



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Detección Fenotípica y Genotípica de Carbapenemasas en Aislados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en la Ciudad de Tijuana, Baja California de 2018 a 2022.

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

PRESENTA

QFB. Francisco Andrés García Torres

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Eva Viviana Sarmiento Gutiérrez

CODIRECTORA DE TESIS

Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA DICIEMBRE DEL 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.353
Tijuana, B.C., a 22 de noviembre, 2023

C. FRANCISCO ANDRÉS GARCÍA TORRES
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente

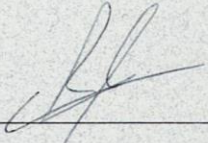
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS.

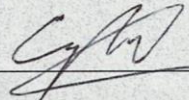
Es propuesto, por las C. Dra. Eva Viviana Sarmiento Gutiérrez y
Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala.

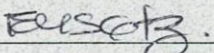
Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema "Detección Fenotípica y Genotípica de Carbapenemasas en Aislados
Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en la Ciudad de Tijuana, Baja California de 2018
a 2022."

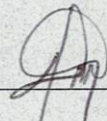
El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. ANTECEDENTES
- III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- IV. JUSTIFICACIÓN
- V. HIPÓTESIS
- VI. OBJETIVOS
- VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VIII. CONCLUSIONES
- IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS
- X. BIBLIOGRAFÍA


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora


Dra. Eva Viviana Sarmiento Gutiérrez
Directora De Tesis


Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala
Co-Directora De Tesis



DEDICATORIA

“Ella es todas las cosas. Se recompensa y se castiga a sí misma; es su propia alegría y miseria. Ella es áspera, tierna, amorosa, cruel, impotente y omnipotente. Ella está eternamente presente. Pasado y futuro son conocidos para ella. El presente es su eternidad. Es benéfica. La alabo en todas sus obras. Es sabia y silenciosa.”

A Dios, la suma de todo lo que fue, es y será...

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, que me ha formado durante casi una década, donde he obtenido aprendizajes, experiencias y algunas de las relaciones que me han ayudado a convertirme en la persona que soy hoy. Sin importar a dónde vaya en el futuro, siempre diré que soy un jorgulloso cimarrón con valores!

Agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Viviana Sarmiento, por su apoyo en este proyecto y por sus cálidas palabras en cada obstáculo que enfrentábamos. Sus historias sobre su época de estudiante, su experiencia profesional y sus aventuras fuera de la UABC me enseñaron que hay muchas cosas a considerar en el camino para convertirse en un científico. Ella me recordó cada día que, aunque siempre hay obstáculos, se puede mantener el buen humor.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Lilia Hurtado, con la que me he formado como microbiólogo desde mi época de licenciatura. Por ser mi ejemplo de todo lo que debería ser un microbiólogo: un profesionalista con integridad, creatividad, con una gran capacidad para resolver problemas y asumir responsabilidades por el bien de su equipo. Gracias por todo.

Agradezco a la Dra. Bertha Landeros y a la Dra. Myrna Brito por sus clases, sus consejos y sus valiosas contribuciones a este proyecto. Aprecio infinitamente cada consejo, cada pregunta y cada conversación casual que compartimos. Gracias a ello, pude darme cuenta de que la ciencia puede ser contemplada desde diversas perspectivas, incluso dentro del mismo campo de estudio.

Agradezco al M.C. Jonathan Baena por compartir sus conocimientos de microbiología y guiarme a lo largo de estos años. Sus altos estándares y la calidad de su trabajo me inspiran a seguir aprendiendo y a dar siempre lo mejor de mí. Estoy comprometido a hacer todo lo posible por los pacientes y a superar mis propios límites. ¡Gracias, Jonathan!

Agradezco a mi amada esposa, Alejandra, por su apoyo y sus sacrificios durante estos años de estudio. Espero con ansias el momento de corresponderte y devolverte todo lo que me has dado, para que puedas vivir tu propia aventura y seguir descubriendo las maravillas de la ciencia.

Agradezco infinitamente a cada persona que hizo posible que en México existan los medios para estudiar y seguir superándome. Agradezco a Conacyt por brindarme los fondos necesarios para desarrollar este proyecto. Dejo esta tesis como evidencia de que aproveché el apoyo brindado y de que hice mi mejor esfuerzo por contribuir a la ciencia y al desarrollo de la humanidad.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN	12
2 INTRODUCCIÓN	13
2.1 Fisiología.....	13
2.2 EPIDEMIOLOGÍA	13
2.3 PATOGENICIDAD	14
2.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	14
3 ANTECEDENTES	18
3.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	18
3.2 ANTECEDENTES NACIONALES	21
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
5 JUSTIFICACIÓN:.....	23
6 HIPÓTESIS	24
7 OBJETIVOS	24
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
8 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
8.1 REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS	24
8.2 EQUIPO.....	25
8.3 MÉTODO PARA RECEPCIÓN Y CONSERVACIÓN INICIAL DE MUESTRAS.....	25
8.4 MÉTODO PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.....	26
8.5 PRUEBAS PARA DETERMINAR FENOTIPOS DE RESISTENCIA.....	26
8.6 MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA LA BÚSQUEDA DE CARBAPENEMASAS.....	28
8.7 MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA.....	32
9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
9.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD Y CLASIFICACIÓN DE RESISTENCIA	34
9.2 ALGORITMO DE SOSPECHA PARA CARBAPENEMASAS	36

9.3	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PRIMARIA.....	36
9.4	MÉTODOS MODIFICADOS DE INACTIVACIÓN DE CARBAPENÉMICOS (MCIM Y ECIM)	36
9.5	CARBA NP	37
9.6	GENES DE RESISTENCIA ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS	38
9.7	PROCESAMIENTO DE DATOS.....	39
10	CONCLUSIONES	41
11	CONSIDERACIONES ETICAS.....	42
12	BIBLIOGRAFIA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de β -lactamasas según los criterios de Ambler (Cavalieri et al., 2005).	16
Figura 2. Algoritmo recomendado por INEI-ANLIS “Dr. C. Malbrán” para la detección de carbapenemasas en <i>P. aeruginosa</i>	28
Figura 3. Procedimiento de inactivación de carbapenémicos mCIM	29
Figura 4. Interpretación de resultado de mCIM.	29
Figura 5. Interpretación de resultado del eCIM	30
Figura 6. Procedimiento colorimétrico carba NP.	31
Figura 7. Pruebas de identificación bacteriana de <i>P. aeruginosa</i>	36
Figura 8. Distribución de infecciones por sitio anatómico.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 9. Perfil de susceptibilidad de aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	35
Figura 10. Fenotipos de multidrogoresistencia de acuerdo con los criterios de ReLAVRA.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11. Halos de inhibición del método modificado de producción de carbapenemasas.	37
Figura 12. Resultados del método modificado de producción de carbapenemasas.	37
Figura 13. Controles de calidad de ensayo carba NP.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Electroforesis en gel al 1.2% de agarosa de los productos amplificados de PCR multiplex.	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos de resistencia <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Tabla 2. Espectro de actividad de las distintas β -lactamasas.....	17
Tabla 3. <i>Cebadores PCR Multiplex con el tamaño de producto esperado para cada cebador</i>	25
Tabla 4. Puntos de cortes para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), CLSI 2022	27
Tabla 5. Criterios de interpretación de Carba NP.....	31
Tabla 6. Comparación entre los diferentes métodos de detección de carbapenemasas.	40

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
®	Marca registrada
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection: Cepa bacteriana de referencia con características específicas
blaIMP	Gen que codifica a la carbapenemasa tipo “Imipenemasa”
blaKPC	Gen que codifica para la “ <i>carbapenemasa de Klebsiella pneumoniae</i> ”
blaNDM	Gen que codifica para la “Nueva Delhi métalo-beta-lactamasa”
blaOXA	Gen que codifica para la carbapenemasas tipo Oxacilinas
blaVIM	Gen que codifica para las "Verona Integron-Encoded Metallo-Beta-Lactamase"
BLEA	β-lactamasas de amplio espectro
BLEE/ESBL	β-lactamasas de espectro extendido
CDC	Centros para la Prevención y Control de Enfermedades
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración mínima Inhibitoria
CRPA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapemicos
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
eCIM	Método modificado de inactivación de carbapenémicos con EDTA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán»	Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” (Argentina)
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L, mL, µL	Litros, mililitros, microlitros
M, mM, µM pM	Molar, milimolar, micromolar, picomolar
MBL	Métalo-β-lactamasas
mCIM	Método modificado de inactivación de carbapenémicos
mgCl ₂	cloruro de magnesio
MDR	Multidrogoresistentes
OPS	Organización mundial de la salud
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDR	Panresistencia
SO ₄ Zn·7H ₂ O	sulfato de zinc heptahidratado
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
XDR	Resistencia extendida

RESUMEN

ANTECEDENTES: En la última década, la proliferación global de carbapenemasas ha contribuido al surgimiento de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*. En Asia, Europa y América, los estudios revelan altas prevalencias y variabilidad genética en estos agentes de resistencia. En México, aunque se han detectado casos en varias ciudades, la búsqueda sistemática de fenotipos de resistencia específicos es limitada, posiblemente debido a restricciones presupuestarias o falta de énfasis en la epidemiología. Esto destaca la urgencia de estrategias más focalizadas para abordar la resistencia antimicrobiana. La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* y la rápida adquisición de mecanismos de resistencia a carbapenemasas plantean preocupaciones globales, destacando la urgencia de estrategias para abordar esta amenaza crítica, según la OMS.

OBJETIVO: Identificar la presencia y expresión de los genes: blaIMP, blaVIM, blaNDM, blaKPC y blaOXA que codifican a carbapenemasas en *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados y ambulatorios en la ciudad de Tijuana entre enero de 2018 a octubre de 2022.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio descriptivo transversal en el que realizó detección de carbapenemasas por los métodos fenotípicos mCIM, eCIM, carba NP y genotípicos de Reacción de Cadena Polimerasa (PCR) en 25 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en dos laboratorios privados de la ciudad de Tijuana, Baja California. El estudio se realizó en el periodo de enero de 2018 y octubre de 2023.

RESULTADOS: Las pruebas de identificación y métodos de inactivación de carbapenémicos (mCIM y eCIM) revelaron que el 8% de las cepas ensayadas eran productoras de carbapenemasas. Se identificó el mismo porcentaje de presencia de genes asociados a la producción de carbapenemasas mediante PCR multiplex. A pesar de la alta resistencia, la baja producción de carbapenemasas plantea la necesidad de evaluar simultáneamente múltiples mecanismos de resistencia en futuras investigaciones. Adicionalmente. El procesamiento de datos mostró una correlación positiva fuerte entre los métodos de detección de carbapenemasas, respaldando su consistencia.

CONCLUSIONES: Se aislaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemasas en Tijuana, México. La aplicación de métodos estandarizados permitió identificar y caracterizar los mecanismos de resistencia presentes. Los resultados respaldaron la hipótesis planteada, destacando la necesidad de una vigilancia continua y estrategias preventivas. Con impacto más allá de la región, la investigación mejora prácticas clínicas y políticas de control de infecciones. Esta contribución esencial a la comprensión de la resistencia antimicrobiana abre oportunidades para futuras investigaciones, subrayando la importancia de abordar este desafío global.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FISIOLÓGÍA

El género *Pseudomonas* está conformado por bacilos Gram negativos que se agrupan en pares y que se encuentran en el agua, la tierra, los animales y en ocasiones forman parte del microbiota del ser humano. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es por mucho la bacteria más importante de este género al representar casi la totalidad de infecciones en humanos. Sin embargo, a pesar de que *P. aeruginosa* es la especie más representativa en las infecciones en el ser humano, estas bacterias son agentes oportunistas que se destacan en infecciones en individuos inmunosuprimidos, con enfermedades crónicas o con neutropenia (Carroll et al., 2015). *P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo aerobio estricto incapaz de fermentar carbohidratos, posee una fuerte capacidad oxidativa debido a la presencia del citocromo oxidasa y entre sus características más notables se encuentra la producción de pigmentos con capacidad antimicrobiana e inmunosupresora como la pioverdina, pioverdina y fluoresceína, así como su resistencia a diversas familias de antimicrobianos mediante mecanismos diversos tanto intrínsecos como los cambios en la permeabilidad de la membrana citoplasmática y bombas de flujo, así como los mecanismos adquiridos como la resistencia enzimática (Ryan & Ray, 2011). Este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente debido a sus bajos requerimientos de nutrientes su capacidad de utilizar compuestos orgánicos como fuentes de carbono y nitrógeno. Es por ello que es posible observar su crecimiento prácticamente en cualquier medio de cultivo (Murray et al., 2017), además de ello posee un amplio intervalo de temperatura al cual puede crecer que va desde los 20 hasta los 42° C (Ryan & Ray, 2011). Estas características funcionan en conjunto para permitirle a este microorganismo invadir al hospedero y evadir a su sistema inmune, logrando proliferar en múltiples tejidos durante los procesos infecciosos. Debido a sus múltiples factores de virulencia y sus notables capacidades de proliferar en ambientes con pocos nutrientes es sorprendente que *P. aeruginosa* no tenga mayor incidencia fuera del ambiente intrahospitalario (Murray et al., 2017).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

El principal hábitat de *P. aeruginosa* es el medio ambiente, aunque en algunas ocasiones puede formar parte del microbiota de la faringe y el intestino en personas sanas. La colonización supone un riesgo en el ambiente intrahospitalario ya que este microorganismo se caracteriza por la proliferación en pacientes que ya cuentan con una condición subyacente. De este modo la capacidad de *P. aeruginosa* de sobrevivir y proliferar en condiciones adversas la convierte en un riesgo para los ambientes intrahospitalarios; Soluciones estériles, medicamentos, desinfectantes y objetos del entorno intrahospitalario, como lo son sondas urinarias, catéteres y equipos de ventilación mecánica, lo que aumentan el riesgo de infecciones bacterianas, ya que al tener una exposición prolongada le permite invadir rápidamente los tejidos, evitando los primeros mecanismos de defensa del hospedero (Ryan & Ray, 2011). Cabe destacar que el aislamiento de *Pseudomonas* en un paciente hospitalizado no debe alarmar al médico y mucho menos justifica un tratamiento antimicrobiano empírico, salvo que exista un diagnóstico apropiado (Murray et al., 2017). Entre las infecciones que este microorganismo es capaz de provocar se encuentran las infecciones de vías aéreas altas y bajas, infecciones de vías urinarias, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones óticas, infecciones en pacientes con quemaduras graves, inmunosuprimidos, diabéticos, con neutropenia o enfermedades crónicas. Además, se puede llegar a generar bacteriemia y endocarditis y muchas de estas infecciones conllevan una serie de situaciones complejas que requieren una evaluación apropiada según el sitio y las condiciones del paciente (Zavala et al., 2012). Las infecciones de vías aéreas se manifiestan desde infecciones asintomáticas o con ligeras molestias hasta infecciones que por sí sola termina con la vida del paciente. Adicionalmente, es posible que *P. aeruginosa* colonice pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y aquellos que sufren

neutropenia. Es importante reiterar que esta colonización que da lugar a procesos infecciosos tiene como factor riesgo el uso previo de antibióticos además de la ya mencionada contaminación en respiradores y equipos invasivos (Murray et al., 2017). Las sondas urinarias son otro elemento que frecuentemente se contamina con *P. aeruginosa*, causando infecciones persistentes debido a la exposición de múltiples antibióticos como terapia en esta clase de infecciones (Murray et al., 2017). Es importante mencionar que este microorganismo requiere una serie de factores específicos para ser capaz de infectar a un paciente, entre los cuales se encuentran: la presencia de la bacteria en el ambiente cercano al hospedero, una vía de entrada (como heridas quirúrgicas, colonización del paciente, quemaduras graves o contaminación en equipo médico) y la concurrencia de factores que debiliten el sistema inmunológico del hospedero, lo cual puede ser provocado por múltiples situaciones, como la eliminación de la microbiota normal, neutropenia o el desplazamiento de la infección hacia un sitio anatómico más profundo (Ryan & Ray, 2011).

