



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

T E S I S

“Susceptibilidad *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente a Ceftolozano/tazobactam en muestras clínicas de pacientes pediátricos”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN

INFECTOLOGÍA

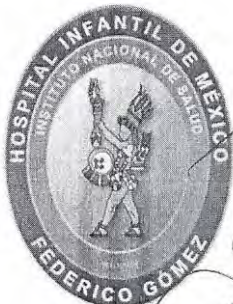
P R E S E N T A:

DRA. MÓNICA SELENE ANDRÉS HERNÁNDEZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA J. AVILÉS ROBLES

ASESOR DE TESIS: DR. SARBELIO MORENO ESPINOSA



Ciudad de México, febrero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE FIRMAS

Dra. Rebeca Gómez Chico Velasco
Directora de enseñanza y desarrollo académico
Hospital Infantil de México Federico Gómez



M. en C. Martha Josefina Avilés Robles
Médico Adscrito al Departamento de Infectología
Hospital Infantil de México Federico Gómez
Directora de tesis



D. en C. Sarbelio Moreno Espinosa
Jefe del Departamento de Infectología
Hospital Infantil de México Federico Gómez
Asesor de tesis

DEDICATORIA

Sin dudar éste trabajo de tesis es dedicado a mi familia, las personas más importantes que tengo en mi vida, quienes me acompañan a cada momento, que me apoyan y me ayudan a seguir.

A mi papá Jorge Andrés, porque mis sueños también son sus sueños y sé que me apoya hasta el último momento para conseguirlos, por ser quien me ha mostrado el camino de la ciencia y por haberme guiado con firmeza a él, por ser mi mayor pilar y por ser la persona que más admiro en el planeta.

A mi mamá Elvia, porque es quien aporta el amor infinito en ésta etapa, quien me ha contagiado de su optimismo en los malos momentos, porque es quien al poner una mano en mi espalda y una nota de ánimos que veo en el espejo todos los días me cura el alma.

A mis hermanas, Liliana a quien admiro también por su amor a la ciencia ser mi primer mejor amiga y por hacerme sentir que está orgullosa de mí, a Karen que siempre me escucha y me da consejos aunque sabe que no tengo razón y a mi Elvis pequeña, porque ha seguido mis pasos y me hace sentir que debo ser el mejor ejemplo cuando me dice lo orgullosa que está de mí.

Y sobre todo a mis pequeños guerreros, a mis niños, a mis pacientes, que todos los días nos siguen enseñando cosas nuevas, más allá de la medicina, a ellos dedico éste trabajo y todas las cosas que hago día a día y que seguiré haciendo hasta que no me queden fuerzas.

No me queda más que agradecerles todo el apoyo brindado en mi carrera y la comprensión al saber que no puedo estar tan cerca de ellos, por hacer mis sueños suyos y por hacer todo lo posible por que se cumplan.

AGRADECIMIENTOS

A la QFP Ma. Del Carmen Castellanos Cruz, encargada de susceptibilidad antimicrobiana del laboratorio de microbiología del Hospital Infantil de México, por su asesoría en el trabajo de laboratorio, supervisión en el desarrollo del método de Kirby Bauer, siempre buscando la excelencia en los métodos realizados.

A la QFB María Isabel Franco Hernández, encargada del cepario del laboratorio de microbiología del Hospital Infantil de México, por su gran apoyo en supervisión de las técnicas de laboratorio y en proporcionarnos físicamente las cepas probadas.

Al QFB Israel Parra Ortega, jefe del Laboratorio del Hospital Infantil de México, por las facilidades proporcionadas para la realización de éste trabajo.

Al Dr. Rafael Franco, Mtra. Melissa Hernández y Mtra. Claudia Colín del Instituto Nacional de la Rehabilitación por la realización de los estudios moleculares.

Y por supuesto a mi directora de tesis, la Dra. Martha Avilés Robles, gracias por su paciencia orientación y por ser un gran ejemplo a seguir, no solo como infectóloga, pediatra, investigadora, sino también como mujer admirable.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
ANTECEDENTES	9
MARCO TEORICO.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	19
OBJETIVOS	20
MÉTODOS.....	21
DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES	23
PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIÓN	33
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	33
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS.....	38

RESUMEN

Introducción: *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los principales microorganismos causales de infecciones nosocomiales potencialmente fatales. Su resistencia a los antibióticos va en aumento a nivel mundial, exigiendo el desarrollo de nuevos antibióticos. En 2014, la FDA aprobó el uso de Ceftolozano/tazobactam (C/T), para tratar infecciones urinarias e intraabdominales en adultos, incluidas las causadas por *Pseudomonas aeruginosa* MDR (PA-MDR).

Planteamiento del problema: En los últimos años ha habido un aumento en la incidencia de cepas de PA-MDR, sin embargo la información de su eficacia en cepas de pacientes pediátricos es muy escasa y no se cuentan con estudios *in vitro* reportados en nuestro país.

Objetivos: Evaluar la susceptibilidad *in vitro* de PA-MDR, aisladas de muestras clínicas de sitios estériles de pacientes pediátricos.

Metodología: Estudio de ciencia básica, transversal, analítico, descriptivo, realizado en el Hospital infantil de México Federico Gómez, donde se seleccionaron 50 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistentes (PA-MDR) de muestras clínicas de sitios habitualmente estériles de pacientes pediátricos, eligiendo una por paciente y analizando la susceptibilidad *in vitro* para ceftolozano/tazobactam (C/T) mediante el método de Kirby bauer. El valor de corte para definir las cepas como sensibles fue ≥ 21 mm, de acuerdo a los criterios del CLSI. Se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, para el control de calidad dando un halo de inhibición de 28 mm, considerada como sensible.

Resultados: Se probaron 50 cepas de PA-MDR, de las cuales 37 (74%) fueron de urocultivos y 11 (22%) de hemocultivos, del total de 50 cepas probadas, 47 mostraron resistencia *in vitro* a C/T (94%) y sólo 3 de ellas fueron sensibles (6%). El 100% de las cepas fueron resistentes a carbapenemicos y también el 100% fueron sensibles a Colistina. Posteriormente se analizaron las 24 cepas mediante biología molecular para identificar la expresión de mecanismos de resistencia que expliquen la poca sensibilidad a C/T,

encontrando que el 19 cepas (79%) expresa metalo beta-lactamasas, de las cuales 13 cepas expresaron VIM, 1 cepa IMP y 1 expresó tanto VIM como IMP.

Conclusión: C/T tiene una amplia actividad contra bacilos Gram negativos y PA-MDR, sin embargo no fue eficiente en las cepas aisladas en nuestro hospital debido a que la gran mayoría expresan MBL del tipo VIM e IMP, que le confieren alta resistencia a la mayoría de los antibióticos antipseudomonas. Esto es un problema de suma importancia a nivel epidemiológico, al representar alto riesgo de morbi mortalidad en nuestros pacientes y el potencial de que éstas cepas se dispersen en nuestro medio.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa (PA) es un microorganismo de alta patogenicidad, implicado comúnmente en infecciones asociadas a cuidados de la salud, afectando a pacientes tanto previamente sanos, como a otros con multi invasión y comorbilidades.

El problema de las infecciones nosocomiales es que alargan la estancia hospitalaria del paciente y pueden provocar complicaciones graves, así como en general son bacterias que pueden ser resistentes a múltiples antibióticos lo que hace difícil su tratamiento.

