible a cambios en el ambiente iónico del coloide por lo que altas concentraciones de sal anulan la doble capa eléctrica disminuyendo la repulsión electroestática. La estabilización estérica es proporcionada a las AuNP por la capa de polímero en la superficie de las nanopartículas que impiden el acercamiento de las mismas (Figura 7) (Capek, 2013).

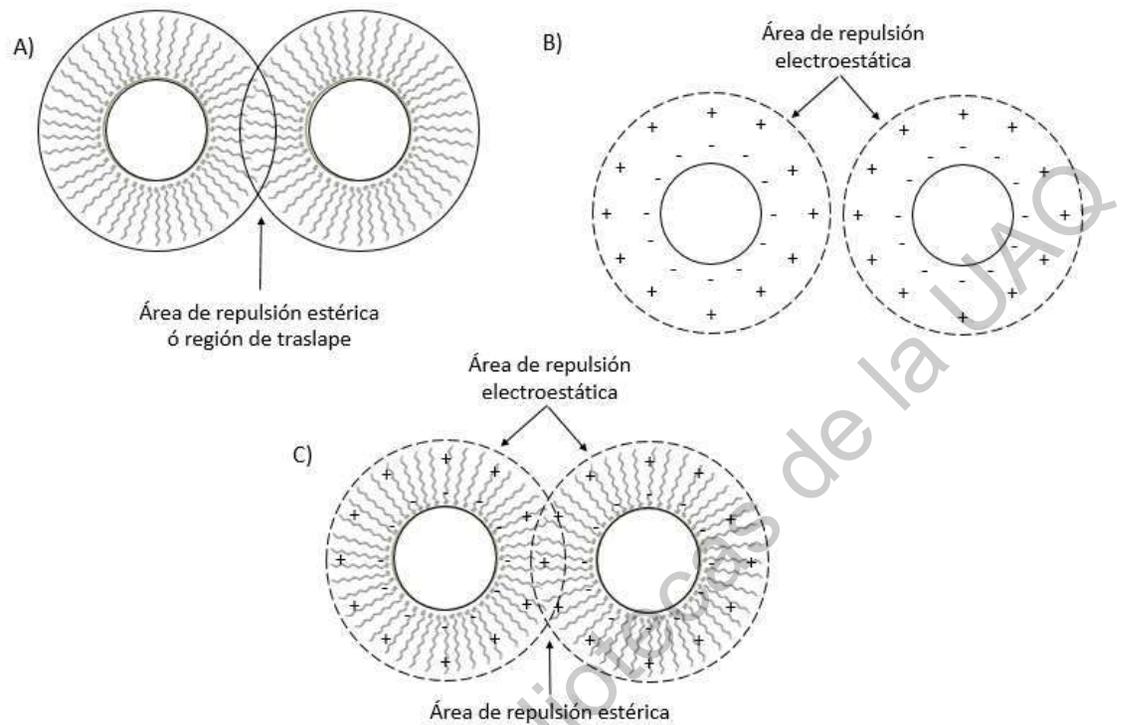


Figura 7. Representación de la estabilización de AuNP, de tipo estérica (A), electroestática (B) y electroestática - estérica (C). Adaptado de Capek, 2013.

Además de las propiedades físicas, las AuNP tienen propiedades ópticas, que han sido aprovechadas en distintos ámbitos de la investigación. Los metales como el oro se caracterizan por poseer una abundancia de electrones en su superficie. Estos no se encuentran unidos al núcleo atómico sino que se mueven a lo largo del material, se comportan como cargas libres también conocido como plasma (Huang, 2010). Estos electrones se encuentran confinados con el nanomaterial, y al ser excitados por una onda electromagnética, pueden oscilar de forma colectiva formando un plasmón en la superficie de la AuNP. Esta oscilación se potencia a una determinada longitud de onda, es decir, entra en resonancia, produciéndose una alta absorción de luz y se emite como un color resultante, el que no se haya absorbido, lo que se conoce como el fenómeno de resonancia del plasmón superficial (RPS) (Figura 8) (Darweesh *et al.* , 2019). Por esta razón las nanopartículas de oro presentan un determinado color y longitud de onda, en

función del tamaño y forma (Arunrut, 2013; Jaroenram, 2012; Muangchuen, 2014; Seetang-Nun, 2013).

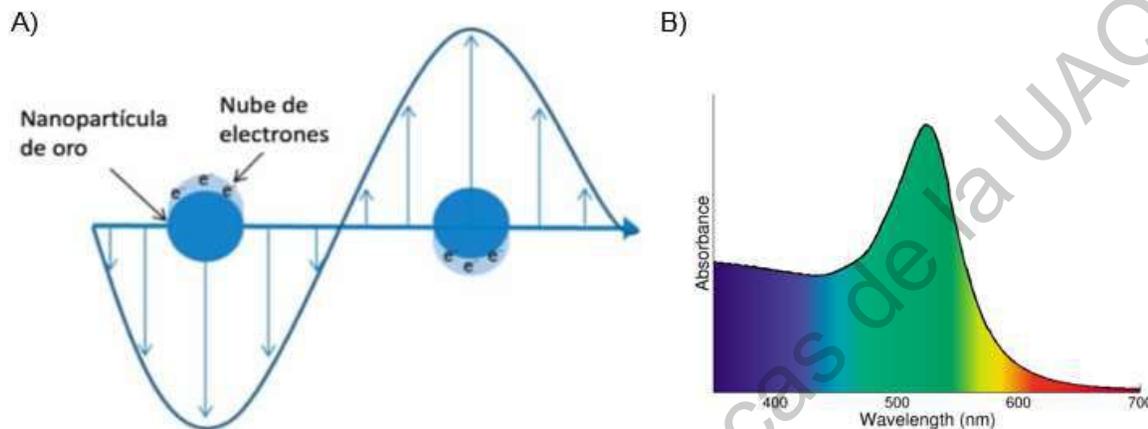


Figura 8. Esquema de la oscilación del plasmón superficial para una esfera de oro de ≈ 25 nm. Donde se muestra el desplazamiento de la nube de electrones de conducción con respecto al núcleo (panel A) y la longitud de onda de con un pico máximo de ≈ 525 nm en un espectrometro UV – Vis correspondiente al tamaño de la AuNP (panel B). Adaptado de Huang, 2010.

Las AuNP pueden ser sintetizadas en distintos tamaños y formas, además pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos como anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc., que sirven como agentes protectores de las AuNP (Al-Qadi, 2009). Para funcionalizar las AuNP se utilizan ligandos bifuncionales, es decir, en un extremo poseen un grupo funcional que les permite unirse a las nanopartículas, mientras que el otro extremo cumple la función de reconocimiento. Las AuNP se pueden funcionalizar de tres maneras: por interacciones electroestáticas, interacción de afinidad y por unión covalente. Los grupos funcionales más utilizados son el tiol (-SH), hidroxilo (-OH) y amino (-NH₂), entre ellos el grupo tiol es el predominante ya que forma un enlace covalente muy fuerte con el oro (126 – 146 kJ / mol), en donde el ligando adquiere una gran estabilidad en la superficie del material (Pluchery,

2012). Los ácidos nucleicos pueden ser fácilmente modificados con grupos tioles (-SH) para ser injertados en las nanopartículas mediante uniones de tipo covalente, dando lugar a nanoconjugados covalentes estables (Oishi, Nakaogami, Ishii, & Nagasaki, 2006).

1.3.3.4.2 Detección colorimétrica de ADN por AuNP

En 1996, se describió por primera vez el uso de AuNP funcionalizadas con tiol y una sonda de ADN para la detección colorimétrica de secuencias de ADN complementario. En este estudio las AuNP-ADN al ser mezcladas con la secuencia complementaria resultó en la formación de una red polimérica que cambiaba del color rojo al azul-morado y un corrimiento en el espectro de absorción de 520 a 570 nm (Mirkin, Letsinger, Mucic, & Storhoff, 1996). El control de la temperatura en el sistema es fundamental para la hibridación entre la sonda en la AuNP y el ADN complementario (Thaxton, 2006).

En el ensayo de detección mediante el complejo AuNP-ADN / ADN complementario, la clave es el control de la dispersión y agregación de las AuNP por la concentración de sal para la detección visual colorimétrica (Glomm, 2005). Existen dos mecanismos de agregación de las nanopartículas en sistemas homogéneos: entrecruzado y sin entrecruzar. En el primero, la agregación de las AuNP, es mediada por la unión entre ADN-ADN ó ADN-ARN. En la agregación sin entrecruzar el cambio de color está dado por cambios en la carga superficial del analito, siendo la agregación inducida por electrolitos, ligandos o ácidos (Lin, Liu, & Chang, 2009). El mecanismo de entrecruzado ha sido ampliamente utilizado, por ejemplo AuNP-ADN para la detección de microorganismos como *Salmonella enterica* (Kalidasan, Neo, & Uttamchandani, 2013), *Brucella melitensis* (Sattarahmady, Kayani, & Heli, 2015) y el virus del camarón de la cabeza amarilla (Jaroenram et al., 2012).

Por tanto, cuando se mezclan las AuNP-ADN y la presencia de la secuencia de ADN objetivo (muestra positiva) se incuban y posteriormente se adiciona una concentración óptima de sal, se entrecruzan las moléculas de ADN de la muestra y

las nanopartículas funcionalizadas. Lo que resulta en la agregación del ADN como lo indican los cambios de color de la solución de color rojo a morado y / o gris, en este caso, el pico de absorción UV-Vis tiene una longitud de onda aproximada de 550 a 650 nm. Por el contrario, en ausencia de la secuencia de ADN objetivo (muestra negativa), el complejo AuNP-ADN soporta la dispersión de nanopartículas en condiciones de fuerza iónica, y como resultado, no se observa ningún cambio colorimétrico (An & Jin, 2012; Muangchuen et al., 2014).

Dirección General de Bibliotecas de la UFG

1.4 JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa multirresistente es responsable del 10 - 15% de IAAS, siendo un gran problema de salud pública por estar relacionado con una alta mortalidad, la cual supera el 50% a nivel mundial.

En los últimos años se ha reportado resistencia a los carbapenémicos, antibióticos de última línea en el tratamiento para *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos. A partir de ello, se han empleado pruebas de susceptibilidad basadas en el crecimiento bacteriano para la identificación de la resistencia antibiótica; no obstante, estas requieren días para obtener un resultado. La resistencia antimicrobiana se atribuye a distintos mecanismos en *P. aeruginosa*, donde se reporta que uno de los más comunes es la síntesis de carbapenemasas, codificadas por gen *bla_{IMP}*. La detección molecular de este gen, se ha extendido por todo el mundo desde su identificación, a través la PCR; método precursor de amplificación de ADN, sin embargo, esta técnica es cara, con tiempos relativamente largos y necesita equipos sofisticados para la obtención del resultado. Por otro lado, la técnica de LAMP ha demostrado ser más rápida, sensible y más rentable que la PCR; LAMP requiere una mínima infraestructura de laboratorio y poca capacitación para su desarrollo. Recientemente en Corea, diseñaron la técnica de LAMP para la detección de *bla_{IMP}* en *P. aeruginosa* y utilizaron electroforesis para visualizar el resultado, sin embargo, esto aumenta el tiempo de la prueba y requirió un equipo que en muchos laboratorios no están disponibles. Es por ello que actualmente se propone el uso de AuNP, para mejorar la detección en productos de LAMP por su alta especificidad, sensibilidad y una fácil interpretación visual por cambio colorimétrico. Particularmente en el país esta técnica acoplada a AuNP no se ha utilizado para este fin y es de vital importancia, ya que el diagnóstico tardío de la susceptibilidad antimicrobiana tiene impactos en la calidad de vida del paciente y altos costos en la salud pública. Por lo que, la implementación de esta técnica de diagnóstico rápido y oportuno, permitirá ahondar en el conocimiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos de la región.

1.5 HIPOTESIS

El uso de AuNP conjugada a la técnica de LAMP permite la detección visual del gen *bla_{IMP}* en ADN de *P. aeruginosa* resistente a carbapenemicos.

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

Implementar la técnica de LAMP acoplada a nanopartículas de oro, para la detección del gen *bla_{IMP}* en muestras de ADN de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos de aislamientos clínicos.

1.6.2 Objetivos particulares

1. Amplificar el gen *bla_{IMP}* a partir de muestras de ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos mediante la técnica PCR.
2. Aplicar la técnica LAMP para la amplificación del gen *bla_{IMP}* a partir de muestras de ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos.
3. Desarrollar la detección visual de amplificación por LAMP acoplado a nanopartículas de oro, del gen *bla_{IMP}* a partir de muestras de ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.7 Diseño

1.7.1 Definición del universo

ADN's donados de *P. aeruginosa* con y sin resistencias antibióticas.

1.7.2 Tamaño de muestra

Todos los ADN's donados de *P. aeruginosa* pertenecientes a la colección de ADN's del Laboratorio de Investigación en Inmunología y vacunas (LINVAS) en la Facultad de Ciencias Naturales.

1.7.3 Variables de inclusión, exclusión y eliminación

No aplican en el presente estudio.

1.7.4 Definición de variables y unidades de medida

El ADN analizado en el estudio se clasificarán con la presencia o ausencia de resistencia a imipenem (principal carbapenémico) mediado por el gen *bla_{IMP}* definido en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Variables y unidades de medida del diseño.

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Resistencia a carbapenémicos	Resistencia a carbapenémicos	Selección de bacterias que tengan resistencia a carbapenémicos mediante el	Cualitativa Dicotómica	Si / No

		método de VITEK-2		
Presencia del gen <i>bla</i>_{IMP} por LAMP	Presencia del gen <i>bla</i> _{IMP}	Amplificación del gen <i>bla</i> _{IMP} en <i>P. aeruginosa</i>	Cualitativa Dicotómica	Presencia / ausencia
Presencia de <i>bla</i>_{IMP} por PCR	Presencia del gen <i>bla</i> _{IMP}	Amplificación del <i>bla</i> _{IMP} en <i>P. aeruginosa</i>	Cualitativa Dicotómica	Presencia / ausencia

1.8 METODOLOGÍA

1.8.1 Amplificar el gen *bla*_{IMP} a partir ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos.

1.8.1.1 Ácidos nucleicos

Se incluyeron en el estudio ADN de aislamientos bacterianos previamente analizados por el Hospital General Regional #1 (HGR#1) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Querétaro, donadas amablemente por la QFB. Mónica Neri; que se obtuvieron de distintas muestras clínicas como líquido cefalorraquídeo, médula ósea, sangre, pus, orina, secreciones de las vías respiratorias inferiores (secreciones endotraqueales, lavado bronco-alveolar y lavado bronquial), esputo, tejidos y otros fluidos corporales estériles. Para la extracción del ADN de la bacteria el HGR#1 recolectó cada muestra con hisopo estéril y este se enjuagó con el buffer de lisis del kit comercial de PROMEGA de Wizard Genomic DNA purification (lote 0000074196), y después siguieron las instrucciones del fabricante.