1.3 PATOGENICIDAD

La patogenicidad de *P. aeruginosa* es compleja e implica diversos mecanismos: secreción de exotoxinas, proteasas y enzimas. Estos conjuntamente ayudan a la adhesión, colonización, invasión local de los tejidos y, finalmente, la diseminación e infección sistémica (Espinoza Pesantez et al., 2021). Para el proceso de adhesión *P. aeruginosa* posee múltiples factores de virulencia, esta se lleva a cabo mediante los flagelos, pili, lipopolisacáridos de la membrana y una capsula de alginato que lo protege de la fagocitosis, la cual es fundamental para la formación de *biofilm*. Una vez que el microorganismo se adhiere al hospedero este libera una serie de proteínas y exotoxinas para lograr la diseminación en el individuo. Entre ellas se encuentran las exotoxinas Exo A, Exo S y Exo T, pioverdina, piocianina y una serie de proteasas, elastasas y fosfolipasas que trabajan conjuntamente para degradar las células del hospedero, inhibir la producción de proteínas, comprometer el sistema inmune y los nutrientes del individuo para así lograr diseminarse en los tejidos y proliferar en el hospedero (Murray et al., 2017).

1.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Las cepas salvajes de *P. aeruginosa* son resistentes intrínsecamente a gran número de agentes antimicrobianos, lo que las convierte en bacterias de difícil abordaje terapéutico. Naturalmente *P. aeruginosa* posee resistencia tanto a β -lactámicos y aminoglucósidos, sin embargo, actualmente se han descrito muchos otros mecanismos de resistencia que son capaces de generar cepas de *P. aeruginosa* particularmente peligrosas. Los mecanismos implicados en la resistencia de *P. aeruginosa* se simplifican en la **Tabla 1** (Bassetti et al., 2018). Actualmente existen múltiples criterios para la clasificación de los organismos multidrogoresistentes, es por ello por lo que en 2019 la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) presentó un consenso latinoamericano que permite estandarizar las definiciones de los diferentes niveles de resistencia a los antimicrobianos en bacterias de importancia en salud pública, dentro del cual se establecen los criterios para la clasificación de multidrogoresistencia en *P. aeruginosa*: multidrogoresistentes (MDR) cuando se observa resistencia a 3 de los 10 grupos de antibióticos usados como marco de referencia (piperacilina, tazobactam, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem, gentamicina, amikacina, ciprofloxacino o levofloxacino y colistina), extremo drogo-resistente (XDR) cuando se observa resistencia a 8 o 9 de los 10 grupos de antibióticos y finalmente Pandrogo-resistente (PDR) cuando las cepas son resistentes a todos los grupos de antibióticos (Jiménez Pearson et al., 2019).

La resistencia natural de *P. aeruginosa* a varias familias de antibióticos se debe en gran medida a la acción simultánea de la baja permeabilidad de membrana y bombas de eflujo activo y sin bien se sabe que los sistemas de eflujo confieren un nivel moderado de resistencia, generalmente operan simultáneamente con otros mecanismos (Bou Arévalo et al., 2015). El mecanismo de resistencia natural más conocido de *P.*

aeruginosa es una cefalosporinasa inducible tipo AmpC que no es inhibida por Inhibidores de β -lactamasas (IBL) como ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam. Aunque sus niveles de expresión son bajos, generalmente puede funcionar a la par de los cambios de permeabilidad y sistemas de expulsión de fármacos para expresar resistencia a algunos agentes β -lactámicos solos o en combinación con IBL. La sobreexpresión de la AmpC inducible o constitutiva puede proporcionar una reducción de la susceptibilidad a todas las clases de β -lactámicos excepto carbapenémicos. Por otra parte, tenemos a las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) que inactivan aminoglucósidos por unión de grupos acetilo, fosfato o adenilo, así como grupos sustituyentes amino e hidroxilo en el antibiótico. Estas modificaciones reducen significativamente la afinidad de aminoglucósidos hacia la subunidad ribosomal 30S y por ello bloquean su actividad (Bassetti et al., 2018).

Actualmente existen diversas clasificaciones para las β -lactamasas, donde una de las más utilizadas es la clasificación de Ambler, que las divide en función de su estructura molecular y secuencia de aminoácidos. Existen cuatro grupos: A, B, C y D los cuales se describen en la **Figura 1**. Las enzimas pertenecientes al grupo A, C Y D se caracterizan por poseer restos de serina en el centro activo y se inhiben por IBL. Las enzimas del grupo B tienen una o dos moléculas de zinc en su zona activa, por lo que se les atribuye el nombre de metaloenzimas, y son inhibidas por agentes quelantes como EDTA (Cavalieri et al., 2005).

Tabla 1. Mecanismos de resistencia *Pseudomonas aeruginosa*. Modificado de Bassetti et al., 2018.

Ubicación	Mecanismo de resistencia	Objetivo del antibiótico	Tipo de resistencia
Resistencia intrínseca (cromosómico)	Cefalosporinas tipo AmpC	β -lactámicos	Inactivación del antibiótico
	Oxacilinas clase D (OXA 50)	β -lactámicos	Inactivación del antibiótico
	Enzimas inactivadoras de aminoglucósidos	Aminoglucósidos	Inactivación del antibiótico
	Bombas de eflujo (Sobreexpresión)	Múltiples antibióticos	Bombas de eflujo
	Disminución de la permeabilidad en la membrana	Múltiples antibióticos	Impermeabilidad de membranas
	ADN Girasas y Topoisomerasas IV	Fluoroquinolonas	Modificación de sitio blanco
	Modificación de lipopolisacáridos	Colistina	Modificación de sitio blanco
Adquirida: Elementos móviles	β -lactamasas clase A: Serina (PSE, CARB, TEM)	β -lactámicos	Inactivación del antibiótico
	B-lactamasas clase A: Serina ESBL (TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, IBC)	β -lactámicos	Inactivación del antibiótico
	Clase D ESBL (Tipo OXA)	β -lactámicos	Inactivación del antibiótico
	Clase B: Metallo- β -lactamasas	Carbapenemasas	Inactivación del antibiótico
	Clase A: Tipo KPC	Carbapenemasas	Inactivación del antibiótico
	Clase D: Carbapenemasas (Tipo OXA: OXA 40)	Carbapenemasas	Inactivación del antibiótico
	Enzimas inactivadoras de aminoglucósidos	Aminoglucósidos	Inactivación del antibiótico
	Enzimas ribosómicas metiltransferasa	Aminoglucósidos	Modificación del blanco

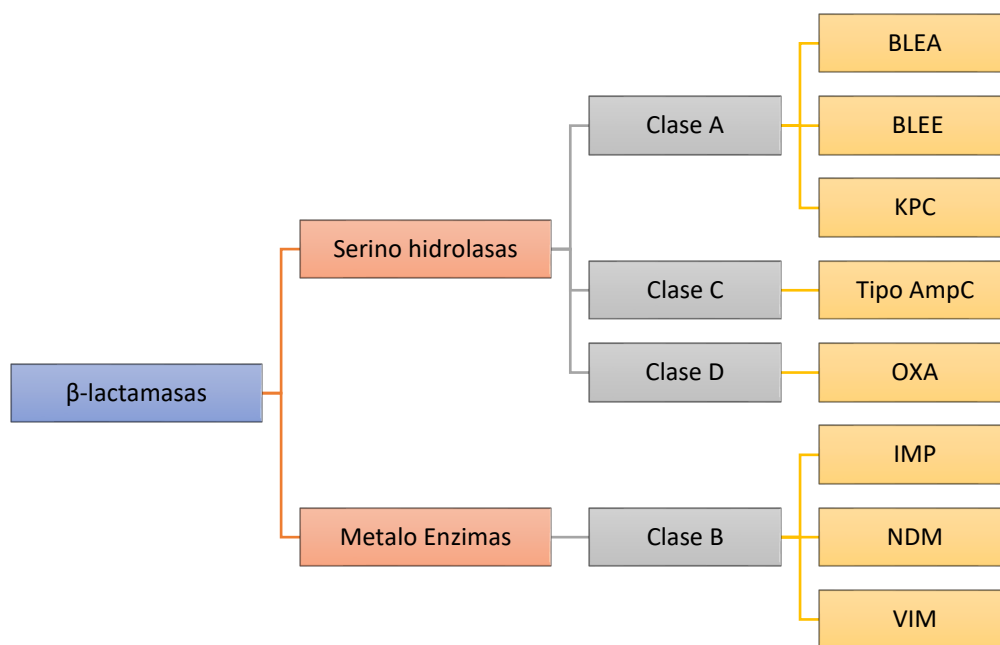


Figura 1. Clasificación de β-lactamasas según los criterios de Ambler (Cavalieri et al., 2005).

Las carbapenemasas más frecuentes de acuerdo con la clasificación de Amber son; De la clase A, la KPC que se encuentran en el mismo grupo que las BLEA y las BLEE, las carbapenemasas de clase B: VIM, carbapenemasas tipo IMP y recientemente descubiertas las del tipo NDM y de la clase D las enzimas tipo OXA, las cuales se pueden dividir en varios grupos según la homología de la secuencia. Al igual que en las enterobacterias, las enzimas carbapenemasas se ha identificado en cepas de *P. aeruginosa*. La clase principal de carbapenemasas que se encuentra en *P. aeruginosa* pertenece al grupo de MBL, que comprende cinco tipos: IMP, VIM, NDM, SPM y GIM. Estas enzimas se codifican principalmente en elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones y casetes que favorecen rápidamente su difusión; Las MBL exhiben un amplio espectro de actividad que cubre todos los β-lactámicos, incluidos los carbapenémicos (Imipenem y meropenem) y son resistentes a IBL (**Tabla 2**). Solo el aztreonam, no es hidrolizado por MBL, pero la susceptibilidad de estas enzimas al aztreonam es a menudo no observada por los diagnósticos de rutina, ya que las actividades de MBL se asocian con frecuencia con otros mecanismos de resistencias a β-lactámicos. Además, a menudo las MBL se localizan en elementos genéticos móviles que incluyen genes asociados a otros mecanismos de resistencia dentro de los cuales se encuentran las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Bassetti et al., 2018).

El incremento en la resistencia antimicrobiana aumenta la mortalidad de los pacientes y es por ello por lo que numerosas instituciones alrededor del mundo han manifestado su preocupación ante el aumento en la adquisición de múltiples mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*, especialmente aquellos mecanismos que son capaces de producir carbapenemasas. El Informe anual de la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (EARS-Net), 2015 mostró que en Europa el 33,9% de *P. aeruginosa* eran resistentes a al menos uno de los grupos antimicrobianos bajo vigilancia (eCDC,2015). Cifras similares sobre resistencia a Carbapenémicos se reportaron en el resto del mundo (Bou Arévalo et al., 2015).

Tabla 2. Espectro de actividad de las distintas β -lactamasas.

	WT	PEN		ESBL		CEPH	CARBA
	WT	TEM PSE CARB	OX A	PER VEB TEM SHV CTX-M	OXA	Amp C	IMP VIM NDM KPC
Carboxypenicillinas	S	R	R	R	R	R	R
Carboxypenicillinas +IBL	S	S/I	I/R	S/I	I/R	R	R
Ureidopenicillinas	S	I/R	R	I/R	R	I/R	R
Ureidopenicillinas + IBL	S	S/I	I/R	S/I	I/R	I/R	R
Ceftazidima	S	S	S	R	I/R	I/R	R
Cefepima	S	S	I/R	R	I/R	I/R	R
Aztreonam	S	S	S	R	I/R	I/R	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	R

IBL: Inhibidores de β -lactamasas - CARBA: carbapenemasas - CEPH: Cefalosporinasa AmpC - ESBL: β -lactamasas de espectro extendido – R: Resistente S: Susceptible I: Resistencia Intermedia PEN: - penicilinas WT, Cepa salvaje. Modificado de Bassetti., et al., 2018.

1.5 TRATAMIENTO Y ABORDAJE

Los tratamientos para infecciones por *P. aeruginosa* se agrupan en ocho categorías de antibióticos los cuales incluyen aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina), carbapenémicos (Imipenem, meropenem), cefalosporinas (ceftazidima, cefepima), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina), penicilinas con IBL (ticarcilina y piperacilina en combinación con ácido clavulánico o tazobactam), monobactámicos (aztreonam), polimixinas (colistina, polimixina B) y fosfomicina (Bassetti et al., 2018). La selección del tratamiento antimicrobiano casi siempre es una decisión basada en el sitio anatómico afectado. En primera instancia se utiliza el llamado tratamiento empírico que junto a otros fármacos busca estabilizar al paciente en las primeras horas de su ingreso al hospital o calmar las molestias resultantes de la infección. De manera general los aminoglucósidos como gentamicina, tobramicina, amikacina muestran actividad contra la mayor parte de las cepas de *P. aeruginosa* (Castro, 2014). Es importante recordar que el tratamiento difiere según el sitio anatómico; por ejemplo, en la otitis externa se recomienda Imipenem, y en infecciones de la piel como queratitis se usa tobramicina más piperacilina o ticarcilina (Ryan & Ray, 2011). En muchas ocasiones, los pacientes son tratados bajo tratamientos empíricos que requiere dos agentes antimicrobianos de diferentes familias bajo la premisa de que esto aumentará la tasa de éxito, sin embargo algunas investigaciones sugieren que la terapia combinada no ofrece ventaja frente a la monoterapia por lo que una vez obtenidos los resultados de los las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se recomienda ajustar el tratamiento según el resultado obtenido (Bassetti et al., 2018).

2. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Los primeros informes de carbapenemasas tipo IMP fueron descritos en Japón en la década de 1990 en una cepa de *P. aeruginosa*. Posteriormente se encontraron genes IMP en Brasil y Canadá tras los primeros informes en Europa durante 1997. Estos genes se han extendido lentamente a otros países del lejano oriente y posteriormente a los Estados Unidos y Australia. Actualmente, se han identificado hasta 18 variedades de carbapenemasas tipo IMP y las investigaciones se centran principalmente en especies de *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, así como en la familia de las enterobacterias (Codjoe & Donkor, 2017). Por otra parte, los genes VIM se encuentran comúnmente en *P. aeruginosa* y *P. putida*. Esta enzima se aisló por primera vez en Verona, Italia, en 1997 y fue clasificada rápidamente como una Metallo- β -lactamasa asociada a integrones. Actualmente la familia de enzimas tipo VIM está formada por 14 variantes las cuales poseen similitudes a las tipo IMP ya que ambas están asociadas a integrones y se pueden encontrar en los mismos plásmidos además de que ambos hidrolizan todos los β -lactámicos excepto los monobactámicos (Aztreonam) y son susceptibles a todos los inhibidores β -lactámicos (Marsik & Nambiar, 2011). En 2001 se informó del primer aislado de *K. pneumoniae* productor de KPC en Carolina del Norte (Yigit et al., 2001). Aunque esta enzima (KPC-1) no fue la primera carbapenemasa que se detectó en *K. pneumoniae*, ya que desde 1994 se habían notificado en Japón aislados que albergaban Metallo- β -lactamasas de clase B capaces de hidrolizar carbapenémicos (Paterson & Bonomo, 2005). Una revisión de los genes del KPC por Perez y Van Duin declaró en 2013 que existían 12 variantes adicionales del gen *blaKPC* a nivel mundial (Perez & Van Duin, 2013). Pasando a las enzimas tipo OXA, estas se pueden dividir en varios grupos según la homología de la secuencia: Una de ellas es la tipa OXA-48, enzima que tiene una mayor actividad hacia carbapenémicos que el resto de las OXA, con las cuales comparte menos de un 50% de homología en su secuencia de aminoácidos. El primer productor de OXA-48 identificado fue una cepa de *K. pneumoniae* en Turquía en el año 2003. Desde entonces ha sido extensamente identificado en brotes nosocomiales y su distribución mundial incluye países de Europa y África por lo que hay una creciente identificación de OXA-48 en brotes nosocomiales iniciados por el traslado de pacientes desde áreas endémicas (Nordmann et al., 2011a). Finalmente, la enzima NDM fue descubierta recientemente en 2007 cuando a un paciente sueco que se encontraba anteriormente hospitalizado en Nueva Delhi, India se le diagnosticó con una infección urinaria por *K. pneumoniae* multirresistente. La caracterización dio lugar al descubrimiento del gen *blaNDM-1* que codificaba la producción de una nueva Metallo- β -lactamasa (Yong et al., 2009). Desde 2010 se han identificado cepas productoras de NDM-1 en todos los continentes, con menor incidencia en algunas regiones de América y mayor en la India, donde se estableció como su principal reservorio. Para tratar infecciones por cepas con genes NDM-1 fue necesario el uso de antibióticos carbapenémicos lo que propició el aumento en la resistencia antimicrobiana, contribuyendo a los niveles actuales de resistencia (Nordmann et al., 2011b).