El problema de la presencia reciente de bacterias multi-drogorresistentes (MDR) a nivel mundial es grave y muy preocupante, en especial caso de *Pseudomonas aeruginosa* que ha desarrollado múltiples mecanismos de resistencia, originando nuevas cepas a nivel mundial resistentes múltiples antibióticos, siendo difícil el tratamiento de los pacientes infectados por éstas cepas, ya que muchas veces nos enfrentamos a microorganismo que no tiene opción terapéutica, convirtiéndose en un problema clínico y epidemiológico de vital importancia.

Es por ello que en 2017, la Organización Mundial de la Salud emite una lista de las bacterias más peligrosas para los humanos debido a que se ha probado que son altamente resistentes a antibióticos, suponiendo una gran amenaza mundial, en dicha lista de la OMS, *Pseudomonas aeruginosa* aparece como Prioridad 1 o CRÍTICA, acompañado de *Acinetobacter baumannii* y el género *Enterobacteriaceae*, la lista publicada tiene como propósito destacar éstos patógenos como “prioritarios” para la realización de estudios de investigación encaminados a búsqueda de nuevos antibióticos para su tratamiento.¹²

Por ello es de prioridad mundial desarrollar nuevos antibióticos para combatir infecciones por éstas bacterias MDR.

Ceftolozano/tazobactam es una cefalosporina de nueva generación asociada a un inhibidor de beta lactamasas que tiene actividad aparente contra cepas de PA-MDR, sin embargo, se carece de información acerca su uso y seguridad en pacientes pediátricos.

ANTECEDENTES

Un estudio prospectivo y multicéntrico realizado por Marta Tato y cols. De Enero a Septiembre de 2013, evaluó la sensibilidad *in vitro* a C/T de 500 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y 500 de enterobacterias, aisladas una cepa por paciente, de infecciones del tracto urinario, intraabdominales, tracto respiratorio bajo y bacteriemias, en 10 centros médicos en España, encontrando que el 94.4% de las cepas de PA fueron sensibles a C/T, incluso mostró actividad contra aquellas cepas multidrogasresistentes, mostrando hasta 85% de susceptibilidad a C/T en las cepas resistentes a carbapenemicos.³

El estudio realizado por Haidar et al, En la Universidad de Pittsburg en el periodo de Junio de 2015 a Marzo 2016, evaluó de manera retrospectiva 21 pacientes con infecciones de vías respiratorias bajas, infecciones del tracto urinario, abdominales y bacteriemias causadas por *Pseudomonas aeruginosa* MDR, que fueron tratados con Ceftolozano/tazobactam por un promedio de 14 días, encontrando que éste tratamiento fue satisfactorio en 71% de los pacientes, evaluando la mortalidad a 30 y 90 días. Se realizaron análisis moleculares de las cepas, encontrando que la emergencia de resistencia a C/T de las cepas de PA fueron debidas a mutaciones *de novo* y fueron relacionados con expresión de proteínas *AmpC*.⁴

En Estados Unidos de 2013 a 2016, se llevó a cabo un estudio por Shortridge y cols, en el que se evaluó la sensibilidad *in vitro* de 18,960 cepas de bacilos Gram negativos, de los cuales 3,737 cepas fueron de *Pseudomonas aeruginosa*, las muestras se colectaron de 32 centros médicos de ese país, se probó la susceptibilidad *in vitro* mediante microdilución de acuerdo a los criterios de CLSI y EUCAST, el resultado mostró que C/T fue el antibiótico β -lactámico más potente contra PA, mostrando que el 97% de las cepas de PA fueron sensibles a C/T, sensibilidad sólo superada por Colistina con 99% y un dato muy importante fue que la susceptibilidad a C/T se mantuvo incluso en cepas de PA multidrogo resistentes, incluyendo aquella resistentes a carbapenemicos que fueron sensibles a C/T en un 88%, éste estudio nos mostró que C/T tiene actividad *in vitro* para PA, incluyendo aquellas resistentes.⁵

J.M. Munita y Cols. realizaron un estudio retrospectivo multicéntrico en 6 hospitales de Estados Unidos, donde evaluaron el desenlace clínico de 35 pacientes con infecciones graves por PA-MDR, incluyendo aquellas resistentes a carbapenémicos y que fueron tratados con C/T, se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de las cepas C/T encontrando que de las 35 cepas, se probó susceptibilidad en 30 de ellas que mostraron sensibilidad a C/T en 87%, se evaluó la supervivencia hospitalaria, resolución de los signos y síntomas y ausencia de recurrencia de la infección siendo desenlace satisfactorio en 74% de los pacientes y en cuanto a la falla microbiológica, ésta se determinó como persistencia de cultivos clínicos después de 72 hrs de haber iniciado manejo con C/T y ninguno de los pacientes presentó falla microbiológica, concluyendo que C/T es una opción terapéutica efectiva para el manejo de infecciones graves por PA-MDR, incluyendo aquellas resistentes a carbapenémicos.⁶

En 2013 Ochoa y cols. describieron las características patogénicas de 92 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos de muestras de pacientes pediátricos del Hospital infantil de México, seleccionadas de Febrero 2008 a Enero 2009, se identificaron las cepas resistentes a carbapenémicos mediante EDTA en medio Muller Hinton, así como hicieron análisis cuantitativos y cualitativos de la producción de biopelícula de éstas cepas. Las muestras fueron recogidas de orina, sangre periférica, catéteres, aspirado bronquial y heridas quirúrgicas. 63% de esas cepas fueron catalogadas como multi-drogoresistentes e identificaron la presencia de metalo-betalactamasas mediante el método de difusión en disco con EDTA, encontrando que hasta el 43% de las cepas resistentes a carbapenémicos expresaban metalo-betalactamasas.⁷

MARCO TEORICO

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, aerobio, no fermentador, distribuido ampliamente en el medio ambiente, podemos encontrarlo en el suelo, animales, plantas, forma parte de la microbiota normal de la piel, materia orgánica, equipo médico, superficies inertes.

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo frecuentemente implicado en infecciones asociadas a cuidados de la salud, el uso indiscriminado de antibióticos es uno de los principales factores que inducen mecanismos de resistencia, incluyendo patrones de multidrogo resistencia.

Pseudomonas aeruginosa manifiesta mecanismos de resistencia intrínsecos, debido a la permeabilidad de su pared celular y otros adquiridos, debido al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, causando mutaciones cromosómicas que regulan los genes de resistencia, o mediante plásmidos y bacteriófagos.

Los mecanismos que más frecuentemente utiliza *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismo de resistencia son: la expresión de enzimas que inactivan los antibióticos β -lactámicos, llamándose enzimas β -lactamasas, la alteración de las bombas de eflujo, que son proteínas que se encuentran en las membranas citoplasmáticas de las bacterias y expulsan los antibióticos y otros productos tóxicos hacia afuera de la célula bacteriana, la alteración de porinas que se encuentran en la membrana externa de las bacterias, que dificulta la penetración de algunos carbapenémicos hacia dentro de las bacterias.⁸

FORMACIÓN DE BIOFILM:

Pseudomonas aeruginosa posee una gran capacidad de mantenerse en huésped infectado, mediante la formación de biofilm o biopelícula, que la protege de la degradación.

