



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización fenotípica y genotípica de
carbapenemasas en aislados clínicos de *Pseudomonas
aeruginosa* de un centro de tercer nivel de la Ciudad de
México**

TESIS

Que para obtener el título de
Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA

María Guadalupe Martínez Zavaleta

PRESENTA

M. en C Melissa Hernández Durán



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTA: Profesora: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

VOCAL: Profesor: LUIS MANUEL PEREA MEJÍA

SECRETARIA: Profesora: MELISSA HERNÁNDEZ DURÁN

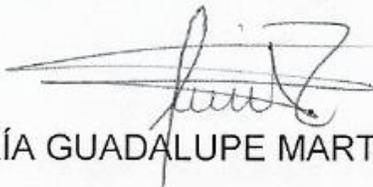
1^{ER} SUPLENTE: Profesor: GENARO JIMÉNEZ REYES

2^º SUPLENTE: Profesora: TANYA PLETT TORRES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN "LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA"



ASESOR DEL TEMA: M. EN C. MELISSA HERNÁNDEZ DURÁN



SUSTENTANTE: MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ ZAVALA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Infectología del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” bajo la dirección de la M. en C. Melissa Hernández Durán.

**“Hay que perseverar y, sobre todo, tener
confianza en uno mismo.”**

Marie Curie

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 8 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 11 |
| GLOSARIO..... | 13 |
| ABREVIATURAS..... | 14 |
| RESUMEN..... | 17 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 18 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 19 |
| 2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 19 |
| 2.1.1 Características generales..... | 19 |
| 2.1.2 Mecanismos de resistencia..... | 20 |
| 2.1.2.1 Resistencia intrínseca..... | 20 |
| 2.1.2.2 Resistencia adquirida..... | 20 |
| 2.2 Carbapenemasas..... | 21 |
| 2.2.1 Clasificaciones..... | 22 |
| 2.2.1.1 Clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros..... | 23 |
| 2.2.1.2 Clasificación de Ambler..... | 23 |
| 2.2.1.2.1 Carbapenemasas de clase A..... | 24 |
| 2.2.1.2.2 Carbapenemasas de clase B..... | 25 |
| 2.2.1.2.3 Carbapenemasas de clase D..... | 26 |
| 2.3 Métodos fenotípicos para la detección y clasificación de carbapenemasas..... | 26 |
| 2.3.1 Detección fenotípica de carbapenemasas..... | 29 |
| 2.3.1.1 Método de inactivación del carbapenémico modificado (mMIC)..... | 29 |
| 2.3.1.2 Carba NP..... | 30 |
| 2.3.2 Clasificación fenotípica de carbapenemasas..... | 31 |
| 2.3.2.1 Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA (eMIC)..... | 31 |
| 2.3.2.2 Prueba con inhibidores..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 2.4 Detección genotípica de carbapenemasas..... | 34 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 35 |
| 4. JUSTIFICACIÓN..... | 36 |
| 5. OBJETIVOS..... | 37 |
| 5.1 Objetivo general..... | 37 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 37 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 38 |
| 6.1 Tipo de estudio..... | 38 |
| 6.2 Ubicación espacial y temporal..... | 38 |
| 6.3 Criterios de selección de muestras..... | 38 |
| 6.3.1 Criterios de inclusión..... | 38 |
| 6.3.2 Criterios de exclusión..... | 38 |
| 6.4 Metodología..... | 38 |
| 6.4.1 Aislados clínicos..... | 38 |
| 6.4.2 Pruebas de pureza y viabilidad..... | 39 |
| 6.4.3 Pruebas de confirmación para la identificación de cepas..... | 39 |
| 6.4.4 Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas..... | 39 |
| 6.4.4.1 Método de inactivación del carbapenémico modificado (mMIC)..... | 39 |
| 6.4.4.2 Prueba Carba NP..... | 40 |
| 6.4.5 Pruebas fenotípicas para la caracterización de carbapenemasas..... | 41 |
| 6.4.5.1 Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA (eMIC)..... | 41 |
| 6.4.5.2 Prueba con inhibidores..... | 41 |
| 6.4.6 Pruebas genotípicas para la tipificación de carbapenemasas..... | 43 |
| 6.4.6.1 Extracción de DNA..... | 43 |
| 6.4.6.2 Amplificación por PCR punto final..... | 43 |
| 6.4.7 Modificaciones a los métodos sugeridos para la detección fenotípica de carbapenemasas..... | 45 |
| 6.4.7.1 Aislados microbiológicos..... | 45 |

| | |
|--|----|
| 6.4.7.2 Pruebas fenotípicas para la detección y caracterización de carbapenemasas..... | 45 |
| 6.4.7.3 Liberación enzimática por sonicación..... | 45 |
| 6.4.7.4 Liberación enzimática por choque osmótico..... | 46 |
| 6.4.7.5 Liberación enzimática por buffer de lisis..... | 47 |
| 6.4.8 Otras características fenotípicas..... | 47 |
| 6.4.9 Determinación de indicadores de eficiencia..... | 48 |
| 7. RESULTADOS..... | 50 |
| 7.1 Descripción de los aislados clínicos..... | 50 |
| 7.2 Pruebas fenotípicas de detección de cepas productoras de carbapenemasas..... | 52 |
| 7.2.1 Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado (mMIC) y Carba NP..... | 52 |
| 7.3 Pruebas de clasificación fenotípica de carbapenemasas en cepas Productoras..... | 53 |
| 7.3.1 Métodos para la búsqueda de MBL..... | 54 |
| 7.3.2 Prueba con inhibidores para la búsqueda de SBL..... | 55 |
| 7.4 Amplificación por PCR punto final para la caracterización genotípica de carbapenemasas..... | 56 |
| 7.4.1 Aislados productores de carbapenemasas de clase A..... | 57 |
| 7.4.2 Aislados productores de carbapenemasas de Clase B..... | 60 |
| 7.4.3 Aislados productores de carbapenemasas de Clase B y Clase D..... | 63 |
| 7.4.4 Aislados productores de dos carbapenemasas de Clase B..... | 65 |
| 7.5 Detección y clasificación fenotípica de carbapenemasas por métodos convencionales, así como por modificaciones al método estándar..... | 67 |
| 7.5.1 Serino β -lactamasas de tipo GES..... | 67 |
| 7.5.2 Metalo β -lactamasas de tipo VIM e IMP..... | 68 |
| 7.5.3 Serino β -lactamasa de Clase D de tipo OXA-23 y Metalo β -lactamasa de tipo VIM..... | 69 |
| 7.5.4 Metalo β -lactamasas de tipo IMP y NDM..... | 70 |

| | |
|--|----|
| 7.6 Características fenotípicas adicionales..... | 71 |
| 7.7 Indicadores de eficiencia..... | 72 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 74 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 79 |
| 10. PERSPECTIVAS..... | 81 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 82 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 19 |
| Figura 2. Estructura química de los carbapenémicos..... | 21 |
| Figura 3. Mecanismo de acción de los β -lactámicos..... | 22 |
| Figura 4. Mecanismo de acción de las enzimas Serino β -lactamasas sobre los carbapenémicos..... | 25 |
| Figura 5. Mecanismo de acción de las Metallo β -lactamasas sobre los β -lactámicos..... | 26 |
| Figura 6. Representación esquemática del Método de inactivación del carbapenémico modificado..... | 29 |
| Figura 7. Representación esquemática del carba NP..... | 30 |
| Figura 8. Representación esquemática del Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA..... | 31 |
| Figura 9. Estructura química de los inhibidores empleados en la prueba con inhibidores para la caracterización de carbapenemasas..... | 32 |
| Figura 10. Tipos de inhibición enzimática; inhibición competitiva e inhibición no competitiva..... | 33 |
| Figura 11. Representación esquemática de la prueba con inhibidores..... | 33 |
| Figura 12. Interpretación del método de inactivación del carbapenémico modificado..... | 40 |
| Figura 13. Interpretación de la prueba carba NP..... | 40 |
| Figura 14. Interpretación del Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA..... | 41 |
| Figura 15. Interpretación de la prueba con inhibidores para la clasificación fenotípica de carbapenemasas..... | 42 |
| Figura 16. Interpretación del Método de inactivación del carbapenémico modificado con sonicado..... | 46 |
| Figura 17. Interpretación del Método de inactivación del carbapenémico modificado con NaCl..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Interpretación del Método de inactivación del carbapenémico modificado con buffer Tris-HCl..... | 47 |
| Figura 19. Interpretación de las pruebas adicionales de caracterización fenotípica..... | 48 |
| Figura 20. Correlación metodológica..... | 49 |
| Figura 21. Aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos por periodo..... | 50 |
| Figura 22. Distribución grafica de los porcentajes para cada tipo de muestra de las que se obtuvieron los aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos..... | 51 |
| Figura 23. Perfil de susceptibilidad a carbapenémicos en porcentaje de los aislados clínicos por tipo de muestra..... | 52 |
| Figura 24. Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas..... | 53 |
| Figura 25. Resultados obtenidos mediante el mMIC y Carba NP para la detección de carbapenemasas..... | 53 |
| Figura 26. Pruebas fenotípicas para la detección de MBL..... | 54 |
| Figura 27. Detección de MBL por eMIC y Prueba con Inhibidores..... | 54 |
| Figura 28. Prueba con inhibidores para la detección de SBL..... | 55 |
| Figura 29. Clasificación de carbapenemasas de tipo SBL por Prueba con inhibidores..... | 55 |
| Figura 30. Detección genotípica de los genes que codifican para las carbapenemasas más frecuentes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 56 |
| Figura 31. Clasificación genotípica de las carbapenemasas más frecuentes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 56 |
| Figura 32. Amplificación por PCR para el gen <i>bla</i> _{GES} | 59 |
| Figura 33. Carbapenemasas de clase A detectadas genotípicamente..... | 58 |
| Figura 34. Diámetros obtenidos por mMIC para los aislados productores de GES..... | 58 |
| Figura 35. Perfil de susceptibilidad para cepas productoras de carbapenemasas de Clase A de tipo GES, para diferentes grupos de antibióticos..... | 59 |
| Figura 36. Distribución por periodo y servicio de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de SBL de tipo GES..... | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 37. Amplificación por PCR para el gen <i>bla</i> _{VIM} y <i>bla</i> _{IMP} | 60 |
| Figura 38. Carbapenemasas de Clase B detectadas genótipicamente..... | 61 |
| Figura 39. Diámetros obtenidos por mMIC para los aislados productores de MBL..... | 61 |
| Figura 40. Perfiles de susceptibilidad para cepas productoras de carbapenemasas de Clase B para diferentes grupos de antibióticos..... | 62 |
| Figura 41. Distribución de MBL por periodo y servicio..... | 63 |
| Figura 42. Amplificación por PCR para el gen <i>bla</i> _{VIM} y <i>bla</i> _{OXA-23} | 63 |
| Figura 43. Carbapenemasas de Clase B y D detectadas genótipicamente..... | 64 |
| Figura 44. Diámetros obtenidos por mMIC para los aislados productores de OXA-23 y VIM..... | 64 |
| Figura 45. Perfil de susceptibilidad para cepas productoras de carbapenemasas de Clase B de tipo VIM y Clase D de tipo OXA-23 para diferentes grupos de antibióticos..... | 65 |
| Figura 46. Amplificación por PCR para el gen <i>bla</i> _{VIM} y <i>bla</i> _{NDM} | 66 |
| Figura 47. Diámetros obtenidos por el método estándar y las diferentes modificaciones para los aislados productores de GES..... | 58 |
| Figura 48. Diámetros obtenidos por el método estándar y las diferentes modificaciones para los aislados productores de VIM e IMP..... | 59 |
| Figura 49. Diámetros obtenidos por el método estándar y las diferentes modificaciones para los aislados productores de OXA-23 y VIM..... | 70 |
| Figura 50. Porcentaje de aislados evaluados para ciertas características fenotípicas adicionales para cada gen o combinación de genes encontrados..... | 72 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Características para la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 19 |
| Tabla 2. Resistencia intrínseca de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 20 |
| Tabla 3. Correlación general entre clasificaciones para carbapenemasas | 22 |
| Tabla 4. Clasificación para carbapenemasas frecuentes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros..... | 23 |
| Tabla 5. Clasificación de Ambler para las carbapenemasas frecuentes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 24 |
| Tabla 6. Evolución y recomendaciones de las pruebas para la detección de carbapenemasas recomendados por el CLSI..... | 27 |
| Tabla 7. Variaciones del Método de Inhibición del Carbapenémico reportadas en la literatura..... | 28 |
| Tabla 8. Comparación de sensibilidades y especificidades por método para la detección de carbapenemasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 29 |
| Tabla 9. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la identificación de carbapenemasas..... | 44 |
| Tabla 10. Temperatura requerida para la amplificación de cada gen por PCR punto final..... | 44 |
| Tabla 11. Porcentaje de aislados resistentes a carbapenémicos por género..... | 50 |
| Tabla 12. Pruebas adicionales de identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 51 |
| Tabla 13. Susceptibilidad a carbapenémicos de los 192 aislados clínicos por tipo de muestra..... | 52 |
| Tabla 14. Resumen de las carbapenemasas detectadas genótipicamente en los aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos..... | 57 |
| Tabla 15. Perfil de susceptibilidad del aislado productor de dos MBL de tipo NDM y VIM..... | 66 |
| Tabla 16. Resultados obtenidos tras la realización de diferentes pruebas fenotípicas a partir de los resultados obtenidos por el método genotípico, positivos para GES..... | 67 |
| Tabla 17. Resultados obtenidos tras la realización de diferentes pruebas fenotípicas a partir de los resultados obtenidos por el método genotípico, positivos para MBL de tipo VIM..... | 68 |

| | |
|---|----|
| Tabla 18. Resultados obtenidos por pruebas fenotípicas a partir de resultados genotípicos positivos para SBL de tipo OXA-23 y MBL de tipo VIM..... | 70 |
| Tabla 19. Resultados obtenidos por pruebas fenotípicas a partir de resultados genotípicos positivos para MBL de tipo IMP y NDM..... | 71 |
| Tabla 20. Sensibilidad y especificidad, pruebas bajo estrés metabólico..... | 73 |

GLOSARIO

Brote epidemiológico: ocurrencia de dos o más casos similares, los cuales están epidemiológicamente relacionados.