Entre los ensayos fenotípicos más utilizados para la detección de carbapenemasas se encuentran los ensayos de discos que contienen carbapenémicos e inhibidores de β -lactamasas (Ensayos de doble disco) como EDTA o ácido bórico. (Radice et al., 2011). Otro método fenotípico para la detección de carbapenemasas es el ensayo colorimétrico Carba NP descrito por Nordmann et al en 2012 y modificado en años posteriores (Nordmann et al., 2012). Este método detecta los cambios de pH producidos cuando se hidrolizan el anillo β -lactámicos de los carbapenémicos. Posteriormente este método fue modificado por Pasteran et al., mejorando su sensibilidad y haciéndolo menos complejo y más accesible para los laboratorios con menos infraestructura (Pasteran et al., 2015). Este método fue adaptado en 2015 por el INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” para la detección de carbapenemasas a partir de la placa de cultivo y servirá como marco de

referencia del procedimiento experimental de la presente investigación (INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2015). Otro método similar es el método Blue carba propuesta por Pasteran et al., donde los autores refieren un 100% de sensibilidad y especificidad en Enterobacterias, *Acinetobacter spp.* *Pseudomonas spp.* (Pasteran, Veliz, et al., 2015). A partir de 2015 el Carba NP es recomendado por el CLSI como método complementario para la búsqueda de carbapenemasas (INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2022). En 2014, Van der Zwaluw et al., desarrolló un método llamado Método de Inactivación de Carbapenémicos (MIC) para la detección de carbapenemasas en bacilos gramnegativos a partir de discos de meropenem. Los autores de este método señalan que además de ser económico y fácil de realizar, no se ve afectado por cambios de temperatura o el tiempo de incubación, además de reducir la posibilidad de falsos positivos en cepas con susceptibilidad reducida a carbapenémicos por mecanismos distintos a la producción de enzimas tipo carbapenemasas (van der Zwaluw et al., 2015). Desde 2017 CLSI ha recomendado una versión modificada del método llamado ensayo modificado de Inactivación de carbapenémicos (mCIM) como herramienta para la detección de carbapenemasas en enterobacteria. A partir de 2018 recomienda realizar simultáneamente otro ensayo idéntico en paralelo, pero con la adición de EDTA para la detección de MBL (método modificado de inactivación de carbapenémicos con EDTA, eCIM). Aunque originalmente CLSI recomendaba estos ensayos únicamente para enterobacterias, en 2018 agregó a *P. aeruginosa* como bacteria recomendada para realizar el mCIM y aunque el eCIM aun no es recomendado por la institución, no sería de sorprenderse que este ensayo sea recomendado en ediciones posteriores como método de rutina para la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa* (INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2022).

La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* y la adquisición de mecanismos de resistencia a carbapenemasas han permitido el desarrollo de cepas MDR Y XDR que actualmente tienen una prevalencia superior al 30% a nivel mundial, limitando así en gran medida los tratamientos efectivos y elevando así la tasa de morbilidad y mortalidad (Bou Arévalo et al., 2015). El problema de la multidrogoresistencia en *P. aeruginosa* ha escalado a tal grado que en 2017 la OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, donde clasifica la prioridad como media, elevada y critica, encontrándose en esta última categoría CRPA (WHO, 2017a). A partir del interés mundial sobre los peligros de CRPA se han desarrollado múltiples investigaciones que plantean simplificar a los investigadores el análisis de los aislamientos de bacterias productoras de carbapenemasas. En 2019 INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” desarrolló un protocolo de PCR multiplex para la detección de carbapenemasas que permite a los investigadores la detección de genes de resistencia asociados a la producción de distintas carbapenemasas de manera simple, rápida y sin la necesidad de diseñar cebadores específicos o experimentar sobre las condiciones de amplificación apropiadas, mismo que será utilizado para la presente investigación (INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2019).

En Asia, se ha generado en los últimos años investigaciones que demostrado la alta prevalencia de carbapenemasas en numerosos países de la región; En el año 2020 una investigación encontró 121 aislamientos de *P. aeruginosa* con genes blaVIM de una investigación realizada a partir de 507 aislamientos de CRPA asiladas de muestras clínicas de 2014 a 2017 en siete hospitales de la india (Pragasam et al., 2018). Posteriormente en el año 2021 se realizó estudio de vigilancia informal de organismos gramnegativos no susceptibles a carbapenem en el Hospital General de Singapur donde se analizaron 222 aislamientos CRPA. Se reportó que todos aislados eran portadores del gen blaOXA, además de 101 aislados contaban al mismo tiempo con el gen blaIMP y 41 aislados con el gen blaNDM (Teo et al., 2021). Por otro lado, en una investigación efectuada en 2015 donde se recolectaron 287 cepas clínicas de *P. aeruginosa* de 43 laboratorios de la República Checa en Europa, se reportó un 60% de genes blaIMP en 197 muestras de CRPA (Papagiannitsis et al, 2017). Nuevamente en Europa en años posteriores se han detectado genes blaVIM en proporciones muy

altas respecto al número de cepas estudiadas que van desde 70 al 90% en cepas clínicas obtenidas de hospitales de Holanda y Alemania (Pirzadian et al,2021; Wendel et al,2022).

En América las cifras no son más alentadoras, encontrando carbapenemasas en múltiples países de la región; En el año 2017 en Brasil se realizó una investigación con 25 aislamientos de *P. aeruginosa*, provenientes de muestras clínicas recuperadas de tres hospitales diferentes ubicados en São Paulo Brasil. Los genes codificadores de β -lactamasas se investigaron mediante PCR seguida de secuenciación de ADN. La actividad de hidrólisis de carbapenémicos se investigó mediante espectrofotómetro y ensayos MALDI-TOF. Finalmente se encontró que el total de las cepas era portadoras del gen blaOXA (Campana et al., 2017). En 2018 se reportaron los resultados de una investigación en Colombia donde se utilizaron 40 cepas clínicas provenientes de tres hospitales del país, cuyos resultados arrojaron que 32 (80%) aislamientos presentaron un fenotipo de resistencia a carbapenémicos. De dichos aislamientos cuatro presentaban el gen blaKPC-2 con resistencia presente a imipenem, meropenem o doripenem y tres presentaban el gen blaVIM con resistencia únicamente a imipenem (Riaño, A., et al., 2018). Ese mismo año se publicaron los resultados de su estudio realizado en el Hospital Militar Central en Perú donde se analizaron 76 aislamientos clínicos de CRPA. El resultado arrojó resistencia mediada por carbapenemasas del 31.6 % (24/76). Los 24 aislamientos productores de carbapenemasas portaban genes para MBL y 23 de los 24 aislamientos (95.8%) portaban los genes blaIMP, así como uno de ellos (4.2%) portaba el gen blaVIM. (Salvador, G. et al, 2018). Más adelante se publicaría en Chile los resultados de una investigación en 2020, donde incluyeron 113 aislados de *P. aeruginosa* resistentes a Imipenem y meropenem, obtenidos entre 1998 y 2019 en 12 hospitales de nueve ciudades del país. Para la detección fenotípica se realiza la prueba rápida carba NP. En aquellas muestras que presentaron fenotipos de resistencia positivos se buscaron genes que codifican a carbapenemasas mediante PCR para los genes blaVIM, blaGES, blaKPC, blaIMP, blaGIM, blaSPM, blaNDM y blaOXA-48. En 61 de los 113 aislados presentaron fenotipos de resistencia positivos 54%. Los fenotipos positivos se separaron en dos grupos: productores de VIM (n: 29), productores de KPC (n: 32). El gen blaKPC fue amplificado en los 32 aislados (52,5%) y el gen blaVIM en los 29 (47,5%), y en ninguno de ellos se detectó la co-portación de ambos genes (Jandira, S., et al., 2020). En 2021 se realizó una investigación observacional descriptiva en seis hospitales de la ciudad de Bogotá en el período de enero de 2017 a agosto de 2018. Se obtuvieron 80 aislamientos de *P. aeruginosa* con CIM correspondientes a resistencia intermedia o resistentes a carbapenémicos y se realizó la detección de genes blaKPC, blaVIM, blaIMP, blaGES, blaOXA-48 y blaNDM. Obteniendo prevalencias de CRPA de 65% (52/80). De las cepas CRPA 39 de ella fueron portadoras del gen blaKPC y 11 aislamientos con el gen blaVIM y dos aislados presentaron coproducción de KPC y VIM (Remolina G. et al., 2021). Ese mismo año en Estados Unidos se realizó a través de la red de Laboratorios de los CDC en un estudio donde participaron 55 laboratorios de salud pública para realizar pruebas especializadas para detectar genes en CRPA. Se recolectar aislados de *P. aeruginosa* resistentes a doripenem, imipenem o meropenem (CMI de $\geq 8 \mu\text{g} / \text{ml}$ y se confirmó de especies por MALDI-TOF). Los aislados de CRPA también se sometieron a pruebas fenotípicas de producción de carbapenemasas utilizando el mCIM o *Rapidec* Carba NP y detección genotípica de genes (blaKPC, blaIMP, blaNDM, blaOXA-48 y blaVIM) mediante protocolos de PCR en tiempo real, Cepheid GeneXpert Carba-R o la prueba de hemocultivo gramnegativo Verigene. Los aislados que demostraron la producción de carbapenemasas y no tenían genes de carbapenemasas detectados en la prueba inicial de Cepheid GeneXpert Carba-R se sometieron a pruebas adicionales para genes específicos mediante PCR en tiempo real. Finalmente se reportaron 6192 aislados, encontrando 3.2% (196/6192) de CRPA. Al analizar las 196 cepas de CRPA en busca de genes de resistencia se encontraron las carbapenemasas de tipo NDM, IMP, KPC, y VIM con una prevalencia de 6.12%, (12), 6.63% (13), 26.02% (51) y 61.22% (120) respectivamente, logrando encontrar cuatro de los cinco genes buscados (Vallabhaneni et al., 2021).

2.2 ANTECEDENTES NACIONALES

En lo que respecta a México hay pocos estudios relevantes sobre la búsqueda e identificación de genes de resistencia para CRPA. En el 2017 un estudio donde colaboraron 20 hospitales mexicanos Gutiérrez Muñoz et al., reportaron una prevalencia de *P. aeruginosa* del 20.4% (115/563 cepas), sin embargo, el estudio solo arroja datos de prevalencia en IAAS (Gutiérrez Muñoz et al., 2017). Fuentes González & Ahumada Topete en 2018 en una investigación donde se analizaron 450 cepas en el Hospital de Especialidades de la ciudad de México Dr. Belisario Domínguez de 2015 a 2018 reportaron prevalencias de 6.9% de *P. aeruginosa* (31/450 cepas) y una resistencia a carbapenemasas de 41.9%, sin embargo, aunque el estudio reporta fenotipos compatibles con producción de carbapenemasas, la metodología no describe una técnica específica por la que los hallazgos podrían limitar las conclusiones sobre la presencia de genes asociados a la producción de carbapenemasas (Fuentes González & Ahumada Topete, 2020). Ese mismo año el Hospital General Regional No. 270 y la Unidad de Medicina Familiar No. 33 del IMSS en un estudio con 191 muestras Lara Medina et al. reportaron una prevalencia de 7.9% en *P. aeruginosa* y una producción de carbapenemasas 86.7%. nuevamente destacamos la falta de metodologías específicas para fenotipos productores de carbapenemasas (Lara Medina et al., 2018). De igual forma en 2018 se reportó una investigación donde se obtuvieron 59 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de 57 pacientes hospitalizados en el Hospital Regional del ISSSTE de Puebla, México, durante el período de abril de 2013 a julio de 2015. Los aislamientos se identificaron por métodos de microbiología convencional a través de pruebas bioquímicas y el sistema automatizado VITEK 2. Las pruebas de susceptibilidad fueron realizadas por el método de Kirby Baüer y por CMI y la identificación de genes fue realizada a través de PCR con cebadores específico. Del total de los aislados, 69.49% fueron resistentes a carbapenémicos (41/59) y 17 estas cepas fueron portadores de genes tipo blaVIM (López García et al., 2018). Posteriormente en el año 2019 la OMS recibió un informe de infecciones por *P. aeruginosa* resistente a antibióticos después de procedimientos realizados en la ciudad de Tijuana, México. Se identificaron 20 casos, logrando confirmar 16 pacientes con infecciones por CRPA productora de Metallo- β -lactamasas tipo VIM. Aunque la organización mundial de la salud sigue vigilando la situación epidemiológica y examinando la evaluación del riesgo, el incidente no se han realizado investigaciones posteriores que ofrezcan un panorama más amplio de la situación de la MDR en cepas de *P. aeruginosa* en la ciudad, aun cuando los antecedentes señalan una problemática latente que podría ser abordada desde el punto de vista clínico y epidemiológico. (CDC, 2021).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Resistencia a los antimicrobianos es una amenaza a la salud que ha tenido un papel creciente en las últimas décadas. La aparición y propagación de organismos MDR hace cada vez más difícil el tratamiento de infecciones comunes, con antibióticos cada vez más ineficientes incluso en países con grandes sistemas de atención sanitaria. Estos microorganismos desgastan los sistemas de salud afectando considerablemente las económicas de las instituciones y de los pacientes, aumentando las estancias hospitalarias y agotando los suministros médicos, generando así un incremento en la morbilidad y mortalidad (Lautenbach et al., 2010). Las infecciones por *P. aeruginosa* tienen una alta morbilidad y mortalidad debido a sus múltiples factores de virulencia y su enorme capacidad de formar resistencia antimicrobiana. Entre sus principales factores de virulencia se encuentra la formación de exotoxinas, proteasas y enzimas que degradan el tejido, brindándole la capacidad de adherirse a las mucosas, causar una infección local y posteriormente llegar a una infección sistémica (Espinoza Pesantez et al., 2021). Por otro lado, la resistencia antimicrobiana juega un papel importante en las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Su membrana poco permeable les confiere una resistencia intrínseca a múltiples antibióticos. El creciente incremento de la resistencia de *P. aeruginosa* a

agentes antimicrobianos y la prevalencia de cepas MDR, XDR e incluso PDR a nivel mundial la ha destacado como una de las 5 importantes en el ambiente intrahospitalario en la actualidad (Bou Arévalo et al., 2015). Aunque la prevalencia de CRPA a nivel mundial va del 12 a 30 %, esta cifra tiende a elevarse en regiones como Asia e India donde *P. aeruginosa* se presenta de manera endémica y en cuyos países los sistemas de salud se ven abrumados por la enorme población que representa un reto diario en la atención sanitaria (Tada et al., 2019). Dentro de los mecanismos de resistencia adquirida de *P. aeruginosa* con mayor importancia en la actualidad se encuentran aquellos que le otorgan resistencia a carbapenémicos, aquellos antibióticos β -lactámicos con mayor espectro de actividad en las infecciones por *P. aeruginosa*. Su producción ha generado un importante problema en la actualidad en materia de resistencia antimicrobiana ya que la presencia de carbapenemasas suelen indicar también resistencia a múltiples familias de antibióticos, destacando nuevamente la importancia de su estudio (Salvador Luján et al., 2018). En México se cuenta con la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) cuyos informes tienen la intención de abordar las estadísticas respecto a las infecciones asociadas a atención de la salud. En su último informe de 2014 se reportó un total de 34,884 IAAS. Estos hallazgos incluyeron datos epidemiológicos y un diagnóstico confirmado de *P. aeruginosa* como agente causal de la infección. En estos hallazgos se identificó a *P. aeruginosa* como el segundo microorganismo más frecuente en IAAS con un total de 4,342 aislamientos (12.4%) del total de infecciones, cifra que aumentaría a 16.76% pero se mantendría como el segundo microorganismo más frecuente en IAAS. (RHOVE, 2014; RHOVE, 2022). A pesar de que se han reportado hallazgos relevantes sobre el papel de que tiene CRPA, en nuestro país existen pocos estudios específicos sobre este microorganismo.