Los datos de la identificación bacteriana fueron proporcionados por la QFB. Mónica Neri, y se realizaron previamente mediante cultivo microbiano convencional de rutina y pruebas bioquímicas utilizando técnicas estándar recomendadas (Collee,

Miles, & Watt, 1996) y los microorganismos se identificaron hasta el nivel de especie utilizando tarjetas de VITEK- 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Para la estandarización de las técnicas moleculares se usaron los ADN previamente extraídos (por el HGR#1) de aislados de *P. aeruginosa* con / sin resistencia a carbapenémicos. Además se utilizó material genético igualmente donado por HGR#1 de *P. aeruginosa*, resistente a carbapenémicos, particularmente a imipenem como posible portador del gen *bla_{IMP}* (MM739765) y control positivo del presente estudio, que fue aislado en Querétaro, el año 2019.

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente, se realizó la cuantificación del ADN, y se midieron los parámetros 260/280 y 260/230 para valorar la pureza del ADN, mediante el espectrofotómetro de microvolúmenes (NanoDrop, ThermoFisher1000).

1.8.1.2 Cebadores para la amplificación del gen *bla_{IMP}*

Los cebadores que se utilizaron en este proyecto fueron previamente descritos por los autores Kim y colaboradores en 2016, su diseño se basó en la amplificación específica del gen *bla_{IMP}* en el genoma completo de *P. aeruginosa* NCGM2.S1, con el número de acceso AP012280.1 que se descargó de la base de datos NCBI GenBank. En el Cuadro 4 se indica la secuencia de los cebadores previamente mencionados.

Cuadro 4. Diseños de cebadores LAMP para la detección del gen *bla_{IMP}*. Reportadas por Kim et al. , 2016.

Cebador	Secuencias	Longitud
F3	TGTTTTGCAGCATTGCTACCGCAGC	25
B3	CGAGAATTAAGCCACTCTATTCCGC	25
FIP	GCCTCAGCATTTACAAGAACCACCA- CGTTTGAAGAAGTTAACGGGTGGGG	50

BIP	AGTTAGTCACTTGGTTTGTGGAGCG- GTGCTGTCGCTATGAAAATGAGAGG	50
F2	CGTTTGAAGAAGTTAACGGGTGGGG	25
F1c	GCCTCAGCATTTACAAGAACCACCA	25
B2	GACCTTTTCTCGCCCTTCCATTTAAAT	27
B1c	TGTTGAATGCCCTGATCGGATTGG	24

1.8.1.3 Amplificación del gen *bla_{IMP}*

La amplificación del gen *bla_{IMP}* se optimizó por la técnica de PCR usando los cebadores externos F3 y B3, previamente reportados por Kim y colaboradores en el 2016. Las concentraciones de reactivos se ajustaron para garantizar una amplificación eficaz del gen de interés. Como referencia se usaron las concentraciones y volúmenes de reactivos descritas en el Cuadro 4 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA), así como temperaturas y tiempos de incubación reportadas previamente que se pueden observar en el Cuadro 5. El amplicón del gen *bla_{IMP}* esperado fue de 571 pb.

Cuadro 5. Concentraciones de reactivos para PCR.

Reactivos PCR	Concentraciones
Cebadores F3	0.5 mM
Cebadores B3	0.5 mM
Taq polimerasa	1 U
ADN	30 ng

Cuadro 6. Temperaturas de amplificación por PCR.

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	2 min	95°C
30	15 seg	95°C
	15 seg	57°C
	15 seg	72°C
1	7 min	72°C

Los productos amplificados por PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % y se tiñeron con GelRed. Las imágenes se documentaron utilizando un fotodocumentador UV (Bio-Rad, Hercules, EE.UU).

1.8.2 Aplicar la técnica LAMP para la amplificación del gen *bla_{IMP}* a partir de ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos.

1.8.2.1 Reacción LAMP para el gen *bla_{IMP}*

Las reacciones de LAMP se llevaron a cabo en mezclas de reacción de 25 µl que contuvieron los reactivos descritos en el Cuadro 7 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA). Finalmente, se añadió como mínimo 30 ng de ADN genómico molde al tubo de reacción. La reacción se llevó a cabo en el tubo de reacción a 60 ° C durante 60 min en incubadoras de baño seco y se inactivo a 83 ° C durante 3 minutos (Kim et al., 2016).

Cuadro 7. Concentraciones de los reactivos para LAMP.

Reactivos	Concentración
Tris-HCl (pH 8,8, 25 °C)	20 mM
KCl	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
Triton® X-100	0.1%
MgSO ₄	2 mM
dNTPs	1.4 mM
<i>Bst</i> ADN polimerasa	8 U
FIP	40 mM
BIP	40 mM
F3	5 mM
B3	5 mM
Total de reacción	25 µL

Los productos amplificados por LAMP se analizaron mediante electroforesis en el gel de agarosa al 1.2 % y se tiñeron con GelRed. Las imágenes se documentaron utilizando un fotodocumentador UV (Bio-Rad, Hercules, EE.UU).

La detección visual para detectar productos LAMP, fue realizada por dos métodos colorimétricos, uno utilizando AuNPs funcionalizadas y el otro utilizando azul de hidroxinaftol (HNB) como indicador (Sigma-Aldrich), donde el cambio de color se puede observar a simple vista bajo luz natural, de color morado a azul. Cuando hay presencia de amplificación del ADN en la reacción, el colorante cambia a una tonalidad violeta azul (Figura 9). La adición del colorante a la reacción no afecta la amplificación ni a la sensibilidad de la técnica (Zhu *et al.*, 2009).



Figura 9. Visualización colorimétrica de diluciones de productos de reacción LAMP con colorante HNB. Una reacción positiva se visualiza en tonalidad azul, mientras que la reacción negativa se mantiene de color morada. Tomada de Goto & Honda, 2009.

1.8.3 Desarrollar la detección visual de amplificación por LAMP acoplado a nanopartículas de oro, del gen *bla_{IMP}* a partir de ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos.

1.8.3.1 Sonda complementaria al producto de LAMP

Para el diseño de la sonda complementaria al producto de LAMP se seleccionó una región genética específica y conservada del gen *bla_{IMP}* que estuviera presente en la secuencia amplificada (GenBank ID: AP012280.1). Para garantizar una especificidad óptima, se utilizó como sonda el cebador FIP, mismo que formó parte de la amplificación del gen de interés en la técnica de LAMP. La sonda fue seleccionada porque cumple con las características físicas de longitud máxima de 50 pares de bases y una temperatura de fusión de 60 - 65 ° C, además es capaz de detectar una estructura deseada, descartando estructuras secundarias y la formación de dímeros. Se realizó una búsqueda secuencial en la plataforma GenBank para confirmar la especificidad y estabilidad de la sonda para el producto de la técnica LAMP.

1.8.3.2 Preparación la sonda

El vial que contiene la sonda se centrifugó a 13,200 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 30 segundos, antes de abrirlo para evitar la aerosolización y la pérdida de cebadores liofilizados. Después de la centrifugación, se agregó agua de grado de biología molecular al vial para alcanzar una concentración recomendada de 100 pmol ml⁻¹ en 1 ml de agua grado biología molecular. Los cebadores son relativamente estables, pero la congelación y descongelación repetidas degrada rápidamente los cebadores. Para evitar la degradación, se dividió la sonda en soluciones de trabajo y stock, y se almacenan a -20 ° C.

1.8.3.3 Acoplamiento covalente de sondas a las AuNP

Para acoplar las sondas a las AuNP, como primer paso se diluyeron los cebadores a sus concentraciones óptimas, según las indicaciones del fabricante. La sonda de ADN (FIP) se añadió inmediatamente a AuNP coloidales a una concentración final de 500 nM y se incubó a 28 ° C con agitación constante (13,000 rpm) durante dos horas. El acoplamiento de las AuNP se determina midiendo la absorbancia a la longitud de onda máxima (λ máx.) utilizando un espectrofotometría UV-Vis. La solución de AuNP se almacenará a 4 ° C en la oscuridad hasta su uso.

1.8.3.4 Espectrofotometría UV – Vis de las AuNP

Para obtener los espectros de absorbancia de las AuNP desnudas como de las funcionalizadas (Gold (III) chloride hydrate 99.995%, Sigma-Aldrich), se leyeron las muestras de cada una de las nanopartículas utilizando $\approx 100 \mu\text{L}$ por cada medición y un barrido de longitudes de onda desde 0 hasta 1000 nm, en el lector de placas de absorbancia con puerto de cubeta (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH).

1.8.3.5 Hibridación y detección de productos de LAMP

La hibridación de productos LAMP en conjunto con la solución de sonda y las AuNP (2,5 nmol) para la detección se realizó en una relación 1: 1 a diferentes temperaturas 60, 62 y 65 ° C, en un volumen total de 10 μL (5: 5 μL) durante 5, 10, 15 y 20 minutos. El efecto de la agregación inducida por la concentración de sal se probó posteriormente a diferentes concentraciones finales de NaCl (0–800 mM y 1M) para determinar las concentraciones óptimas para la detección visual del cambio de color y el recocido de la sonda a su objetivo. Después de agregar NaCl, el resultado negativo apareció cuando los complejos de la sonda LAMP-AuNP / ADN se mantuvieron dispersos y el color rojo intenso de la mezcla se pudo observar a simple vista, mientras que el resultado positivo se representó por el complejo de la agregación de AuNP / ADN, el color de la solución cambia de rojo intenso a púrpura, luego a incoloro después del período de incubación.

1.9 Bioética

Para abordar los aspectos bioéticos de este proyecto nos basaremos en el Manual de bioseguridad, de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su versión del año 2005, en el capítulo 1 “principios generales”, donde se establece que se utilicen las medidas de bioseguridad que involucran a todas las dependencias de la institución. Con base a lo que este manual sugiere, todo el personal y visitantes deberán cumplir con las normas establecidas en el laboratorio para prevenir accidentes; utilizando barreras, que interpongan al contacto directo del material con el operador, además de medios de eliminación del material contaminado, los cuales se procesan y eliminan muestras biológicas sin riesgo para los operadores y la comunidad. Durante la realización del presente proyecto se trabajará con ADN de *P. aeruginosa*, bacteria que se clasifica como grupo de riesgo tipo dos, es decir, que es de un riesgo individual moderado y riesgo poblacional bajo; podría provocar enfermedades humanas, pero tienen pocas probabilidades de ser un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, o el medio ambiente, dado que se cuenta con medidas para prevenir o combatir la infección. Cabe mencionar que durante el trabajo no se manipulará cultivos de *P. aeruginosa*, su material genético será brindado amablemente por colaboradores que previamente realizaron la extracción de ADN. El laboratorio en el que se realizarán todos los experimentos (Laboratorio de Investigación de Inmunología y Vacunas, LINVAS) cumple con los requisitos mínimos de un laboratorio de bioseguridad nivel 2, según las pautas descritas por la OMS en el Manual de bioseguridad 2005, por lo tanto, se podrán aplicar todas las medidas de bioseguridad mínimas necesarias para evitar la propagación del ADN y los desechos de sus respectivas técnicas moleculares. El material genético se trabajará en cabinas de eflujo de laminar nivel 2 para evitar la exposición a salpicaduras, además no se manejarán objetos punzocortantes (agujas, navajas ni material de vidrio), el material utilizado será desechable, las puntas de las micropipetas tienen filtros para evitar contaminación. El área de trabajo expuesta será desinfectada antes y después del uso, con detergentes y desinfectantes como hipoclorito sódico al 1%, etanol al 70%,

glutaraldehído al 2%, formaldehído, alcohol isopropílico al 4%, además de una inactivación física, la cual se realiza con calor húmedo a 121°C durante un mínimo de 15 minutos, o con calor seco a 170°C - 250°C durante al menos 30 minutos. Los desechos biológicos se manipulan de forma adecuada al colocarlos en contenedores y bolsas rojas que posteriormente son descontaminados. El equipo de protección personal indispensable involucra: batas, guantes y lentes.

Nos basaremos en el capítulo “Técnicas mínimas generales de bioseguridad” del Manual de bioseguridad en el laboratorio de la OMS del año 2005 para la manipulación, el manejo, desecho e inactivación de materiales con presencia de ADN de microorganismos patógenos en el laboratorio. Además, nos enfocaremos también en el capítulo “Bioseguridad y tecnología del ADN recombinante”, para las “consideraciones de bioseguridad en relación con los vectores de expresión”, donde se indica cuáles son las propiedades a evaluar del organismo donante, la naturaleza de las secuencias de ADN que van a transferirse y las propiedades del entorno; del mismo modo, nos basamos en la “Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados” DOF- 18-03-2009, donde se indican los procedimientos correctos de la manipulación y el desecho correcto del material genético diseñado de forma *in vitro*, además de las medidas para la protección de la salud humana y del ambiente, en caso de que ocurriera un evento de liberación no deseado, y los métodos de limpieza o disposición final de los residuos de la liberación.

1.9.1 Bioseguridad en el laboratorio

En materia de bioseguridad en el LINVAS, la manipulación de RPBI (Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos) y RP (Residuos Peligrosos) generados durante el presente proyecto, se realizará con el cumplimiento adecuadamente del apartado de “procedimientos de manipulación, eliminación de material y desechos contaminados” del Manual de bioseguridad en el laboratorio del año 2005, en donde se cumple con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, de protección ambiental, Salud ambiental, Residuos peligrosos biológicos-infecciosos,

clasificación y especificaciones de manejo, y la NOM-052-SEMARNAT-2005. Ambas normas establecen los requisitos de identificación, separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos. En el caso particular de nuestro laboratorio, la empresa TRIRSA será la encargada de desechar todo el producto de RP y RPBI en las instalaciones de la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada, en donde se encuentra ubicado el LINVAS, laboratorio donde se realizará toda la fase experimental del presente proyecto. La empresa TRIRSA realiza la recolección 2 veces al mes, según lo establecido.

1.10 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las IAAS son causadas por algunos géneros de bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa*. Esta bacteria que tiene una alta mortalidad, la cual supera el 50% a nivel mundial, dado que presenta una amplia resistencia a diferentes fármacos (OMS, 2019). En 2015, *P. aeruginosa* ocupó el tercer lugar en brotes intrahospitalarios en México (RHOVE, 2016). Los carbapenémicos son los antibióticos de preferencia para el tratamiento para *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (Dantas, Ferreira, Gontijo-Filho, & Ribas, 2014). No obstante, en los últimos años se ha reportado la resistencia a estos antibióticos en aislados de *P. aeruginosa* (Cai et al., 2017; Ulises Garza-Ramos et al., 2015; Sousa Mesquita et al., 2013).