Carbapenemasas: enzimas hidrolizantes de la familia de las β -lactamasas que confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos de amplio espectro de actividad bactericida como los carbapenémicos (Doripenem, Ertapenem, Imipenem y Meropenem).

Cofactor: molécula auxiliar no proteica.

Enzimas: proteínas formadas por aminoácidos unidos covalentemente entre sí, que catalizan en el organismo un gran número de reacciones químicas.

Inhibidor enzimático: molécula química que interfiere con la actividad de las enzimas, impidiendo o disminuyendo su actividad.

Multidrogoresistencia: presencia de resistencia a dos o más clases de antibióticos.

Plásmido: molécula pequeña de DNA circular que a menudo se encuentra en bacterias, por lo general tienen un pequeño número de genes, de los cuales algunos pueden asociarse con la resistencia a antibióticos.

Quelante: molécula que forma complejos con iones de metales, antagonista de metales.

Resistencia antimicrobiana: capacidad de las bacterias de soportar los efectos de antibióticos destinados a su control o erradicación haciendo que pierdan su eficacia.

Sustrato: molécula sobre la cual tiene actividad una enzima.

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| ADP | Ácido dipicolínico |
| AFB | Ácido fenilborónico |
| Ago | Agosto |
| AK | Amikacina |
| AMC | Agar MacConkey |
| AMH | Agar Mueller Hinton |
| ASC | Agar sangre de carnero |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| AZT | Aztreonam |
| BLEE | Betalactamasas de espectro extendido |
| CAZ | Ceftazidime-avibactam |
| CENIAQ | Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados |
| CIP | Ciprofloxacino |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| COL | Colistina |
| dATP | Por sus siglas en inglés, Desoxiadenosina trifosfato |
| dCTP | Por sus siglas en inglés, Desoxicitidina trifosfato |
| dGTP | Por sus siglas en inglés, Desoxiguanosina trifosfato |
| DNA | Por sus siglas en inglés, Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Por sus siglas en inglés, Desoxinucleósido trifosfato |
| dTTP | Por sus siglas en inglés, Desoxitimidina trifosfato |
| DORY | Doripenem |
| DPA | Por sus siglas en inglés, Ácido dipicolínico |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Ácido etilenglicoltetraacético |
| eMIC | Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA |
| Ene | Enero |
| Feb | Febrero |
| FEP | Cefepime |
| g | Gramos |
| GES | Guiana extended-spectrum β -lactamase |
| GIM | German Imipenemase |
| GN | Gentamicina |
| IMI | Imipenemase |
| IMP | Imipenem-resistant Pseudomonas |
| IMPM | Imipenem |
| Jul | Julio |
| Jun | Junio |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase |
| L | Litros |
| LVX | Levofloxacino |

| | |
|-------------|--|
| M | Molar |
| Mar | Marzo |
| MBL | Metalo β -lactamasas |
| MHT | Por sus siglas en inglés, Test de Hodge modificado |
| MRP | Meropenem |
| mm | Milímetros |
| mL | Mililitros |
| MIC | Método de inactivación del carbapenémico |
| mM | Milimolar |
| mMIC | Método de inactivación del carbapenémico modificado |
| MIC plus | Método de inactivación del carbapenémico plus |
| MIC Tris | Método de inactivación del carbapenémico Tris |
| MIC Tris II | Método de inactivación del carbapenémico Tris II |
| MDR | Multi drogo resistente |
| MPM | Marcador de Peso Molecular |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| NAG | Ácido N-acetilglucosamina |
| NAM | Ácido N-acetilmurámico |
| NDM | New Delhi metallo- β -lactamase |
| NMC | Non metallo carbapenemase |
| Nov | Noviembre |
| Oct | Octubre |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OXA | Oxacilinas |
| Pb | Pares de bases |
| PBP | Por sus siglas en inglés, Proteínas de unión a penicilina |
| PBS | Por sus siglas en inglés, Solución salina amortiguada por fosfatos |
| PCR | Por sus siglas en inglés, Reacción en cadena de la polimerasa |
| PFGE | Electroforesis en Gel de Campo Pulsado |
| pmol | Picomol |
| R | Resistente |
| rMIC | Método de inactivación del carbapenémico rápido |
| RNA | Por sus siglas en inglés, Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| S | Sensible |
| SBL | Serino β -lactamasas |
| SME | <i>Serratia marcescens</i> enzyme |
| sMIC | Método de inactivación del carbapenémico simplificado |
| SPM | Sao Paulo metallo- β -lactamase |
| tMIC | Método de inactivación del carbapenémico Triton |
| TSB | Por sus siglas en inglés, Caldo de digerido de soja y caseína |
| TZP | Piperacilina-tazobactam |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| V | Volts |

| | |
|---------------|---|
| VIM | Verona integron-encoded metallo- β -lactamase |
| vol | Volumen |
| Zn | Zinc |
| μg | Microgramos |
| μl | Microlitros |

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenémicos es un importante patógeno nosocomial causante de diferentes tipos de infecciones asociadas a la atención de la salud que resultan difíciles de tratar debido a la alta resistencia intrínseca que presenta a diferentes grupos de antibióticos, aunado a su gran capacidad de desarrollar y adquirir distintos mecanismos que le confieren esta característica. Actualmente esta resistencia se ve mediada principalmente por la producción de carbapenemasas de diferentes tipos (Clase A, B o D), aunque también puede asociarse a otros mecanismos de resistencia como sobreexpresión de la β -lactamasa AmpC, expresión disminuida de porinas de tipo OprD o sobreexpresión de bombas de flujo.

La diseminación de este microorganismo constituye una importante amenaza para los sistemas de salud, siendo *Pseudomonas aeruginosa* productor de carbapenemasas el asociado a mayores tasas de mortalidad en todo el mundo; es por eso que para prevenir y controlar su propagación resulta de suma importancia llevar a cabo una rápida y oportuna identificación y por ende un tratamiento adecuado.

En el presente estudio se realizó la búsqueda y caracterización de carbapenemasas en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* por métodos fenotípicos y genotípicos, así como por métodos que involucran modificaciones a la prueba fenotípica mMIC basadas en métodos de liberación enzimática como alternativa estratégica de optimización.

Los resultados demuestran que la producción de carbapenemasas no es el principal mecanismo de resistencia en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, pese a esto, las carbapenemasas más frecuentes son Metallo β -lactamasas de tipo VIM, seguidas por Serino β -lactamasas de tipo GES. Así mismo, se demostró que al hacer modificaciones al método fenotípico estándar se detectó el total de cepas productoras de carbapenemasas de manera eficiente.

1. INTRODUCCIÓN

Los β -lactámicos constituyen una de las familias de antibióticos más grandes en cuanto a la cantidad de antimicrobianos que presentan, y comúnmente estos mismos son los más empleados en la práctica clínica como tratamiento de elección frente a infecciones causadas por patógenos MDR.

Su conformación química, la cual define su nombre, consta de un anillo β -lactámico que para estar activo tiene que estar unido a otros radicales (comúnmente a otros anillos); éstas diferentes uniones dan lugar a cinco agrupaciones, dentro de las cuales existen pequeñas alteraciones en la estructura química que son capaces de definir la afinidad por ciertos receptores, el espectro o la resistencia a las betalactamasas.¹ Dentro de estos grupos se encuentran los carbapenémicos, los cuales son los β -lactámicos con el mayor espectro de acción.

Pseudomonas aeruginosa representa un problema importante de salud en centros hospitalarios debido a que es considerado como uno de los principales patógenos nosocomiales oportunistas que tiene la capacidad de desarrollar principalmente cuatro mecanismos de resistencia diferentes, los cuales pueden asociarse con la resistencia a otro grupo de antibióticos, además de que es una bacteria que presenta una alta resistencia intrínseca a diferentes antibióticos.² Entre estos mecanismos se encuentra la producción de carbapenemasas, el cual actualmente es considerado como uno de los más importantes y más estudiados por su asociación con altas tasas de mortalidad en el mundo.³

La producción de carbapenemasas es un mecanismo de resistencia adquirida que aparece como consecuencia de mecanismos bioquímicos codificados por plásmidos, esto genera mayor gravedad al problema en cuanto a la resistencia, ya que estos elementos pueden favorecer la diseminación, así como la aparición de brotes nosocomiales.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1 Características generales

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo aerobio, no fermentador, indol negativo, oxidasa positivo y arginina positivo, puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C (**Tabla 1**); es fácilmente reconocible por sus características macroscópicas en medios habituales ya que la mayoría producen pigmentos difusibles y un olor a uva o tortilla. Sus colonias generalmente son planas, con bordes no uniformes y muestran iridiscencia, aunque en algunos casos se muestran lisas y mucosas (**Figura 1**).³

Tabla 1. Características para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.⁴

| | Oxidasa | Crecimiento a 42°C | Reducción de nitratos | Pigmento | Arginina | Lisina | Ornitina | Urea | Gelatina | Glucosa | Xilosa | Lactosa | Sacarosa | Maltosa | Manitol | Citrato de Simmons |
|-------------------------------|---------|--------------------|-----------------------|----------|----------|--------|----------|------|----------|---------|--------|---------|----------|---------|---------|--------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + |

* +, Positivo. -, negativo.

Sus condiciones nutrimentales y de temperatura le permiten adherirse y sobrevivir en equipos médicos y superficies hospitalarias lo que favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Estas infecciones son difíciles de erradicar debido a la elevada resistencia intrínseca que presenta, sin dejar a un lado su gran capacidad para adquirir resistencia a diversos antibióticos.⁵

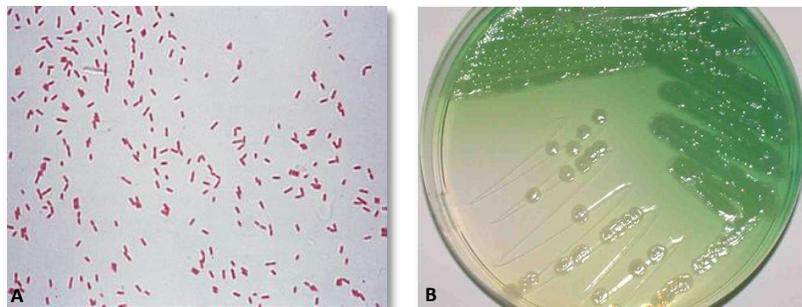


Figura 1. Características de *Pseudomonas aeruginosa*. **A.** Características microscópicas, bacilos Gram negativos. **B.** Características macroscópicas, presencia de pigmento (pioverdina) en agar Müller-Hinton.

2.1.2 Mecanismos de resistencia

2.1.2.1 Resistencia intrínseca

Pseudomonas aeruginosa presenta resistencia natural a diversos antimicrobianos de uso frecuente en la clínica diaria, como por ejemplo, a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda o tercera generación, cloranfenicol y fluoroquinolonas, entre otros (**Tabla 2**). Esta resistencia se asocia a que su membrana externa es una membrana semipermeable que permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y que presenta muy baja permeabilidad para compuestos hidrofóbicos, esta permeabilidad depende principalmente de porinas, las cuales son proteínas de membrana externa formadoras de poros de cierta especificidad y en menor medida a sistemas de transporte específicos como lo son las bombas de eflujo cuya contribución es el transporte de quinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprima y β -lactámicos.²

Tabla 2. Resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa*.⁶

| | Ampicilina / Amoxicilina | Ampicilina-Sulbactam | Amoxicilina-clavulanato | Cefotaxima | Ceftriaxona | Ertapenem | Tetraciclinas / Tigeciclina | Trimetoprima | Trimetoprima - Sulfametoxazol | Cloranfenicol |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------|------------|-------------|-----------|-----------------------------|--------------|-------------------------------|---------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |

*R, Resistente.