Las biopelículas bacterianas consisten de células incrustadas en una matriz auto producida conteniendo sustancias poliméricas extracelulares (EPS) como polisacáridos, proteína y

DNA. La composición de esta matriz de es extrema importancia para las propiedad de la biopelícula, ya que le da la estabilidad estructural así como el incremento de la tolerancia a los antimicrobianos y las células inmunológicas.

Los mecanismos de resistencia abarcan características heredadas que obstruyen directamente la funcionalidad o eficacia de los antimicrobianos. Los mecanismos de resistencia le permiten a la bacteria crecer y proliferar ante la presencia de antibióticos. La tolerancia por el otro lado se refiere a la habilidad para sobrevivir a la exposición de los antimicrobianos.

BOMBAS DE EFLUJO:

Es uno de los principales mecanismos de resistencia de *PA*, se localizan a lo ancho de la membrana citoplasmica de la bacteria y actúa como un transportador hacia afuera de la célula bacteriana, de productos tóxicos para la misma, como son detergentes, ácidos grasos, tintes y antibióticos de diversas clases. Aumentan la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la bacteria al reducir las concentraciones del antibiótico dentro de la célula.

Se ha identificado que *PA* expresa 12 diferentes bombas de eflujo, que le confieren resistencia a múltiples antibióticos, entre ellas *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, *MexEF-OprN* y *MexXYOprM*.

El sistema *MexAB-OprM* es una de las bombas de eflujo que expresa *PA*, está regulado por la proteína *MexR*, que regula la expresión de genes del éste sistema cambiando la expresión de las proteínas *MexA*, *MexB* y *OprM*, que le confieren a la cepa mayor resistencia antibiótica.

Otra proteína implicada *OprD*, importante porque al estar alterada la expresión de ésta proteína, la bacteria expresa resistencia a la clase antibiótica de carbapenemicos.

Estas bombas de eflujo específicas pueden ser identificadas mediante biología molecular, que detecta la presencia de los genes que alteran su expresión.⁹

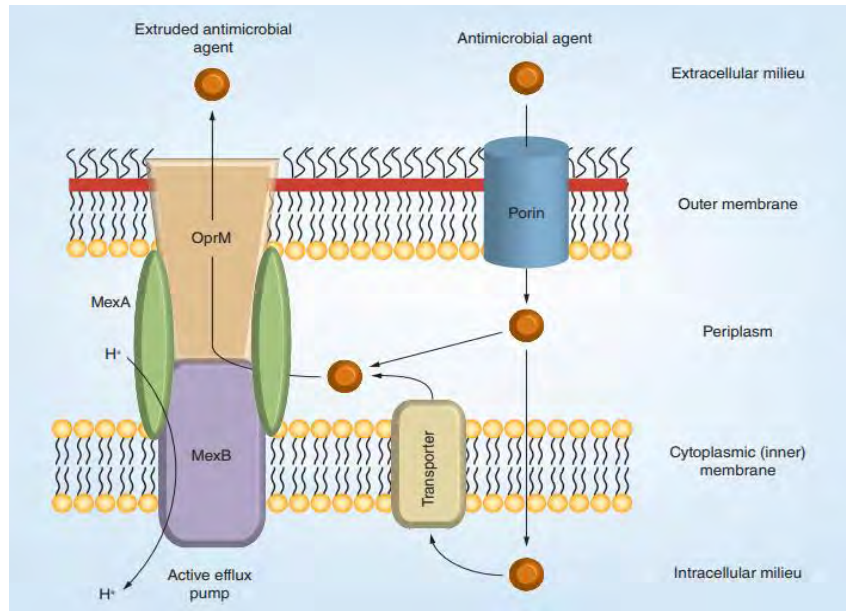


Figura 1: En ésta figura se identifica la situación anatómica de las bombas de eflujo y su función en enviar hacia afuera los agentes antibióticos. ¹⁰

Bombas de eflujo de *Pseudomonas aeruginosa* y su sustrato

Bomba	Gen regulador	Proteína transmembrana	Proteína de fusión de membrana	Proteína de membrana externa	Mutación	Sustratos
<i>MexAB-OprM</i>	<i>mexR</i>	<i>MexR</i>	<i>MexA</i>	<i>OprM</i>	<i>nalB</i> y <i>nalC</i>	BL, FQ, CM, TC, TP, SM, ML, CV, TS
<i>MexCD-OprJ</i>	<i>nrxB</i>	<i>MexD</i>	<i>MexC</i>	<i>OprJ</i>	<i>nfxB</i>	BL, FQ, CM, TC, , NV, TP, ML, CV, TS
<i>MexEF-OprN</i>	<i>mexT</i>	<i>MexF</i>	<i>MexE</i>	<i>OprN</i>	<i>nfxC</i>	FQ, CM, TP, TS
<i>MexXY-OprM</i>	<i>mexZ</i>	<i>MexY</i>	<i>MexX</i>	<i>OprM</i>	<i>ParRS</i>	FQ, AG, TC, ER

Cuadro 1: Sistema de bombas de eflujo, con los sustratos antibióticos de cada uno de ellos, que indica resistencia a los mismos.¹⁰ BL:β-lactámicos, AG: aminoglucosidos, CM: cloranfenicol, CV: cristal violeta, ER: eritromicina, FQ: Fluoroquinolonas, ML: macrólidos, NV: novobiocina, SM: sulfonamidas, TC tetraciclinas, TP: trimetoprim, TS:triclosan.

ENZIMAS β -LACTAMASAS

Pseudomonas aeruginosa puede producir una serie de enzimas, como mecanismo de resistencia adquirida, éstas enzimas principalmente le confieren resistencia a múltiples antibióticos β -lactámicos, por lo tanto éstas enzimas son llamadas β -lactamasas.

PA posee un gen llamado *ampC*, que índice cromosómicamente la expresión de β -lactamasas, otras β -lactamasas expresadas por *PA* son mediadas por plásmidos y éstas enzimas pueden ser inhibidas por inhibidores como ácido clavulánico y tazobactam, no así las mediadas por plásmidos.¹⁰

Hay 4 clases de β -lactamasas: A, B, C y D.

Las clases A, C y D llevan a cabo su acción de resistencia mediante mecanismos mediados por serina.

La clase B de las betalactamasas también es llamado metalo-beta-lactamasas (MBL) y actúan mediante en zinc que es un cofactor, éstas β -lactamasas no pueden ser inhibidas por los típicos inhibidores de betalactamasas y pueden inhibir cualquier β lactámico, excepto los monobactamicos. Pueden *in vitro* ser inhibidas por la presencia de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) que es un quelante de zinc y ésta prueba se usa en laboratorio para inferir la presencia de MBL del tipo B.

Las MBL son las enzimas con mayor impacto y que han merecido mayor estudio, debido al problema clínico que representan al causar multidrogorresistencia de las cepas de *PA*, incluyendo resistencia a carbapenemicos.