En el libro titulado “Amenazas de la resistencia a antibióticos en los Estados Unidos, 2013”, se clasifica la resistencia a los carbapenémicos en la categoría más grave: “amenaza urgente”, lo que significa que es “Una amenaza inmediata para la salud pública que requiere una acción urgente y agresiva” (Centers for Disease and Control and prevention, 2013). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, las organizaciones de la salud para contrarrestar esta resistencia, no se ha tenido éxito. La OMS en 2017 presentó una lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, teniendo como prioridad crítica a *P. aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos (OMS, 2017).

P. aeruginosa ha adquirido la resistencia a esta familia de antibióticos por dos tipos de mecanismos de resistencia bacteriana. Si la resistencia se debe a la impermeabilidad de la membrana o a la bomba de eflujo, no es transmisible a otras bacterias y no es necesario aislar a los pacientes para prevenir la propagación de la infección (Georges et al., 2006; Lister et al., 2009; Tafur et al., 2009); pero si la resistencia es causada por la producción de enzimas carbapenemasas, es transmisible y es necesaria una acción preventiva (Laudy et al., 2017; Neyestanaki et al., 2014; Tamma et al., 2017). A partir de la noción de este gran problema mundial, el personal de la salud se han dedicado a identificar las resistencias bacterianas con el uso de pruebas de susceptibilidad basadas en el crecimiento

bacteriano; sin embargo, éstos requieren hasta 48 horas para mostrar un resultado y se tiene la limitación de no saber la causa específica de la resistencia (Solanki et al., 2013).

Algunas las bacterias que muestran resistencia a los antibióticos a través de enzimas. Las enzimas bacterianas β -lactamasas hidrolizan el anillo β -lactámico inactivan los fármacos, lo que les confiere resistencia (Urmi et al., 2020). Bioquímicamente, las enzimas β -lactamasas se clasifican en dos grandes grupos: 1) La producción de enzimas β -lactamasas del grupo A, son las que incorporan serina en su sitio activo e hidrolizan diversos β -lactámicos de primera línea como penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (Knott-Hunziker, Waley, Orlek, & Sammes, 1979). 2) Las metalobetalactamasas son enzimas del grupo B que contienen uno o dos iones de zinc esenciales en los sitios activos e hidrolizan casi todos los antibióticos betalactámicos disponibles clínicamente (Salgado, Gilsanz, & Maseda, 2015). Entre ellas la enzima más común del grupo B es la enzima imipenemasa (IMP), reportada por primera vez en 1991 por Watanabe, es codificada por el gen *bla_{IMP}* en bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* (Gong et al., 2018; Khorvash, Yazdani, Shabani, & Soudi, 2017).

La técnica de PCR es el método precursor de amplificación de ADN para la detección de genes de resistencia, siendo altamente rápida, sensible y específica. A través de esta técnica, la detección molecular del gen *bla_{IMP}* se ha extendido por todo el mundo desde su identificación (Gong et al., 2018; Khorvash et al., 2017; Neyestanaki et al., 2014; Sánchez-Martinez et al., 2010; Senda et al., 1996).

1.10.1 Amplificar el gen *bla_{IMP}* a partir ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos.

Para cumplir con el objetivo uno de este proyecto, se realizó un análisis de los cebadores, reportados por Kim et al. en el 2016 para el gen *bla_{IMP}*, desglosado en el Cuadro 8. En el cual se incluyen las secuencias de los cebadores, la longitud, la

temperatura de hibridación (o también llamada T_m por temperatura de melting, en inglés), el porcentaje de GC en la secuencia nucleotídica y el Delta G de dímeros; con valores esperados de 20-25 nucleótidos de longitud, un 40-60 en porcentaje de GC, una T_m de 50-65°C y un Delta G: $< - 8$ kcal/mole en dímeros. En todos los casos se cumplen los criterios establecidos para el diseño de cebadores como los más óptimos para una amplificación genética (Kalendar, Lee, & Schulman, 2009; Orozco-Ugarriza, Anaya, & Martinez, 2016).

Cuadro 8. Análisis bioinformático de cebadores de LAMP para el gen *bla_{IMP}*.

Cebador	Secuencias (5' → 3')	Longitud	T_m (°C)	% GC	Delta G (kcal/mole)
F3	TGTTTTGCAGCAT TGCTACCGCAGC	25	62.8	52	-1.98
B3	CGAGAATTAAGC CACTCTATTCCGC	25	57.5	48	-0.36
FIP	GCCTCAGCATTTA CAAGAACCACCA- CGTTTGAAGAAGT TAACGGGTGGGG	50	-	50	-6.55
BIP	AGTTAGTCACTTG GTTTGTGGAGCG- GTGCTGTCGCTAT GAAAATGAGAGG	50	-	48	-3.35

A partir de los cebadores F3 y B3 previamente diseñados se efectuó la técnica de PCR para la amplificación del gen *bla_{IMP}*, con una muestra de ADN de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos donada al banco de ADN del LINVAS, que fue aislada y extraída de una muestra clínica por colaboradores del proyecto en el HGR#1 (MM739765). La prueba mostró una banda intensa en la talla esperada, en

la electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. El control positivo se eligió con base a los resultados obtenidos en la PCR, confirmando que era portador del gen *bla_{IMP}* (Figura 10). La muestra de ADN portadora del gen se utilizó en las posteriores reacciones de amplificación en comparación con otras muestras de ADN de *P. aeruginosa*; mediante la técnica molecular PCR, siendo ésta más la sensible y específica para la detección de genes de resistencia antimicrobiana (Gong *et al.*, 2018).

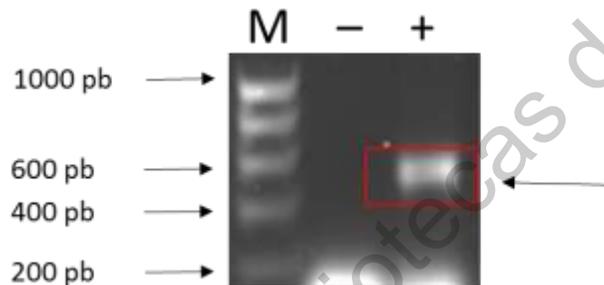


Figura 10. Detección del gen *bla_{IMP}* en *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos mediante la técnica de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del producto de PCR, con temperatura de 57 ° C. Carriles: M: Marcador de peso molecular de 1Kb; (-): Control negativo, mezcla de PCR + agua; (+): Mezcla de PCR + muestra de ADN de *P. aeruginosa* resistente a imipenem.

Posteriormente, para estandarizar el programa de PCR, reportado previamente por Kim *et al.*, se realizó la técnica con un gradiente de temperatura de 60 – 65 ° C, por 90 minutos. El resultado mostró que la temperatura óptima de amplificación fue del rango de 56-57 ° C (Figura 11). La muestra, previamente identificada como portadora del gen *bla_{IMP}*, se utilizó como control positivo en las siguientes reacciones de amplificación.

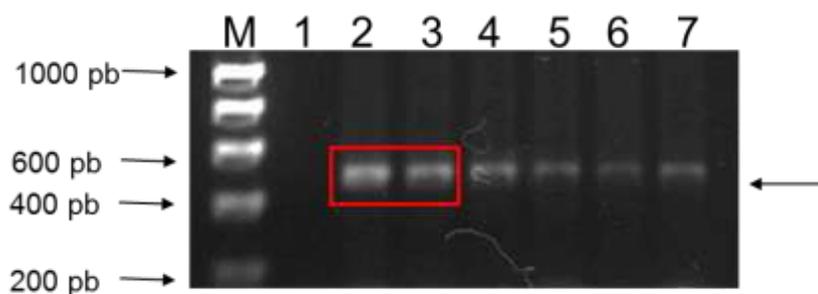


Figura 11. Gradiente de temperatura para la amplificación del gen *bla_{IMP}* de *P. aeruginosa* mediante la técnica de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % del producto de PCR del gen *bla_{IMP}*, teñido con RedGel. Carriles: M: Marcador de peso molecular de 1Kb; 1: control negativo; 2: 56.1 ° C; 3: 57.1 ° C; 4: 58.4 ° C; 5: 59.4 ° C; 6: 60.1 ° C; 7: 60.5 ° C. El cuadro rojo indica la amplificación que se consideró como la más óptima.

Una vez establecido el programa para la amplificación del gen *bla_{IMP}*, se realizó la determinación de la presencia del gen *bla_{IMP}* en 18 muestras de ADN de *P. aeruginosa* procedentes de aislados clínicos, pertenecientes al banco de ADN del LINVAS. De las dieciocho muestras identificamos siete muestras de ADN de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos por PCR (Figura 12). Este resultado sugiere tener ventaja en cuanto al tiempo en comparación con el método convencional, de cultivo microbiano basado en crecimiento bacteriano de 48 horas (Nusrat *et al.*, 2019). Sin embargo, el tiempo total de detección del ensayo para este método puede requerir más de 8-10 horas, incluyendo la extracción de ADN, la amplificación por PCR y detección de amplicones por electroforesis en geles de agarosa (Mori & Notomi, 2009).

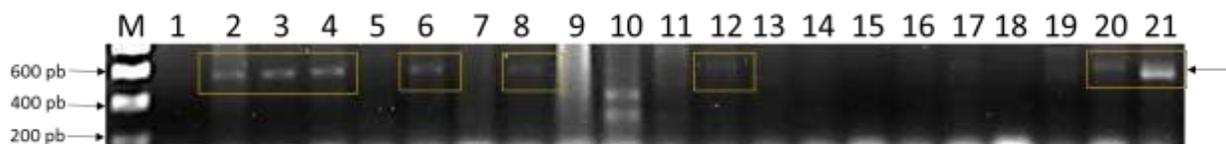


Figura 12. Amplificación del gen *bla*_{IMP} de muestras de ADN de *P. aeruginosa* mediante la técnica de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % del producto de PCR del gen *bla*_{IMP} con una temperatura de amplificación de 57 ° C, teñido con RedGel. Carriles. M: Marcador de peso molecular de 1Kb; 1: Control negativo, mezcla de PCR + agua; 2-20: muestras de ADN de *P. aeruginosa*; 21: Control positivo, mezcla de PCR + muestra positiva de *P. aeruginosa* resistente de imipenem. Los cuadros color amarillo evidencian el amplicón del gen *bla*_{IMP}.

Las técnicas moleculares han ido innovando en cada ámbito al cual se aplica. LAMP es una nueva técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (Notomi et al., 2000), que hoy en día se conoce como una prueba de diagnóstico molecular rápida, específica, sensible, rentable, fácil de operar y muy prometedora para múltiples patógenos infecciosos (Birmpa et al., 2015; Britton et al., 2016; Parida et al., 2008; Yari et al., 2016).

1.10.2 Detección del gen *bla*_{IMP} a partir de ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos mediante la técnica LAMP.

La técnica de LAMP se aplicó para la detección del gen *bla*_{IMP} utilizando los cebadores y el programa reportado previamente por Kim et al., en el 2016. La técnica de LAMP se realizó utilizando 30 ng de ADN total de *P. aeruginosa* del control positivo (MM739765) portador del gen *bla*_{IMP}.

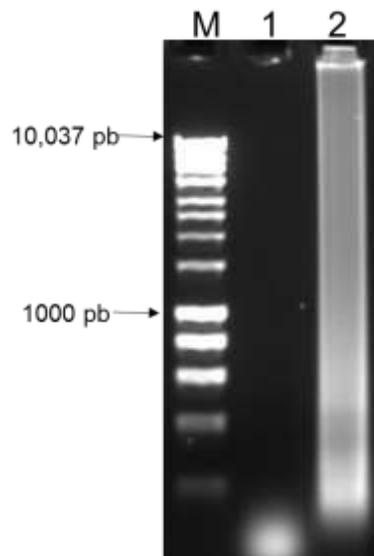


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa para producto de LAMP del gen *bla*_{IMP}. M: Escalera de 1Kb; (-): Control negativo, mezcla de PCR + agua; (+): Control positivo *P. aeruginosa* resistente de imipenem.

Para determinar la mejor temperatura de amplificación, se realizó un gradiente de temperatura en un rango de 60 - 65°C, considerando que estudios previos mostraron a la temperatura de 63 ° C como óptima, por Kim et al. En la Figura 14 se muestra la amplificación del gen *diana*, con el barrido característico de una amplificación por LAMP. De manera interesante, no observamos diferencia de amplificación del gen entre las temperaturas analizadas. Dado que las temperaturas más cercanas a la T_m aumentan la especificidad de la detección por LAMP, se seleccionó la temperatura de 60 ° C como la temperatura óptima (Kono, Savan, Sakai, & Itami, 2004). La amplificación del gen pudo llevarse a cabo en 60 minutos como lo describieron Kim et al.; siendo una técnica molecular más rápida que PCR para la detección de genes de resistencia antimicrobiana (Cheng, 2014; Mori & Notomi, 2009).

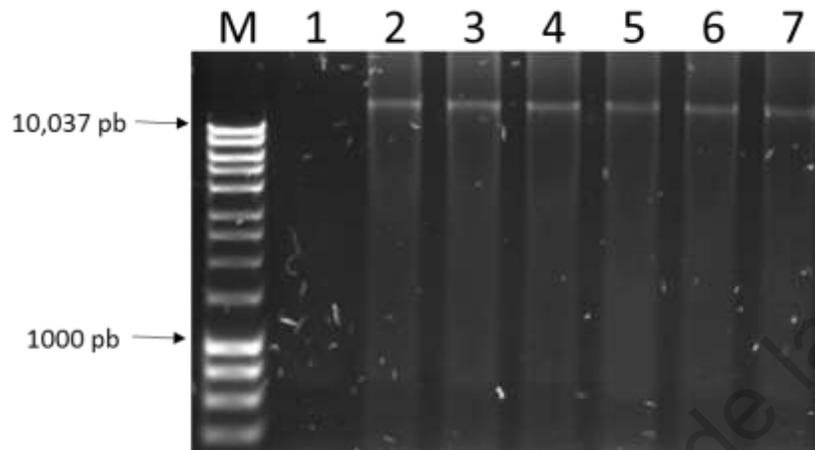


Figura 14. Gradiente de temperatura para la amplificación del gen *bla_{IMP}* de *P. aeruginosa* mediante la técnica de LAMP. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del producto de PCR del gen *bla_{IMP}* utilizando un gradiente de temperatura. M: Marcador de peso molecular de 1Kb; 1: Control negativo, mezcla de LAMP + agua; 2-7: mezcla de LAMP + ADN de *P. aeruginosa* resistente de imipenem a diferentes temperaturas; 1: 60 ° C, 2: 61 ° C, 3: 62 ° C, 4: 63 ° C, 5: 64 ° C y 6: 65 ° C.