Es importante mencionar que *Pseudomonas aeruginosa* además de los mecanismos anteriormente mencionados, también presenta algunos otros mecanismos cromosómicos inducibles, como las β -lactamasas AmpC que generan resistencia a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefalosporinas, cefotaxima y ceftriaxona; y la enzima OXA-50 también conocida como *poxB*, la cual al parecer en condiciones normales no se expresa.⁷

2.1.3 Resistencia adquirida

Los mecanismos de resistencia adquiridos pueden asociarse a dos mecanismos: mutación de genes o transferencia horizontal de genes asociados a la resistencia de antibióticos.

La resistencia producida por mutaciones puede generar alteraciones genéticas que afectan a las vías de regulación de los mecanismos de resistencia intrínsecos,

produciendo un aumento de resistencia a varios niveles como la sobreexpresión de bombas de eflujo, la expresión disminuida de porinas OprD y la sobreexpresión de AmpC.⁸

Por otro lado, la resistencia debida a transferencia horizontal de genes esta codificada en plásmidos y puede dar lugar a mecanismos que confieren resistencia a diferentes antibióticos en función de los genes adquiridos, por ejemplo los genes que codifican para β -lactamasas de espectro extendido y los genes que codifican para carbapenemasas.

2.2 Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar el sitio activo de los β -lactámicos, como lo son los carbapenémicos (**Figura 2**), impidiendo así su actividad antimicrobiana. Los carbapenémicos son β -lactámicos de amplio espectro con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, cuyo mecanismo de acción al igual que el resto de antibióticos β -lactámicos, inhiben la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación, uniéndose al centro activo de enzimas transpeptidasas, situadas en la parte externa de la membrana citoplasmática, denominadas también como PBPs (**Figura 3**).^{9,10}

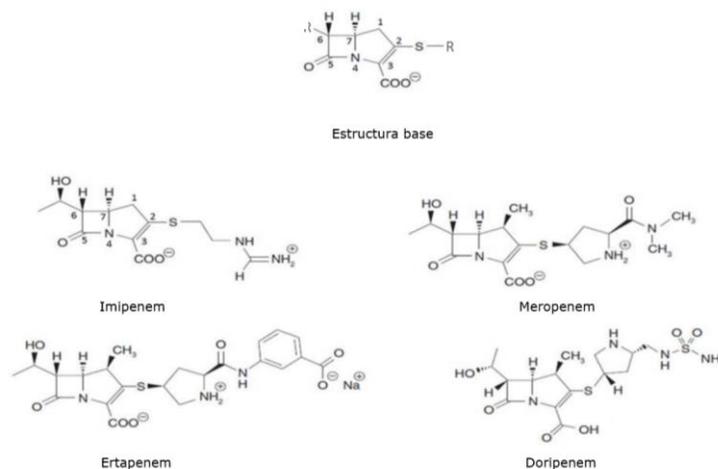
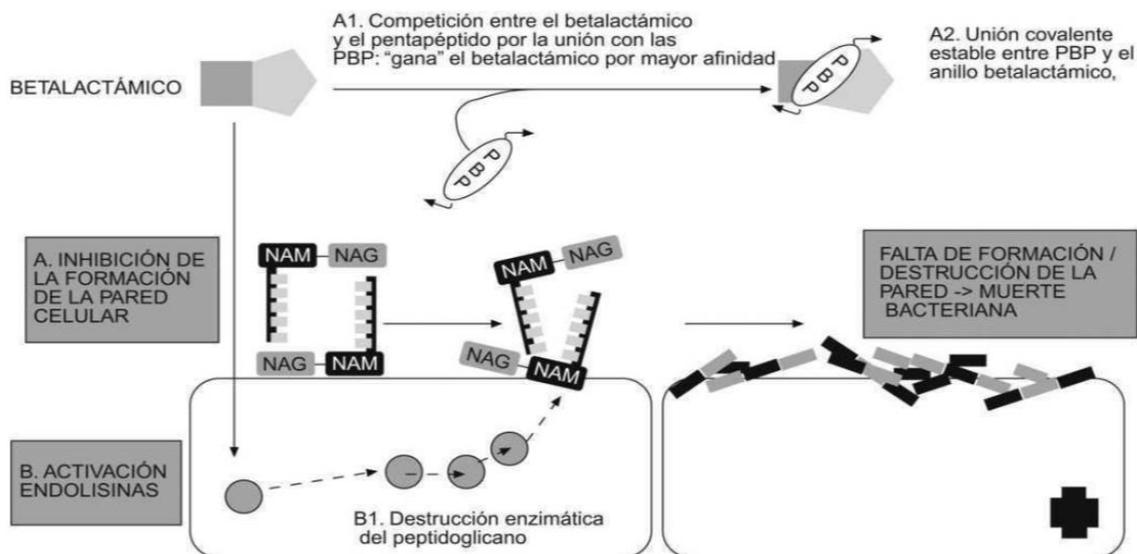


Figura 2. Estructura química de los carbapenémicos.

El uso habitual de los carbapenémicos ha llevado al aumento de la resistencia a estos antibióticos, principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* y en *Acinetobacter baumannii*, microorganismos en los que pueden estar involucrados múltiples mecanismos de resistencia, tanto enzimáticos como no enzimáticos, pero el mecanismo de resistencia que se ha considerado como uno de los principales asociado a mayores tasas de mortalidad en el mundo, principalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, son las carbapenemasas.¹¹



*NAM: ácido N-acetilmurámico, NAG: ácido N-acetilglucosamina, PBP: Penicillin Binding Protein.

Figura 3. Mecanismo de acción de los β -lactámicos.⁹

2.2.1 Clasificaciones

Para agrupar a estas enzimas existen dos tipos de clasificaciones, una propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros y la segunda propuesta por Ambler; ambas se basan en las diferentes características específicas de las enzimas que permiten agruparlas en cada una de las clases propuestas (**Tabla 3**).¹²

Tabla 3. Correlación general entre las clasificaciones para carbapenemasas.

| Ambler | Bush, Jacoby y Medeiros | Inhibición | | Carbapenemasa | Localización |
|--------|-------------------------|-------------------|------|------------------------|--------------|
| | | Ácido clavulánico | EDTA | | |
| A | 2f | Variante | No | KPC, GES | Plasmídica |
| B | 3a | No | Si | IMP, VIM, NDM | Plasmídica |
| D | 2df | Variante | No | OXA-40, OXA-48, OXA-23 | Plasmídica |

2.2.1.1 Clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros

Esta clasificación fue propuesta por Bush en 1989, posteriormente en 1995 fue revisada por Bush, Jacoby y Medeiros, pero la última actualización a esta clasificación se realizó en 2010 por Jacoby y Medeiros. Esta se basa principalmente en la afinidad que tienen estas enzimas por ciertos sustratos y en su capacidad de inhibirse por ciertas moléculas químicas, como lo son el ácido clavulánico y el EDTA. Esta clasificación es usada para todas las β -lactamasas en general, y se agrupan desde el número uno al tres, en donde el grupo uno presenta dos subgrupos: 1 y 1e, el dos a su vez tiene doce subgrupos entre los cuales se encuentran: 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e y 2f, y el grupo tres presenta dos subgrupos: 3a y 3b; cada subgrupo tiene afinidad por diferentes sustratos, pero las carbapenemasas únicamente se encuentran el grupo 2df, 2f y 3a (**Tabla 4**).

Tabla 4. Clasificación para carbapenemasas frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa* propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros.

| Grupo | Subgrupo | Inhibición | | Carbapenemasa |
|-------|----------|-------------------|------|------------------------|
| | | Ácido clavulánico | EDTA | |
| 2 | 2f | Variante | No | KPC, GES |
| | 2df | Variante | No | OXA-40, OXA-48, OXA-23 |
| 3 | 3a | No | Si | IMP, VIM, NDM |

2.2.1.2 Clasificación de Ambler

En 1980 Ambler propuso una clasificación para estas enzimas en función de la secuencia de aminoácidos y la actividad que presentan frente algunas moléculas químicas; esta clasificación se compone de cuatro clases en general para β -lactamasas: A, B, C y D, pero las carbapenemasas solo se encuentran en tres de estas clases: A, B y D (**Tabla 5**). Las carbapenemasas de clase A y de clase D, también son llamadas Serino β -lactamasas puesto que presentan serina en su sitio activo como aminoácido principal. Por otro lado, las carbapenemasas de clase B también son conocidas como Metallo β -lactamasas ya que requieren de uno o dos iones de zinc para llevar a cabo su actividad enzimática.¹³

Tabla 5. Clasificación de Ambler para las carbapenemasas frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa*.

| Clase | Nombre en base a la clasificación | Inhibición | Carbapenemasa |
|-------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| A | Serino β -lactamasas | Ácido clavulánico o por AFB | KPC, GES |
| B | Metalo β -lactamasas | EDTA, ácido dipicolínico | IMP, NDM, VIM |
| D | Serino β -lactamasas | No inhibidor | OXA-40, OXA-48, OXA-23 |

2.2.1.2.1 Carbapenemasas de clase A

Las carbapenemasas de clase A, que también forman parte del grupo 2f de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros, se han considerado como Serino β -lactamasas, ya que la secuencia de aminoácidos que presentan generalmente es serina-X-X-lisina. Estas enzimas se ven inhibidas generalmente por ácido clavulánico y ácido fenilborónico (**Tabla 5**). Dentro de esta clase se destacan cinco carbapenemasas: IMI, SME, NMC, KPC y GES, y sus respectivas variantes; IMI, SME y NMC nunca se han reportado en *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, KPC se describió por primera vez en 2006 en Colombia en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* y posteriormente dos de sus variantes se encontraron en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* KPC-2 y KPC-5 en Colombia y en Puerto Rico, respectivamente. Por otro lado, GES se describió por primera vez en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* en el 2000. Esta enzima como todas las carbapenemasas, tiene diferentes variantes, pero no todas tienen actividad hidrolítica en carbapenémicos; de las cuarenta y tres que se han descrito para GES, solo once presentan esta actividad contra carbapenémicos: GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-14, GES-15, GES-16, GES-18, GES-20, GES-21 y GES-24 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de las cuales, en *Pseudomonas aeruginosa* solo se han detectado dos variantes: GES-2 y GES-5.^{12,14}

Estas enzimas poseen una capacidad hidrolítica que abarca a todos los β -lactámicos pero su espectro de hidrólisis es menor en carbapenémicos y monobactámicos. En términos generales todas las Serino β -lactamasas operan bajo un mecanismo de acción que involucra varios pasos en donde se ve implicada la formación de un intermediario acil-enzima y posteriormente la destrucción hidrolítica del sustrato, que en este caso es el carbapenémico (**Figura 4**).^{15,16}

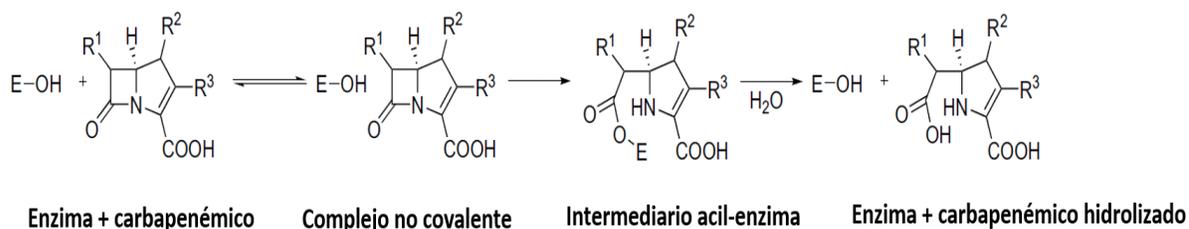


Figura 4. Mecanismo de acción de las enzimas Serino β -lactamasas sobre los carbapenémicos.