Ésta clase de MBL fueron aisladas por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* en Japón en el año 1991, a partir de entonces se han aislado prácticamente en todo el mundo, son causantes de la alta mortalidad y morbilidad que causa éste microorganismo.¹¹

De acuerdo a la estructura molecular, se han descrito varios tipos de MBL, las cuales son las siguientes:

- IMP: Imipenemasa
- VIM: Codificadas en el integron Verona
- SPM: Sao Pablo
- GIM: Imipenemasa alemana

- SIM: Imipenemasa de Seul
- AIM: Austria
- KHM: Japón

Hay algunas MBL que se han descrito únicamente en ciertas partes del mundo. Un ejemplo de ello es la β -lactamasa New Delhi (NDM-1), que es también una β -lactamasa de clase B, aislada por primera vez en 2008 en Suecia, sin embargo fue aislada de un paciente que previamente se encontraba hospitalizado en la India, de ahí su nombre, NDM-1 es producida por enterobacterias, su importancia radica en que codifica genes que confieren resistencia a quinolonas y aminoglicosidos. Se ha reportado la presencia de NDM-1 en *Pseudomonas aeruginosa* de manera escasa y sólo en la India.

Se reportó en 2014, por Mariappan Shanthi, un estudio en la India, en el que se evaluó mediante PCR la presencia de MBL en 61 cepas de *PA* resistentes a carbapenemicos, encontrando de esas 61 cepas, 4 expresaban NDM-1 y un dato importante es que tenían co-asociación con otras MBL, además es importante resaltar que éstas cepas HDM-1 fueron sensibles únicamente a Colistina.¹²

En cuanto a la epidemiología en América latina IMP-1 y SPM-1 se han reportado en Brasil, en Argentina IMP-13 y VIM-11, en Chile VIM-2 y en Colombia también VIM.⁸

Para detectar la presencia de MBL, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), no ha recomendado una prueba altamente eficaz y específica. Sin embargo, el método que más se ha usado es la llamada prueba "Etest", en la cual se usa el principio de que las MBL pueden ser inhibidas por un quelante de metales como el EDTA, por lo tanto, éste quelante se adiciona a un antibiótico en la prueba *in vitro* para observar el halo de inhibición de un antibiótico solo y de un antibiótico adicionando EDTA, siendo positiva cuando el halo de inhibición producido por el antibiótico adicionado con EDTA es mayor que el antibiótico solo, suponiendo que esto sucede porque EDTA ha inhibido a la MBL.⁸

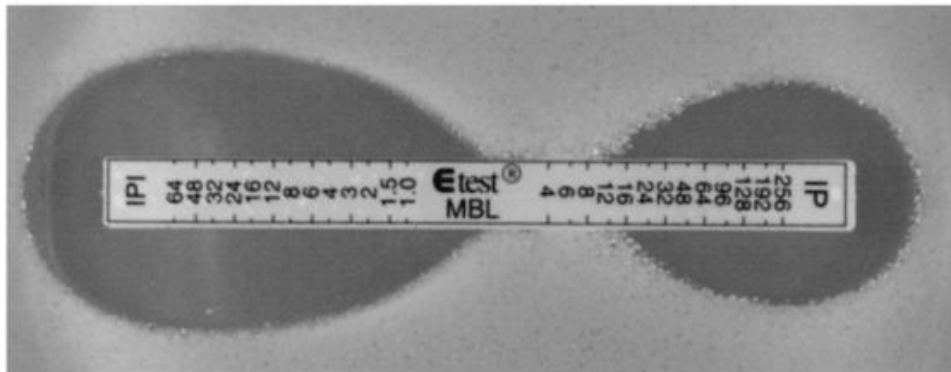


Figura 2: En ésta imagen se observa del lado izquierdo el halo de inhibición de Imipenem + EDTA que es mayor que el halo del extremo derecho, que sólo contiene Imipenem, observándose el halo mayor en el que se asocia a EDTA pues éste quelante ha inactivado la MBL.

DEFINICION DE MULTI DROGO RESISTENTE (MDR), EXTENSAMENTE DROGORRESISTENTE (XDR) Y PANDROGO RESISTENTE (PDR)

Para evaluar los perfiles de susceptibilidad antibiótica de los microorganismos, se realizan análisis *in vitro* hacia múltiples antibióticos, se carece de un consenso general para clasificarlos como multidrogosresistentes (MDR), extensamenmte resistentes(XDR) y pandrogosresistentes(PDR).

En 2011 el Centro de prevención y control de enfermedades (CDC) junto con el centro europeo de prevención y control de enfermedades (ECDC) publican una propuesta para la clasificación de *S. aureus*, *Enterococcus spp*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae spp* y *Acinetobacter app.*, siendo éstos microorganismos los más recientemente importantes declarados por la OMS como de alta virulencia por los altos perfiles de resistencia bacteriana que han mostrado a nivel mundial.

En ésta propuesta se definen de la siguiente manera:

MDR: No susceptible a ≥ 1 agente antimicrobiano en \geq de 3 categorías de antibióticos.

XDR: No susceptible a ≥ 1 agente antimicrobiano en todas, menos en menos de 2 categorías antibióticas.

PDR: No susceptible a todos los antibióticos de todos los grupos de antibióticos.¹³

CEFTOLOZANO/TAZOBACTAM

Ceftolozano/tazobactam es una cefalosporina de nueva generación con actividad antipseudomonas, asociado a un inhibidor de β -lactamasas, aprobado recientemente por la FDA para el tratamiento de infecciones complicadas por bacilos gram negativos, incluyendo a los productores de β -lactamasas de espectro extendido y PA incluyendo aquellas MDR.

Ceftolozano es una cefalosporina oximino-aminotiazolilo, contiene en su estructura un anillo aminotiazolilo en la posición 7 de la cadena, con un pirazol en la posición 3, que le confiere mejoría en la permeabilidad de las membranas bacterianas y más estable en contra de β -lactamasas *AmpC*, que le confiere actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Mecanismo de acción: actúa como inhibidor de la síntesis de la pared bacteriana, por medio de su unión a las proteínas ligadoras de penicilina y actúa como bactericida.

Tazobactam es un inhibidor irreversible de β -lactamasas de espectro extendido y anaerobios, tiene la capacidad de unirse a algunas β -lactamasas mediadas por plásmidos.

Tiene actividad constante y estable hacia β -lactamasas *AmpC*, así como es estable y resistente a bombas de eflujo que expresa PA.

Ceftolozano/tazobactam (C/T) tiene actividad contra cocos gram positivos como son *S. salivarius*, *S. constellatus*, *S. anginosus*, así como para algunos anaerobios como *B. fragilis*, *Prevotella spp*, *Fusobacterium spp* y tiene actividad limitada contra *Staphylococcus spp*.

Carece de actividad contra metalo-beta lactamasas, así como carbapenemasas.

Tiene baja probabilidad de presentar resistencias bacterianas comparado con otros antibióticos como quinolonas, aunque se cree que las cepas en exposición por más de 7 días a C/T pueden mutar y producir resistencia a éste.¹⁴

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La multirresistencia antibiótica de *Pseudomonas aeruginosa* va en aumento a nivel mundial y actualmente es una de las infecciones con mayor mortalidad debido a las escasas opciones terapéuticas existentes. En los últimos años, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez se ha observado la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente (PA-MDR) como causante de infecciones nosocomiales en pacientes pediátricos, incrementando la morbi-mortalidad y prolongando su estancia hospitalaria.

Respecto a las opciones terapéuticas existentes, hay pocos ensayos clínicos publicados en la literatura y son realizados en población adulta. Dentro de las propuestas de nuevos antibióticos con utilidad contra *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra el Ceftolozano-tazobactam pero aún no se ha probado su seguridad y eficacia en población pediátrica. Uno de los primeros pasos que se deben seguir para conocer su posible utilidad en población pediátrica es evaluar la efectividad *in vitro* de dicho medicamento.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la susceptibilidad *in vitro* de PA-MDR a Ceftolozane/tazobactam (C/T), de muestras obtenidas de aislamientos clínicos de sitios habitualmente estériles de pacientes pediátricos?