Adicionalmente, se analizó el tiempo mínimo de amplificación, del gen de interés. Por lo que se hizo el experimento de probar la técnica a 35, 45 y 60 minutos con diferentes concentraciones de ADN de nuestra plantilla, para el programa de amplificación genética por la técnica de LAMP. En la Figura 15, se puede observar que en todas las temperaturas y en todas las concentraciones el gen *bla_{IMP}* amplifico, por lo que tomamos el menor tiempo de 35 min y la concentración mínima de 30 ng, como lo mejor para amplificar el gen.

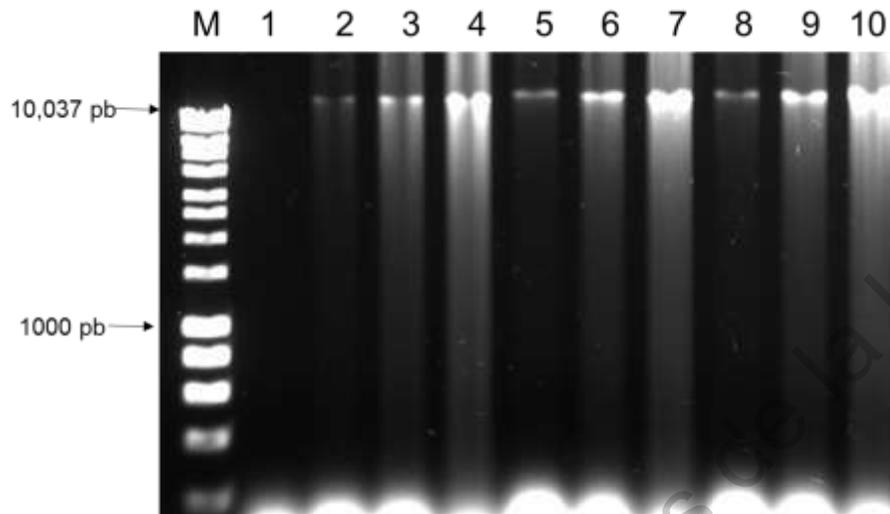


Figura 15. Optimización del tiempo de reacción de LAMP utilizando una plantilla de ADN de *P. aeruginosa* resistente a imipenem portador del gen *bla_{IMP}* a diferentes concentraciones. Carriles: M: Escalera de 1Kb; 1: Control negativo, mezcla de LAMP + agua; 2-4: 30, 50 y 125 ng a 35 minutos; 5-7: 30, 50 y 125 ng/ μ L a 45 min y 8—10: 30, 50 y 125 ng a 60 minutos.

Posteriormente, se determinó la presencia del gen *bla_{IMP}* en 18 muestras de ADN donadas procedentes de aislados clínicos, pertenecientes al banco de ADN del LINVAS. En los resultados de la Figura 16, identificamos 16 muestras de ADN de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos con la presencia del gen *bla_{IMP}* mediante la técnica de LAMP.

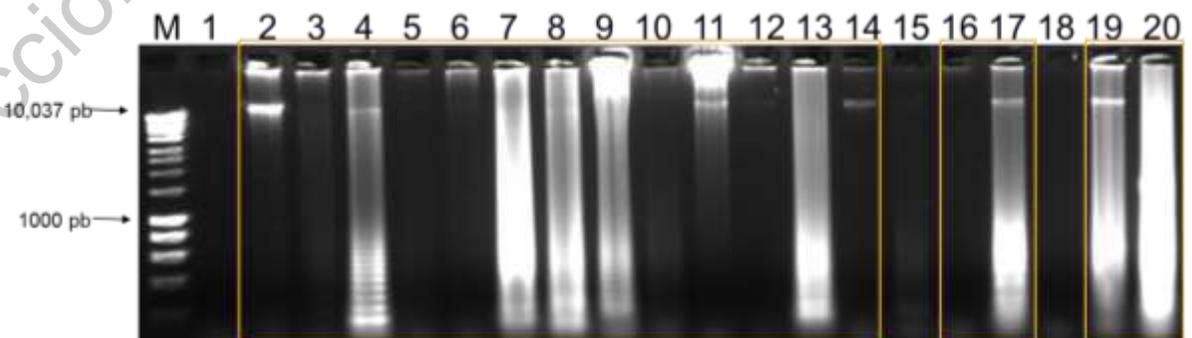


Figura 16. Amplificación del gen *bla*_{IMP} de muestras de ADN de *P. aeruginosa* mediante la técnica de LAMP. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % del producto de LAMP del gen *bla*_{IMP} con una temperatura de amplificación de 60 ° C, teñido con RedGel. Carriles. M: Marcador de peso molecular de 1Kb; 1: Control negativo, mezcla de LAMP + agua; 2-19: muestras de ADN de *P. aeruginosa*; 20: Control positivo, mezcla de LAMP + muestra positiva de *P. aeruginosa* resistente de imipenem. Los cuadros color amarillo evidencian el barrido de amplificación del gen *bla*_{IMP}.

En este estudio, la técnica de LAMP se pudo llevar a cabo a 60 ° C durante 35 minutos, lo que fue más rápido que la reacción de PCR, que se describió anteriormente por Khorvash y col. en 2017, debido a la adición de cebadores internos que aceleraron la reacción de LAMP. Esta técnica logra la amplificación de ADN en un tiempo más corto que la PCR y de una forma más simple, sin disminuir la sensibilidad o especificidad que una técnica molecular posee. Además la técnica requiere una infraestructura mínima, donde solo es necesario un bloque calefactor o un baño de agua caliente en lugar de un termociclador costoso (Notomi *et al.*, 2000).

Los resultados comparativos de las técnicas moleculares nos muestran que en la técnica de PCR solo se pudieron identificar siete portadores del gen de las 18 muestras (Figura 12), en cambio en la técnica de LAMP se pudieron identificar 16 portadores de las 18 muestras (Figura 16), con la concordancia de los carriles 15 y 18 fueron negativos en los dos casos, lo que nos hace concluir que la técnica de LAMP es más sensible que PCR. Esto se debe a que la amplificación de ácido nucleico objetivo en la técnica de LAMP consiste en un juego de cuatro cebadores que reconocen 6 regiones del ADN diana, teniendo mayor probabilidad de unirse a su región objetivo (Zhang *et al.*, 2017).

Además de las ventajas de rapidez, sensibilidad y especificidad, en LAMP se ha buscado que sea una técnica fácil de identificar visualmente la amplificación, con el menor costo posible y sin necesidad de equipos tan costosos y sofisticados como

en el caso de PCR (Nagamine *et al.*, 2001; Notomi *et al.*, 2000). A través de los años desde que la técnica de LAMP se inventó, se utiliza la electroforesis para saber si existe la amplificación del gen diana en la muestra. Kumar en el 2014 utiliza el SYBR green para observar la fluorescencia verde en los tubos con amplificación, pero en el caso de este intercalante del ADN se necesita una luz UV, lo que aumenta el costo de la prueba. Tanner *et al.*, en el 2015, añade colorantes dependientes del pH para visualizar mediante colorimetría la amplificación genética. La calceína se puede usar en combinación con iones de manganeso libres que tienen un efecto quelante, dando como resultado una fluorescencia verde brillante después de la excitación con luz UV (Mori & Notomi, 2009). El colorante Azul de Hidroxinaftol ha sido ampliamente empleado en la determinación visual de la presencia del gen diana en una muestra, el cual cambia de color violeta a azul cielo por la quelación de iones Mg^{+2} de los dNTPs recién agregados a las cadenas nuevas de ADN (Goto & Honda, 2009; Panferov *et al.*, 2018).

Es por ello que este proyecto propone evaluar diferentes métodos de detección colorimétrica, utilizando 18 muestras de ADN de *P. aeruginosa*, y determinar si el HNB podría funcionar o si el oro coloidal que aplicamos en la técnica tiene más ventajas. En la Figura 17, podemos observar el resultado de la prueba de LAMP con el colorante azul de hidroxinaftol, en donde de las 18 muestras, 16 presentaron el cambio de color de morado a azul, lo que significa que presentan el gen diana.

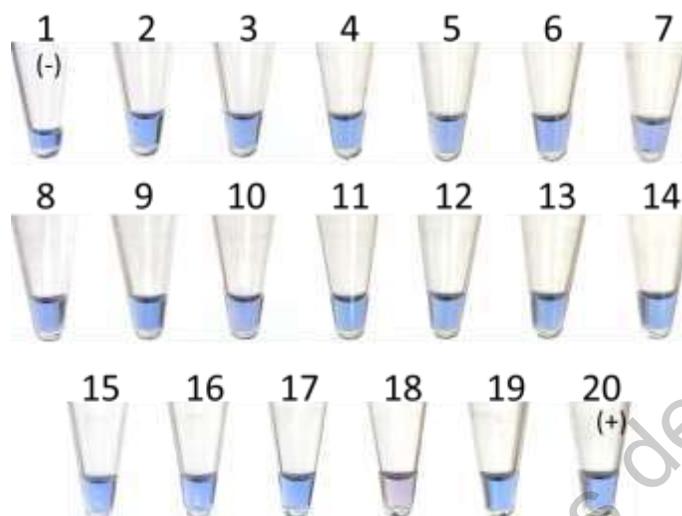


Figura 17. Detección visual de amplificación del gen *bla*_{IMP} por la técnica de LAMP con HNB. Se utilizaron las reacciones de LAMP, que se corrieron en el gel de agarosa de la Figura 16, para la prueba colorimétrica.

Los resultados de las amplificaciones genéticas del gen *bla*_{IMP} en la Figura 16 en comparación con la detección visual de LAMP con HNB en la Figura 17, vemos que el control negativo tornó de color violeta a azul, lo contrario a lo que se esperaba, además no se logra distinguir el color entre los tubos a excepción del 18. El tubo 15 se confunde con una reacción positiva cuando en realidad es una muestra negativa, no posee el gen blanco, ausente en comparación con el gel de electroforesis de la Figura 16, lo que nos muestra resultados falsos negativos. Estos resultados se podrían esperar por ser el HNB es un colorante detecta el cambio de pH de la reacción (Goto & Honda, 2009). El método de la calceína (Tomita et al., 2008) y el método del azul de hidroxinaftol (Goto & Honda, 2009), miden la acumulación del fosfato por producto de la reacción LAMP y podrían dar reacciones de color falso positivo con amplicones LAMP no específicos (Jiang, Li, Milligan, Bhadra, & Ellington, 2013). Ambos carecen de un paso de hibridación para confirmar la naturaleza de los amplicones. Por otra parte, las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de oro coloidal permiten hacer un cambio de color, en presencia

del gen diana al unirse a su cebador complementario en su superficie (Muangchuen et al., 2014).

1.10.3 Desarrollar la detección visual de amplificación por LAMP acoplado a nanopartículas de oro, del gen *bla_{IMP}* a partir de ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos.

Para cumplir el objetivo de la detección visual de amplificación del gen *bla_{IMP}* a partir de ADN de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos por LAMP acoplado a nanopartículas de oro, se utilizaron AuNP, donadas amablemente por el Dr. José de Jesús Olivares Trejo. Las AuNP desnudas y las recubiertas con PEG tienen un diámetro de 17 (+ / - 2) nm. Este diámetro de nanopartículas de oro se ha reportado previamente en otros trabajos como el mejor para los métodos de detección colorimétrica en la técnica de LAMP (Muangchuen et al., 2014; Wachiralurpan et al., 2018). El coloide de oro donado es de color rojo intenso, característico de las AuNP con un diámetro entre 10 y 30 nm.

El análisis por UV – Vis se realizó para observar si había un cambio de absorción con respecto a que las AuNP estuvieran desnudas o acopladas a PEG. La Figura 15 A nos muestra una banda intensa en el espectro visible con una absorbancia de 523 nm correspondiente a la banda máxima de absorción de las AuNP desnudas y en la Figura 15 B se pueden observar dos bandas, una correspondiente al grupo PEG ditiol (grupo mediador entre el oligonucleótido FIP y las AuNP) con una banda máxima de absorción de 238 nm. Los resultados nos muestran que al estar presente el grupo PEG se observa un arrastre de banda de 523 nm a 530 nm, lo que confirma su unión a las AuNP.

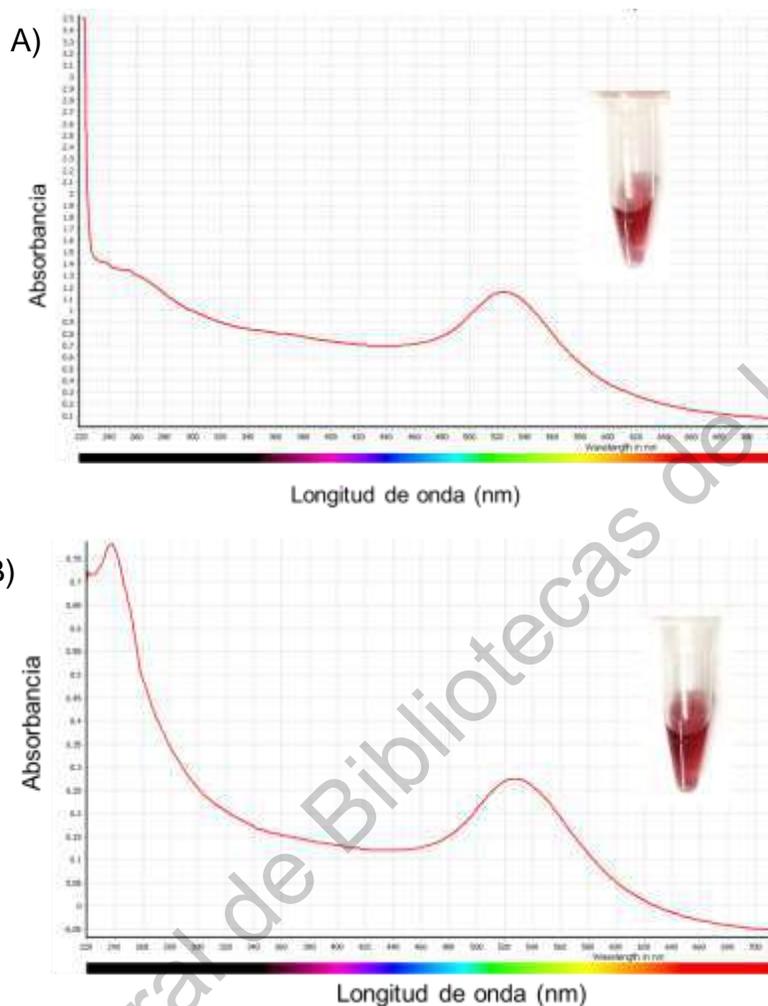


Figura 18. Espectros de absorción UV - Vis de las AuNP donadas. A) AuNP desnudas, B) AuNP + PEG ditiol. En el recuadro interior se indica una fotografía de las nanopartículas.