2.2.1.2.2 Carbapenemasas de clase B

Las carbapenemasas de clase B también son conocidas como Metalo β -lactamasas porque son enzimas que para llevar a cabo su actividad hidrolítica requieren de la unión a uno o dos equivalentes de zinc (**Figura 5**).¹³ Estas enzimas se consideran las más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa* debido a su amplia diseminación por todo el mundo y en diferentes microorganismos. Dentro de esta clase se encuentran tres subclases: B1, B2 y B3, que se diferencian por la secuencia de aminoácidos y los requerimientos de iones metálicos. La subclase B1 es la de mayor importancia clínica, cuyas enzimas presentan una secuencia de aminoácidos de tipo histidina-X-histidina-X-aspartato que posee un sitio de unión a zinc, es por eso que las moléculas que tienen actividad inhibidora para estas enzimas son los quelantes de metales como el EDTA (**Figura 9**) o el ácido dipicolínico.^{12,17} Dentro de esta clase se encuentran principalmente cinco tipos: NDM, VIM, IMP, SPM Y GIM. Para *Pseudomonas aeruginosa* las más frecuentes son IMP, seguidas por VIM y NDM. IMP se describió por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* en 1988 en Japón; actualmente existen 77 variantes distribuidas por todo el mundo (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).^{12,18}

Por su parte VIM, se detectó por primera vez en Verona en 1999 en un aislado de *Pseudomonas aeruginosa*, actualmente existen sesenta y seis variantes, todas con actividad hidrolítica en carbapenémicos, las cuales se han encontrado principalmente en Europa, en aislados como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y en Enterobacterias.¹⁸

NDM se detectó por primera vez en aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en 2009 en Nueva Delhi, India; siendo en Serbia, en 2011 la descripción del primer caso en *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁸

En cuanto al espectro de hidrólisis sobre los carbapenémicos, el de VIM e IMP son similares e incluso se consideran más amplios en comparación con el de NDM, aunque generalmente el perfil hidrolítico de estas enzimas abarca a la mayoría de los β -lactámicos con excepción del aztreonam.^{18,19}

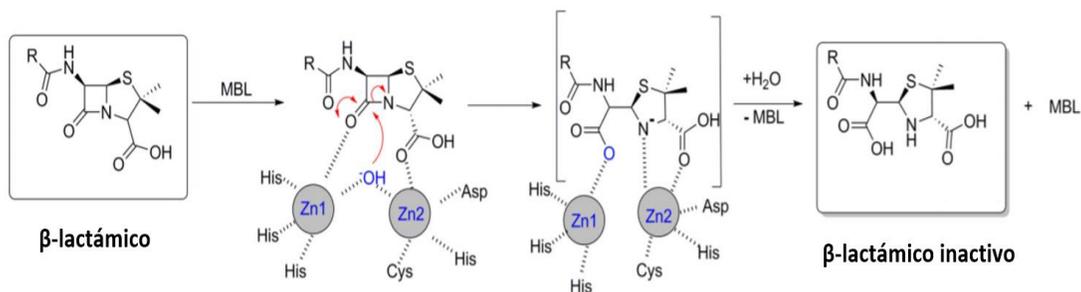


Figura 5. Mecanismo de acción de las Metallo β -lactamasas (MBL) sobre los β -lactámicos.¹⁹

2.2.1.2.3 Carbapenemasas de clase D

Las carbapenemasas de clase D, también llamadas oxacilinasas, al igual que las de clase A, se encuentran dentro de las Serino β -lactamasas ya que presentan como secuencia de aminoácidos serina-X-X- lisina, cuyo mecanismo de acción es igual que las de clase A (**Figura 4**).¹² Sin embargo, estas presentan baja actividad contra imipenem y una rápida hidrólisis de oxacilina (de ahí su nombre), algunas se ven inhibidas por NaCl y actualmente algunos estudios han propuesto una molécula llamada temocilina como un posible inhibidor especialmente para OXA-48 puesto que presenta una amplia actividad hidrolítica en comparación con las BLEE, AmpC e incluso algunas otras carbapenemasas.²⁰ Actualmente se han descrito alrededor de setecientos noventa y dos oxacilinasas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), pero no todas tienen actividad de carbapenemasa, algunas son plasmídicas y otras cromosómicas, por ejemplo, la OXA-50 también conocida como *poxB*, la cual es una OXA cromosómica descrita en 2004 en Francia en aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, que al parecer en condiciones normales no se expresa. De las oxacilinasas existen muchos subgrupos, en los cuales se encuentran las enzimas que tenga una similitud en su secuencia de aminoácidos de alrededor del 90%.⁷

Estas enzimas son encontradas principalmente en *Acinetobacter baumannii*; sin embargo, en *Pseudomonas aeruginosa* se describió por primera vez en España en el 2008 y se ha reportado como la más frecuente en este aislado, así como también se han encontrado otras como OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-198, entre otras.¹⁴

2.3 Métodos fenotípicos para la detección y clasificación de carbapenemasas

La búsqueda e incorporación de métodos fenotípicos cuyo objetivo principal es detectar y clasificar a estas enzimas, se ha vuelto un reto importante en los últimos años ya que se busca que estas técnicas sean más sensibles, específicas y que sean eficientes en cuanto al tiempo de interpretación, esto con el fin de permitir

mejorar los tiempos de respuesta, con resultados que son un gran aporte para el manejo y control de infecciones.

Actualmente existen diferentes tipos de pruebas para detectar la presencia de carbapenemasas, algunas de detección rápida, ya que su interpretación se puede realizar hasta en 2 h como el carba NP, y también existen métodos cuya interpretación se realiza a partir de 24 h, como el Test de Hodge Modificado (MTH) y el Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado (mMIC).²¹

En cuanto a la clasificación, se han recomendado métodos que se basan en la actividad inhibitoria que las enzimas presentan, como el Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado con EDTA para la búsqueda de MBL y prueba de inhibidores para carbapenemasas de clase A, clase B y clase D por descarte.²²

De estas pruebas, en la actualidad el MTH y la prueba con inhibidores, son los únicos métodos que no se describen en el CLSI; sin embargo, existen ciertas condiciones para los métodos recomendados por esta guía (**Tabla 6**) puesto que no todos se deberían emplear para ciertos microorganismos pues la sensibilidad y especificidad podría disminuir (**Tabla 8**).^{23,24}

Tabla 6. Evolución y recomendaciones de las pruebas para la detección de carbapenemasas recomendados por el CLSI.²³

| Periodo de tiempo | Recomendaciones en la guía M100 |
|-------------------|---|
| Pre-2000 | No hay recomendaciones específicas sobre las pruebas de resistencia a carbapenémicos. |
| 2000 | Reconocimiento de la amenaza KPC. Resultados clínicos para aislamientos con CIM's de carbapenémicos elevadas. |
| 2009 | Introducción de la prueba de Hodge Modificada (MHT) para aislamientos de Enterobacterias con CIM's de carbapenémicos elevados. Si la MHT es positiva, los laboratorios deben reportar todos los carbapenémicos como resistentes. |
| 2010 | Revisión de los puntos de corte para carbapenémicos en Enterobacterias. Cambio de recomendación de MHT a "opcional". |
| 2012 | Revisión de los puntos de corte para carbapenémicos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Introducción del carba NP para Enterobacterias, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter spp.</i> |
| 2014 | Revisión de los puntos de corte para carbapenémicos en <i>Acinetobacter spp.</i> |
| 2017 | Introducción de mMIC para Enterobacterias. |
| 2018 | Eliminación de MHT. Introducción del eMIC para Enterobacterias. Eliminación del carba NP para <i>Acinetobacter spp.</i> Introducción del mMIC para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . |

Este problema se ha convertido en un desafío de gran interés para la comunidad de microbiología clínica con respecto a las pruebas de detección, de hecho se han hecho revisiones sobre los cambios que han sufrido las pruebas recomendadas por el CLSI hasta 2018. En estas revisiones se han reportado modificaciones a los métodos que pueden ser prometedores para la detección oportuna y confiable de este mecanismo de resistencia (**Tabla 7**).

Tabla 7. Variaciones del Método de Inhibición del Carbapenémico reportadas en la literatura.²³

| Método | Descripción | Microorganismo(s) |
|--|--|--|
| MIC | Cosechar la asada del aislamiento de 10 µl de agar Müller-Hinton, suspender el aislamiento en 400 µl de agua, añadir un disco de Meropenem de 10 µg a la suspensión, incubar 2 h a 35°C. Retirar el disco, usarlo para la difusión en disco estándar de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, incubar la placa durante 6 h o toda la noche. | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| mMIC | Mayor sensibilidad para carbapenemasas de tipo OXA-48: Suspender 1 µl del aislado en TSB, incubar 4 h a 35°C. Incubar la placa de la difusión del disco por 18 h. | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| mMIC para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Aumento de la sensibilidad para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Inóculo de 10 µl para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| MIC Plus | Adición de inhibidores (EDTA, ácido fenilborónico) al agua para diferenciar las clases de carbapenemasas según Ambler. | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| sMIC | Simplicidad mejorada: Uso de disco de imipenem de 10 µg, inóculo directamente en el disco en TSB. Sin incubación previa del disco, prueba de difusión de disco. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> |
| tMIC | Rendimiento mejorado para <i>Acinetobacter spp.</i> : Célula permeabilizada agregando 0.1% (vol / vol) de triton X-100 a TSB, Uso de 10 µl del aislado de prueba. | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| MIC Tris | Detección mejorada en <i>Acinetobacter spp</i> y <i>Pseudomonas spp</i> : Uso del buffer Tris-HCl para extraer carbapenemasas de la célula. | <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| MIC Tris II | Detección mejorada en <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Disco de meropenem de 5 µg y 5 µl de inóculo. Uso de buffer Tris-HCl. Tiempo de incubación de 1 h. | <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> |
| rMIC | Detección más rápida (2.5 h) de carbapenemasas: Uso de 20 µl de inóculo previamente incubado por toda la noche, homogeneizar en 1 ml de agua estéril, agregar 2 discos de meropenem de 10 µg, incubar 30 min a 37°C, cosechar células por centrifugación, añadir y mezclar 500 µl de sobrenadante con 2.5 ml de 1 McFarland de suspensión de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en TSB. Incubar a 37°C durante 1.5–2 h. Evaluar el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> usando un nefelómetro. | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| eMIC | Diferenciación de carbapenemasas de clase B añadiendo EDTA al mMIC. | <i>Enterobacteriaceae</i> |

| | | |
|-------------------------|--|---------------------------|
| MIC automatizado | Las placas se impregnan en Becton Dickinson Kiestra™ Work Cell, se incuban y los diámetros son evaluados utilizando el programa ReadA. | <i>Enterobacteriaceae</i> |
|-------------------------|--|---------------------------|

Tabla 8. Comparación de sensibilidades y especificidades por método para la detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*.²⁴

| Método de detección de carbapenemasas | Sensibilidad | Especificidad |
|---------------------------------------|--------------|---------------|
| MHT | 95% | 91% |
| mMIC | 98% | 95% |
| Carba NP | 96% | 90% |
| MIC Tris | 98% | 93% |

2.3.1 Detección fenotípica de carbapenemasas

2.3.1.1 Método de inactivación del carbapenémico modificado (mMIC)

Este método se basa en la capacidad de la enzima de hidrolizar el sitio activo del carbapenémico, impidiendo que lleve a cabo su actividad antimicrobiana (**Figura 6**). Esta técnica tiene una sensibilidad del 98% y una especificidad de alrededor del 95% para *Pseudomonas aeruginosa*.^{10,24}

La prueba consiste básicamente en inocular 10 µl de la cepa problema en 2000 µl de caldo TSB, agregar un disco de 10 µg de meropenem e incubarlo durante 4 h, posteriormente sacar el disco impregnado y colocarlo en una placa de AMH previamente inoculada con una suspensión al 0.5 McFarland de *Escherichia coli* ATCC 25922. La placa se incuba durante 24 h a 37°C y posteriormente se realiza su interpretación (**Figura 6**).⁶

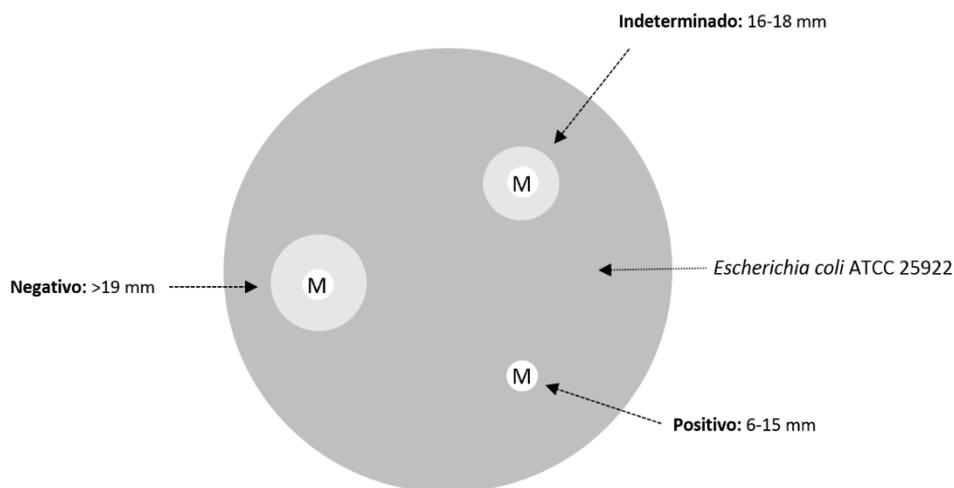


Figura 6. Representación esquemática del Método de inactivación del carbapenémico modificado. *M: Meropenem.