Si bien existen algunos estudios sobre resistencia de *P. aeruginosa* cuyos resultados han informado fenotipos productores de carbapenemasas en cifras variadas (algunas de ellas alarmantes) cabe señalar que la mayoría de los estudios clínicos tienen limitaciones metodológicas y que la interpretación de la evidencia es difícil, lo que provoca que la información generada hasta la fecha aún no nos permita hacer conclusiones sobre el tema. Por ello es necesario incorporar técnicas que nos permitan caracterizar más detalladamente las cepas de CRPA que se aíslan en los laboratorios del país para así tener suficientes herramientas para la toma de decisiones en la salud de los pacientes. En vista de estas observaciones y ante la sospecha de una alta prevalencia de CRPA por los antecedentes en la ciudad (CDC, 2021) buscamos determinar la frecuencia y expresión de 5 genes de resistencia asociados a la producción de carbapenemasas en *P. aeruginosa* (blaVIM, blaNDM, blaIMP, blaKPC, blaOXA). Esto se realizará a través del análisis de muestras clínicas provenientes de heridas y tejidos blandos, secreciones respiratorias, orina y heces, sangre, fluidos organismos y otras muestras de naturaleza clínica de pacientes hospitalizados y ambulatorios de dos laboratorios privados de la ciudad de Tijuana, México, durante el periodo comprendido de enero de 2018 a octubre de 2022. Posterior a la recolección se realizará un tamizaje bioquímico para confirmar la correcta identificación de las cepas obtenidas. Seguido a ello, se realizarán ensayos fenotípicos que mostrarán la producción de carbapenemasas basados en métodos enzimáticos y colorimétricos. Finalmente se hará identificación de los genes de resistencia en las muestras recuperadas mediante cebadores específicos para cada uno de los genes. Con ello se generará nueva información sobre la epidemiología local, estableciendo el antecedente para futuras investigaciones que permitirán a las instituciones de salud tener mayor conocimiento sobre el peso de CRPA en la ciudad y así contribuir al desarrollo de mejores herramientas para la toma de decisiones en el control de infecciones de organismos MDR, el tratamiento de pacientes y éxito terapéutico.

4. JUSTIFICACIÓN:

Debido al uso y abuso de agentes antimicrobianos, en las últimas décadas ha propiciado que algunos microorganismos desarrollen o adquieran cada vez más rápidos mecanismos de resistencia que les permite sobrevivir en el entorno hostil. Aunque el uso y abuso de medicamentos es un concepto común para el personal de la salud ya que ocurre en el ambiente intrahospitalario, existen otras circunstancias que contribuyen al actual panorama de la multidrogoresistencia, como su uso en la industria alimenticia (animales de granja o cultivos de frutas y verduras) o en productos de limpieza. Esta situación ha escalado a nivel mundial, generando más de 250 000 muertes cada año (WHO, 2017b). Múltiples investigaciones han estudiado los efectos que ejerce la resistencia a antimicrobianos de CRPA en la atención del paciente, concluyendo que los costos hospitalarios sufren aumentos significativos que provienen del incremento en el uso de medicamentos, entre ellos el uso mayor de antibióticos. En el caso de CRPA, el costo total de la estancia hospitalaria puede superar el 20% (Zhen et al., 2020), aunque otras investigaciones han encontrado que los costos hospitalarios han sufrido incrementos de hasta el 50% posteriores al reporte del cultivo bacteriano. Por otra parte, es posible que la hospitalización represente retos adicionales para las instituciones de salud, lo que lleva en muchas ocasiones a incrementos en los periodos de hospitalización, sin embargo, esto comúnmente es pasado por alto ya que normalmente el incremento en el tiempo se hace evidente solo hospitalizaciones largas en patologías complejas. De esta forma combatir IAAS puede representar un aumento de hasta un 60% de la estancia hospitalaria (Lautenbach et al., 2010). A medida que la estancia hospitalaria por microorganismos resistentes a carbapenémicos se prolonga, las opciones terapéuticas se vuelven cada vez menores, lo que da como resultado un incremento importante en la mortalidad de los pacientes (Chen et al., 2019). Los CDC reportaron en Estados Unidos alrededor de 46,000 casos de infecciones intrahospitalarias asociadas a *P. aeruginosa* en 2012 y nuevamente una cifra similar para el año siguiente. A pesar de los continuos esfuerzos para disminuir las IAAS, en 2017 se reportaron alrededor de 32,600 casos de infecciones intrahospitalarias asociadas a CRPA para ese año, cuyas muertes estimadas alcanzaron las 2,700, generando así cerca de 767 millones de dólares en costos asociados a la salud en 2017 (CDC, 2019). El mismo año en España las bacterias resistentes a carbapenémicos costaron a los sistemas de salud más de 300 millones de Euros, significando miles de vidas que no se pudieron salvar y más de 100,000 años perdidos por la mortalidad prematura de estos pacientes (Cantón et al., 2021). El impacto de la pandemia de Covid-19 ha traído como resultado un aumento de las infecciones por microorganismos resistentes a los antimicrobianos en infecciones asociadas a la atención médica, como consecuencia los CDC reportaron en 2022 que tan solo en Estados Unidos hubo un incremento del 32% de IAAS por *P. aeruginosa* en 2020 frente a los datos recopilados para 2019 (CDC, 2022). Aunque se espera que este revés sea temporal, valdría la pena tener en cuenta la dificultad que representa obtener cualquier clase de avance en la lucha contra la resistencia antimicrobiana, sobre todo frente a la velocidad con la que crece el problema. Adicionalmente a lo anterior, durante la pandemia los hospitales experimentaron desafíos en el suministro de equipos de protección personal, escasez de personal y estadías más prolongadas de los pacientes. Los hospitales también trataron a pacientes más enfermos que requerían un uso más frecuente y prolongado de dispositivos médicos como catéteres y ventiladores mecánicos. Por estas razones los costos de hospitalización se incrementaron de manera general, independientemente de los costos asociados a la resistencia a carbapenémicos (Lashari et al., 2022). Aunque se han encontrado estudios a nivel mundial que alertan sobre la importancia de *P. aeruginosa* en pacientes hospitalizados y su gran capacidad de adquirir resistencia antimicrobiana, la bibliografía local es insuficiente y la falta de información actualizada en los programas de vigilancia epidemiológicamente de índole gubernamental ha mermado significativamente la generación de informes sobre la prevalencia de infecciones de interés en México.

5. HIPÓTESIS

Existe la presencia de al menos uno de los genes blaVIM, blaNDM, blaIMP, blaKPC, blaOXA asociados a resistencia de β -lactámicos por producción de carbapenemasas en cepas de *P. aeruginosa* en aislados de muestras clínicas en pacientes hospitalizados y ambulatorios de Tijuana, Baja California, México.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia y expresión de los genes: blaIMP, blaVIM, blaNDM, blaKPC y blaOXA que codifican a carbapenemasas en *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados y ambulatorios en la ciudad de Tijuana entre enero de 2018 a octubre de 2022.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Recolectar cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos de muestras clínicas recuperadas de dos laboratorios privados de la ciudad de Tijuana.
- b) Identificar la producción de carbapenemasas en cepas *P. aeruginosa* mediante pruebas fenotípicas.
- c) Determinar la presencia de alguno de los genes blaVIM, blaIMP blaNDM blaKPC, blaOXA.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

Reactivos químicos

Para las pruebas de identificación primaria se empleó tinción de Gram marca Hycel[®] y reactivo de oxidasa (Tetrametil-p- fenilenediamina) Beckman Dickinson[®]. Para el aislamiento, identificación y procesamiento de las cepas bacterianas se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Agar nutritivo, Agar MacConkey, Medio P, Medio F, Medio basal de OF y caldo Infusión de Cerebro Corazón (BHI) de la marca DIFCO[®]. El método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM) y eCIM (mCIM EDTA) se llevaron a cabo con Agar Müller Hinton de la marca DIFCO[®], discos de meropenem de 10 μ g marca *Bio-Rad Laboratories*[®], solución de EDTA 0.5 molar a pH 8 de la marca Thermo Fisher[®] y estándar comercial 0.5 a la escala de McFarland marca Hardy Diagnostic[®]. La prueba fenotípica carba NP fue realizada con una solución preparada a partir de rojo de fenol al 0.05% y SO₄Zn-7H₂O marca Fermont[®] y formulación farmacéutica de Imipenem/cilastatina (500/500mg) marca PISA[®]. Para la lectura de los productos amplificados del PCR se utilizó electroforesis en gel de agarosa. El gel de agarosa se preparó al 1.2% a partir de agarosa QD[®] y Buffer TAE 1x (Tris-acetato-EDTA) con 50 μ L de bromuro de etidio marca Apex[®]. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50pb preteñido (6x) de la marca bioLabs[®].

Reactivos biológicos

Se amplificaron los genes por PCR empleando múltiples oligonucleótidos cebadores, los cuales fueron sintetizados por el instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBM UNAM) de acuerdo al “Protocolo de PCR múltiple para la detección de los genes blaKPC, blaOXA-48-like, blaVIM, blaIMP y blaNDM en bacilos gran negativos” (INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2019). Los cebadores

utilizados se describen en la **Tabla 3**. Para la PCR se utilizó ADN total el cual fue obtenido a partir de los aislados. Para añadir el resto de los compuestos de la PCR se usó 2x Super Máster Mix marca Bimake®, que contiene todos los componentes para la PCR con excepción del ADN y cebadores (ADN taq polimerasas, tampón de reacción, mgCl₂ y DNTPs).

Tabla 3. Cebadores PCR Multiplex con el tamaño de producto esperado para cada cebador.

Nombre Primer	Gen	Secuencia 5'—3'	Tamaño de amplicón
VIM-F	VIM	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G	261
VIM-R		ATG AAA GTG CGT GGA GAC	
IMP-UF1	IMP	GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA	404
IMP-UR1		GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT	
NDM-F	NDM	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC	512
NDM-R		GGC GTA GTG CTC AGT GTC	
KPC-F	KPC	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG	916
KPC-R		AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA	
OXA-48-F	OXA-48-like	ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG	775
OXA-48-R		TGAGCACTTCTTTGTGATG	

Para la determinación fenotípica de producción de carbapenémicos en el mCIM y eCIM utilizó la cepa *E. coli* ATCC25922 como parte del protocolo descrito por el CLSI. Para los controles de calidad de todas las pruebas ensayadas se utilizaron las cepas *K. pneumoniae* BAA-1705 productora de carbapenemasa tipo KPC (Serin carbapenemasa) y *E. cloacae* BAA-2468 productora de carbapenemasas tipo NDM (Métalo-β-lactamasas) como controles positivos y como control negativo se usó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

7.2 EQUIPO

La preparación de los medios de cultivo se llevó a cabo en utilizando una balanza analítica Mettler-Toledo® PBI502-L, un Potenciómetro Corning-Scholar® 1728 y una autoclave digital Lorma 28. Para la conservación de los reactivos y muestras se utilizó un refrigerador y un congelador de la marca SCI Cool®. Para la siembra y procesamiento de muestras se utilizaron campanas de flujo laminar Enviroco® 6'A2-10451-EBC-70 Clase I y Luzeren® BYKG-II Clase I, centrifugas eppendorf® Mini Spin plus y eppendorf 5415 D, vortex IKA® 3, incubadora Quincy Lab Inc. 12-180 AE y un microscopio ZEISS Primo Star. Para el PCR se utilizó un termociclador BIO RAD T100® y para la lectura de las bandas se utilizó una cámara de electroforesis BIO RAD Mini-Sub® y un transiluminador de luz UV TFP M/WL.

7.3 MÉTODO PARA RECEPCIÓN Y CONSERVACIÓN INICIAL DE MUESTRAS

Las cepas se recolectaron de enero de 2018 a octubre de 2022 de dos laboratorios privados que colaboraron con la investigación. La identificación microbiana y las pruebas de susceptibilidad se realizaron previamente en las instituciones de origen mediante los equipos automatizados Vitek II® mediante las tarjetas GN para identificación y AST-N271 y MicroScan® con las tarjetas NC68 para aislamientos clínicos y BYC86 para aislamientos urinarios y los resultados fueron entregados al *Laboratorio de Análisis microbiológicos* de la UABC. Entre el periodo de 2018 a 2022 se recolectaron los resultados de 75 infecciones y se recuperaron

físicamente 25 muestras *P. aeruginosa* para la identificación de mecanismos de resistencia. Los 25 aislamientos fueron entregados por parte de los dos laboratorios en placas de agar sangre, nutritivo o chocolate de acuerdo con sus protocolos de procesamiento. Una vez se recibieron las muestras, los bordes de las cajas Petri se cerraron con papel Parafilm y se guardaron en el refrigerador a 4°C para su posterior procesamiento. Una vez que las cepas fueron recibidas en el laboratorio, se seleccionaron colonias perfectamente aisladas del agar y se procedió a realizar una serie de resiembras consecutivas para el proceso de conservación. Se realizó una primera resiembra en agar nutritivo a 35°C ± 2°C por 18 a 48 horas por la técnica de estría múltiple. Posteriormente se realizó una segunda resiembra de una colonia perfectamente aislada que tuviera las mismas características morfológicas observadas en la placa anterior, nuevamente en agar nutritivo a 35°C ± 2°C por 18 a 24 horas utilizando un hisopo estéril y sembrando en toda la extensión de la placa para la obtención de biomasa. Posteriormente al crecimiento en la placa de agar y mediante un asa bacteriológica se transfirió la mayor cantidad de biomasa posible a un criotubo que contenía 1.5 ml de caldo BHI con glicerol al 15% y se posteriormente se almacenó a -20°C con la finalidad de conservarlas hasta su posterior análisis. Este procedimiento se realizó por triplicado para conservar varias copias de cada bacteria. Más adelante estas cepas fueron reactivadas para realizar los ensayos fenotípicos, así como la búsqueda de genes de resistencia. Para realizar esta reactivación se descongeló cada criotubo a temperatura ambiente y seguido a ello se transfirió el contenido de manera aséptica a un tubo con 2 mL de caldo BHI estéril, luego se incubó a 35°C ± 2°C a 18 a 24 horas. Al día siguiente se realizó una siembra del contenido en placas de agar nutritivo y se incubó nuevamente a 35°C ± 2°C por 18 a 24 hrs para su utilización en las pruebas correspondientes.

7.4 MÉTODO PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La pureza de los aislados de *P. aeruginosa* se verificó a través de pruebas bioquímicas de microbiológica tradicional. Brevemente, se transfirió una colonia perfectamente aislada de agar nutritivo a placas de agar MacConkey, medio P y F y se incubó a 35°C ± 2°C por 18 a 24 horas. Al día siguiente se seleccionó una colonia perfectamente aislada de agar nutritivo y se realizó una tinción de Gram de acuerdo con el procedimiento estándar. De aquellas cepas que mostraron las características de Bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa (BGNNF), con un aplicador de madera se tomaron 3-4 colonias bien aisladas en agar nutritivo, se colocó el inóculo sobre un fragmento de papel filtro y se añadió una gota del reactivo de oxidasa. La reacción se consideró positiva cuando a los 30 segundos viró a un color azul o violeta azulado. Para las cepas BGNNF oxidasa positivo tomó 1 colonia con un asa de picadura y se sembró por duplicado en Medio Basal de OF (Hugh y Leifson) suplementando con 1% de glucosa. Uno de ellos fue cerrado ligeramente (tubo abierto) y otro se le añadió una pequeña cantidad de aceite de parafina estéril (tubo cerrado) y ambos se incubaron a 35°C ± 2°C durante 24 horas. Al día siguiente se observó el cambio de coloración de los tubos: En la vía oxidativa, solamente el tubo abierto viró ligeramente en la parte superior a color amarillo. En la vía fermentativa hay un viraje intenso a amarillo que comienza en el fondo de los dos tubos. Finalmente se clasificó como *P. aeruginosa* aquellos BGNNF oxidasa positivo que utiliza la glucosa por vía oxidativa y manifestaron pigmento fluorescente en algunos de los medios utilizados. Las cepas que no presentaron ninguna de estas condiciones tras varias resiembras se descartaron y se procedió a descongelar y reactivar otra copia de la cepa almacenada.