La síntesis del complejo AuNP – PEG ditiol – sonda de ADN se realizó utilizando el oligonucleótido FIP con una concentración 10 mM. La concentración de las AuNP con la capa de ADN es importante, ya que si está saturada, esto puede inferir con el resultado de los ensayos o en baja cantidad, podría tener un bajo rendimiento y bajos niveles de detección (Kumvongpin *et al.*, 2016). La Figura 16 muestra dos bandas, una correspondiente al grupo PEG ditiol con un máximo de longitud de onda de 249 nm, y otra banda a las AuNP con una banda intensa a 524

nm. Se esperaba un arrastre de bandas después de la unión con el oligonucleótido FIP porque al tener la sonda ADN unida, las nanopartículas cambian su absorbancia y la banda se desplaza en la longitud de onda de absorción como se ha observado en otros trabajos (Arunrut *et al.*, 2016; Li & Rothberg, 2004; Muangchuen *et al.*, 2014; Seetang-Nun, 2013). Los tubos de las AuNP desnudas (Figura 15 A), las AuNP unidas al grupo PEG ditiol (Figura 15 B) y las funcionalizadas con el oligonucleótido FIP (Figura 16) no muestran un cambio de coloración significativo, manteniendo el color rojo característico esperado. La caracterización por UV – Vis muestra distintos longitudes de onda máximas, sugiriendo que durante la funcionalización de las AuNP + PEG ditiol se unieron a la sonda FIP adecuadamente (Osmani Bojd, Kamaladini, Haddadi, & Vaseghi, 2017).

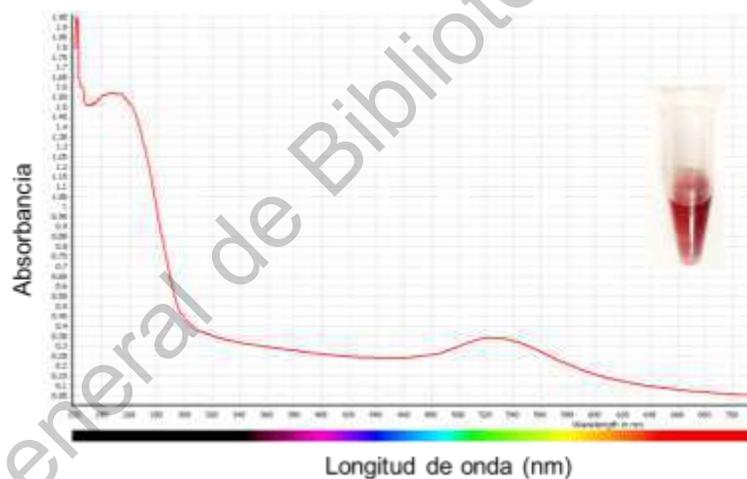


Figura 19. Espectro de absorción UV - Vis del complejo de AuNP - PEG – ADN. En el recuadro interior se indica una fotografía de las nanopartículas.

Las nanopartículas han sido ampliamente utilizadas para el desarrollo de métodos diagnósticos clínicos y para detectar colorimétricamente la presencia de microorganismos, en la clínica y en el ambiente (Baptista *et al.*, 2008; Jung, Jung, Parab, Li, & Park, 2010; C. Kong *et al.*, 2018; Panferov *et al.*, 2018; Seetang-Nun *et al.*, 2013). Las AuNP pueden interactuar con ADN, péptidos y una gran variedad de ligandos. Tienen la capacidad de cambiar de color según las características físicas

o químicas de la nanopartícula, o del ambiente coloide donde se encuentren. Los espectros de absorbancia son indispensables para analizar y garantizar la unión de la sonda a las AuNP (Arunrut *et al.*, 2013; Jaroenram *et al.*, 2012; Seetang-Nun *et al.*, 2013). Se ha informado que las AuNP marcadas con una sonda de ADN complementaria a un ADN objetivo, hace que las nanopartículas se agreguen al estar en contacto con una concentración de sal alta, donde se puede visualizar un cambio de color de rojo a azul (Darweesh *et al.*, 2019; Huang & El-Sayed, 2010; Pluchery, 2012; Song, Li, Cheng, & Liu, 2010a). Por el contrario, en una muestra negativa, la hibridación de la sonda AuNP con un ADN complementaria evita la agregación de las AuNP inducida por una concentración óptima de sal, evitando así un cambio de color en el coloide (Jaroenram *et al.*, 2012; Seetang-Nun *et al.*, 2013). Por lo tanto, el fenómeno de la técnica LAMP combinado con la sonda AuNP puede lograr ver resultados de amplificación a simple vista (Manajit *et al.*, 2018).

Para poder ver un cambio de coloración en las AuNP probamos distintas sales en saturación reportadas en otros estudios para la detección visual mediante AuNP y ADN; por ejemplo: $MgCl_2$ (Jaroenram *et al.*, 2012; Watthanapanpituck, Kiatpathomchai, Chu, & Panvisavas, 2014), $NaCl$ (H. Li & Rothberg, 2004) y el $MgSO_4$ que ha sido ampliamente empleada en este tipo de estudios (Arunrut *et al.*, 2013; Kumvongpin *et al.*, 2016; Manajit *et al.*, 2018; Seetang-Nun *et al.*, 2013; Wachiralurpan *et al.*, 2018), entre otros.

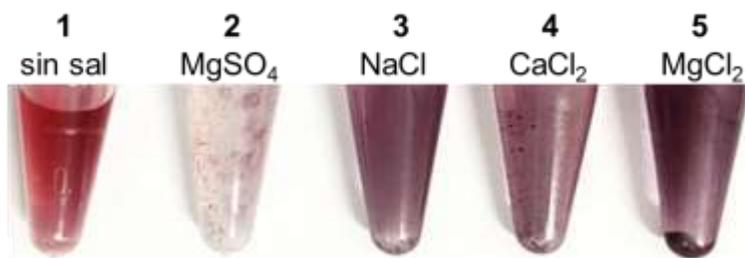


Figura 20. Fotografías de las partículas AuNP-PEG-Ditiol adicionado con sal e incubación a 60 ° C por 10 min. El primer tubo no se le adiciono sal, a partir

de ahí cada tubo contiene diferentes sales en saturación, tubo 2 (MgSO_4), tubo 3 (NaCl), tubo 4 (CaCl_2) y tubo 5 (MgCl_2).

En la figura 20, podemos observar el resultado del cambio de coloración de los tubos con AuNP-PEG-Ditiol y diferentes sales (tubo 2 (MgSO_4), tubo 3 (NaCl), tubo 4 (CaCl_2) y tubo 5 (MgCl_2) incubados por diez minutos, la imagen muestra las nanopartículas con sales en saturación. En todos los tubos observamos el cambio de color rojo a morado e incluso transparente, como en el caso de MgSO_4 , sin embargo, en un estudio realizado por Jaroenram en 2012, se encontró que en ausencia de la plantilla amplificadora de ADN, una concentración baja de sal (es decir, 5 mM) fue insuficiente para inducir la auto agregación de AuNP, lo que condujo a un resultado falso positivo. En el caso de los tubos con las sales NaCl , CaCl_2 y MgCl_2 , las AuNP altamente agregadas, precipitan en las soluciones para formar sedimentos negros / grises, lo que proporciona un medio para la detección biológica y química (Kalidasan et al., 2013). No obstante, la sal divalente NaCl se ha empleado con éxito en varios estudios por ser más eficaz que otras sales para interferir con el estado del plasmón de la superficie de AuNP (Hill & Mirkin, 2006; Jung et al., 2010; Sato, Hosokawa, & Maeda, 2003; Song, Li, Cheng, & Liu, 2010). Por lo tanto, decidimos utilizar el NaCl para los posteriores experimentos.

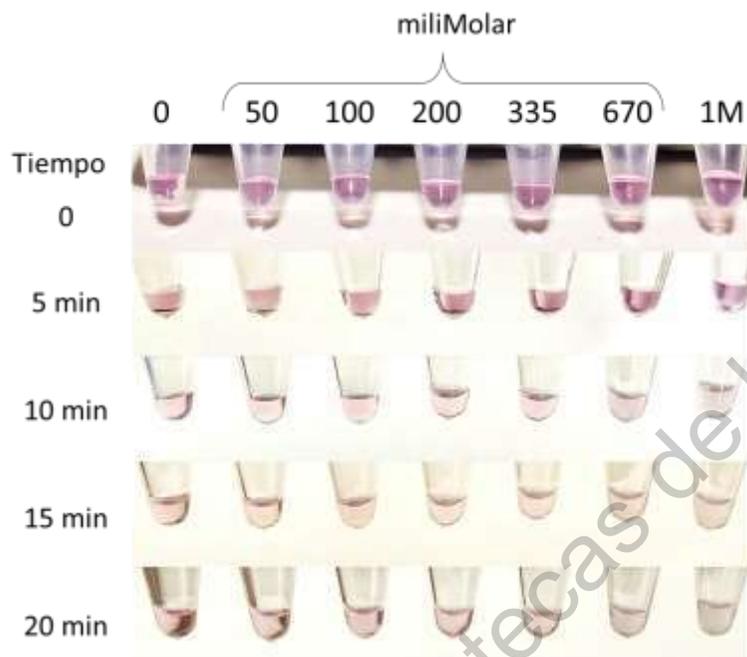


Figura 21. Optimización del efecto de las concentraciones de NaCl en AuNP- ADN, sin plantilla, con monitoreo de tiempo por 20 minutos cada 5 minutos. Cada tubo contiene 3 μ l de AuNP-ADN sin plantilla objetivo y se mezcló con 3 μ l (volumen ajustado) de solución de NaCl para obtener concentraciones finales que van desde 0 mM hasta 667 mM y 1M. El color inicial de la prueba es rosa y conforme la distinta concentración de sal va agregado las nanopartículas, el color cambia a gris, según el tiempo de exposición.

Para optimizar la concentración de sal, las AuNP-ADN se sometieron a la adición de NaCl en varias concentraciones (1, 2 y 4 M) y así lograr concentraciones ajustadas de 50, 100, 200, 335, 667 mM y 1M, en volúmenes finales de 8 μ l. Los cambios de color se registraron visualmente (Figura 21). Una concentración de 335 no promovió el cambio de color pero el 670 mM y el 1 M sí tornaron a gris desde el minuto 10.

Por lo tanto se procedió en hacer pruebas de AuNP-ADN en combinación con controles negativos y controles positivos de las reacciones de LAMP, y concentraciones intermedias de NaCl basados en los resultados anteriores.

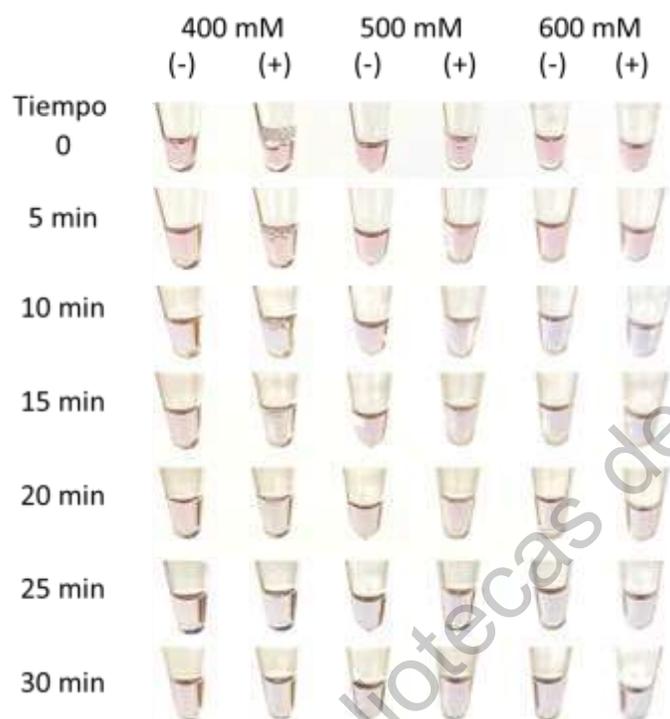


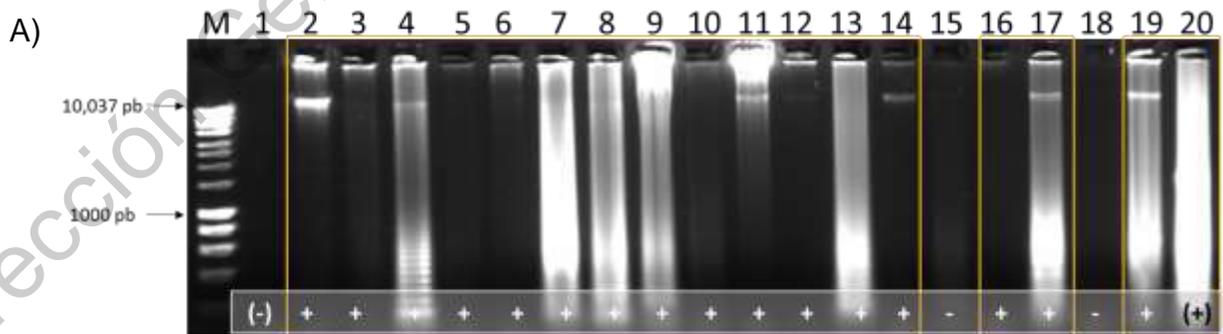
Figura 22. Optimización del efecto de las concentraciones de NaCl en AuNP- ADN y plantilla de ADN, con monitoreo de tiempo por 30 minutos cada 5 minutos. Cada tubo contiene 3 μ l de AuNP-ADN, 3 μ l de producto de LAMP (controles negativos (-) y controles positivos (+)) y se mezcló con 2 μ l (volumen ajustado) de solución de NaCl para obtener concentraciones finales que van desde 400 mM hasta 600 mM.

Se utilizó una relación estándar de AuNP-ADN y el producto de LAMP en 1: 1 (3 μ l: 3 μ l), ya que proporcionó diferencias de color reproducibles entre los resultados de prueba positivos y negativos (Arunrut et al., 2013; Jaroenram et al., 2012; Wachiralurpan et al., 2018).