2.3.1.2 Carba NP

Carba NP es un método colorimétrico rápido de detección de carbapenemasas, ya que su interpretación puede llevarse hasta en 2 h de incubación (**Figura 7**). De la misma manera que la mayoría de los métodos de detección de carbapenemasas, se basa en la capacidad de la enzima de hidrolizar el sitio activo del sustrato que en este caso es imipenem. Esta prueba contiene un buffer de lisis que ayuda a promover la liberación enzimática acelerando así el tiempo de detección. A pesar de que es un método rápido, al ser colorimétrico su interpretación puede resultar subjetiva al criterio del operador, además de que este método tiene una menor sensibilidad y especificidad en comparación con el mMIC (96% y 90%, respectivamente), sobre todo para carbapenemasas de clase D, es por eso que en *Acinetobacter baumannii* no se recomienda puesto que en este microorganismo son las carbapenemasas más frecuentes.^{24,25}

La técnica es muy sencilla pues para cada cepa problema, se añaden a tubos Eppendorf por duplicado 150 µl de buffer Tris-HCl, pH 7.4; se inocula la cepa y se homogeniza la muestra en vórtex durante 5 segundos. Posteriormente, se agregan 150 µl a un tubo de la solución A, la cual contiene sulfato de zinc heptahidratado 10 mM y rojo de fenol al 0.5%, este tubo es el control negativo para la prueba y este se identifica como tubo A; al segundo tubo se agregan 150 µl de la solución B, la cual contiene lo mismo que la solución A más el carbapenémico, que en este caso es imipenem, este se identifica como tubo B. Se incuban los tubos durante 2 h a 37°C, haciendo lecturas a los 0, 30, 60, 90 y 120 min; durante estos tiempos se puede ir visualizando una posible hidrólisis, pero la interpretación definitiva se realiza a las 2 h comparando el tubo A (control negativo) con el tubo B (**Figura 7**).⁶



Figura 7. Representación esquemática del carba NP.⁶*A: control negativo, B: tubo problema.

2.3.2 Clasificación fenotípica de carbapenemasas

2.3.2.1 Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA (eMIC)

Esta prueba es empleada para detectar la presencia de carbapenemasas de clase B o también llamadas MBL. Se basa en la utilización de quelantes metálicos para que de esta manera se inactive la enzima dependiente de zinc para llevar a cabo su actividad hidrolítica contra los carbapenémicos (**Figura 8**); como quelante en esta prueba se usa el EDTA, pero también se han reportado otros inhibidores como el DPA.¹⁷

El método es relativamente sencillo puesto que en un tubo Eppendorf se colocan 1980 μ l de caldo TSB y 10 μ l de EDTA al [0.5 M] (concentración final 5 mM de EDTA), posteriormente se inoculan 10 μ l de la cepa problema, se agrega un disco de 10 μ g de meropenem y se incuba durante 4 h, después el disco impregnado se saca y se coloca en una placa de AMH previamente inoculada con una suspensión al 0.5 McFarland de *Escherichia coli* ATCC 25922. La placa se incuba durante 24 h a 37°C y finalmente se puede realizar la interpretación. Regularmente esta prueba se realiza al mismo tiempo que el mMIC, puesto que su interpretación se hace con referencia al diámetro obtenido para esta prueba (**Figura 8**).⁶

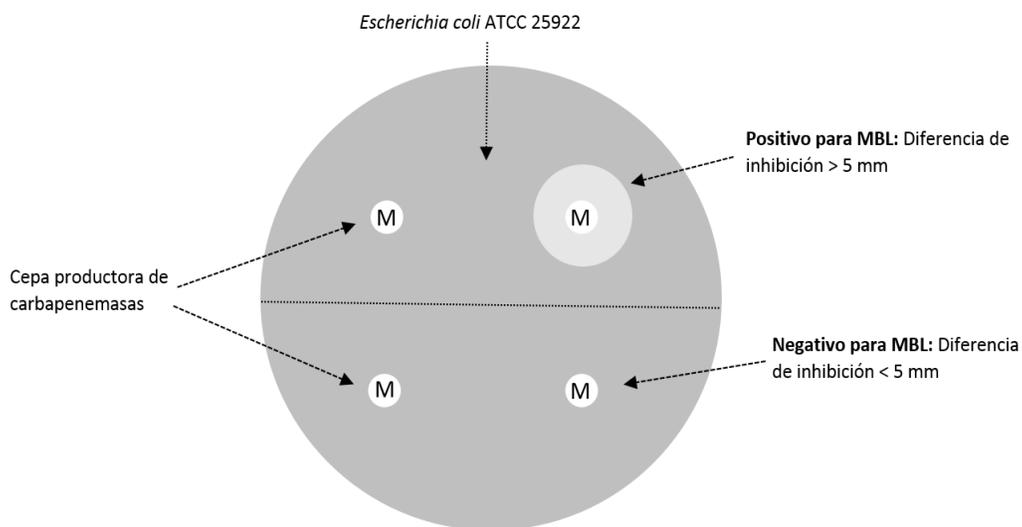


Figura 8. Representación esquemática del Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA. *M: Meropenem.

2.3.2.2 Prueba con inhibidores

Esta prueba emplea diferentes inhibidores para la caracterización de las distintas clases de enzimas según la clasificación de Ambler. Entre estos inhibidores se encuentra el AFB, la cloxacilina y el EDTA (**Figura 9**). Las carbapenemasas de clase A se ven inhibidas por AFB y no por Cloxacilina, mientras que las carbapenemasas de clase B se inhiben por EDTA. El mecanismo por el que actúan el AFB y la cloxacilina es por una inhibición competitiva de la enzima con el inhibidor por el sitio activo del carbapenémico (**Figura 10**); en el caso del EDTA, el mecanismo se conoce como una inhibición no competitiva ya que el inhibidor no bloquea la unión del sustrato con el sitio activo, pero puesto que el EDTA es un quelante, aísla el catión divalente de Zn^{2+} de estas enzimas, el cual actúa como cofactor en estas enzimas, impidiendo así que lleven a cabo su actividad (**Figura 10**).²⁶

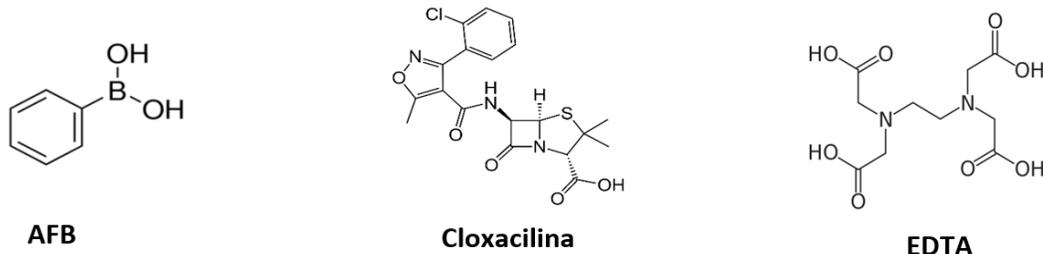


Figura 9. Estructura química de los inhibidores empleados en la prueba con inhibidores para la caracterización de carbapenemasas.^{27,28,29}

Esta prueba también puede caracterizar a las enzimas de clase C de Ambler, las cuales son β -lactamasas y se inhiben con AFB y Cloxacilina; de igual forma las carbapenemasas de clase D, ya que si por métodos de detección se evidencia la presencia de carbapenemasas y al momento de clasificarla por este método no se inhibe con alguna de las moléculas empleadas, por descarte se puede sospechar de una enzima de clase D.^{30,31}

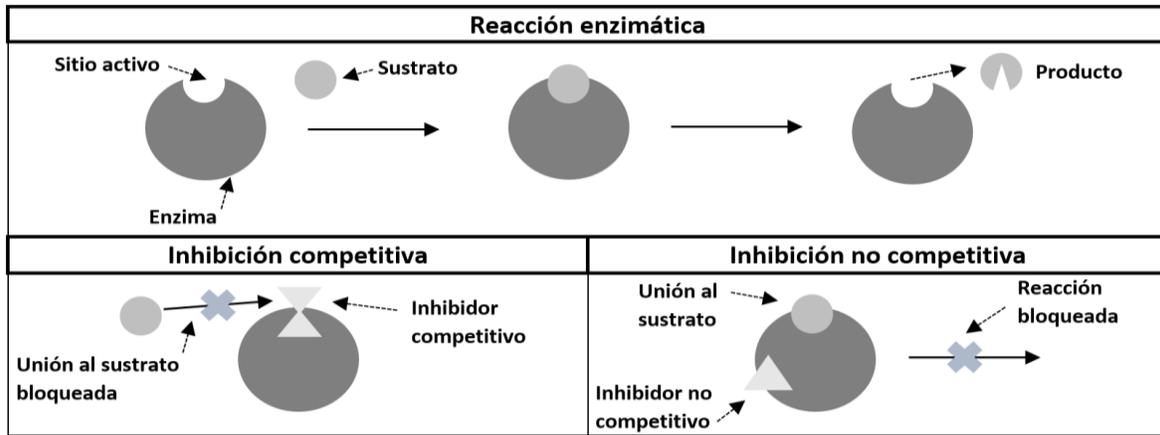
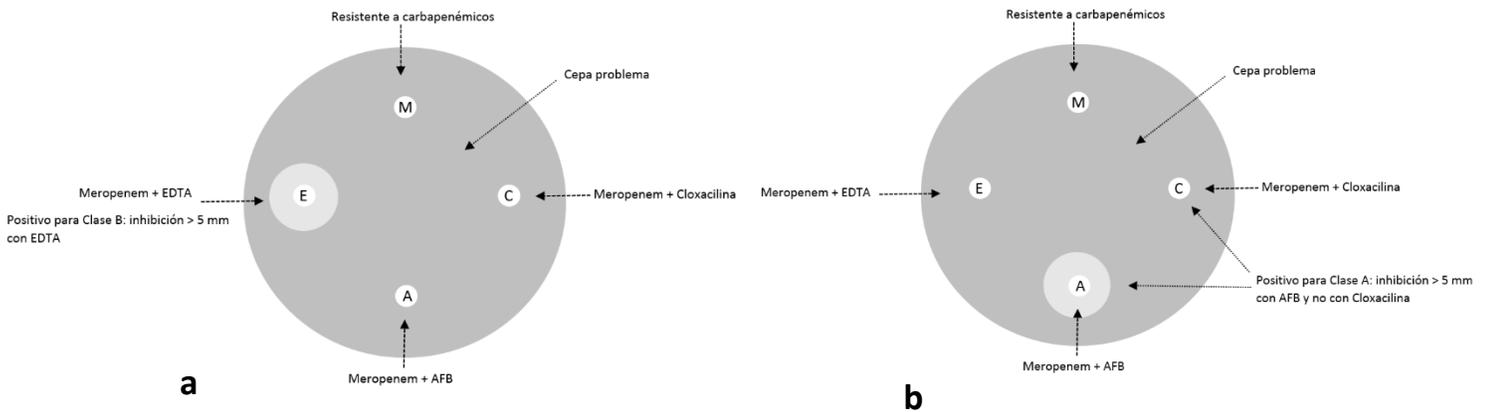


Figura 10. Tipos de inhibición enzimática; inhibición competitiva e inhibición no competitiva.

El método consiste en emplear cuatro discos de meropenem de 10 µg, tres de ellos previamente impregnados con 10 µl de cada solución inhibitoria (AFB, cloxacilina y EDTA), y el cuarto disco, sin inhibidor, se emplea como referencia. Se realiza una suspensión al 0.5 McFarland de la cepa problema, esta se inocula en placas de agar Müller-Hinton, según el método de difusión en disco.³² Posteriormente, en cada placa se colocan en cada cuadrante los tres discos impregnados con los diferentes inhibidores y el disco control; se incuban por 24 h a 37°C y se procede a realizar la interpretación (**Figura 11**).



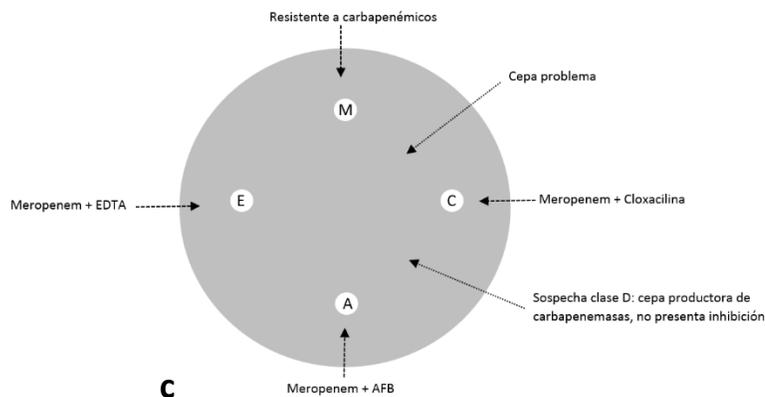


Figura 11. Representación esquemática de la prueba con inhibidores. **a.** Prueba positiva para carbapenemasas de clase B, **b.** Prueba positiva para carbapenemasas de clase A, **c.** Prueba sugerente para carbapenemasas de clase D. *M: Meropenem, E: EDTA, A: AFB, C: cloxacilina.