7.5 PRUEBAS PARA DETERMINAR FENOTIPOS DE RESISTENCIA

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana.

Una vez obtenido el perfil de susceptibilidad de los aislados de *P. aeruginosa* para la presente investigación, este fue validado de conforme a los puntos de cortes para CMI según los lineamientos del

documento M100 del CLSI 2023 (CLSI, 2023), los cuales se muestran en la Tabla 6. Así mismo la clasificación de multidrogoresistencia de las cepas se realizó de acuerdo con el “Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes” (Jiménez Pearson et al., 2019).

Tabla 4. Puntos de cortes para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), CLSI 2023.

Agente antimicrobiano	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)		
	Susceptible	Intermedio	Resistente
Amicacina (AMK)	≤ 16	32 [^]	≥ 64
Cefepima (FEP)	≤ 8	16	≥ 32
Ceftazidima (CAZ)	≤ 8	16 [^]	≥ 32
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 0.5	1 [^]	≥ 2
Imipenem (IMP)	≤ 2	4 [^]	≥ 8
Levofloxacina (LEV)	≤ 1	2 [^]	≥ 4
Meropenem (MER)	≤ 2	4 [^]	≥ 8
Norfloxacina (NOR)	≤ 4	8	≥ 16
Piperacilina-Tazobactam (PZT)	$\leq 16/4$	32/4	$\geq 64/4$
Tobramicina (TOB)	≤ 1	2 [^]	≥ 4
Amicacina (AMK)	≤ 16	32 [^]	≥ 64

Algoritmo se sospecha para carbapenemasas

Para las sospechas de carbapenemasas se tomó en cuenta el algoritmo recomendado por el INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” para la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa* (INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2021).



Figura 2. Algoritmo recomendado por INEI-ANLIS “Dr. C. Malbrán” para la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa*.

Este algoritmo muestra los niveles de corte de los antibióticos (Imipenem, meropenem, ceftazidima) indicadores de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas (Modificado de INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2021).

7.6 MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA LA BÚSQUEDA DE CARBAPENEMASAS

ENSAYO MODIFICADO DE INACTIVACIÓN A CARBAPENÉMICOS (MCIM)

La producción fenotípicamente de carbapenemasas se realizó por triplicado mediante el mCIM de acuerdo con el lineamiento del documento M100 del CLSI 2022 (CLSI, 2022). Se transfirió una colonia de la cepa problema con un asa de 10 µg en cada tubo con 2 mL de caldo BHI rotulado como mCIM y se homogenizó en vórtex por 10-15 segundos. Se añadió un disco de meropenem de 10 µg a la suspensión mediante pinzas estériles y se agito suavemente hasta sumergir el disco completamente en el caldo cuidando no agitar demasiado para evitar que el disco sufriera daños y se incubó a 35°C ± 2°C durante 4 horas. Antes de cumplir las cuatro horas de incubación se preparó una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 ajustada al 0.5 de la escala McFarland. Una vez preparada la suspensión bacteriana y dentro de los primeros 15 minutos posteriores a la preparación del inóculo de *E. coli*, se inoculó una placa de agar Müller-Hinton, utilizando el procedimiento de rutina para difusión, como lo es la técnica de difusión en disco) empleando un hisopo estéril, sembrando en las 3 direcciones (CLSI, 2022). Transcurridas las 4 horas de incubación e inmediatamente después a la siembra de la suspensión de *E. coli* en agar Müller Hinton, se removió el disco de meropenem del caldo BHI utilizando pinzas estériles o empleando un asa bacteriológica, quitando el exceso de caldo presionándolo contra las paredes del tubo y se colocó el disco de meropenem sobre el agar Müller-Hinton. Posteriormente se invirtieron las placas de agar Müller-Hinton y se incubaron de 18 a 24 horas a 35°C ± 2°C.

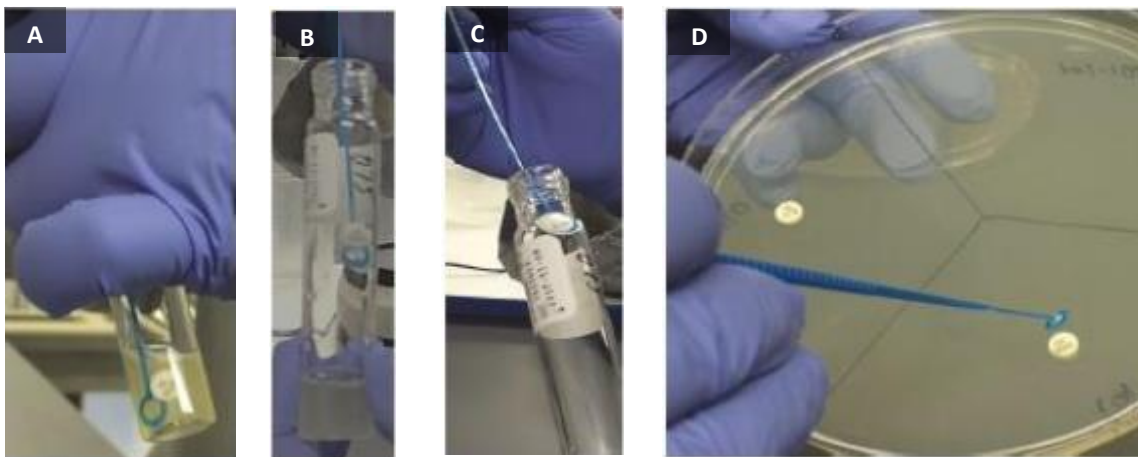


Figura 3. Procedimiento de inactivación de carbapenémicos mCIM. **A:** Se inactiva el sensidisco de meropenem sumergiéndolo en 2 mL de caldo BHI. **B:** Tras 4 horas de incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, se comienza a remover el sensidisco quitando el excedente del caldo presionándolo con las paredes del tubo. **C:** Una vez eliminado el exceso, se retira el sensidisco con pinzas estériles o con un asa microbiológica. **D:** Se siembra en agar Müller-Hinton *Escherichia coli* ATCC 25922 desde una suspensión 0.5 McFarland en toda la placa. Finalmente se añade el sensidisco con meropenem en las placas ya sembradas con la cepa de *E. coli* (CLSI, 2022).

Al día siguiente se midieron los halos de inhibición y se realizaron las interpretaciones de acuerdo con los criterios del método (**Figura 4**): Halo de inhibición de 6-15 mm o presencia de colonias pequeñas en la zona de 16-18mm, se considera resultado positivo y se reporta como cepa productora de carbapenemasas. Halo de inhibición $\geq 19\text{mm}$ (zona de inhibición clara sin ningún tipo de crecimiento), se considera resultado negativo y se reporta como cepas no productoras de carbapenemasas. Halo de inhibición de 16-18 mm o Halo de inhibición $\geq 19\text{mm}$, pero se observan colonias pequeñas, se considera resultado indeterminado y se repite la prueba.

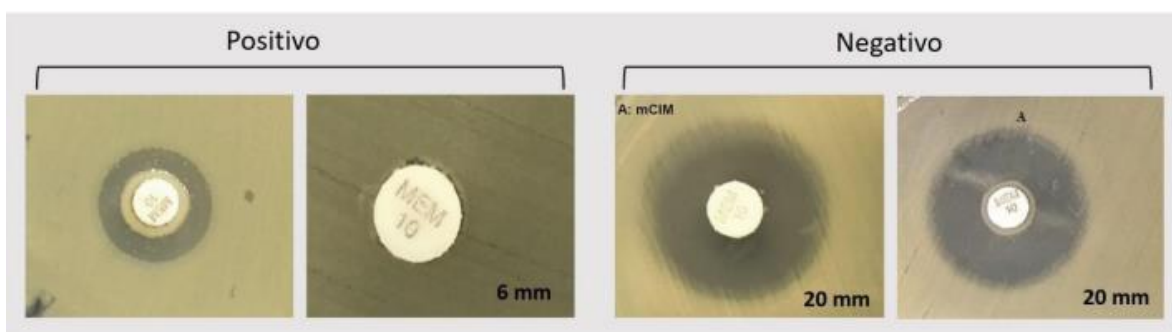


Figura 4. Interpretación de resultado de mCIM. Se puede observar crecimiento alrededor del disco de meropenem debido al acarreo del microorganismo de estudio, pero debe ser ignorado (CLSI, 2022).

ENSAYO MODIFICADO DE INACTIVACIÓN A CARBAPENÉMICOS CON EDTA (ECIM)

Simultáneamente al mCIM para poder diferenciar entre carbapenemasas tipo Serino hidrolasas y las Metallo- β -lactamasas, por cada aislamiento se etiquetó un segundo tubo con 2mL de caldo BHI como eCIM. A este segundo tubo se le adicionaron 20 μL de EDTA 0.5M y seguido a esto se continuó el procedimiento con los mismos pasos que para el mCIM. Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: Si hubo un Incremento $\geq 5\text{mm}$ en el halo de inhibición de eCIM en comparación de mCIM (exclusivamente para eCIM ignorando las colonias pequeñas que puedan observarse en el interior del halo para realizar la medición) se

considera un ensayo positivo y se reporta como cepa productora de Metallo- β -lactamasas. Si el incremento es ≤ 4 mm en el halo de inhibición de eCIM en comparación de mCIM se considera negativo y si el ensayo mCIM fue positivo y eCIM negativo entonces se reporta una cepa productora de carbapenemasa tipo Serino hidrolasa (**Figura 5**).

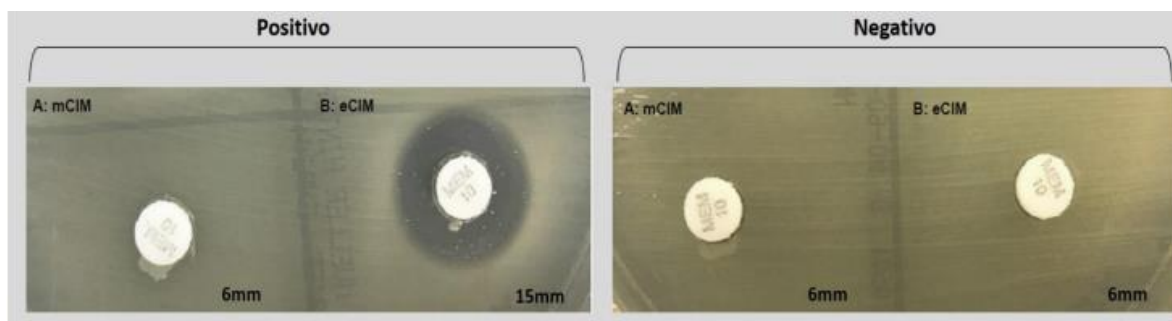


Figura 5. Interpretación de resultado del eCIM. El Incremento ≥ 5 mm en el halo de inhibición de eCIM en comparación de mCIM se considera un resultado positivo para presencia de carbapenemasas tipo Metallo- β -lactamasas (CLSI, 2022).

MÉTODO PARA IDENTIFICACIÓN DE CARBAPENEMASA CARBA NP

La búsqueda fenotípica de carbapenemasas se realizó adicionalmente por el método colorimétrico carba NP (**Figura 6**) utilizando el protocolo “- CARBA NP DIRECT - Detección rápida de carbapenemasas directo de placas de cultivo” del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” por triplicado (INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán», 2015). Para ello se disolvieron 50 mg de rojo de fenol en 100mL de H₂O (concentración final 0.1 mmol/L). En la solución anterior se disolvió 2.87 mg de SO₄Zn·7H₂O (concentración final 0.1 mmol/L), se midió el pH y se ajustó a 7.8, obteniendo una solución color roja que se nombró solución A. Para esta solución se omitió el uso de Tritón X-100 de acuerdo con las recomendaciones de Angelini et al., 2021 que mostró que no existen cambios en el resultado final durante el ensayo Carba NP al omitir este reactivo. Posteriormente se preparó la solución B añadiendo en partes iguales solución A y una solución de 12mg Imipenem/cilastatina a partir de una formulación farmacéutica de Imipenem/cilastatina (500/500mg). La solución obtenida fue incolora y no alteró el pH final. Una vez preparadas las soluciones A y B se transfirió 100 μ L de cada solución a dos microtubos independientes. Posteriormente se inocularon los microtubos con la cepa de *P. aeruginosa* procedente de un agar nutritivo, utilizando una asada completa de 1 microlitro en cada uno (5 a 10 colonias), se taparon los tubos y homogenizaron en vórtex por 5 a 10 segundos. Posteriormente se incubaron a 35°C $\pm$ 2°C y cada 15 minutos se retiraron de la incubadora para observar cambios en la coloración de los tubos. Este proceso se repitió cada 15 minutos hasta llegar a las 2 horas de incubación y finalmente se realizó la interpretación del cambio de color de acuerdo con los criterios descritos en la Tabla 5.

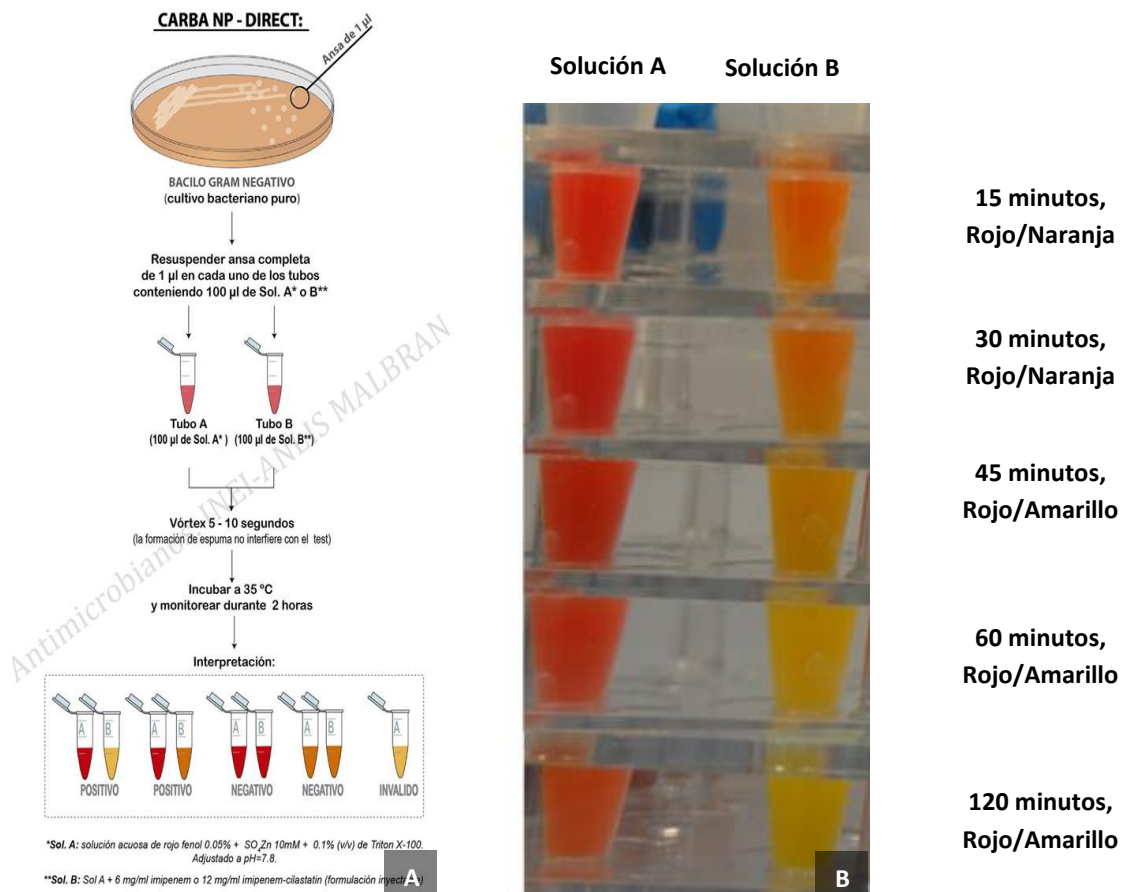


Figura 6. Procedimiento colorimétrico carba NP. **A:** Procedimiento para ensayo carba NP. **B:** Cambio de color de cepa productora de carbapenemasa a lo largo del tiempo.