Los productos de ADN de LAMP (negativo (-) y positivo (+)) se hibridaron con la sonda de AuNP seguido de la adición de 3 μ l de NaCl en varias concentraciones (1, 2 y 4 M) para lograr concentraciones finales 400, 500 y 600 mM. Los cambios de color se pueden observar visualmente (Figura 22). Una concentración final de NaCl de 400 mM fue la que promovió un cambio más evidente de color rosa a gris en

mezclas que contenían ADN diana (carril (+)), mientras que concentraciones de 500 mM o más instantáneamente se agregaron, tornando a color gris. Para evitar una mala interpretación de resultados, se seleccionó NaCl 4 M añadido a una concentración final de 400 mM en un volumen de reacción final de 8 μ l en los experimentos posteriores. Concentración que coincide con otros trabajos (Jaroenram et al., 2012; Watthanapanpituck et al., 2014). Cabe destacar que en la Figura 21 y figura 22, el cambio de color se distingue perfectamente de rosado (color inicial) a gris (color final, en caso de ser positivo) a partir de los 10 minutos, por lo tanto, es el tiempo en el que se incubarán las muestras en este estudio.

La hibridación específica entre la sonda en las AuNP y los amplicones LAMP da como resultado la formación de una red polimérica tridimensional de AuNP entrelazadas y esto conduce a un cambio cuántico en su espectro de absorbancia visualizado como un cambio de color rosa a azul-gris. Por el contrario, los AuNP-ADN se mantienen dispersas en presencia de sal agregada en el blanco y el control negativo que contiene ADN no complementario que evita que formen agregados (es decir, los mantiene separados) para que mantengan su color rojo en presencia de sal agregada (Baptista et al., 2008).



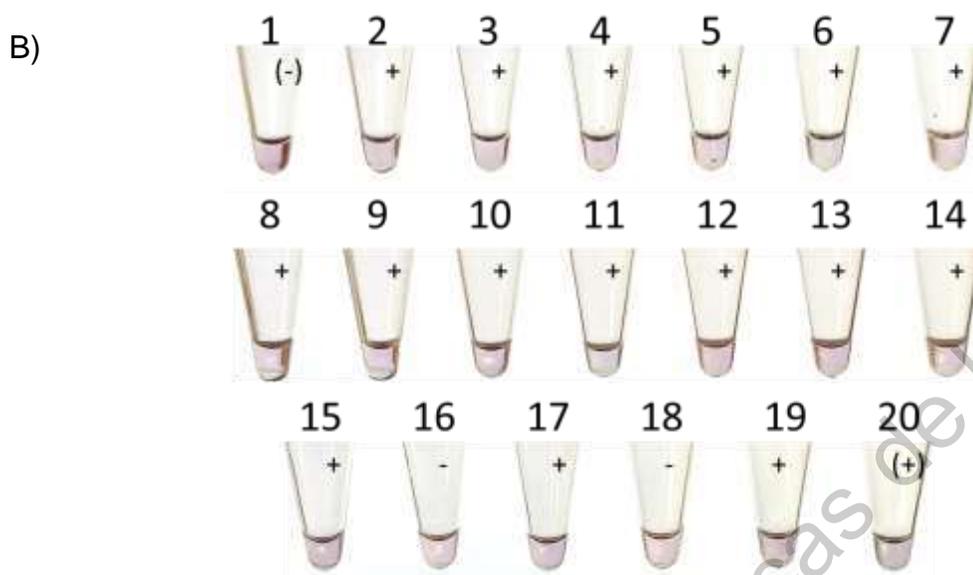


Figura 23. Comparación de la electroforesis en gel de agarosa para la detección de productos LAMP (panel A) y las fotografías el ensayo basado en AuNP (Panel B). Carriles en electroforesis. M: Marcador de peso molecular de 1Kb; el número de carril en el gel corresponde al número de tubo. 1: Control negativo, mezcla de LAMP + agua; 2-19: muestras de ADN de *P. aeruginosa*; 20: Control positivo, mezcla de LAMP + muestra positiva de *P. aeruginosa* resistente de imipenem portadora del gen *bla_{IMP}*. Los cuadros color amarillo evidencian el barrido de amplificación del gen *bla_{IMP}*. En cada Figura 23A y 23B se especifica cómo fue interpretado cada resultado por los signos – para negativo y + para positivo, indicados entre paréntesis los controles.

Se aplicó la metodología ya estandarizada en las 18 muestras con las que se ha trabajado a lo largo de este estudio. En la figura 23A tenemos el resultado de la amplificación del gen *bla_{IMP}* en el gel de electroforesis, teniendo positivas 16 de 18 muestras de ADN de *P. aeruginosa*. Cada número de carril del gel corresponde al mismo número de tubo en las AuNP. El resultado colorimétrico para los productos LAMP se puede observar en la Figura 23B visto después de la adición de sal y de haber sido incubado por 10 minutos a 60 ° C. Tomamos de referencia el control negativo de color rosa-morado en el tubo 1 y control positivo de color gris en el tubo

20, de ahí, los tubos 2 al 15,17 y 19 tornaron a color gris, por otro lado los tubos, 16 y 18 quedaron ligeramente de color rosado-morado. Lo que nos indica que el tubo 16 y 18 son negativos a la presencia del gen *bla_{IMP}*, lo que coincide en parte con los resultados del gel de electroforesis. En el caso del tubo 15, las AuNP-ADN-LAMP de LAMP fue más sensible que el método de LAMP convencional para la detección del gen *bla_{IMP}* en *P. aeruginosa*, cambiando de color de morado a gris (Manajit et al., 2018; Suebsing, Prombun, Srisala, & Kiatpathomchai, 2013).

En resumen, AuNP-ADN-LAMP es una solución sencilla, económica, rápida, sensible y específica se ha evaluado como un método específico para la detección visual del gen *bla_{IMP}* en *P. aeruginosa*.

1.11 CONCLUSION

La técnica de LAMP acoplada a las AuNP se estableció para la detección de la resistencia a carbapenémicos con éxito. El ensayo colorimétrico demostró ser rápido, simple y específico en la amplificación del gen de resistencia bacteriana *bla_{IMP}* en muestras de ADN de *P. aeruginosa*.

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Al-Qadi, S., & Remuñán-López, C. (2009). Nanopartículas metálicas: oro. *Monografía XXVIII: Nanotecnología Farmacéutica*, 8–17.
- Aliotta, J. M., Pelletier, J. J., Ware, J. L., Moran, L. S., Benner, J. S., & Kong, H. (1996). Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3' → 5' proofreading exonuclease activity. *Genetic Analysis - Biomolecular Engineering*, 12(5–6), 185–195.
- An, H., & Jin, B. (2012, November 1). Prospects of nanoparticle-DNA binding and its implications in medical biotechnology. *Biotechnology Advances*. Elsevier.
- Arunrut, N., Kampeera, J., Sirithammajak, S., Sanguanrut, P., Proespraiwong, P., Suebsing, R., & Kiatpathomchai, W. (2016). Sensitive visual detection of AHPND bacteria using loop-mediated isothermal amplification combined with DNA Functionalized gold nanoparticles as probes. *PLoS ONE*, 11(3).
- Arunrut, N., Kampeera, J., Suebsing, R., & Kiatpathomchai, W. (2013). Rapid and sensitive detection of shrimp infectious myonecrosis virus using a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification and visual colorogenic nanogold hybridization probe assay. *Journal of Virological Methods*, 193(2), 542–547. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.017>
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., & Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242>
- Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., ... Franco, R. (2008). Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), 943–950. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1768-z>
- Barnaby Whitman, W. (2015). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608>
- Bartolone, S. N., Tree, M. O., Conway, M. J., Chancellor, M. B., & Lamb, L. E. (2018).

- Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for Zika Virus and Housekeeping Genes in Urine, Serum, and Mosquito Samples. *Journal of Visualized Experiments*, e58436(139), 7.
- Birmpa, A., Kalogeropoulos, K., Kokkinos, P., & Vantarakis, A. (2015). Evaluation of Two Loop-mediated Isothermal Amplification Methods for the Detection of Salmonella Enteritidis and Listeria Monocytogenes in Artificially Contaminated Ready-to-Eat Fresh Produce. *Italian Journal of Food Safety*, 4(3), 5383.
- Blanc, D. S., Petignat, C., Janin, B., Bille, J., & Francioli, P. (1998). Frequency and molecular diversity of Pseudomonas aeruginosa upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 4(5), 242–247. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1998.tb00051.x>
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Bratu, S., Landman, D., Alam, M., Tolentino, E., & Quale, J. (2005). Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in Enterobacter spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 776–778.
- Bravo-Burguillos, & Jiménez Cid, V. (2018). *Resistencia antibiótica en Pseudomonas aeruginosa: situación epidemiología en España y alternativa de tratamiento*. Facultad de farmacia, Universidad Complutense.
- Britton, S., Cheng, Q., Grigg, M. J., William, T., Anstey, N. M., & McCarthy, J. S. (2016). A Sensitive, Colorimetric, High-Throughput Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of Plasmodium knowlesi. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(1), 120–122.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8).
- Cai, B., Echols, R., Magee, G., Arjona Ferreira, J. C., Morgan, G., Ariyasu, M., ...

- Nagata, T. Den. (2017). Prevalence of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections in the United States Predominated by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Open Forum Infectious Diseases*, 4(3), ofx176.
- Calvo, J., Canton, R., Fernandez, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gram negativos. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
- Cappek, I. (2013). *Preparation and Functionalization of Gold Nanoparticles*. *J. Surface Sci. Technol* (Vol. 29).
- Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G. M., & Samore, M. H. (1999). Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1379–1382.
- Centers for Disease and Control and prevention. (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States*.
- Cheng, C., Zheng, F., & Rui, Y. (2014). Rapid detection of bla_{NDM}, bla_{KPC}, bla_{IMP}, and bla_{VIM} carbapenemase genes in bacteria by loop-mediated isothermal amplification. *Microbial Drug Resistance*, 20(6), 533–538.
- CLSI. (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*.
- Coggan, K. A., & Wolfgang, M. C. (2012). Global regulatory pathways and cross-talk control *pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Current Issues in Molecular Biology*, 14(2), 47–70. <https://doi.org/10.21775/cimb.014.047>
- Collee, J. G., Miles, R. S., & Watt, B. (1996). *Tests for the identification of bacteria. Mackie and McCartney practical medical microbiology*. (14th ed.).
- Costerton, J. W. (2001, February 1). Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in Microbiology*.

[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01918-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01918-1)

- Custovic, A., Smajlovic, J., Hadzic, S., Ahmetagic, S., Tihic, N., & Hadzagic, H. (2014). Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. *Materia Socio-Medica*, 26(1), 7–11.
- Dandachi, I., Fayad, E., El-Bazzal, B., Daoud, Z., & Rolain, J.-M. (2018). Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli and Emergence of mcr-1 Colistin Resistance Gene in Lebanese Swine Farms. *Microbial Drug Resistance*, 00(00), mdr.2018.0110.
- Dantas, R. C., Ferreira, M. L., Gontijo-Filho, P. P., & Ribas, R. M. (2014). Pseudomonas aeruginosa bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *Journal of Medical Microbiology*, 63(Pt 12), 1679–1687. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.073262-0>
- Darweesh, R. S., Ayoub, N. M., & Nazzal, S. (2019, September 19). Gold nanoparticles and angiogenesis: Molecular mechanisms and biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S223941>
- Davies, Parsek, Pearson, Iglewski, Costerton, & Greenberg. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280, 295-8.
- Denys, G. A., Callister, S. M., & Dowzicky, M. J. (2013). Antimicrobial susceptibility among gram-negative isolates collected in the USA between 2005 and 2011 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-24>
- Duytschaever, G., Huys, G., Boulanger, L., De Boeck, K., & Vandamme, P. (2013). Amoxicillin–clavulanic acid resistance in fecal Enterobacteriaceae from patients with cystic fibrosis and healthy siblings. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(6), 780–783.
- Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L., & Mirkin, C. A. (1997). Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-

- Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science*, 277(5329), 1078–1081. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1078>
- Elliott, J., Simoska, O., Karasik, S., Shear, J. B., & Stevenson, K. J. (2017). Transparent Carbon Ultramicroelectrode Arrays for the Electrochemical Detection of a Bacterial Warfare Toxin, Pyocyanin. *Analytical Chemistry*, 89(12), 6285–6289. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00876>
- Espino Hernández, M., ÁlvarezVarela, E., Zayas T, Á., & Contreras Alarcón, R. (2010). Detección de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido por el sistema DIRAMIC. *Panorama Cuba y Salud*, 5, 33–36.
- Esposito, S., & De Simone, G. (2017). Update on the main MDR pathogens: Prevalence and treatment options. *Infezioni in Medicina*.
- Fan, F., Du, P., Kan, B., & Yan, M. (2015). The Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *PloS One*, 10(4), e0124507.
- Fauci, V. La, Bruno Costa, G., Arena, A., Spagnolo, E. V., Genovese, C., Palamara, M. A., & Squeri, R. (2018). Trend of MDR-microorganisms isolated from the biological samples of patients with HAI and from the surfaces around that patient. *New Microbiologica*, 41(1), 1121–1138.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of penicillium, with special reference to their use in silation of *H. influenzae*. *Br J Exp Pathol*, 10, 226.
- Galán Sánchez, Fátima Gutiérrez Saborido, D., & Guerrero Lozano, I. (2014). *Infecciones por enterobacterias. Medicina: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* (Vol. 11). DOYMA.
- Garza-Ramos, J. U., Sanchez-Martinez, G., Barajas, J. M., Suarez, S., Sanchez-Perez, A., Rojas-Moreno, T., ... Silva-Sanchez, J. (2010). Variability of the bla IMP-15 -Containing Integrons, Highly Related to In 95 , on an Endemic Clone of *Pseudomonas aeruginosa* in Mexico. *Microbial Drug Resistance*, 16(3), 191–195.
- Garza-Ramos, U., Tinoco, P., Silva-Sanchez, J., Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Leon-Garnica, G., ... Jones, R. N. (2008). Metallo- β -lactamase

IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(1), 78–80.