2.4 Detección genotípica de carbapenemasas

A pesar de que actualmente existen técnicas fenotípicas para la detección de carbapenemasas, es importante comprobar estos resultados con técnicas de biología molecular que son consideradas como el estándar de oro en la detección de carbapenemasas, así como en la identificación y vigilancia de muchos otros mecanismos de resistencia y es que estas técnicas ofrecen altas sensibilidades y especificidades, lo que hace que los resultados sean altamente confiables.

Existen diferentes técnicas aplicadas al diagnóstico bacteriano como PCR punto final y PCR en tiempo real; estas técnicas tienen como objetivo producir suficiente DNA, generando la amplificación de regiones específicas de un determinado gen para que pueda analizarse.³³

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud que va en aumento en todo el mundo. En febrero del 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la cual aparece *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente como prioridad crítica puesto que ha adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos, principalmente imipenem y meropenem, los cuales son los antibióticos β -lactámicos con un mayor espectro de acción. Se considera esta resistencia va en aumento debido a que este patógeno oportunista nosocomial posee la extraordinaria capacidad de desarrollar diferentes mecanismos de resistencia, entre ellos, la sobreproducción de bombas de eflujo, la expresión disminuida de porinas, la sobreexpresión de la β -lactamasa AmpC y la producción de carbapenemasas, este último mecanismo, actualmente está asociado con las mayores tasas de mortalidad en el mundo.

4. JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los principales microorganismos aislados en muestras clínicas de pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, representa un patógeno oportunista nosocomial que ha adquirido resistencia a antibióticos de última elección, como lo son los carbapenémicos. Por ello, la detección de carbapenemasas como mecanismo asociado a mayores tasas de mortalidad en el mundo, es de suma importancia para poder prevenir la transmisión nosocomial y llevar a cabo de manera oportuna la detección y control de brotes.

La disponibilidad de pruebas de detección de carbapenemasas precisas y simples puede ofrecer un incentivo para que los laboratorios y hospitales monitoreen de cerca este problema. Para esto, resulta necesario identificar y describir el comportamiento de este mecanismo de resistencia, con la finalidad de contar con información y herramientas para el posible desarrollo de blancos terapéuticos que permitan el tratamiento y la erradicación de infecciones causadas por este patógeno.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar la caracterización fenotípica y genotípica de carbapenemasas presentes en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos obtenidos del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.

5.2 Objetivos particulares

1. Comprobar la presencia de carbapenemasas en cada aislado mediante los métodos de mMIC y carba NP; y comparar los resultados de ambos métodos.
2. Identificar fenotípicamente la clase de carbapenemasa presente en cada aislado mediante eMIC y prueba de inhibidores.
3. Caracterizar genotípicamente la carbapenemasa presente.
4. A partir de los resultados genotípicos, hacer modificaciones al método estándar para identificar la presencia de carbapenemasas (mMIC) con base en métodos de liberación enzimática para optimizar el método.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo descriptivo y transversal.

6.2 Ubicación espacial y temporal

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Infectología del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, con aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de un periodo de agosto del 2011 a julio del 2018.

6.3 Criterios de selección de muestras

6.3.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* que presentarán resistencia al menos a un carbapenémico, obtenidos de abscesos, aspirados, biopsias, hemocultivos, puntas de catéter y urocultivos; se eligió un aislado por paciente que proviniera de la muestra con mayor importancia clínica.

6.3.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos provenientes de hisopados.

6.4 Metodología

6.4.1 Aislados clínicos

Se seleccionaron de la base de datos del cepario del Laboratorio de Infectología 192 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos previamente identificados por pruebas bioquímicas y el sistema semiautomatizado Vitek 2®, cuya susceptibilidad se obtuvo del mismo y se comprobó la resistencia a carbapenémicos por microdilución en caldo.

6.4.2 Pruebas de pureza y viabilidad

Los aislados se recuperaron del cepario de infectología en el cual se encuentran conservados en caldo Müeller-Hinton con glicerol al 5% a -70°C. Se comprobó la viabilidad de las cepas sembrándolas en agar sangre de carnero al 5% el cual es un medio enriquecido, y su pureza sembrándolas en un medio selectivo y diferencial para bacilos Gram negativos como lo es el agar MacConkey, se incubaron a 37°C por 24 h. Los aislados que se mostraron puros en agar MacConkey, se resembraron en agar sangre de carnero y se sometieron a incubación.

6.4.3 Pruebas de confirmación para la identificación de cepas

1. Se confirmó la identificación de los aislados mediante pruebas rápidas de identificación como lo son indol rápido y oxidasa, en donde para este microorganismo se obtiene un resultado negativo y positivo, respectivamente.
2. Se sometieron a la prueba de crecimiento a 42°C en agar Müeller-Hinton.
3. Se sembraron en agar Müeller-Hinton, para observar la posible presencia de pigmento.

6.4.4 Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas

6.4.4.1 Método de inactivación del carbapenémico modificado (mMIC)

Cada aislado se sometió al mMIC siguiendo los protocolos del CLSI 2017 (reduciendo a la mitad los volúmenes sugeridos, conservando las concentraciones finales), empleando como control positivo *Enterobacter cloacae* BAA-ATCC 2468, cepa productora de Metalo β -lactamasa (NDM), y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922, la cual es una cepa susceptible, por ende, no productora de carbapenemasas.⁶

Por cepa problema, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadió 1.0 mL de TBS en el cual posteriormente se inoculó con una asa calibrada de 10 μ l el aislado microbiológico previamente sembrado en una placa de ASC e incubado por 24 h a 37°C; se homogenizó la muestra y se colocó un disco de meropenem de 10 μ g. Se incubaron los tubos durante 4 h a 37°C. Quince minutos antes de que terminara el tiempo de incubación, se impregnaron placas de agar Müeller-Hinton, con una suspensión al 0.5 McFarland de la cepa susceptible, *Escherichia coli* ATCC 25922, según el método de difusión en disco.³² Posteriormente, se colocaron en la placa previamente impregnada, los discos obtenidos de la suspensión con ayuda de un aplicador de madera, presionando el disco en las paredes del tubo para retirar los excesos del medio y se incubaron durante 24 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de

incubación, se midió el halo de inhibición y se llevó a cabo la interpretación de la prueba de acuerdo a las recomendaciones del CLSI 2017 (**Figura 12**).⁶

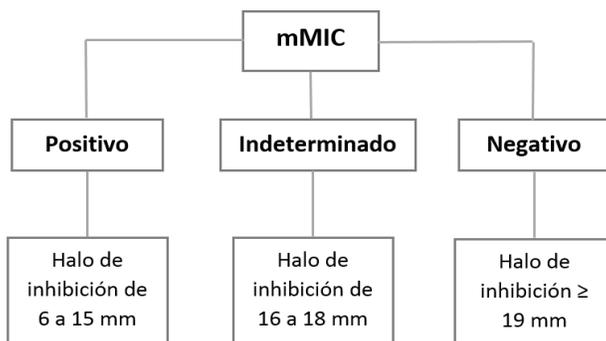


Figura 12. Interpretación del método de inactivación del carbapenémico modificado.

6.4.4.2 Prueba Carba NP

Todos los aislados se sometieron al método de Carba NP siguiendo los protocolos del CLSI 2017, empleando como controles los mismos aislados bacterianos del mMIC.⁶

Para cada cepa problema, se añadieron por duplicado 150 μ l de buffer Tris-HCl, pH 7.4, a tubos Eppendorf de 500 μ l; se inoculó la cepa proveniente de ASC y se homogenizó la muestra en vórtex durante 5 s. Posteriormente, se agregaron 150 μ l a un tubo de la solución A, la cual contiene sulfato de zinc heptahidratado 10 mM y rojo de fenol al 0.5%, este tubo es el control negativo para la prueba y este se identificó como tubo A; al segundo tubo se añadieron 150 μ l de la solución B la cual contiene lo mismo que la solución A más el carbapenémico, que en este caso es imipenem, este se identificó como tubo B. Se incubaron los tubos durante 2 h a 37°C, haciendo lecturas a los 0, 30, 60, 90 y 120 min, cuya interpretación final fue a los 120 min (**Figura 13**).⁶

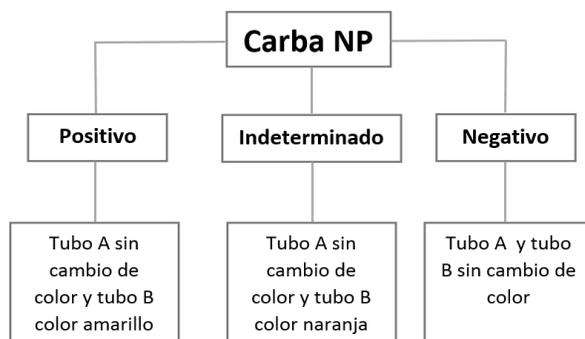


Figura 13. Interpretación de la prueba colorimétrica carba NP.

6.4.5 Pruebas fenotípicas para la caracterización de carbapenemasas

6.4.5.1 Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA (eMIC)

Este método se llevó a cabo para todos los aislados siguiendo los protocolos del CLSI 2017 (reduciendo a la mitad los volúmenes sugeridos, conservando las concentraciones finales), empleando los mismos controles que en los métodos anteriores.⁶

Por cepa problema, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 990 μ L de TBS más 10 μ L de EDTA [0.5 M], en el cual con una asa calibrada de 10 μ L se inoculó el aislado microbiológico previamente sembrado en ASC e incubado a 37°C por 24 h, se homogenizó la muestra y se colocó un disco de meropenem de 10 μ g. Se incubaron los tubos durante 4 h a 37°C. Quince minutos antes de que terminara el tiempo de incubación, se impregnaron placas de agar Müller-Hinton, con una suspensión al 0.5 McFarland de la cepa susceptible, *Escherichia coli* ATCC 25922, según el método de difusión en disco.³² Posteriormente, de la misma manera que en el mMIC, se colocaron en la placa previamente impregnada los discos obtenidos de la suspensión y se incubaron durante 24 h a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el halo de inhibición y se llevó a cabo la interpretación de la prueba con base a los resultados obtenidos para el mMIC de acuerdo a las recomendaciones del CLSI 2017 (Figura 14).⁶

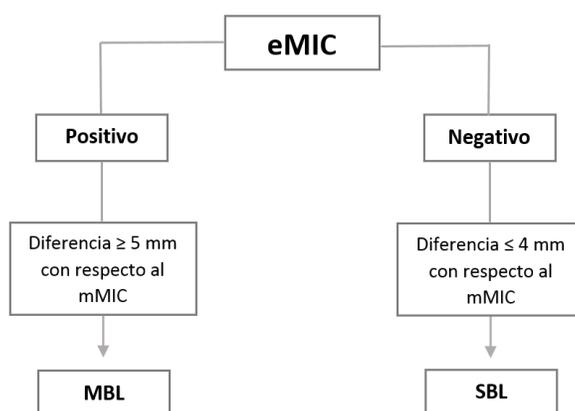


Figura 14. Interpretación del Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA.

6.4.5.2 Prueba con inhibidores

Esta prueba se realizó en todos los aislados empleando tres soluciones inhibitoras diferentes: cloxacilina [500 μ g/ml], [AFB 400 μ g/ml] y EDTA [0.5 M].^{22,30}

Para cada aislado se emplearon cuatro discos de meropenem de 10 µg, tres de ellos se impregnaron con 10 µl de cada solución inhibidora por separado 15 min antes de llevar a cabo la prueba, y el cuarto disco, sin inhibidor, se empleó como referencia. Se realizó una suspensión con cada aislado al 0.5 McFarland, la cual se inoculó en placas de agar Müller-Hinton, según el método de difusión en disco.³² Posteriormente, en cada placa inoculada se colocaron en cada cuadrante, los tres discos impregnados con los diferentes inhibidores y el disco control. Se incubaron por 24 h a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición y después se llevó a cabo la interpretación de los resultados (**Figura 15**).