JUSTIFICACIÓN

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se ha observado en los últimos años un incremento en aislamientos de *PA*-MDR.

Existen algunas alternativas para tratar estas infecciones, como la Colistina, un antibiótico altamente nefrotóxico que en situaciones críticas es la última alternativa para el manejo de éstos pacientes, sometiéndolos al riesgo de desarrollar falla renal aguda.

Otro de los antibióticos aprobados recientemente por la FDA para el manejo de *PA* MDR es Ceftolozano/tazobactam, que es una cefalosporina de nueva generación asociada a un inhibidor de beta-lactamasas, pero la susceptibilidad a éste antibiótico pueda variar con base en los mecanismos de resistencia específicos que expresa cada bacteria.

Carecemos de evidencia en pacientes pediátricos tanto de estudios *in vitro*, como *in vivo* y de ensayos clínicos sobre la efectividad de C/T en cepas de *PA* MDR, que demuestren que C/T puede ser una alternativa útil para su tratamiento en este grupo de pacientes.

El 5 de junio del 2018, el Consejo de Salubridad General publicó en el Diario oficial de la Federación un acuerdo en el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia A los Antimicrobianos. Esto implica que se deben encaminar todos los esfuerzos necesarios para identificar nuevas opciones terapéuticas para microorganismos multiresistentes, por lo que la realización de este estudio sigue esta línea prioritaria de investigación.¹⁵

OBJETIVOS

- Evaluar la susceptibilidad *in vitro* de Ceftolozane/tazobactam contra *Pseudomonas aeruginosa* MDR, aisladas de muestras clínicas de sitios estériles de pacientes pediátricos.
- Conocer la susceptibilidad general de las cepas de *PA*-MDR encontradas en el Hospital Infantil de México hacia los principales antibióticos activos contra *PA*.
- Evaluar mediante biología molecular las cepas de *PA*-MDR para determinar el tipo de MBL que expresan.

MÉTODOS

a) Diseño de estudio.

Estudio de ciencia básica, transversal, analítico, descriptivo.

b) Lugar del estudio

Hospital Infantil de México Federico Gómez

c) Periodo de estudio

Noviembre 2012 a octubre 2017

d) Muestra.

Muestreo no probabilístico, de conveniencia de los casos consecutivos durante el periodo de estudio.

e) Criterio de inclusión

- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras de sitios habitualmente estériles de pacientes pediátricos (1 por paciente) que cumplieran con la definición de MDR (ver anexo 1 y 2).

f) Criterios de Exclusión.

- Cepas que no eran procedentes de sitios estériles
- Aquellas cepas en las que no se especifique el método de obtención de la muestra pudiera ser inadecuado por la probabilidad de contaminación de la misma
- Cepas de *PA-MDR* repetidas del mismo paciente
- Cultivos positivos para más de un microorganismo además de *PA-MDR* durante el mismo periodo de tiempo

g) Descripción general del estudio

- Se hizo la selección de cepas de *PA*-MDR de los registros de aislamientos y sensibilidades del Laboratorio de microbiología del Hospital Infantil de México.
- Se resembraron esas cepas en Agar sangre, la identificación y sensibilidad de las cepas se realizó mediante espectrometría de masas.
- Se analizó la sensibilidad de *PA*-MDR a C/T mediante el método de Kirby Bauer (ver anexo 3) utilizando sensidiscos de Ceftolozano 30µg/tazobactam 10µg (HARDY diagnostics ®).
- Se midió el halo de inhibición del halo de inhibición formado, el valor de corte para definir a las cepas como sensibles o resistentes a C/T fue 21 mm o más, de 17-20 mm como intermedio y menos de 16 mm de halo de inhibición como resistente de acuerdo a los criterios del CLSI.
- Se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, como control de calidad dando un halo de inhibición de 28 mm, considerada como sensible.
- Se generó una base de datos en una hoja de Excel con los resultados obtenidos.
- El análisis molecular se llevó a cabo en el laboratorio de Infectología del Instituto Nacional de Rehabilitación. A las cepas identificadas como resistentes a C/T, se les realizó la prueba de inhibición con EDTA. Las cepas que fueron inhibidas por el EDTA (infiriendo que expresan MBL) se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para búsqueda de MBL del tipo VIM, IMP, NDM y KPC.

DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	TIPO	DEFINICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
Edad	Cuantitativa discreta	Tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento	Años, meses, días
Sexo	Cualitativa nominal	Condición orgánica que identifica a los seres humanos como masculino o femenino	Masculino, Femenino
Sensibilidad antibiótica	Cualitativa ordinal	Propiedad de una cepa bacteriana de ser inhibida o destruida en su crecimiento por la acción de un antibiótico	Sensible, Intermedio, Resistente
Tipo de muestra	Cualitativa nominal	Muestra biológica obtenida de un sitio habitualmente estéril de donde se aisló PA-MDR	Orina, sangre, LCR, Líquido pleural
PA-MDR	Cualitativa nominal	No susceptible a más de 1 agente en al menos 3 más de 3 categorías de antibióticos con actividad antipseudomonas.	Multidrogorresistente (MDR) y susceptible
Metallo beta-lactamasas	Cualitativa nominal	Enzimas expresadas por diferentes bacterias y que les confieren resistencias bacterianas altas, potente actividad carbapenemasa, resistencia a los	-IMP: Imipenemasa -VIM: Codificadas en el integron Verona -SPM: Sao Pablo -GIM: Imipenemasa alemana

		inhibidores de betalactamasas y ausencia de actividad contra monobactámicos.	-SIM: Imipenemasa de Seul -NDM-1: New Delhi
--	--	---	---

Cuadro 2: Descripción de las variables.

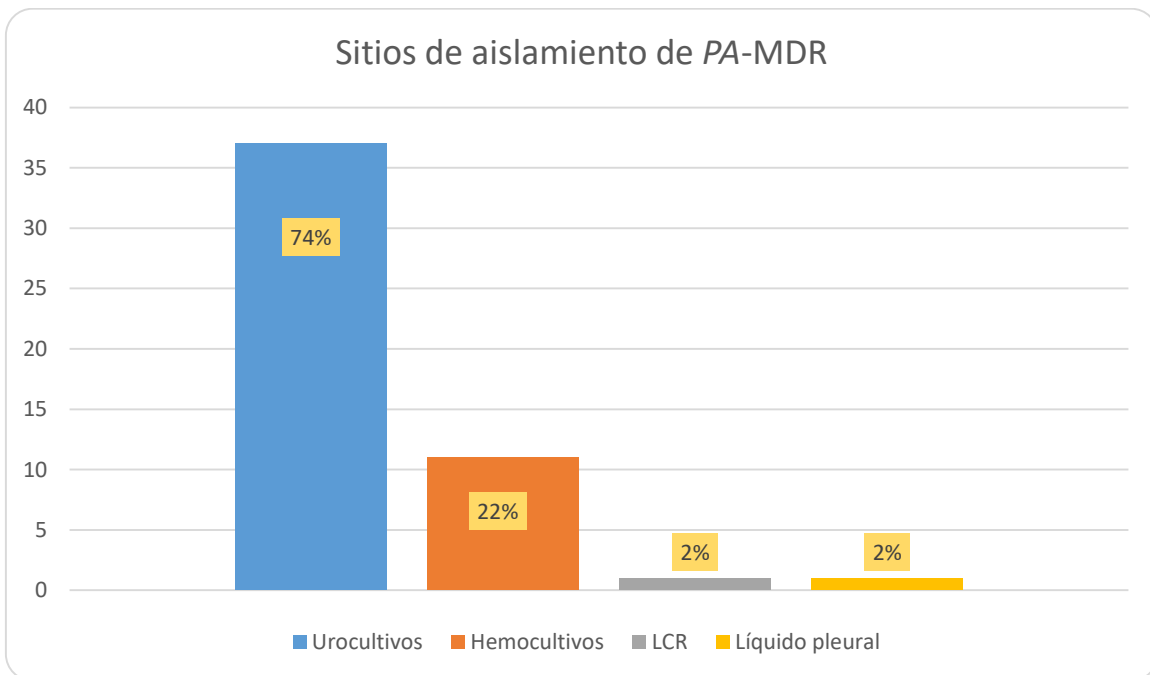
PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizarán los datos mediante estadística descriptiva, reportando los resultados con medidas de tendencia central y porcentajes.