Tabla 5. Criterios de interpretación de Carba NP. Los cambios de color pueden ser interpretados en cualquier momento a partir de la inoculación las soluciones hasta finalizar las 2 horas de incubación.

Tubo A (Sin Imipenem)	Tubo B (Con Imipenem)	Interpretación
Rojo	Naranja	Carbapenemasas positivo
Rojo	Amarillo	Carbapenemasas positivo
Naranja	Amarillo	Carbapenemasas positivo
Rojo	Rojo	Carbapenemasa negativo
Naranja	Naranja	Carbapenemasa negativo
Amarillo	Rojo/Naranja/Amarillo	Test Inválido

7.7 MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA

La detección de genes se realizó mediante el “Protocolo de PCR multiplex para la detección de los genes *blaKPC*, *blaOXA-48-like-blaVIM*, *blaIMP* y *blaNDM* en bacilos Gram negativos” del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” (INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2019). De esta manera todos los genes fueron identificados por triplicado para las 27 cepas recolectadas para este estudio. Para los controles de calidad se utilizaron las cepas *K. pneumoniae* BAA-1705 portadora del gen *blaKPC-2* y *E. cloacae* BAA-2468 portadora del gen *blaNDM-1* (Métalo- β -lactamasas) como controles positivos y como control negativo se usó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Para todos los ensayos se utilizó un control de reacción negativo con todos los componentes necesarios con excepción del ADN total.

Obtención del DNA total

Para la obtención de ADN total se partió de 1 colonia perfectamente aislada que se subcultivo en placas de agar nutritivo durante 18-24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para asegurar la pureza del cultivo. Al día siguiente se tomó 1 asada (5-10 colonias) y se mezcló en 200 μL de agua estéril y se calentó 15 minutos a 100°C . Pasado este tiempo se conservó a -4°C para su posterior uso.

Detección de la presencia de genes codificantes por PCR Multiplex

Para la amplificación de genes de resistencia se realizó PCR. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μL con las siguientes concentraciones finales: 2 μL de DNA, 50 pM de cada cebador (VIM-F, VIM-R, IMP-UF1, IMP-UR1, NDM-F, NDM-R, KPC-F, KPC-R, OXA-48-F, OXA-48-R), 5 μL de agua libre de DNA y RNA. Para el resto de los componentes se usó 2x Super Máster Mix (ADN taq polimerasas, tampón de reacción, mgCl_2 y dNTPs). Los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 3**. La amplificación se realizó con las condiciones siguientes: Desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: desnaturalización 94°C por 30 segundos; hibridación 54°C por 30 segundos, amplificación 72°C por 60 segundos y un período final de elongación 72°C por 10 minutos.

Análisis de resultados

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en buffer TAE 1x con 50 μL de bromuro de etidio. Para ello, se mezclaron 10 μL de cada producto amplificado con 5 μL de buffer de carga de ADN (6X) y se sembró todo el volumen en el gel de agarosa. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a un voltaje constante de 100 Voltios. Las bandas de amplificaciones se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y los tamaños de los amplicones se calcularon mediante comparación con un marcador de pesos moleculares de 50 pb colocado en uno de los pocillos del gel.

Procesamiento de datos

Los datos se ingresaron, codificaron, limpiaron y verificaron utilizando el software Microsoft Excel 2023; Se asignó un código único consecutivo a cada aislamiento recolectado y posteriormente se describieron los factores sociodemográficos y clínicos mediante estadísticas descriptivas como frecuencia y porcentaje. A partir de los datos obtenidos de las frecuencias se realizaron tablas, graficas de barras, graficas de barras acumuladas y graficas de pastel. Se realizaron análisis estadísticos utilizando el software Prism 10.0.0 para determinar la fuerza de asociación entre las variables. Se empleó la prueba de chi-cuadrada para evaluar la asociación entre las variables categóricas, mientras que la prueba de correlación de Pearson se utilizó para

analizar la relación entre los métodos empleados en la detección de carbapenemasas. Se estableció un intervalo de confianza del 95% para evaluar la magnitud de la asociación.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2018 y el 31 de octubre de 2022 se obtuvieron 75 hallazgos clínicos no repetidos de *P. aeruginosa* de dos laboratorios privados en la ciudad de Tijuana. Del total de los hallazgos generados por los laboratorios, fue posible recuperar 25 aislamientos de *P. aeruginosa*, los cuales fueron utilizados para la búsqueda de carbapenemasas. El total de las cepas presentaban las características bioquímicas de *P. aeruginosa*, por ello el total de los aislados clínicos recuperados fueron utilizados para su caracterización fenotípica y la búsqueda de genes de resistencia (**Figura 7**). Los datos recopilados de los pacientes se analizaron tomando en cuenta distintos parámetros como el género, la edad, sexo, departamento de procedencia, laboratorio de procedencia y perfil de susceptibilidad antimicrobiana.

En nuestro estudio 56% (42/75) provenían del laboratorio 1 y 44% (33/75) provenían del laboratorio 2. El 33.33% (23) fueron aislamientos de tipo ambulatorio y 66.67% (46) pertenecen a aislamientos de pacientes hospitalizados. La epidemiología de los aislados reveló que el 34.67 % provenían de infecciones de piel y tejidos blandos, 26.67% de infecciones de vías respiratorias, 13.33% de vías urinarias, 13.33% para cultivos de sangre, 6.0% de aparato gastrointestinal y 4.0% provenían de otros sitios anatómicos. (**Tabla 6**). En el presente estudio se encontraron diferencias entre los datos epidemiológicos obtenidos frente a otros autores; Doumith et al. encontró en Arabia Saudita en 2022 mayor prevalencia en muestras de secreciones respiratorias, seguidas de muestras de vías urinarias. En 2019 McCracken et al., encontraron mayor prevalencia de infecciones en secreciones respiratorias, seguidas de infecciones de sangre, y en 2020 Kresken et al., reportaron hallazgos similares, encontrando a las infecciones con tejidos blandos en tercer lugar en frecuencia. Por otro lado, encontramos similitudes entre los hallazgos de Farajzadeh et al., Rostami et al., y Ellappan et al., quienes obtuvieron mayor frecuencia de infecciones de piel y tejidos blancos en sus investigaciones. Aunque la bibliografía reporta una mayor frecuencia de infecciones por *P. aeruginosa* en vías respiratorias, las infecciones de piel y tejidos blandos no están exentas de este microorganismo, sin embargo dada la naturaleza de este estudio y el tamaño de muestra limitado no podemos establecer que los hallazgos aquí encontrados representen la epidemiología de toda la región (McCracken et al., 2019; Kresken et al., 2020; Doumith et al. 2022, Farajzadeh et al., 2020; Rostami et al., 2018 y Ellappan et al.,).

Tabla. 6. Epidemiología de los resultados obtenidos.

Características	Cepas totales	Laboratorio 1	Laboratorio 2	CRPA	Cepas Ensayadas
Genero					
Masculino	50.66 % (38)	35.71% (15)	69.7% (23)	57.14% (24)	56.00% (11)
Femenino	49.34% (37)	64.29% (27)	30.3% (10)	42.86% (18)	44% (14)
Servicio					
Ambulatorios	33.33% (23)	52.78% (19)	12.12% (4)	28.95% (11)	50% (11)
Hospitalizados	66.67% (46)	47.22% (17)	87.88 % (29)	71.05 (27)	50% (11)
Sitio anatómico					

Leche materna	1.33% (1)	2.38% (1)	0.00%	0.00%	0.00%
Oído	1.33% (1)	2.38% (1)	0.00%	0.00%	4.00% (1)
Ojo	1.33% (1)	2.38% (1)	0.00%	0.00%	0.00%
Piel y tejidos	34.67% (26)	30.95% (13)	39.39%	38.1% (16)	40% (10)
Sangre	13.33% (10)	7.14% (3)	21.21%	11.9% (5)	8% (2)
Aparato Gastrointestinal	8.00% (6)	11.9% (5)	3.03%	9.52% (4)	16% (4)
Vías respiratorias	26.67% (20)	21.43% (9)	33.33%	26.19% (11)	8% (2)
Vías urinarias	13.33% (10)	21.43% (9)	3.03%	14.29% (6)	24% (6)

8.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD Y CLASIFICACIÓN DE RESISTENCIA

La determinación del perfil de resistencia expresado por los aislamientos identificados se basó en análisis de la concentración mínima Inhibitoria y este fue realizado con base en los lineamientos del CLSI (CLSI, 2023) para considerar al patógeno resistente, sensible o con resistencia intermedia al antimicrobiano expuesto (Tabla 4).

Entre los aislados de *P. aeruginosa* encontramos la resistencia más alta en los antibióticos a carbapenémicos con 64% de resistencia Imipenem seguido de resistencia alta en otros agentes β -lactámicos; Ceftazidima y piperacilina/Tazobactam con una resistencia de 57% cada uno, seguido 51% de resistencia a cefepima, 48% a meropenem. Los siguientes antibióticos con mayor resistencia fueron las fluoroquinolonas con resistencia de 41% a Norfloxacin y levofloxacin y un 39% para ciprofloxacino. Finalmente, los antibióticos con tasas más bajas de resistencia fueron los aminoglucósidos con 31% de resistencia en gentamicina y 21% para tobramicina. Aunque los niveles de resistencia pueden variar significativamente entre diferentes regiones del mundo, las tasas de resistencia obtenida en este estudio son superiores a la información sobre resistencia antimicrobiana presentadas en el último informe de la RHOVE de 2015 y en el Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA (RHOVE, 2015). Por otra parte, en los reportes del el CONAMED de 2018 muestran que, aunque históricamente la resistencia antimicrobiana ha fluctuado con el paso del tiempo, la tasa de resistencia es significativa en México, con picos que superan hasta el 50% de resistencia en antibióticos como B-lactámicos, fluoroquinolonas, polimixina y aminoglucósidos. (CONAMED, 2018). Adicionalmente se encontraron valor del 58% de cepas MDR, siendo además un 19% de cepas de *P. aeruginosa* XDR, valores alarmantes si consideramos que organismos como SEIMC de Europa proponen un promedio cerca al 30% a nivel mundial (SEIMC, 2015).

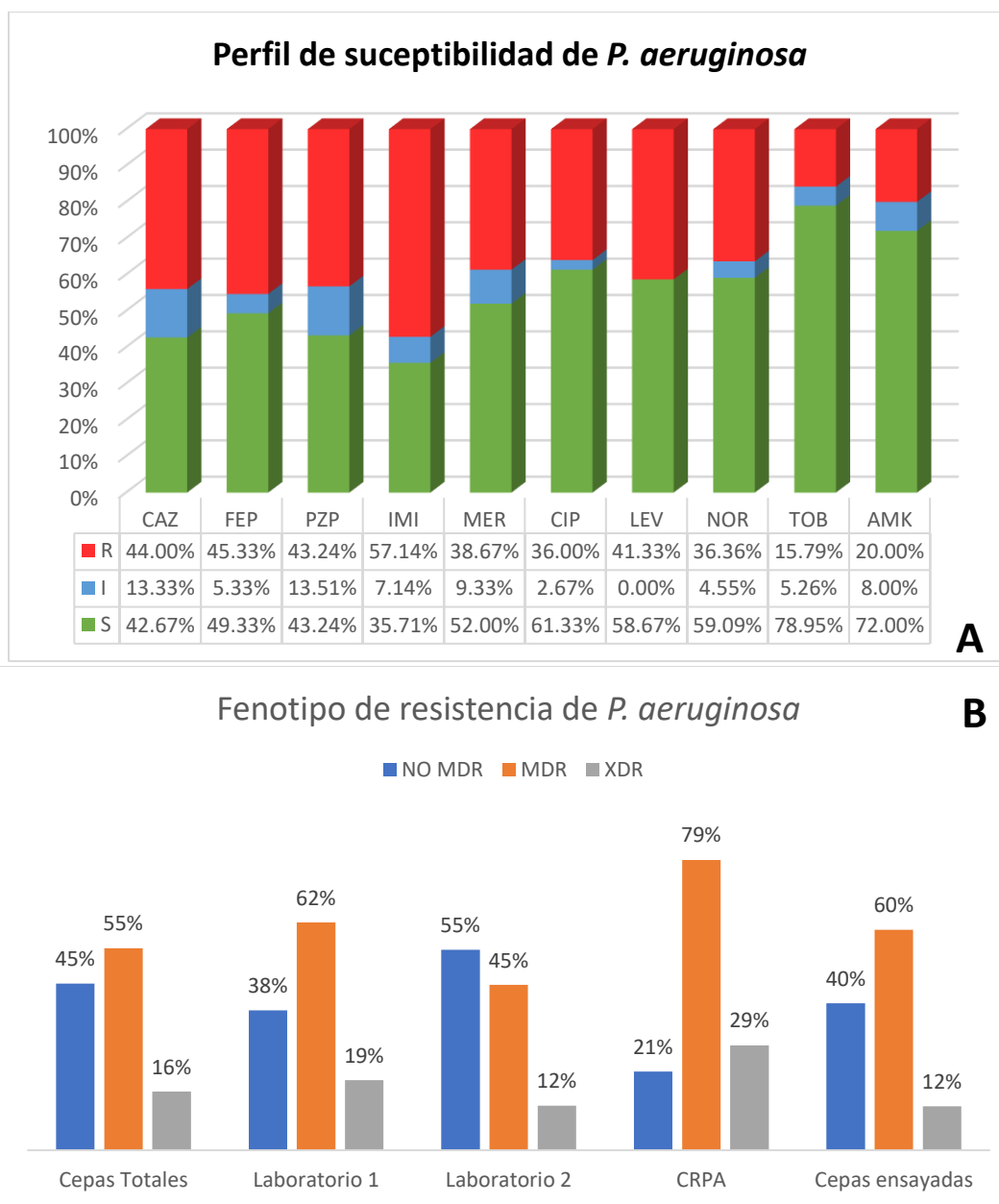


Figura 8. A: Perfil de susceptibilidad de aislados clínicos de *P. aeruginosa* 2018-2022; B: Resultados de los fenotipos de resistencia obtenidos utilizando las reglas para la definición de Multirresistencia de *P. aeruginosa* de la ReLAVRA. Nota: El porcentaje mostrado para cepas MDR incluye la sumatoria de las cepas que son además XDR. PZP = Piperacilina/Tazobactam, FEP = Cefepima, CAZ= Ceftazidima, IMI = Imipenem, MER= Meropenem, GEN= Gentamicina, TOB = Tobramicina, AMK = Amikacina, CIP = Ciprofloxacina, NOR = Norfloxacino, LVX = Levofloxacina.

8.2 ALGORITMO DE SOSPECHA PARA CARBAPENEMASAS

Una vez obtenidos y corroborados los perfiles de susceptibilidad de cada bacteria utilizando el manual M100 del CLSI 2023, se procedió a aplicar el algoritmo de sospecha para carbapenemasas del INEI-ANLIS Dr. C. Malbrán. Del total cepas sometidas al algoritmo, 42.66% (32/75) resultaron sospechosas para presencia de carbapenemasas por su alta CMI en los antibióticos meropenem, Imipenem y ceftazidima. Los 57.34 % (43/75) aislamientos restantes no presentaron evidencia de producción de carbapenemasas mediante este algoritmo.