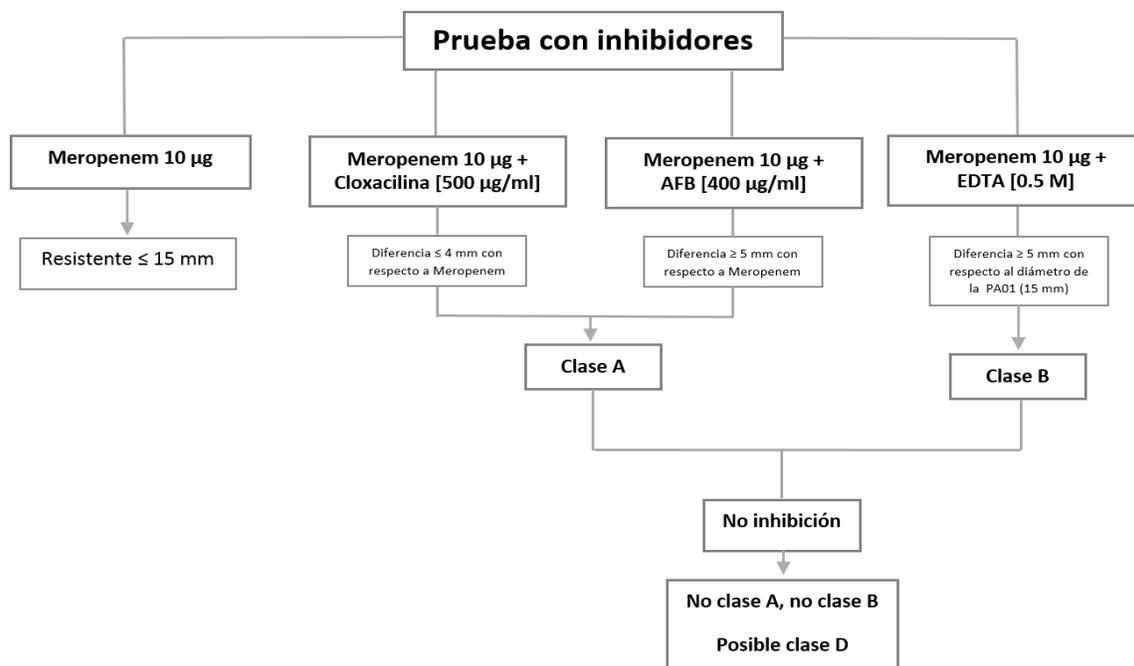


Figura 15. Interpretación de la prueba con inhibidores para la clasificación fenotípica de carbapenemasas.

6.4.6 Pruebas genotípicas para la tipificación de carbapenemasas

6.4.6.1 Extracción de DNA

Los aislamientos se sembraron en ASC y se incubaron por 24 h a 37°C; posteriormente se extrajo el DNA mediante choque térmico. Por aislado microbiológico, en un tubo Eppendorf de 500 µl se agregaron 200 µl de PBS 1X, se suspendió una colonia del aislamiento bacteriano y se homogenizó la muestra; después cada tubo se incubó a 94°C durante 25 min y se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 min a 4°C. Una vez que se centrifugaron las muestras, se retiró el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf; realizado este procedimiento, se conservaron las extracciones a -20°C.

6.4.6.2 Amplificación por PCR punto final

Se llevó a cabo la tipificación, así como la confirmación de la presencia de MBL incluyendo los genes *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, así mismo SBL incluyendo los genes *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}* y *bla_{OXA-48}* por PCR punto final. La técnica consistió en hacer la mezcla de reacción, la cual contenía 1.25 µl de ThermoPol® reaction buffer 1X (suplementado con MgSO₄ [2 mM]) New England BioLabs®, 0.30 µl de una mezcla de dNTP's [0.2 mM] (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) Invitrogen®, 0.07 µl de *Taq* DNA polimerasa New England BioLabs®, 0.30 µl de cada oligonucleótido [10 pmol] (F y R) T4Oligo® (**Tabla 9**), 7.28 µl de agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas Sigma- Aldrich® y 3.00 µl de DNA para tener un volumen final de 12.50 µl.

La amplificación se realizó mediante un programa que consistía en tres etapas; la primera comprendió 1 ciclo de 1 min a 95°C, la segunda 32 ciclos de 30 s a 95°C, 15 s a la temperatura requerida para cada par de oligonucleótidos (**Tabla 10**) y 45 segundos a 68°C, por último la tercer etapa, en 1 ciclo de 5 minutos a 68°C.

Los productos de la PCR se separaron por la técnica de electroforesis en gel,³⁴ en la cual se empleó un gel de agarosa al 10% cargado con 4 µl de SYBR Green y 10 µl de la muestra, se dejó correr a 100 V durante una hora.³³

Tabla 9. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la identificación de carbapenemasas.

| Gen | Secuencia de oligonucleótidos | Tamaño del amplicón (pb) | Control de amplificación |
|------------------------------|--|--------------------------|---|
| <i>bla</i> _{NDM} | F: 5´- GGC GGAATGGCTCATCACGA-3´ | ~600 | <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC-BAA 2468 |
| | R: 5´- CGCAACACAGCCTGACTTTC-3´ | | |
| <i>bla</i> _{IMP} | F: 5´- GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT-3´ | ~400 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | R: 5´- GGAATAGAGTGGCTTAATTCT-3´ | | |
| <i>bla</i> _{VIM} | F: 5´- AGTGGTGAGTATCCGACAG-3´ | ~400 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | R: 5´- ATGAAAGTGC GTGGAGAC-3´ | | |
| <i>bla</i> _{KPC} | F: 5´- TTTTCAGAGCCTTACTGCCC-3´ | 798 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC—BAA 1705 |
| | R: 5´- ATGTCACTGTATCGCCGTGT-3´ | | |
| <i>bla</i> _{GES} | F: 5´- TCATTCACGCHCTATTVCTGGCA-3´ | 857 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | R: 5´- CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3´ | | |
| <i>bla</i> _{OXA-23} | F: 5´- GATCGGATTGGAGAACCAGA-3´ | ~300 | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| | R: 5´- ATTTCTGACCGCATTTCAT-3´ | | |
| <i>bla</i> _{OXA-40} | F: 5´- GGAATTCCATGAAAAATTTATACTTCC-3´ | 400 | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| | R: 5´- CGGGATCCCGTTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGCG-3´ | | |
| <i>bla</i> _{OXA-48} | F: 5´- CCAAGCATTTTTACCCGCATCKAC-3´ | 438 | <i>Escherichia coli</i> |
| | R: 5´- GYTTGACCATACGCTGRCTGC-3´ | | |

Tabla 10. Temperatura requerida para la amplificación de cada gen por PCR punto final.

| Gen | Temperatura (°C) |
|------------------------------|------------------|
| <i>bla</i> _{NDM} | 56 |
| <i>bla</i> _{IMP} | 52 |
| <i>bla</i> _{VIM} | 56 |
| <i>bla</i> _{KPC} | 56 |
| <i>bla</i> _{GES} | 58 |
| <i>bla</i> _{OXA-23} | 56 |
| <i>bla</i> _{OXA-40} | 56 |
| <i>bla</i> _{OXA-48} | 56 |

6.4.7 Modificaciones a los métodos sugeridos para la detección fenotípica de carbapenemasas

6.4.7.1 Aislados microbiológicos

Partiendo de los resultados obtenidos por las pruebas genotípicas, los aislados clínicos se recuperaron del cepario del Laboratorio de Infectología sometiendo a los mismos a estrés metabólico, suspendiendo el aislado en 1.0 mL de caldo Müller-Hinton con un disco de meropenem de 10 µg, se incubó por 24 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se sembraron los aislados en una placa de Agar MacConkey y Agar Müller-Hinton, ambos con una concentración 8 µg/mL de doripenem, de igual manera se incubaron a 37°C por 24 h; de esta manera se confirmó la pureza y viabilidad de las mismas.

6.4.7.2 Pruebas fenotípicas para la detección y caracterización de carbapenemasas

Se repitieron el Método de inactivación del carbapenémico modificado, el Método de inactivación del carbapenémico modificado con EDTA y la prueba con inhibidores para los aislados positivos genotípicamente y sometidos previamente a estrés metabólico, siguiendo los protocolos descritos en el apartado 6.4.4.1, 6.4.5.1 y 6.4.5.2 respectivamente.^{22,30}

6.4.7.3 Liberación enzimática por sonicación

Este método se realizó en todos los aislados previamente caracterizados genotípicamente. Se emplearon los mismos controles para el mMIC.⁶

En tubos Eppendorf de 1.5 mL, se añadió 1.0 mL de TBS en el cual se inocularon los aislados con una asa calibrada de 10 µl a partir de ASC, se homogenizó la muestra en un vórtex y se sonicaron a 130 W a una amplitud del 45% tres veces por 10 s, esperando 5 s entre cada repetición. Posteriormente, se colocó un disco de meropenem de 10 µg y se incubaron 4 h a 37°C.

15 min antes de que terminara el tiempo de incubación, se impregnaron placas de agar Müller-Hinton con una suspensión al 0.5 McFarland de la cepa susceptible (*Escherichia coli* ATCC 25922) según el método de difusión en disco.³² Posteriormente, se colocaron en la placa los discos obtenidos de las suspensiones y se incubaron durante 24 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el halo de inhibición y se llevó a cabo la interpretación de la prueba (**Figura 16**).

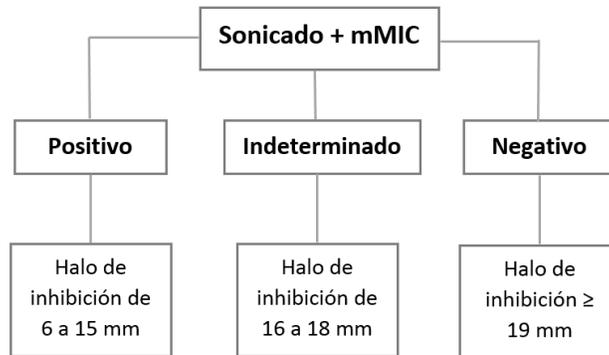


Figura 16. Interpretación del Método de inactivación del carbapenémico modificado con sonicado.

6.4.7.4 Liberación enzimática por choque osmótico

De la misma manera que el método anteriormente descrito, se realizó en los mismos aislados, empleando los mismos controles.⁶

En tubos Eppendorf de 1.5 mL se añadió 1.0 mL de TBS preparado con NaCl a una concentración de 0.5 M, con ayuda de una asa calibrada de 10 µl se inocularon las cepas problema partir de ASC, se homogenizó la muestra, se añadió un disco de meropenem de 10 µg a cada tubo y se incubaron a 37°C por 4 h. 15 min antes de concluir con el tiempo de incubación, se impregnaron las placas de Agar Müller-Hinton con la cepa susceptible como se mencionó en el método anterior, se colocaron los discos impregnados con la cepa problema y se incubaron las placas a 37°C por 24 h. Posteriormente, se llevó a cabo la interpretación (**Figura 17**).

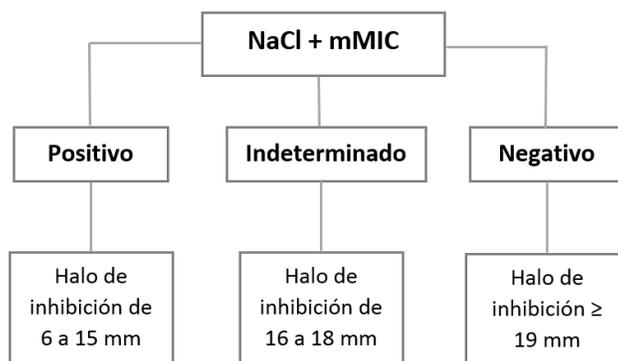


Figura 17. Interpretación del Método de inactivación del carbapenémico modificado con NaCl.

6.4.7.5 Liberación enzimática por buffer de lisis

Se emplearon los mismos controles que el mMIC y se trabajaron las mismas cepas problema. Para este método, en tubos Eppendorf de 1.5 mL se añadieron 1.0 mL de TBS preparado con buffer Tris-HCl [0.5M], en el cual se inocularon 10 µl de la cepa problema con una asa calibrada, se homogenizó la muestra, se añadió un disco de meropenem de 10 µg a cada tubo y se incubaron a 37°C por 4 h. El protocolo se siguió de la misma manera que se describe el mMIC en el apartado 6.4.4.1 al casi concluir con las 4 h de incubación y se procedió a realizar la interpretación (**Figura 18**).³⁵

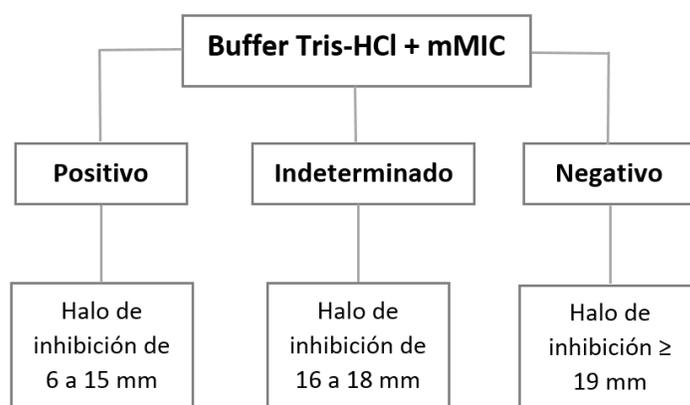


Figura 18. Interpretación del Método de inactivación del carbapenémico modificado con buffer Tris-HCl.