RESULTADOS

Se analizaron 50 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, que mediante perfil de susceptibilidad cumplieran la definición de MDR, aisladas de sitios habitualmente estériles, 37 fueron aisladas de orina, asegurándonos que fueran tomadas mediante sonda urinaria para asegurar que fuera una técnica adecuada, 11 aisladas de sangre, 1 de líquido cefalorraquídeo y 1 cepa aislada de líquido pleural. Sólo se incluyó una cepa por paciente, se descartaron aquellas cepas cuya técnica de obtención de muestra no fuera adecuada y pudiera representar contaminación de la misma.

En la gráfica 1, se muestran los sitios de donde se aislaron las cepas, se observa que *Pseudomonas aeruginosa* fue mayormente aislada en orina, tal como se identifica en la literatura.



Gráfica 1: Sitios de aislamiento de PA-MDR

Del total de 50 cepas probadas, 47 fueron resistentes a C/T (94%) y sólo 3 de ellas fueron sensibles (6%). El 100% de las cepas fueron resistentes a carbapenémicos y también el 100% fueron sensibles a Colistina. El patrón de susceptibilidad de las cepas a los diferentes antibióticos probados se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Susceptibilidad *in vitro* de las 50 cepas de PA-MDR

Agente antimicrobiano		Sensible n (%)	Resistente n (%)
AMINOGLUCÓSIDOS	Amikacina	1 (2)	49 (98)
	Gentamicina	6 (12)	44 (88)
CARBAPENÉMICOS	Imipenem	0 (0)	50 (100)
FLUOROQUINOLONAS	Ciprofloxacino	4 (8)	46 (92)
CEFALOSPORINAS	Cefepima	2 (4)	48 (96)
	Ceftazidima	2 (4)	48 (96)
	Ceftolozano/tazobactam	3 (6)	47 (94)
POLIMIXINAS	Colistina	50 (100)	0 (0)

Tabla 1: Susceptibilidad *in vitro* de las 50 cepas probadas de PA-MDR a múltiples antimicrobianos en el Hospital Infantil de México



Figura 3: Agar Müller Hinton, método de Kirby Bauer, se observa el crecimiento de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y se observa el sensidisco de C/T, mostrando ser resistentes, pues no se identifica halo de inhibición.

El perfil de susceptibilidad general de las tres cepas sensibles a C/T se expone a continuación:

La primera mostró diámetro de inhibición para C/T de 28 mm, y además fue sensible a Cefepima y Ceftazidima (MIC de 8mg/L).

El segundo aislamiento mostró diámetro de inhibición de 22 mm a C/T, sensible además a Colistina con 17 mm de diámetro de inhibición, ciprofloxacino con MIC ≤ 0.25 mg/L y gentamicina con MIC ≤ 1 mg/L.

El tercer aislamiento mostró halo de inhibición de 25 mm para C/T, ciprofloxacino MIC 4 mg/L, ceftazidima MIC de 4 mg/L y gentamicina de ≤ 1 mg/L

Si bien, las 3 cepas fueron sensibles a C/T se siguen considerando como multidrogo resistentes porque cada cepa era resistente al menos a un cefalosporina: la Cepa #1 a ceftolozane/tazobactam, la cepa #2 a ceftazidima y la cepa #3 a cefepima.

Para el control de calidad se probó la susceptibilidad *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, dando un halo de inhibición de 28 mm, considerada como sensible.

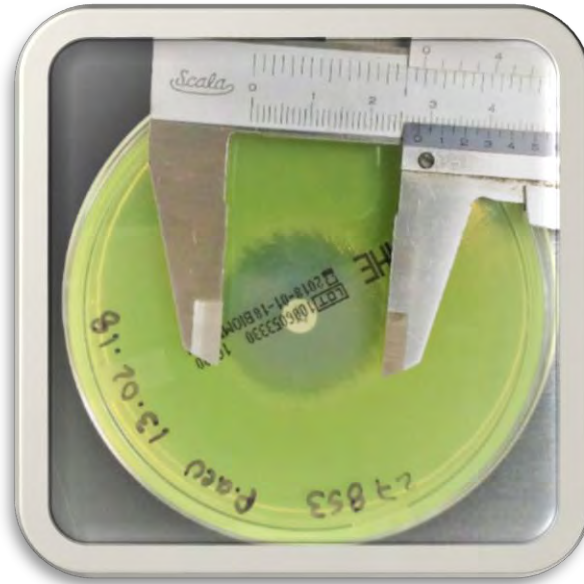


Figura 4: Se observa el halo de inhibición que originó C/T en la cepa PA ATCC 27853, así como se observa el método de medición del halo.

Tabla 2. Perfil de susceptibilidad general de las cepas sensibles a Ceftolozano/tazobactam

	AN*	GM*	IMP*	CIP*	FEP*	CAZ*	C/T**	COLI**
#1	≥64 (R)	≤1 (S)	≥8 (R)	≥4 (R)	8 (S)	8 (S)	28 (S)	15 (S)
#2	≥64 (R)	≤1 (S)	≥8 (R)	≤0.25 (S)	16 (I)	≥ 32 (R)	22 (S)	17 (S)
#3	≥64 (R)	≤1 (S)	≥8 (R)	4 (R)	≥ 32 (R)	4 (S)	25 (S)	NR

AN: Amikacina, GM: Gentamicina, IMP: Imioenem, CIP: Ciprofloxacino, FEP: Cefepima, CAZ: Ceftazidima, C/T: Ceftolozano/tazobactam, COLI: Colistina.

MICs (mg/L) (R=resistente, I=intermedio, S=sensible). NR= No realizado.

*susceptibilidad realizada por concentración mínima inhibitoria, reportándose en mg/L.