8.3 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PRIMARIA

Durante el periodo de recolección, se seleccionó la muestra de 25 aislamientos de *P. aeruginosa* y se realizaron las pruebas bioquímicas de tamizaje para la confirmación de los hallazgos recolectados (**Figura 7**). Tras obtener los resultados se determinó que el 100% de los hallazgos contaban con las características bioquímicas de *P. aeruginosa* por lo cual se procedió a realizar su caracterización fenotípica y la búsqueda de genes de resistencia.

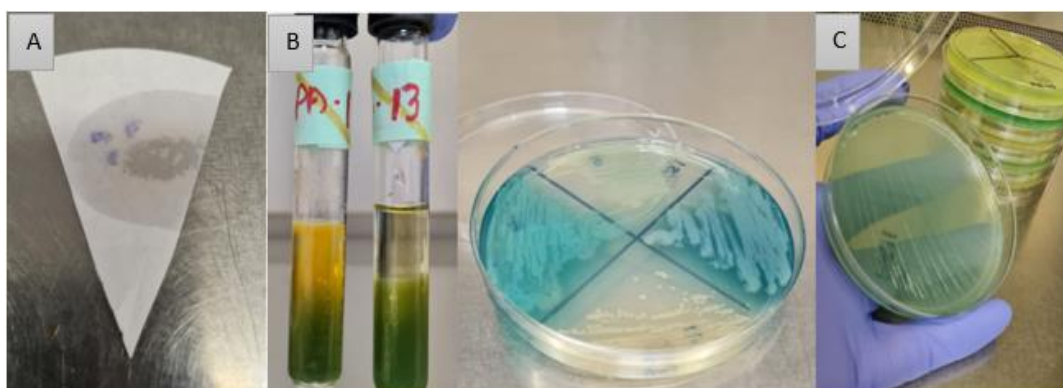


Figura 7. Pruebas de identificación bacteriana de *P. aeruginosa*. **A:** Presencia de Citocromo oxidasa, **B:** Metabolismo Oxidativo, **C:** Expresión de pimienta fluorescente.

8.4 MÉTODOS MODIFICADOS DE INACTIVACIÓN DE CARBAPENÉMICOS (MCIM Y ECIM)

Mediante los mCIM y eCIM se realizó la búsqueda fenotípica de carbapenemasas en los aislados clínicos disponible seleccionados por conveniencia. Se obtuvo un 8% (2/25) de cepas productoras de carbapenemasas y 60% (15/25) de los aislados no fueron productores de carbapenemasas. El 32% (8/25) de los aislados produjo un resultado indeterminado para el mCIM por lo que no fue posible confirmar o descartar la producción de carbapenemasas por este método el 30% de los aislados (**Figura 12**). Para los dos aislamientos productores de carbapenemasas, se detectan dos carbapenemasa de tipo Metallo- β -lactamasas mediante el resultado positivo del eCIM (**Anexo 3**).

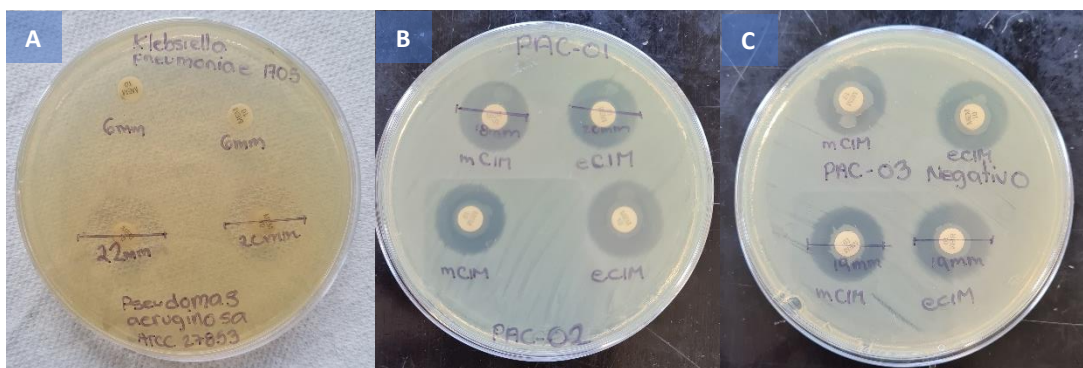


Figura 8. Halos de inhibición del método modificado de producción de carbapenemasas. **A:** *K. pneumoniae* BAA-1705 productora de carbapenemasas tipo KPC y *P. aeruginosa* ATCC 27853 no productora de carbapenemasas. **B:** Cepas de *P. aeruginosa* con resultado indeterminado a mCIM y eCIM. **C:** Cepa problema de *P. aeruginosa* con resultado negativo para producción de carbapenemasas.

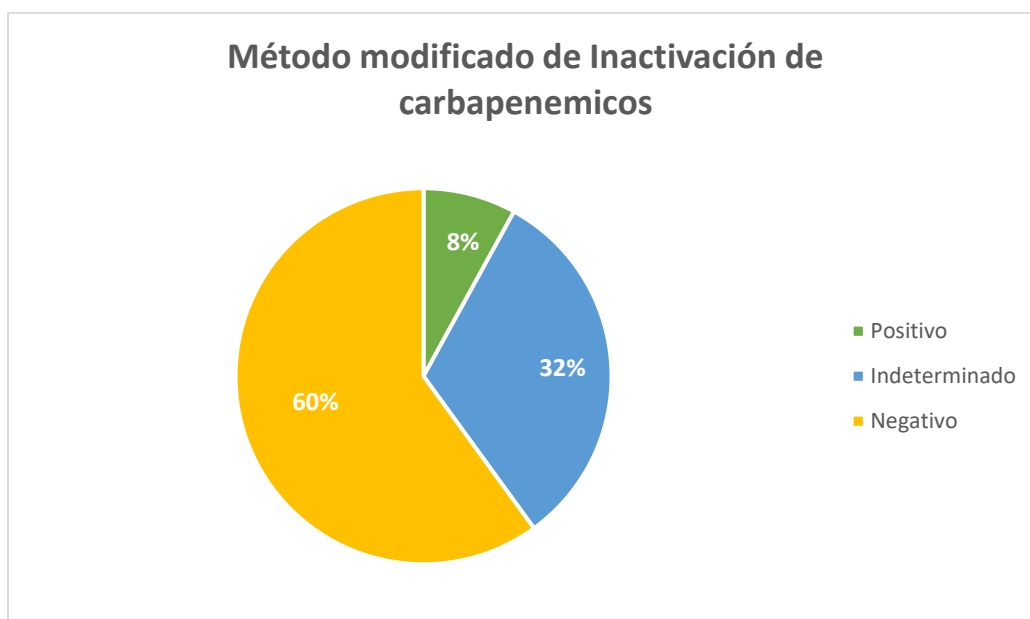


Figura 9. Resultados del método modificado de producción de carbapenemasas.

8.5 CARBA NP

Tras la realización el mCIM y eCIM se llevó a cabo el ensayo carba NP para la detección de carbapenemasas en todos los aislados bacterianos. Se obtuvo que 8.00% (2/25) de las muestras mostraban fenotipo positivo para producción de carbapenemasas y el 91.00% (23/25) no expresaron producción de carbapenemasas (**Figura 13**).

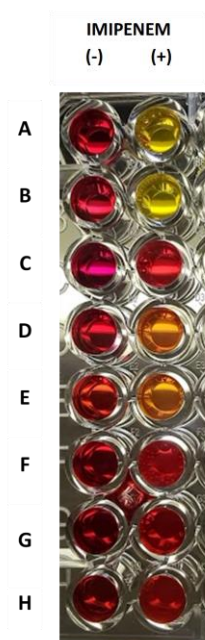


Figura 10. Resultados representativos del ensayo fenotípico carba NP; A: *K. pneumoniae* BAA-1705 productora de carbapenemasas tipo KPC.; B *E. cloacae* BAA-2468 productora de carbapenemasas tipo NDM-1; C: Cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 no productora de carbapenemasas; D-E: muestras clínicas de *P. aeruginosa* positivas para producción de carbapenemasas; F, G, H: muestras clínicas de *P. aeruginosa* no productora de carbapenémicos.

8.6 GENES DE RESISTENCIA ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS

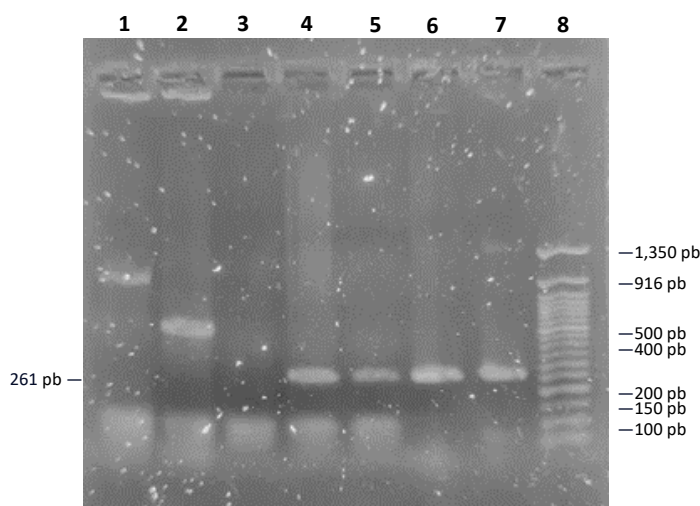


Figura 11. Electroforesis en gel (1.2 % de agarosa) de extractos de ADN de cepas portadoras de genes asociados a la producción de carbapenemasas (A). Carril 1(A), Escalera de ADN de 50 pb; Carril 2(A), Extracto de ADN de *E. cloacae* BAA-2468 productora de carbapenemasas tipo NDM; Carril 3(A); Extracto de ADN de *P. aeruginosa* ATCC 27853 no productora de carbapenemasas; Carriles 4-6(A) Extracto de ADN de muestras clínicas de *P. aeruginosa* sin presencia de genes productores de carbapenemasas; Carril 7(A), Extracto de ADN de muestra PAC-20 con banda de 261 pb, correspondientes a gen blaVIM; Carril 8(A), Control negativo de reacción con buffer de carga de ADN (6X).

En el presente estudio se utilizó la técnica de PCR multiplex para la detección genotípica de resistencia a carbapenémicos por producción de carbapenemasas siendo el estándar de oro para la detección de carbapenemasas debido a su rapidez y sensibilidad (Angelini et al., 2021). Como resultado del ensayo se obtuvo un porcentaje de producción de carbapenemasas del 8% (2/25) para los aislados utilizados y una producción de carbapenemasa en CRPA de 12.5% (2/16).

8.7 PROCESAMIENTO DE DATOS

Una vez obtenidos los datos epidemiológicos de las muestras, se investigó la asociación entre el origen del paciente (hospitalizado o ambulatorio) y la resistencia a carbapenémicos, así como la asociación entre el género del paciente y la resistencia a carbapenémicos. En relación con el origen del paciente, se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p = 0.101$) entre ser hospitalizado y la resistencia a carbapenémicos. Los pacientes hospitalizados presentaron un riesgo relativo de 2.745 veces mayor de desarrollar resistencia en comparación con los pacientes ambulatorios (intervalo de confianza del 95%: 1.220 a 6.178). Además, se observó una diferencia significativa en las proporciones de resistencia, con una diferencia de 0.2992 entre los grupos de pacientes hospitalizados y ambulatorios (intervalo de confianza del 95%: 0.07916 a 0.5192). Estos resultados destacan la importancia de considerar el origen del paciente al evaluar el riesgo y manejo de la resistencia a carbapenémicos.

En cuanto al género del paciente, no se encontró una correlación estadísticamente significativa ($p = 0.2452$) entre el género y la resistencia a carbapenémicos. Esto sugiere que el género del paciente no es un factor determinante en la resistencia a carbapenémicos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados se basaron en una muestra específica y pueden variar en diferentes poblaciones. Se recomienda realizar estudios adicionales con muestras más amplias y considerar otros factores relacionados para obtener una comprensión más completa de los determinantes de la resistencia a carbapenémicos.

Una vez realizadas las metodologías para la búsqueda y detección de carbapenemasas se obtuvieron y procesaron los datos para cada método descrito (Tabla 6). Se obtuvieron 2 aislados productores de carbapenemasas por el método mCIM y eCIM. La presencia de carbapenemasa en los aislados fue confirmada adicionalmente confirmada por el método fenotípico carba NP obteniendo los mismos resultados en las muestras utilizadas. Finalmente se realizó búsqueda de genes de los genes asociados a la producción de carbapenemasas mediante los cebadores específicos para la detección de fragmentos correspondientes. Se utilizaron los dos aislados que demostraron presencia fenotípica de genes asociados a la producción de carbapenemasas en las pruebas fenotípicas obteniendo un fragmento de 261 pb que confirmó la presencia del gen blaVIM en ambos aislados bacterianos. De esta manera se obtuvo un porcentaje de producción de carbapenemasas del 8% (2/25) para los aislados utilizados y una producción de carbapenemasa en CRPA de 12.5% (2/16). Con las frecuencias obtenidas, se determinó la fuerza de asociación entre las variables utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados revelaron una correlación positiva fuerte y significativa entre los métodos de detección de carbapenemasas utilizados ($r = 0.8484$, $p < 0.0012$). Esta asociación positiva respalda la consistencia de los tres métodos evaluados, sugiriendo que son predictivos entre sí en la detección precisa de carbapenemasas en muestras clínicas. Estos hallazgos son consistentes con estudios anteriores que también han demostrado una alta concordancia entre estos métodos (Angelini et al, 2021). En este sentido y manera global encontramos similitudes entre las estadísticas mundiales de producción de carbapenemasas que reportan rangos mundiales del 8-30% de producción de carbapenemasas en CRPA (SEIMC, 2015, CDC, 2022), sin embargo, es importante señalar que ante un 64% de CRPA en las cepas

ensayadas, un 60 % de cepas MDR y una predicción fenotípica de producción de carbapenemasas de un 48% el porcentaje de producción de carbapenemasas resultó ser significativamente bajo. Es importante recordar que *P. aeruginosa* cuenta con múltiples mecanismos de resistencia que no están asociados a la producción de carbapenemasas como lo es la mutación de las porinas OprD, que permiten la entrada de carbapenémicos, aunque no de otros β -lactámicos o la resistencia a macrólidos, además de la relación entre la presencia de genes de resistencia para aminoglucósidos y la resistencia en β -lactámicos. (Gómez Álvarez et al., 2005). De este modo valdría la pena ampliar la perspectiva en los estudios epidemiológicos para evaluar simultáneamente múltiples mecanismos de resistencia en futuras investigaciones sin limitarse a los genes asociados a la producción de carbapenemasas buscados en esta investigación y de esta manera, obtener mejores conclusiones sobre los mecanismos de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* MDR en aislados clínicos y buscar la construcción de mejores herramientas de diagnóstico clínico y mayor efectividad en los tratamientos antimicrobianos.

Tabla 6. Frecuencia entre los diferentes métodos de detección de resistencia a agentes carbapenémicos.

Metodología empleada	Resultados		
Fenotipo de Resistencia	CRPA	No CRPA	
	16	9	
Sospecha de producción	Sospechosa	No Sospechosa	
	13	12	
mCIM / eCIM	Positivo	Indeterminado	Negativo
	2	8	15
	8		
Carba NP	Positivo	Negativo	
	2	23	
PCR	Positivo	Negativo	
	2	23	

9. CONCLUSIONES

Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenemasas es uno de los grandes retos de la época y está catalogado por la OMS como prioritario en la búsqueda de nuevos antibióticos debido a sus múltiples mecanismos de resistencia y su capacidad de proliferar en condiciones adversas y poco comunes lo que la convierte en un microorganismo complejo que requiere tratamiento antimicrobiano de última línea.