- Garza-Ramos, Ulises, Barrios, H., Reyna-Flores, F., Tamayo-Legorreta, E., Catalan-Najera, J. C., Morfin-Otero, R., ... Silva-Sanchez, J. (2015). Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 81(2), 135–137. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.029>
- Georges, B., Conil, J.-M., Dubouix, A., Archambaud, M., Bonnet, E., Saivin, S., ... Houin, G. (2006). Risk of emergence of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to β -lactam antibiotics in intensive care units. *Critical Care Medicine*, 34(6), 1636–1641. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000215517.51187.CA>
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilionis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137–146.
- Glomm, W. R. (2005). Functionalized gold nanoparticles for applications in bionanotechnology. *Journal of Dispersion Science and Technology*. Taylor & Francis Group . <https://doi.org/10.1081/DIS-200052457>
- Głowacka, P., Zakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., & Bielawska-Drózd, A. (2018). Brucella – Virulence factors, pathogenesis and treatment. *Polish Journal of Microbiology*, 67(2), 151–161.
- Gong, X., Zhang, J., Su, S., Fu, Y., Bao, M., Wang, Y., & Zhang, X. (2018). Molecular characterization and epidemiology of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from the Eastern region of Heilongjiang Province, China. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 417.
- Goto, M., & Honda, E. (2009). Colorimetric detection of loopmediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Short Technical Reports*, 46(3), 4.
- Guimarães, A. C., Donalisio, M. R., Santiago, T. H. R., & Freire, J. B. (2011).

- [Mortality associated with nosocomial infection, occurring in a general hospital of Sumaré-SP, Brazil]. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 64(5), 864–869.
- Hammami, S., Ghozzi, R., Burghoffer, B., Arlet, G., & Redjeb, S. (2009). Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathologie Biologie*, 57(7–8), 530–535.
- Han, S., & Mallampalli, R. K. (2015). The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(5), 765–774.
- Hay, I. D., Gatland, K., Campisano, A., Jordens, J. Z., & Rehm, B. H. A. (2009). Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), 6022–6025. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-09>
- Hill, H. D., & Mirkin, C. A. (2006). The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nature Protocols*, 1(1), 324–336. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.51>
- Hindler, J. A., & Humphries, R. M. (2013). Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1678–1684.
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., ... Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), 3574–3581.
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I.-H., Jeong, S. H., Kang, H.-K., & Lee, K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & Chemotherapy*, 47(2), 81–97.
- Hong, M., Zha, L., Fu, W., Zou, M., Li, W., & Xu, D. (2012). A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *World Journal of*

- Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 523–531.
<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0843-y>
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010, January 1). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
- Hugh, R., & Leifson, E. (1964). The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon.*, 14(2), 69-84.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. (2016). *P. aeruginosa*. Fichas de agentes biológicos. *Databio*, 1–5.
- Jadzinsky, P. D., Calero, G., Ackerson, C. J., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. (2007). Structure of a thiol monolayer-protected gold nanoparticle at 1.1 Å resolution. *Science*, 318(5849), 430–433.
<https://doi.org/10.1126/science.1148624>
- Jaroenram, W., Arunrut, N., & Kiatpathomchai, W. (2012). Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus using loop-mediated isothermal amplification and a colorogenic nanogold hybridization probe. *Journal of Virological Methods*, 186(1–2), 36–42.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.013>
- Jiang, Y., Li, B., Milligan, J. N., Bhadra, S., & Ellington, A. D. (2013). Real-time detection of isothermal amplification reactions with thermostable catalytic hairpin assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 135(20), 7430–7433. <https://doi.org/10.1021/ja4023978>
- Jung, Y. L., Jung, C., Parab, H., Li, T., & Park, H. G. (2010). Direct colorimetric diagnosis of pathogen infections by utilizing thiol-labeled PCR primers and unmodified gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(8), 1941–1946. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.01.010>
- Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. (2009). FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. Retrieved from

<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/>

- Kalidasan, K., Neo, J. L., & Uttamchandani, M. (2013). Direct visual detection of Salmonella genomic DNA using gold nanoparticles. *Molecular BioSystems*, 9(4), 618–621.
- Kallen, A. J., Hidron, A. I., Patel, J., & Srinivasan, A. (2010). Multidrug Resistance among Gram- Negative Pathogens That Caused Healthcare- Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2006–2008. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(5), 528–531.
- Kamachi, K., Moriuchi, T., Hiramatsu, Y., Otsuka, N., & Shibayama, K. (2017). Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of Bordetella pertussis infection. *Journal of Microbiological Methods*, 133, 20–22.
- Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., & Suzutani, T. (2007). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(3), 499–501.
- Khorvash, F., Yazdani, M., Shabani, S., & Souidi, 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, 147.
- Kim, D. H., Choi, J. Y., Kim, H. W., Kim, S. H., Chung, D. R., Peck, K. R., ... Ko, K. S. (2013). Spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii global clone 2 in Asia and AbaR-type resistance islands. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5239–5246. <https://doi.org/10.1128/AAC.00633-13>
- Kim, H. S. H. J., Kim, H. S. H. J., Lee, J. M., Yoon, S. S., & Yong, D. (2016). Rapid detection of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii Harboring bla(VIM-2), bla(IMP-1) and bla(OXA-23) genes by using loop-mediated isothermal amplification methods. *Annals of Laboratory Medicine*, 36(1), 15–22.
- Kim, Kim, An, Cho, Park, & Jang. (2014). Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant Acinetobacter infections. *Chonnam Medical Journal*, 50(2), 37.

- Kipnis, E., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 36(2), 78–91.
- Knott-Hunziker, V., Waley, S. G., Orlek, B. S., & Sammes, P. G. (1979). Penicillinase active sites: Labelling of serine-44 in β -lactamase I by 6 β -bromopenicillanic acid. *FEBS Letters*, 99(1), 59–61. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80248-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80248-3)
- Kobayashi, T., Yagami, A., Suzuki, K., Yoshikawa, T., & Matsunaga, K. (2014). Concurrent reactivation of herpes simplex and varicella zoster viruses confirmed by the loop-mediated isothermal amplification assay. *Case Reports in Dermatology*, 6(1), 5–9.
- Kong, C., Wang, Y., Fodjo, E. K., Yang, G. xin, Han, F., & Shen, X. sheng. (2018). Loop-mediated isothermal amplification for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* using gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 185(1), 1–7.
- Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010, January). Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>
- Kono, T., Savan, R., Sakai, M., & Itami, T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 115(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.09.015>
- Kumvongpin, R., Jearanaikool, P., Wilailuckana, C., Sae-ung, N., Prasongdee, P., Daduang, S., ... Daduang, J. (2016). High sensitivity, loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric gold-nanoparticle probes for visual detection of high risk human papillomavirus genotypes 16 and 18. *Journal of Virological Methods*, 234, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.04.008>
- Lau, Y.-L., Lai, M.-Y., Fong, M.-Y., Jelip, J., & Mahmud, R. (2016). Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Identification of Five Human Plasmodium Species in Malaysia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(2), 336–339.
- Laudy, A. E., Róg, P., Smolińska-Król, K., Ćmiel, M., Słoczyńska, A., Patzer, J., ...

- Tyski, S. (2017). Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. *PLoS One*, *12*(6), e0180121.
- Lauretti, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., & Rossolini, G. M. (1999). Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(7), 1584–1590. <https://doi.org/10.1128/aac.43.7.1584>
- Lee, D., Kim, E. J., Kilgore, P. E., Takahashi, H., Ohnishi, M., Tomono, J., ... Seki, M. (2015). A Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Serogroup Identification of *Neisseria meningitidis* in Cerebrospinal Fluid. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1548.
- Li, H., & Rothberg, L. (2004). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(39), 14036–14039.
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet. Infectious Diseases*, *6*(9), 589–601.
- Li, X.-Z., & Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, *64*(2), 159–204.
- Lin, Y. W., Liu, C. W., & Chang, H. T. (2009). DNA functionalized gold nanoparticles for bioanalysis. *Analytical Methods*, *1*(1), 14–24.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009, October). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A. W., Thibodeaux, B. A., O'Callaghan, R. J., & Wright, J. R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant

- proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288(2), L409–L418.
- Manajit, O., Longyant, S., Sithigorngul, P., & Chaivisuthangkura, P. (2018). Development of uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification coupled with nanogold probe (UDG-LAMP-AuNP) for specific detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5734–5743. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8557>
- Maseda, H., Yoneyama, H., & Nakae, T. (2000). Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 658–664.
- McCracken, M. G., Adam, H. J., Blondeau, J. M., Walkty, A. J., Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., ... Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA) and CANWARD. (2019). Characterization of carbapenem-resistant and XDR *Pseudomonas aeruginosa* in Canada: results of the CANWARD 2007-16 study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(Supplement_4), iv32–iv38. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz285>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., & Storhoff, J. J. (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592), 607–609. <https://doi.org/10.1038/382607a0>
- Miyoshi-Akiyama, T., Tada, T., Ohmagari, N., Viet Hung, N., Tharavichitkul, P., Pokhrel, B. M., ... Kirikae, T. (2017). Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biology and Evolution*, 9(12), 3238–3245.
- Morales, R. (2003). Ertapenem: Una nueva clase de carbapenem. *Revista Chilena de Infectología*, 20(4).
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., & Notomi, T. (2004). Real-time turbidimetry of LAMP

- reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2), 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.12.005>
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1), 150–154.
- Mori, Y., & Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*.
- Morrow, B. J., Pillar, C. M., Deane, J., Sahm, D. F., Lynch, A. S., Flamm, R. K., ... Davies, T. A. (2013). Activities of carbapenem and comparator agents against contemporary US *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the CAPITAL surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(4), 412–416.
- Muangchuen, A., Chaumpluk, P., Suriyasomboon, A., & Ekgasit, S. (2014). Colorimetric detection of *Ehrlichia canis* via nucleic acid hybridization in gold nano-colloids. *Sensors (Switzerland)*, 14(8), 14472–14487. <https://doi.org/10.3390/s140814472>
- Murray. (2006). P. Microbiología Médica. *P. Microbiología Médica. España. 2006., 5ta edición.*
- Mythri, H., & Kashinath, K. (2014). Nosocomial infections in patients admitted in intensive care unit of a tertiary health center, India. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 4(5), 738–741.
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., & Notomi, T. (2001). Loop-mediated Isothermal Amplification Reaction Using a Nondenatured Template. *Clinical Chemistry*, 47(9).
- Nakashima, K., Aoshima, M., Ohkuni, Y., Hoshino, E., Hashimoto, K., & Otsuka, Y. (2014). Loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia* in HIV-uninfected immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(12), 757–761.

- Nakayama, T., Yamazaki, T., Yo, A., Tone, K., Mahdi Alsashahni, M., Fujisaki, R., & Makimura, K. (2017). Detection of Fungi from an Indoor Environment using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method. *ABiocontrol Science*, 22(2), 97–104.
- Neyestanaki, D. K., Mirsalehian, A., Rezagholizadeh, F., Jabalameli, F., Taherikalani, M., & Emaneini, M. (2014). Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns*, 40(8), 1556–1561.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63.
- Nusrat, Akter, Haque, Rahman, Dewanjee, Ahmed, & D. Rozario. (2019). Comparative Study of CDST & Multiplex PCR to Detect MBL Producing Gram-Negative Bacilli among VAP Patients Admitted in a Public Medical College Hospital of Bangladesh. *Pathogens*, 8(3), 151. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030151>
- Nzulu, C. O., Cáceres, A. G., Guerrero-Quincho, S., Tineo-Villafuerte, E., Rodriguez-Delfin, L., Mimori, T., ... Kato, H. (2016). A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta Tropica*, 153, 116–119.
- Oishi, M., Nakaogami, J., Ishii, T., & Nagasaki, Y. (2006). Smart PEGylated gold nanoparticles for the cytoplasmic delivery of siRNA to induce enhanced gene silencing. *Chemistry Letters*, 35(9), 1046–1047. <https://doi.org/10.1246/cl.2006.1046>
- OMS. (2011). Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. A systematic review of the literatura.
- OMS. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Retrieved October 29, 2018, from

<http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

OMS. (2018). Resistencia a los antibióticos. Retrieved October 21, 2018, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>

OPS, O. P. de la salud. (2012). *Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud. Organización Panamericana de la salud* (Vol. III).

OPS, & OMS. (2017). *Salud Américas. Resumen: panorama regional y perfiles de país*. Retrieved from <https://www.paho.org/salud-en-las-americas-2017/wp-content/uploads/2017/09/Print-Version-Spanish.pdf>

Organización Mundial de la salud. (2019). OMS | Infección por Pseudomonas aeruginosa resistente a los carbapenémicos - México. WHO.

Organización Mundial de la Salud. (2016). *The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis POLICY GUIDANCE*.

Orozco-Ugarriza, M. E., Anaya, P. F., & Martinez, Y. O. (2016). VALIDACIÓN In silico DE OLIGONUCLEÓTIDOS-PRIMERS PARA LA DETECCIÓN ESPECIFICA DE Salmonella spp. MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. *RIADS: Revistas de Investigación Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 1(1), 42–50. Retrieved from <http://revistas.sena.edu.co/index.php/riads/article/view/703>

Osmani Bojd, M., Kamaladini, H., Haddadi, F., & Vaseghi, A. (2017). Thiolated AuNP probes and multiplex PCR for molecular detection of Staphylococcus epidermidis. *Molecular and Cellular Probes*, 34, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.04.006>

Palleroni, N., Benner, Krieg, Staley, & Garrity. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Springer-Verlag. New York*.

Palleroni, N. J. (2010). The pseudomonas story. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1377–1383.

- Palleroni, N., Kunisawa, R., Contopoulou, R., & Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the Genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 23(4), 333–339.
- Palmore, T. N., & Henderson, D. K. (2014). Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Call for Cultural Change. *Annals of Internal Medicine*, 160(8), 567.
- Panferov, V. G., Safenkova, I. V., Byzova, N. A., Varitsev, Y. A., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2018). Silver-enhanced lateral flow immunoassay for highly-sensitive detection of potato leafroll virus. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 445–457. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1401044>
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18(6), 407–421.
- Peña, C., Pujol, M., Ardanuy, C., Ricart, A., Pallarés, R., Liñares, J., ... Gudiol, F. (2001). An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum beta-lactamase. *The Journal of Hospital Infection*, 47(1), 53–59.
- Pereira, S. G., Rosa, A. C., & Cardoso, O. (2015). Virulence factors as predictive tools for drug resistance in *pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1048958>
- Pier GB, R. R. (2010). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases - 9781455748013 | US Elsevier Health Bookshop (7th ed.)*. Philadelphia: Churchill Livingstone. Retrieved from <https://www.us.elsevierhealth.com/mandell-douglas-and-bennetts-principles-and-practice-of-infectious-diseases-9781455748013.html>
- Pluchery, O. (2012). *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology*. Imperial College Press.
- Poole, C. B., Ettwiller, L., Tanner, N. A., Evans, T. C., Wanji, S., Carlow, C. K. S., & Carlow, C. K. S. (2015). Genome Filtering for New DNA Biomarkers of *Loa loa* Infection Suitable for Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS One*, 10(9),

e0139286.

- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiology*. McGraw-Hill.
- Puerta-García A. y Mateos-Rodríguez F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426–3431.
- Ramón, J., Pascual, Á., Cantón, R., Martínez-martínez, L., Estudio, G. De, Hospitalaria, D. I., ... Real, C. (2007). Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Medicina*, 21(2), 77–82.
- RHOVE. (2016). Informe Anual 2015. *Dirección General de Epidemiológica*, 61.
- Riccio, M. L., Franceschini, N., Boschi, L., Caravelli, B., Cornaglia, G., Fontana, R., ... Rossolini, G. M. (2000). Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.5.1229-1235.2000>
- Rodríguez, M. O., Covián, L. B., García, A. C., & Blanco-López, M. C. (2016). Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays. *Talanta*, 148, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.068>
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2000). The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection*, 2(14), 1721–1731.
- Sader, H. S., Deshpande, L. M., Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Garza-Ramos, U., Silva-Sanchez, J., & Jones, R. N. (2007). *Dissemination of IMP-Type Metallo- β -lactamases among P. aeruginosa and Emergence of VIM-2 in Klebsiella oxytoca in Mexico: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. Retrieved from www.jmilabs.com
- Saderi, H., Lotfalipour, H., Owlia, P., & Salimi, H. (2010). Detection of Metallo- β -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients in Tehran, Iran . *Laboratory Medicine*, 41(10), 609–612. <https://doi.org/10.1309/lmqjf9j3t2oaacdj>

- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1209–1223.
- Safdar, A., & Armstrong, D. (2003). Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a Comprehensive Cancer Center (1955-1997). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 483–485. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.483-485.2003>
- Salgado, P., Gilsanz, F., & Maseda, E. (2015). *Therapeutic options for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Bacteriología. Rev Esp Quimioter* (Vol. 28).
- Sánchez-Martínez, G., Garza-Ramos, U. J., Reyna-Flores, F. L., Gaytán-Martínez, J., Lorenzo-Bautista, I. G., & Silva-Sánchez, J. (2010). In169, A New Class 1 Integron that Encoded blaIMP-18 in a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from Mexico. *Archives of Medical Research*, 41(4), 235–239.
- Sato, K., Hosokawa, K., & Maeda, M. (2003). Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, 125(27), 8102–8103. <https://doi.org/10.1021/ja034876s>
- Sattarahmady, N., Kayani, Z., & Heli, H. (2015). Highly simple and visual colorimetric detection of *Brucella melitensis* genomic DNA in clinical samples based on gold nanoparticles. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 12(9), 1569–1576. <https://doi.org/10.1007/s13738-015-0629-5>
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>
- Seetang-Nun, Y., Jaroenram, W., Sriurairatana, S., Suebsing, R., & Kiatpathomchai, W. (2013). Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification. *Molecular and Cellular Probes*, 27(2), 71–79.

- Seki, M., Yamashita, Y., Torigoe, H., Tsuda, H., Sato, S., & Maeno, M. (2005). Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1581–1586.
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., ... Ohta, M. (1996). PCR Detection of Metallo-Lactamase Gene (*bla_{IMP}*) in Gram-Negative Rods Resistant to Broad-Spectrum-Lactams. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 34).
- Shannon, K., King, A., & Phillips, I. (1982). DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS DURING THERAPY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA INFECTIONS. *The Lancet*, 319(8287), 1466.
- Shenoy, E. S., Pierce, V. M., Walters, M. S., Moulton-Meissner, H., Lawsin, A., Lonsway, D., ... Hooper, D. C. (2018). Transmission of Mobile Colistin Resistance (*mcr-1*) by Duodenoscope. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*.
- Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., ... Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1), 1–14.
- Singh, P., Singh, S., Ranjan Mirdha, B., Guleria, R., Kumar Agarwal, S., & Mohan, A. (2015). Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of *Pneumocystis jirovecii* in Immunocompromised Patients. *Molecular Biology International*, 2015, 1–6.
- Sobhan Ghafourian, al, Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2015). Extended Spectrum Beta-lactamases. *Curr. Issues Mol. Biol*, 17, 11–22. <https://doi.org/10.21775/cimb.017.011>
- Solanki, R., Vanjari, L., Ede, N., Gungi, A., Soory, A., & Vemu, L. (2013). Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of *bla_{NDM-1}* and *bla_{KPC}* genes among carbapenem-resistant clinical Gram-

- negative isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART10), 1540–1544.
- Song, J., Li, Z., Cheng, Y., & Liu, C. (2010a). Self-aggregation of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles and its applications for highly sensitive detection of DNA. *Chemical Communications*, 46(30), 5548–5550.
- Song, J., Li, Z., Cheng, Y., & Liu, C. (2010b). Self-aggregation of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles and its applications for highly sensitive detection of DNA. *Chemical Communications*, 46(30), 5548–5550. <https://doi.org/10.1039/c0cc00308e>
- Sousa Mesquita, C., Soares-Castro, P., & Santos, P. M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance*.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964.
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Suebsing, R., Prombun, P., Srisala, J., & Kiatpathomchai, W. (2013). Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1254–1263.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2009). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3), 10.
- Tamayo, R., Ryan, S. S., McCoy, A. J., & Gunn, J. S. (2002). Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity*, 70(12), 6770–6778.
- Tamma, P. D., Opene, B. N. A., Gluck, A., Chambers, K. K., Carroll, K. C., & Simner, P. J. (2017). Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of

- carbapenemase- producing enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(4), 1046–1055. <https://doi.org/10.1128/JCM.02338-16>
- Tan, T. Y., & Ng, S. Y. (2007). Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(5), 541–544.
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
- Thaxton, C. M. and C. M. (2006). DNA-Gold-Nanoparticle Conjugates. In *Nanobiothechnology: Concepts, Applications and Perspectives*. (pp. 288–307).
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877–882.
- Urmi, U. L., Nahar, S., Rana, M., Sultana, F., Jahan, N., Hossain, B., ... Haque, M. (2020). Genotypic to phenotypic resistance discrepancies identified involving β -lactamase genes, blaKPC, blaIMP, blaNDM-1, and blaVIM in uropathogenic klebsiella pneumoniae. *Infection and Drug Resistance*, 13, 2863–2875. <https://doi.org/10.2147/IDR.S262493>
- Ushikubo, H. (2004). Principle of LAMP method, a simple and rapid gene amplification method. *Uirusu*, 54(1), 107–112.
- Viau, R., Frank, K. M., Jacobs, M. R., Wilson, B., Kaye, K., Donskey, C. J., ... Bonomo, R. A. (2016, January 1). Intestinal carriage of Carbapenemase-producing organisms: Current status of surveillance methods. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00108-14>
- Wachino, J., Yoshida, H., Yamane, K., Suzuki, S., Matsui, M., Yamagishi, T., ... Arakawa, Y. (2011). SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 5143–5149.

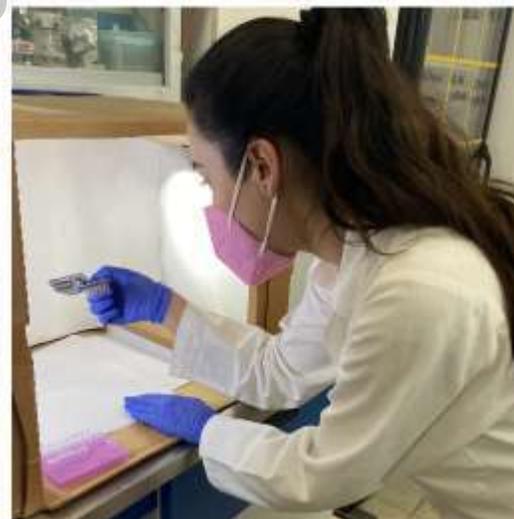
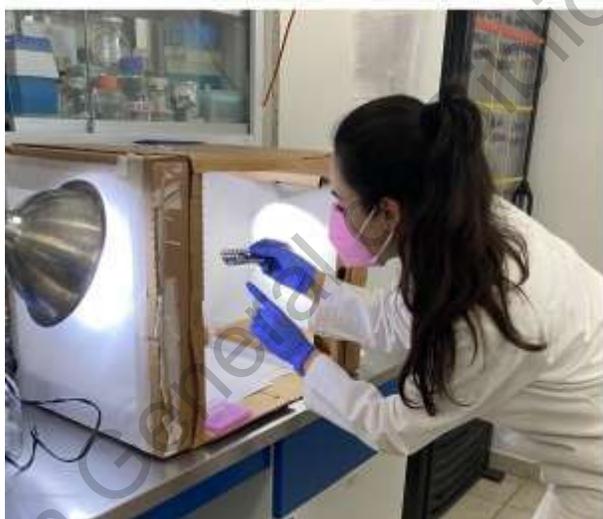
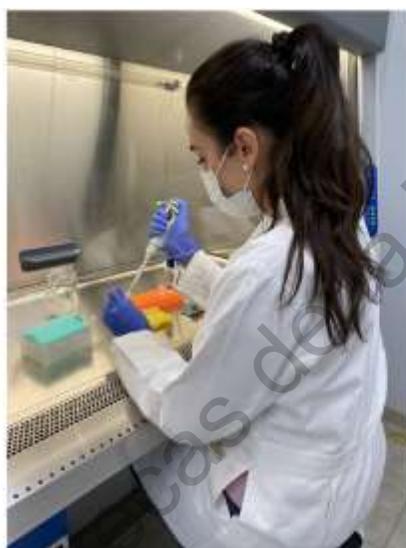
- Wachiralurpan, S., Sriyapai, T., Areekit, S., Sriyapai, P., Augkarawaritsawong, S., Santiwatanakul, S., & Chansiri, K. (2018). Rapid colorimetric assay for detection of *Listeria monocytogenes* in food samples using LAMP formation of DNA concatemers and gold nanoparticle-DNA probe complex. *Frontiers in Chemistry*, 6(APR).
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo- β -lactamases: The quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*.
- Wang, S., Quan, Y., Lee, N., & Kennedy, I. R. (2006). Rapid Determination of Fumonisin B₁ in Food Samples by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Colloidal Gold Immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2491–2495. <https://doi.org/10.1021/jf0530401>
- Wang, X., Li, X., Hu, S., Qu, H., Zhang, Y., Ni, H., & Wang, X. (2015). Rapid detection of active human cytomegalovirus infection in pregnancy using loop-mediated isothermal amplification. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 2269–2274.
- Wang, Y., Zhang, R., Li, J., Wu, Z., Yin, W., Schwarz, S., ... Shen, J. (2017). Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nature Microbiology*, 2(4), 16260.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(1), 147–151. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.1.147>
- Wattanapanpituck, K., Kiatpathomchai, W., Chu, E., & Panvisavas, N. (2014). Identification of human DNA in forensic evidence by loop-mediated isothermal amplification combined with a colorimetric gold nanoparticle hybridization probe. *International Journal of Legal Medicine*, 128(6), 923–931. <https://doi.org/10.1007/s00414-014-1018-9>
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35–48.
- Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S., & Chee, H.-Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626–643.

- Wright, A. (1999). The penicillins. *Mayo Clin Proc.*, 74, 290–307.
- Wright, G. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470.
- Yari, F., Abiri, R., Aryan, E., Ahmadi Jouybari, T., Navabi, J., & Alvandi, A. (2016). Loop-Mediated Isothermal Amplification as a Fast Noninvasive Method of *Helicobacter pylori* Diagnosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(5), 464–470.
- Youn Jeong, K., Sang I, K., Kyung Wook, H., Yang Ree, K., Yeon Joon, P., & Moon Won, K. (2012). Risk factors for mortality in patients with carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii* bacteremia: Impact of appropriate antimicrobial therapy. *Journal of Korean Medical Science*, 27(5), 471–475.
- Zhang, Y., Yao, Y., Du, W., Wu, K., Xu, W., Lin, M., ... Li, J. (2017). Development of loop-mediated isothermal amplification with *Plasmodium falciparum* unique genes for molecular diagnosis of human malaria. *Pathogens and Global Health*, 111(5), 247–255.
- Zhao, N., Liu, J. X., Li, D., & Sun, D. X. (2016). Loop-mediated isothermal amplification for visual detection of hepatitis B virus. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi = Zhonghua Ganzangbing Zazhi = Chinese Journal of Hepatology*, 24(6), 406–411.
- Zhu, R. Y., Zhang, K. X., Zhao, M. Q., Liu, Y. H., Xu, Y. Y., Ju, C. M., ... Chen, J. D. (2009). Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Journal of Microbiological Methods*, 78(3), 339–343.
- Ziros, P. G., Kokkinos, P. A., Allard, A., & Vantarakis, A. (2015). Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of Adenovirus 40 and 41. *Food and Environmental Virology*, 7(3), 276–285.
- Zoutman, D. E., Ford, B. D., Bryce, E., Gourdeau, M., Hébert, G., Henderson, E., ... Health Canada. (2003). The state of infection surveillance and control in Canadian acute care hospitals. *American Journal of Infection Control*, 31(5), 266–272; discussion 272-3. <https://doi.org/10.1067/mic.2003.88>

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ANEXOS

Evidencias de actividades realizadas.



Constancia de capacitación de bioética.



La Universidad Autónoma de Querétaro
en colaboración con
la Comisión Nacional de Bioética

Otorgan la presente
CONSTANCIA
a
Scarlette Dlydia Beltrán Hidalgo

Por haber concluido la
Capacitación en la ética de investigación científica con seres humanos
con valor de 25 horas
14 de enero de 2020

Dra. Margarita Espinosa Blas

Facultad de Filosofía
Directora

Dr. Manuel H Ruiz de Chávez

Comisionado Nacional de Bioética

Dirección General de Bibliotecas de la UA

Actividades adicionales

Participación en proyecto FOPER 2019



La Universidad Autónoma de Querétaro
y la Secretaría de Atención a la Comunidad Universitaria
otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

BELTRÁN HIDALGO SCARLETTE DLYDIA

Por su participación como
RESPONSABLE DE PROYECTO

FOPER 2019

“Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría”

Santiago de Querétaro, Qro, diciembre de 2019.


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
RECTORA


Lic. Verónica Núñez Perusquia
TITULAR DE LA SECRETARÍA DE ATENCIÓN
A LA COMUNIDAD UNIVERSITARIA

Participación en Proyecto "Control integrado de COVID-19 mediante el diagnóstico inmunomolecular y la vacunación".



Constancia de Curso Virtual “escribe y publica tu trabajo científico”.



La Dirección de Enseñanza y Divulgación
otorga la presente **CONSTANCIA** a

Scarlette Dlydia Beltrán Hidalgo

por haber aprobado el

Curso Virtual

escribe y publica tu trabajo científico

realizado del 10 de junio al 30 de septiembre,
con una duración total de 30 horas.

Ciudad de México, a 30 de septiembre de 2020.



Dr. Oscar Arias Carrión
Director de Enseñanza y Divulgación

Fecha: INMG/DED/SEA/epic/2020