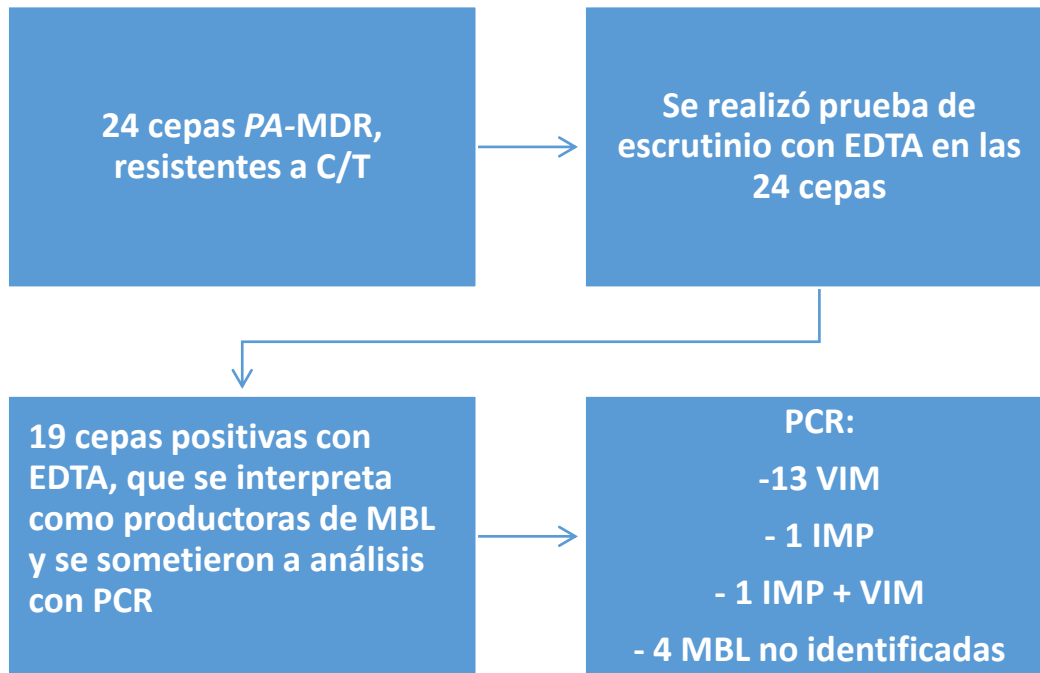
** susceptibilidad realizada por método Kirby Bauer, reportándose el diámetro de inhibición (mm).

Análisis por biología molecular

Se realizó además análisis mediante biología molecular de las cepas analizadas, con el fin de determinar la presencia de determinados mecanismos de resistencia que ocasionaron la falta de susceptibilidad a C/T, en específico, la probabilidad de que las cepas analizadas expresaran carbapenemasas y/o metalo-beta lactamasas, que como se ha descrito, no se encuentran dentro de la cobertura de C/T.

De manera preliminar se han analizado 24 cepas de PA-MDR, que fueron resistentes a C/T. Se les realizó la prueba de EDTA, de las cuales 19 fueron positivas a la prueba, interpretándose como productoras de MBL. Éstas 19 cepas se analizaron mediante PCR para búsqueda de MBL específicas, encontrando que 13 presentaron VIM y 1 cepa fue positiva solo a la presencia de IMP, y otra mostro tanto VIM como IMP. En las otras 4 cepas no se identificó la MBL que expresa.

Se identificó entonces que la causa de la falta de sensibilidad a C/T de las cepas de PA-MDR probadas *in vitro* aparentemente se debió a que presentan MBL, principalmente del tipo VIM y en menos cantidad IMP, también cabe mencionar que una de las cepas expresó al mismo tiempo tanto VIM como IMP.



Grafica 2: Diagrama de flujo en la realización de las pruebas de escrutinio y posteriormente PCR en búsqueda de MBL.

Esta evaluación mediante biología molecular, mostró que la mayoría (79%) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR aisladas en nuestro hospital expresan Metalo betalactamasas, que le confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos con actividad antipseudomonas, incluyendo resistencia a C/T.

DISCUSIÓN

El aumento de las resistencias bacterianas va en aumento a nivel mundial y en especial de *PA*, que en el Hospital Infantil de México se ha vuelto un microorganismo comúnmente involucrado en infecciones asociadas a cuidados de la salud, aumentando la morbi mortalidad de los pacientes.

Se han reportado ya algunos ensayos clínicos que justifican el uso de Ceftolozano/tazobactam para el manejo de infecciones intrabdominales y urinarias con éxito, incluso algunos han mostrado no inferioridad con carbapenémicos ante microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido.¹⁶

Sin embargo, nuestro grupo de pacientes es crítico, al ser pacientes pediátricos, con múltiples comorbilidades y se carece en la literatura de ensayos clínicos que justifiquen la seguridad del uso de C/T en la población pediátrica, que resalta la importancia de realizar un estudio *in vitro* de manera inicial para posteriormente iniciar estudios *in vivo*.

Llama la atención que las 50 cepas de *PA*-MDR seleccionadas, son además resistentes a carbapenémicos, y que contrario a los reportes de la literatura, sólo el 6% fueron sensibles a C/T y que la única alternativa mostrada *in vitro* para el tratamiento es la Colistina, que mostro sensibilidad en el 100% de las cepas.

Se identificó además que el 79% de las 24 cepas analizadas expresan MBL, que es la razón por la que se mostraron resistentes a la acción de C/T.

En la literatura hay reportes aislados sobre la presencia de MBL en aislamientos de *PA*-MDR. En México, Quinones y cols. en 2009 reportan la emergencia de 3 cepas de *PA*-MDR que expresan MBL tipo IMP y VIM en el Instituto nacional de enfermedades respiratorias (INER)¹⁷. En 2012, Castillo y cols. reportaron también 14 aislamientos de cepas productoras de MBL: GES, VIM y OXA fueron las encontradas, las cepas identificadas se aislaron en 2004, en el Centro médico nacional La Raza, de IMSS.¹⁸

Son pocos los reportes en la literatura y no hay nada reportado acerca de éstas cepas en aislamientos de pacientes pediátricos, sin embargo en nuestros resultados observamos una cepa con expresión de dos tipos de MBL al mismo tiempo (IMP y VIM) situación que ya se ha observado en los reportes descritos en nuestro país, llama la atención que los reportes

no sean tan constantes, lo que pudiera deberse a la falta de búsqueda intencionada de éstas MBL mediante técnicas de biología molecular.

De acuerdo a los reportado por Ochoa, et al en 2013, en un estudio que evaluó la presencia de metano-betalactamasas en pacientes pediátricos de nuestra institución, consideramos importante que ellos describen desde 2009 la presencia de MBL hasta en 43% de las cepas de PA-MDR seleccionadas.⁷ Sus resultados sugieren que en nuestro medio hospitalario la producción de MBL ya se ha observado desde ese año, sin embargo, no realizan análisis molecular para tratar de identificar el tipo de MBL.

En nuestro caso, consideramos la necesidad de análisis del genoma completo de éstas cepas, para identificar si se trata de la misma clona o diferentes, consideramos éstos resultados representan un alto riesgo de diseminación de éstas cepas incrementando las resistencias bacterianas en otros lugares de la república mexicana.