Debido a la importancia de este microorganismo en los ambientes intrahospitalarios, el propósito de este trabajo fue realizar la búsqueda e identificación de fenotipos de resistencia a carbapenémicos por producción de carbapenemasas, así como la identificación de los genes involucrados en la producción enzimática. Simultáneamente se realizó un análisis de los datos sociodemográficos y los perfiles de resistencia de las bacterias para poder realizar asociación entre las variables seleccionadas mediante la prueba de chi-cuadrada. Entre los datos sociodemográficos encontramos la misma proporción entre pacientes masculinos y pacientes femeninos. Por otra parte, al analizar las frecuencias en los sitios de infección observamos mayor frecuencia de infecciones de piel y tejidos blandos que infecciones de vías respiratorias lo que contrasta con los datos comúnmente reportados en la bibliografía, donde usualmente se señalan a las infecciones de vías respiratorias como las más frecuentes para IAAS en este microorganismo.

Los perfiles de resistencia observados incluyeron resistencia a agentes β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, así como una alta resistencia en agentes carbapenémicos. Además, se observó una asociación estadísticamente significativa entre el aumento de la resistencia a carbapenémicos en pacientes hospitalizados frente a pacientes ambulatorios lo que resultó acorde a los datos esperados debido a los procesos de colonización de *P. aeruginosa* en pacientes sanos lo que permite a estos microorganismos obtener nuevos mecanismos antimicrobianos en ambientes hospitalarios. El perfil de susceptibilidad antimicrobiana es de suma importancia ya que nos permite observar el comportamiento de resistencia de *P. aeruginosa*, entre más antibióticos sean ensayados más sensible será el análisis de la multidrogoresistencia, además que la utilización de ensayos fenotipos y algoritmos de detección de fenotipos de resistencia para encontrar cepas MDR son herramientas que posibilita tamizar a los microorganismos para ahorrar tiempo y dar pauta a posibles intervenciones así como a próximos estudios que ayuden a combatir la problemática.

La implementación de los métodos fenotípicos mCIM y eCIM, basados en los protocolos del CLSI 2022, junto con la aplicación del método colorimétrico carba NP desarrollado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán" (INEI-ANLIS), arrojó resultados favorables en relación con los aislamientos del estudio. Este análisis reveló la presencia de fenotipos de resistencia asociados a la producción de carbapenemasas. Adicionalmente, mediante la implementación del protocolo de PCR multiplex para detección de genes productores de carbapenemasas establecido por el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", se logró una identificación de los genes específicos asociados a la producción de carbapenemasas en las muestras clínicas de *P. aeruginosa*. Al mismo tiempo observamos una asociación positiva estadísticamente significativa que respalda la consistencia de los tres métodos evaluados, lo que además nos permitió comprobar de manera efectiva la presencia de genes asociados a la producción de carbapenemasas en pacientes en instituciones de la ciudad de Tijuana, México (INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2015; INEI-ANLIS «Dr Carlos G. Malbrán», 2019; CLSI, 2022).

En resumen, los resultados obtenidos en esta investigación constituyen un aporte valioso en el abordaje de la resistencia a carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en la ciudad. A través de métodos fenotípicos y genotípicos estandarizados, esta investigación ha logrado identificar y caracterizar los mecanismos de resistencia específicos presentes en las cepas estudiadas. La consistencia y confirmación de la hipótesis planteada en este estudio, respaldada por la asociación estadísticamente significativa encontrada, refuerza la relevancia de esta investigación y su aporte al campo de la microbiología y la salud pública.

Cabe destacar que esta investigación no solo proporciona información crucial para la ciudad de Tijuana, sino que también establece un marco fundamental para futuros esfuerzos de monitoreo y control de la resistencia antimicrobiana en el ámbito hospitalario, y potencialmente en un contexto más amplio en México. Los niveles significativamente elevados de resistencia a carbapenemasas observados en las muestras, junto con la detección de los genes asociados, enfatizan la necesidad de una vigilancia continua y la implementación de estrategias preventivas. Siendo la primera en dar seguimiento a la alerta epidemiológica de 2018 a través de un nuevo monitoreo de hallazgos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, esta investigación establece un precedente valioso para la identificación temprana y la contención de cepas de CRPA, allanando el camino para una mejor comprensión y gestión de la propagación de estas bacterias multidrogoresistentes, particularmente en nuestra región.

Finalmente, este estudio ofrece una contribución esencial a la ciencia y a la salud pública en Tijuana y más allá. Al proporcionar información detallada sobre la resistencia a carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*, abre oportunidades para futuras investigaciones que puedan profundizar nuestra comprensión de este problema y permitir la implementación de medidas más efectivas para combatirlo. La importancia de este trabajo radica en su capacidad para mejorar las prácticas clínicas, brindar información que le permita a las instituciones mejorar las políticas de control de infecciones y proteger a la comunidad de los riesgos asociados con la resistencia antimicrobiana.

10. CONSIDERACIONES ETICAS

Los aislamientos de *P. aeruginosa* se obtuvieron de muestras clínicas procedentes de pacientes a los cuales se les realizará el cultivo microbiológico como parte de los procedimientos clínicos habituales en los laboratorios de microbiología que participarán en la investigación y no se solicitarán datos personales de los pacientes por lo que no se requiere consentimiento informado y los datos manejados durante la investigación se manejarán de manera confidencial.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Angelini, F. A., Pegels, E. R., & Quiroga, M. (2021). Evaluation of phenotypic methods for the detection of carbapenemases applicable to low complexity laboratories. *Revista de Ciencia y Tecnología: RECyT*, 36(1), 14–23.
2. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, 7, 212527. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
3. Bou Arévalo, G., Chaves Sánchez, F., Palomo, A. O., & Oteo Iglesias, J. (2015). *Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>
4. Cantón, R., Huarte, R., Morata, L., Trillo-Mata, J. L., Muñoz, R., González, J., Tort, M., & Badia, X. (2021). Determining the burden of infectious diseases caused by carbapenem-resistant gram-negative bacteria in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39(4), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.04.009>
5. Carroll, K. C., Butel, J., & Morse, S. (2015). *Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology* 27 E. McGraw-Hill Education. <https://lib.hpu.edu.vn/handle/123456789/32528>
6. Castro, A. M. (2014). *Bacteriología médica basada en problemas*. Editorial El Manual Moderno.
7. Cavalieri, S. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Marie B. Coyle (Editora). http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf
8. CDC. (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
9. CDC. (2021, febrero 18). *Pseudomonas aeruginosa* | HAI | Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. <https://www.cdc.gov/hai/outbreaks/pseudomonas-aeruginosa.html>
10. CDC. (2022, agosto 11). *COVID-19 & Antibiotic Resistance*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>
11. Chen, Z., Xu, Z., Wu, H., Chen, L., Gao, S., & Chen, Y. (2019). The impact of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* on clinical and economic outcomes in a Chinese tertiary care hospital: A propensity score-matched analysis. *American Journal of Infection Control*, 47(6), 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.10.025>
12. CLSI. (2022). *CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed. CLSI supplement M100*. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
13. Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences (Basel, Switzerland)*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>
14. Costa, J. S. T. da, Lima, C. A., Vera-Leiva, A., San Martín Magdalena, I., Bello-Toledo, H., Domínguez Yévenes, M., Opazo-Capurro, A., Mella Montecinos, S., Quezada-Aguiluz, M., González-Rocha, G., Costa, J. S. T. da, Lima, C. A., Vera-Leiva, A., San Martín Magdalena, I., Bello-Toledo, H., Domínguez Yévenes, M., Opazo-Capurro, A., Mella Montecinos, S., Quezada-Aguiluz, M., & González-Rocha, G. (2021). Carbapenemasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales de Chile. *Revista chilena de infectología*, 38(1), 81–87. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100081>
15. Espinoza Pesantez, D. I., Esparza Sanchez, G. F., Espinoza Pesantez, D. I., & Esparza Sanchez, G. F. (2021). Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista chilena de infectología*, 38(1), 69–80. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100069>
16. European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS Net) 2015*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2900/6928>

17. Farajzadeh Sheikh, A., Shahin, M., Shokoohizadeh, L., Ghanbari, F., Solgi, H., & Shahcheraghi, F. (2020). Emerge of NDM-1-Producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Co-Harboring of Carbapenemase Genes in South of Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 49(5), 959–967.
18. Fuentes González, M. F., & Ahumada Topete, V. H. (2020). Incremento de resistencias antimicrobianas en bacteriemias. Reporte de un centro de referencia. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 58(3), 5854. <https://doi.org/10.24875/RMIMSS.M20000032>
19. Gómez Álvarez, C. A., Leal Castro, A. L., Pérez de Gonzalez, M. de J., & Navarrete Jiménez, M. L. (2005). MECANISMOS DE RESISTENCIA EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ENTENDIENDO A UN PELIGROSO ENEMIGO. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(1), 27–34.
20. Guajardo Lara, C. E., Hernández Galván, N. N., Ayala Gaytán, J. J., & Valdovinos Chávez, S. B. (2021). Susceptibilidad a ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos. *Revista del Instituto de Salud Pública de Chile*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.34052/rispch.v1i1.108>
21. Gutiérrez Muñoz, J., Ramírez Corona, A. M., & Martínez Bustamante, M. E. (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 30(2), 68–75.
22. Hu, Y., Liu, C., Wang, Q., Zeng, Y., Sun, Q., Shu, L., Lu, J., Cai, J., Wang, S., Zhang, R., & Wu, Z. (2021). Emergence and Expansion of a Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone Are Associated with Plasmid-Borne bla KPC-2 and Virulence-Related Genes. *MSystems*, 6(3), e00154-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00154-21>
23. INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán”. (2015). - CARBA NP DIRECT - Detección rápida de carbapenemasas directo de placas de cultivo. Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán”. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2015/12/CARBA-NP-DIRECT-v3-21.pdf>
24. INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán”. (2019). Protocolo de PCR-Multiplex para la detección de carbapenemasas. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/01/Detecci%C3%B3n-CBP-Multiplex.pdf>
25. INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán”. (2021). Algoritmo de detección de carbapenemasas 2021. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2020/11/Algoritmo-de-deteccion-de-carbapenemasas-en-P.-aeruginosa-2019.pdf>
26. INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán”. (2022). Novedades CLSI. http://antimicrobianos.com.ar/category/novedad_clsi/
27. Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1–8. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
28. Lara Medina, R. O., Horta Rodriguez, C., Marcos Valdez, G. A., Ramírez Quintanilla, L. Y., Acosta Gozález, R. I., Martínez Montoya, H., & Hernández Jiménez, M. C. (2018). Prevalencia de carbapenemasas en aislamientos clínicos de Reynosa, Tamaulipas, México. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina (ISSN:2448-8380)*, 72–72.
29. Lashari, Y., Rochmanti, M., Purba, A. K. R., Notobroto, H. B., Sarassari, R., & Kuntaman, K. (2022). The Economic Impact of Carbapenem Resistant-Non-Lactose Fermenter and Enterobacteriaceae Infections on Hospital Costs in Dr. Soetomo General Academic Hospital Surabaya, Indonesia. *Antibiotics*, 11(5), 694. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050694>
30. Lautenbach, E., Synnestvedt, M., Weiner, M. G., Bilker, W. B., Vo, L., Schein, J., & Kim, M. (2010). Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(1), 47–53. <https://doi.org/10.1086/649021>

31. López García, A., Rocha Gracia, R. del C., Bello López, E., Juárez Zelocualtecal, C., Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M., López-Pliego, L., González-Vázquez, M. C., Torres, C., Ayala-Núñez, T., Jiménez-Flores, G., Arenas-Hernández, M. M. de la P., & Lozano-Zarain, P. (2018). Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican Hospital. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1523–1536. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173455>
32. Marsik, F. J., & Nambiar, S. (2011). Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(12), 1094–1095. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31823c0e47>
33. Muñoz, J. G., Corona, A. M. R., & Bustamante, M. E. M. (s/f). *Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México*. 8.
34. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences.
35. Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011a). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791–1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
36. Nordmann, P., Poirel, L., & Dortet, L. (2012). Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 18(9), 1503–1507. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>
37. Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011b). Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), 689–692. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq520>
38. Pasteran, F., Tijet, N., Melano, R. G., & corso, A. (2015). Simplified Protocol for Carba NP Test for Enhanced Detection of Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(12), 3908–3911. <https://doi.org/10.1128/JCM.02032-15>
39. Pasteran, F., Veliz, O., Ceriana, P., Lucero, C., Rapoport, M., Albornoz, E., Gomez, S., & corso, A. (2015). Evaluation of the Blue-Carba Test for Rapid Detection of Carbapenemases in Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(6), 1996–1998. <https://doi.org/10.1128/JCM.03026-14>
40. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
41. Paz Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
42. Perez, F., & Van Duin, D. (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A menace to our most vulnerable patients. *Cleveland Clinic journal of medicine*, 80(4), 225–233. <https://doi.org/10.3949/ccjm.80a.12182>
43. Radice, M., Marín, M., Giovanakis, M., Vay, C., Almuzara, M., Limansky, A., Casellas, J. M., Famiglietti, A., Quinteros, M., Bantar, C., Galas, M., Pupko, J. K., Nicola, F., Pasterán, F., Soloaga, R., & Gutkind, G. (2011). *Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: Recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología*.
44. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). (2015). *Boletín informativo Anual 2015*. Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212974/infoanual_rhove_2015.pdf
45. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). (2022). *Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE)* https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/808320/BOLETINRHOVECIERRE2022_FINAL.pdf

46. Riaño, D. J. A., Cardozo, B. C., Guayazán, M. V. M., Ortiz, R. A. M., Roza, Z. L. C., Olarte, N., Valderrama, A., Tovar, C., Buelvas, F., Moncayo, J., Guaca, Y., Reyes, N., Gómez, N. V., & Pérez, J. E. (2018). Caracterización genética y molecular de *Pseudomonas Aeruginosa* causante de infecciones en UCI de tres ciudades de Colombia. *Visionarios en ciencia y tecnología*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.47186/visct.v3i1.68>
47. Rostami, S., Farajzadeh Sheikh, A., Shoja, S., Farahani, A., Tabatabaiefar, M. A., Jolodar, A., & Sheikhi, R. (2018). Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.08.016>
48. Ryan, K., & Ray, C. (2011). *Sherrie: Microbiología médica (5a. ed.)*.
49. Salvador Luján, G., García de la Guarda, R., & Gonzales Escalante, E. (2018). Caracterización de metalo- β -lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de pacientes hospitalizados en el Hospital Militar Central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(4), 636. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.354.3755>
50. Sharp, S. E., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Cavalieri, S. J., & Sautter, R. L. (s/f). II METODOS DE PRUEBA. 240.
51. Shiralizadeh, S., Keramat, F., Hashemi, S. H., Majzoobi, M. M., Azimzadeh, M., Alikhani, M. S., Karami, P., Rahimi, Z., & Alikhani, M. Y. (2023). Investigation of antimicrobial resistance patterns and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among Coronavirus disease-19 patients. *BMC Microbiol.*, 23(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02825-w>
52. Tada, T., Hishinuma, T., Watanabe, S., Uchida, H., Tohya, M., Kuwahara-Arai, K., Mya, S., Zan, K. N., Kirikae, T., & Tin, H. H. (2019). Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Hospitals in Myanmar. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(5), e02397-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02397-18>
53. van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015). The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. *PLoS ONE*, 10(3), e0123690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
54. WHO. (2017a). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
55. WHO. (2017b). *Antibacterial agents in clinical development: An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis* (WHO/EMP/IAU/2017.11). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258965>
56. Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
57. Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
58. Zavala, J. T., Gutierrez, M., Lopez, R., Molina, J., & Manjarrez, M. (2012). *Parasitología médica de Tay. Méndez*.
59. Zhen, X., Stålsby Lundborg, C., Sun, X., Gu, S., & Dong, H. (2020). Clinical and Economic Burden of Carbapenem-Resistant Infection or Colonization Caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*: A Multicenter Study in China. *Antibiotics*, 9(8), 514. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080514>