CONCLUSIÓN

- Hasta nuestro conocimiento, éste es el primer estudio *in vitro* de la susceptibilidad de PA-MDR a ceftolozano/tazobactam en cepas aisladas de pacientes pediátricos en México.
- A pesar de la amplia cobertura reportada de Ceftolozano/tazobactam para PA-MDR, el 94% de las cepas aisladas en el Hospital infantil de México mostraron resistencia *in vitro* a dicho medicamento.
- Los eventos de infección con aislamiento de PA-MDR más frecuentes fueron infección de vías urinarias, seguida de bacteriemias.
- La mayoría de las cepas de PA-MDR aisladas en el Hospital Infantil de México expresan MBL, las principales son VIM e IMP, lo que les confiere resistencia a múltiples antibióticos.
- Nuestros resultados no apoyan el uso empírico de C/T para el tratamiento de infecciones por PA-MDR en pacientes del Hospital Infantil de México.
- La identificación de MBL en las cepas de *P. aeruginosa* de nuestra institución, representa un alto riesgo de esparcimiento de las cepas con el consiguiente riesgo de provocar brotes e incremento de morbi mortalidad en pacientes pediátricos.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las cepas evaluadas en éste trabajo, fueron recolectadas sólo de un centro hospitalario, que representa el perfil de susceptibilidad de las cepas locales, no así de las cepas en circulación nacional.

La susceptibilidad de las cepas de PA-MDR se realizó mediante el método de difusión en disco y no se realizaron concentraciones mínimas inhibitorias que son el método de elección para la interpretación de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana.

Y por último, la selección de las cepas fue realizada de manera retrospectiva

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	2017					2018					
	Ag o	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun
Título de tesis											
Anteproyecto de tesis											
Portafolio											
Marco teórico											
Identificar cepas											
Pruebas de susceptibilidad											
Análisis de datos											
Redacción del borrador											
Revisión y corrección del borrador											
Presentación del informe											

BIBLIOGRAFÍA

1. Knols BG, Smallegange RC, Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G, Singh N. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics. *Lancet Infect Dis*. 2016;9(9):535-536. doi:10.1016/S1473-3099(09)70222-1
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2017;3099(17):1-10. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
3. Tato M, García-Castillo M, Bofarull AM, Cantón R. In vitro activity of ceftolozane/tazobactam against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae recovered in Spanish medical centres: Results of the CENIT study. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(5):502-510. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.004
4. Haidar G, Philips NJ, Shields RK, et al. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. *Clin Infect Dis*. 2017;65(1):110-120. doi:10.1093/cid/cix182
5. Shortridge D, Pfaller MA, Castanheira M, Flamm RK. Antimicrobial Activity of Ceftolozane-Tazobactam Tested Against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* with Various Resistance Patterns Isolated in U.S. Hospitals (2013–2016) as Part of the Surveillance Program: Program to Assess Ceft. *Microb Drug Resist*. 2017;00(00):mdr.2017.0266. doi:10.1089/mdr.2017.0266
6. Munita JM, Aitken SL, Miller WR, et al. Multicenter Evaluation of Ceftolozane/Tazobactam for Serious Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2017;65(1):158-161. doi:10.1093/cid/cix014
7. Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Rodea GE, et al. Phenotypic characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from pediatric patients

associated to biofilm formation. *Microbiol Res.* 2015;172:68-78.

doi:10.1016/j.micres.2014.11.005

8. Gonzales E. Metallo- β -lactamasas: ¿el fin de los β -lactámicos? *Rev Peru Epidemiol.* 2012;16(3):01-08. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203125431002>.
9. Arabestani, MR; Mousavi S. Expression of Efflux Pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Samples using qRT-PCR. *Arch Iran Med.* 2015;18(2):102-108. doi:015182/aim.008
10. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* 2015;10(10):1683-1706. doi:10.2217/fmb.15.48
11. Abaza AF, El Shazly SA, Selim HSA, Aly GSA. Metallo-beta-lactamase producing *pseudomonas aeruginosa* in a healthcare setting in Alexandria, Egypt. *Polish J Microbiol.* 2017;66(3):297-308. doi:10.5604/01.3001.0010.4855
12. Shanthi M, Sekar U, Kamalanathan A, Sekar B. Detection of New Delhi metallo beta lactamase-1 (NDM-1) carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* in a single centre in southern India. *Indian J Med Res.* 2014;140(October):546-550.
13. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
14. Cho JC, Fiorenza MA, Estrada SJ. Ceftolozane/Tazobactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination. *Pharmacotherapy.* 2015;35(7):701-715. doi:10.1002/phar.1609
15. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION. ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN.
16. Wagenlehner FM, Umeh O, Steenbergen J, Yuan G, Darouiche RO. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: A randomised, double-blind, phase 3 trial

(ASPECT-cUTI). *Lancet*. 2015;385(9981):1949-1956. doi:10.1016/S0140-6736(14)62220-0

17. Quinones-Falconi F, Galicia-Velasco M, Marchiaro P, et al. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo-lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(2):126-131. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02780.x
18. Castillo-Vera J, Ribas-Aparicio RM, Nicolau CJ, Oliver A, Osorio-Carranza L, Aparicio-Ozores G. Unusual Diversity of Acquired β -lactamases in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Mexican Hospital. *Microb Drug Resist*. 2012;18(5):471-478. doi:10.1089/mdr.2011.0183
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th.*; 2017.

ANEXOS

Anexo 1: Criterios para definir a *Pseudomonas aeruginosa* como Multidrogorresistente (MDR), extensamente drogo resistente (XDR) y Pandrogorresistente (PDR)¹³

Criterios para la definición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR, XDR, PDR	
MDR	No susceptible a ≥ 1 agente antimicrobiano en \geq de 3 categorías de antibióticos.
XDR	No susceptible a ≥ 1 agente antimicrobiano en todas, menos en menos de 2 categorías antibióticas.
PDR	No susceptible a todos los antibióticos de todos los grupos de antibióticos

Anexo 2: Categorías antibióticas y agentes antimicrobianos que no componen, que se usan para la definición de PA MDR, XDR y PDR. ¹³

Categorías de antibióticos antipseudomonas	
AMINOGLUCOSIDOS	Gentamicina Tobramicina Amikacina Netilmicina
CARBAPENEMICOS ANTIPSEUDOMONAS	Imipenem Meropenem Doripenem
CEFALOSPORINAS ANTIPSEUDOMONAS	Ceftazidima Cefepima
FLUOROQUINOLONAS ANTIPSEUDOMONAS	Ciprofloxacino Levofloxacino
PENICILINAS ANTIPSEUDOMONAS + INHIBIDOR DE β-LACTAMASAS	Piperazilina/tazobactam Ticarcilina/ac. Clavulánico
MONOBACTAMICOS	Aztreonam
AC. FOSFONICOS	Fosfomicina
POLIMIXINAS	Colistina Polimixina B

Anexo 3: Descripción del método Kirby Bauer¹⁹

Método de Kirby Bauer en Agar Muller Hinton
1- Seleccionar una colonia de <i>PA-MDR</i>
2. Colocar la colonia en un tubo de ensaye con solución fisiológica estéril y ajustar la turbiedad en el tubo al 0.5 del nefelómetro de Mc Farland
3. Introducir un hisopo en la suspensión, para empaparlo de la solución.
4. Sacar el hisopo retirando el exceso del inóculo, rotando contra la pared del tubo
5. Sembrar masivamente con el hisopo en una caja de Agar Muller Hinton
6. Dejar secar el inóculo en la placa algunos minutos
7. Colocar un disco de Ceftolozano 30µg/tazobactam 10µg (HARDY diagnostics ®)
8. Incubar a 37°C durante 24-48 hrs
9. Lectura de los diámetros de inhibición
10. Comparar los valores en las tablas de CLSI
11. Informar el resultado como S=sensible, I=intermedio, R=resistente