6.4.8 Otras características fenotípicas

Para evaluar otras características fenotípicas los aislados clínicos se sembraron en agar Sangre de Carnero al 5% para observar características como hemólisis e iridiscencia. Así mismo en agar MacConkey y en agar Müller-Hinton, para evaluar la mucosidad y la producción de pigmento, respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h y se realizó la interpretación (**Figura 19**).

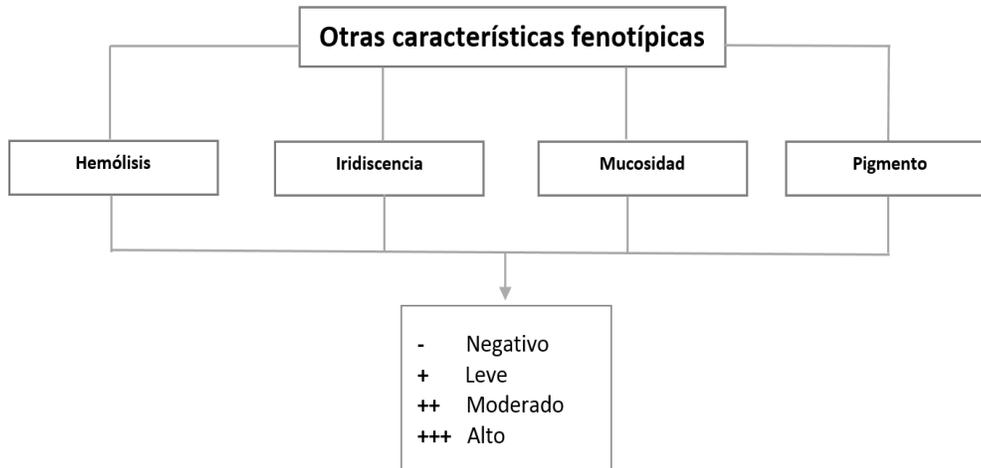


Figura 19. Interpretación de las pruebas adicionales de caracterización fenotípica.

6.4.9 Determinación de indicadores de eficiencia

La sensibilidad y especificidad de las pruebas antes mencionadas fueron recopiladas de reportes previos.²⁴ En el caso de aquellas pruebas bajo estrés metabólico, diseñadas en el presente proyecto, la sensibilidad y especificidad se determinó mediante la elaboración de tablas de contingencia. La especificidad se reporta sólo en aquellos ensayos cuya evaluación se desarrolló en todos los aislados microbiológicos.

Finalmente, la **Figura 20** resume el proceso metodológico que se empleó en este trabajo.

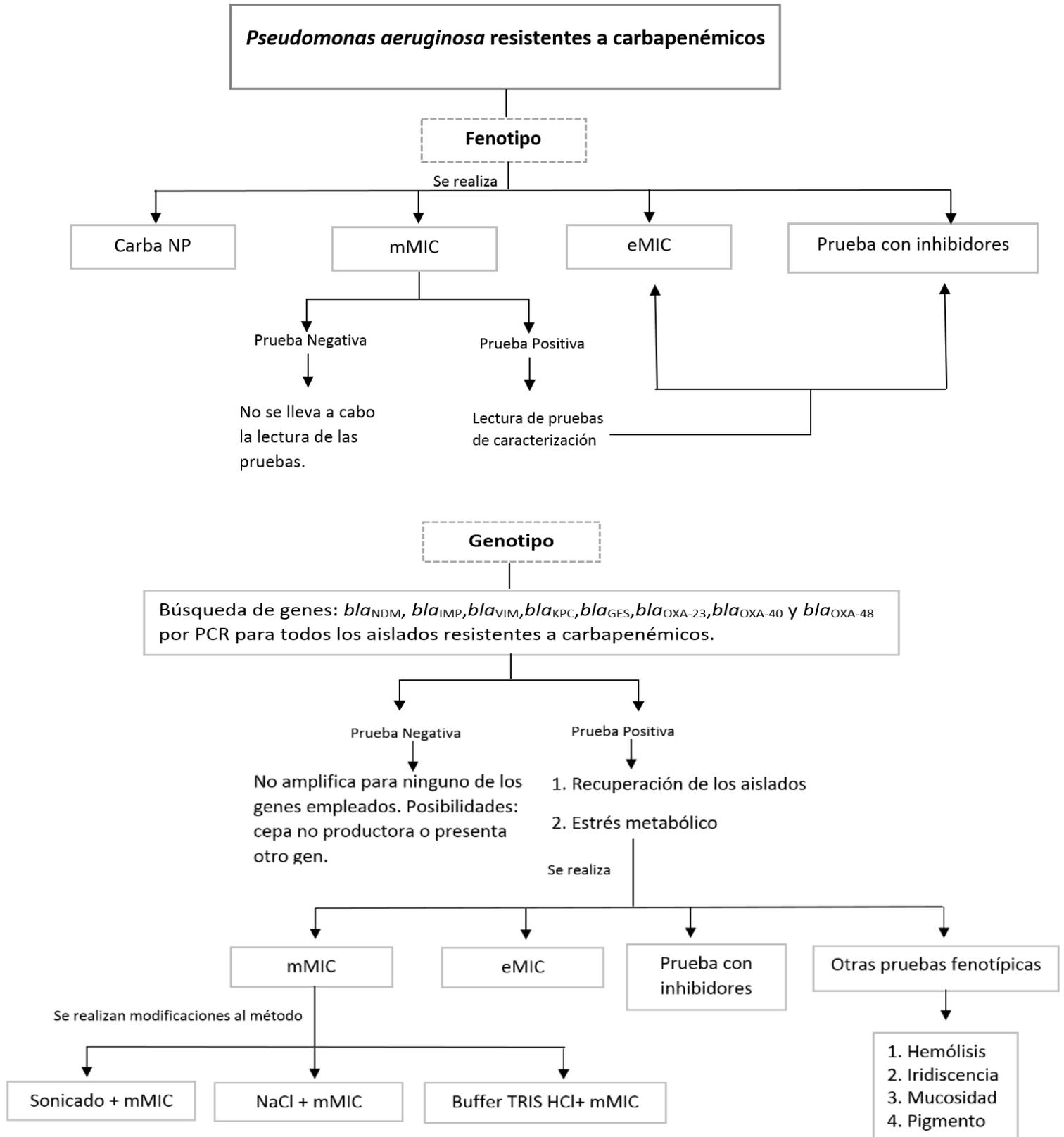


Figura 20. Correlación metodológica.

7. RESULTADOS

7.1 Descripción de los aislados clínicos

En este proyecto de investigación se incluyeron 192 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos seleccionados de la base de datos del Laboratorio de Infectología en un periodo de agosto del 2011 a julio del 2018 (**Figura 21**) de los cuales, 52 pertenecen a mujeres y 140 a hombres (**Tabla 11**).

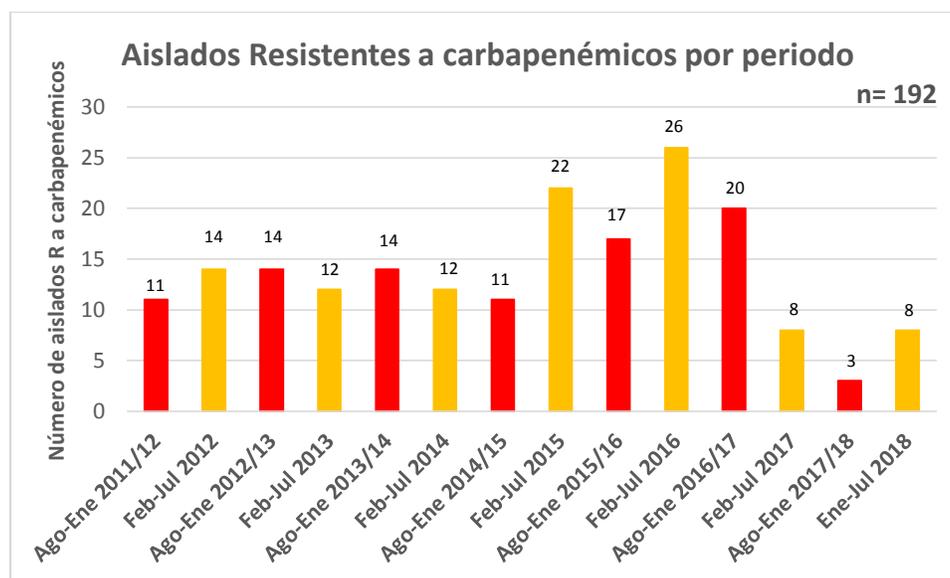


Figura 21. Aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos por periodo.*R, Resistentes. n=192.

Tabla 11. Porcentaje de aislados resistentes a carbapenémicos por género. n=192.

| | Aislados resistentes a carbapenémicos n (%) |
|----------------|--|
| Hombres | 150 (73) |
| Mujeres | 42 (23) |

Pese a que los aislados habían sido identificados previamente por pruebas bioquímicas y por Vitek 2®, se realizaron pruebas adicionales para confirmar que los aislados a trabajar corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*, en donde el 100% fue positivo para las pruebas de crecimiento a 42°C y oxidasa, el 100% fue negativo para la prueba de indol rápido y el 81% fue positivo para la producción de pigmento en AMH (**Tabla 12**).

Tabla 12. Pruebas adicionales de identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. n=192.

| | Indol rápido n(%) | Oxidasa n(%) | Crecimiento a 42°C n(%) | Pigmento n(%) |
|-----------------|----------------------|-----------------|-------------------------------|------------------|
| Positivo | 0 (0) | 192 (100) | 192 (100) | 156 (81) |
| Negativo | 192 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 36 (19) |

Los 192 aislados confirmados como *Pseudomonas aeruginosa* fueron obtenidos de diferentes tipos de muestras clínicas; 2 (1%) de abscesos, 21 (11%) de aspirados, 100 (52%) de biopsias, 19 (10%) de hemocultivos, 10 (5%) de puntas de catéter y 40 (21%) de urocultivos (**Figura 22**); así mismo, en la **Tabla 13** se muestra la agrupación de sensibilidad obtenida previamente por Vitek 2® y confirmada por microdilución en caldo por carbapenémico para cada tipo de muestra; para el caso de los abscesos y urocultivos, el 100% de los aislados presentaron resistencia a los tres carbapenémicos, en el caso de los demás tipos de muestra la mayoría presentaron resistencia a los tres carbapenémicos, pero algunos mostraban resistencia solo a dos o incluso a un carbapenémico, sin embargo seguían cumpliendo con el criterio de inclusión (**Figura 23**).

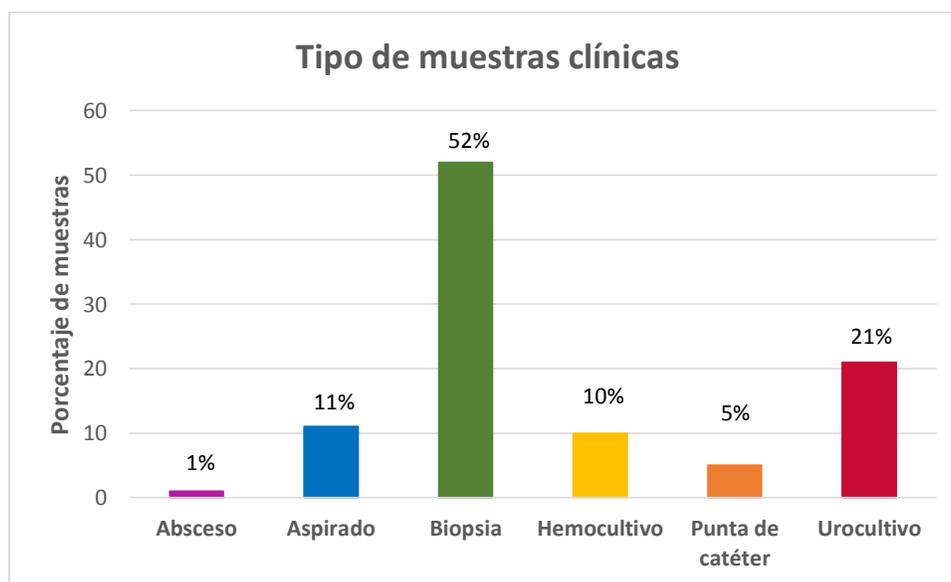


Figura 22. Distribución grafica de los porcentajes para cada tipo de muestra de las que se obtuvieron los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. n=192.

Tabla 13. Susceptibilidad a carbapenémicos de los 192 aislados clínicos por tipo de muestra.

| | Abscesos n=2 | | | Aspirados n=21 | | | Biopsias n=100 | | | Hemocultivos n=19 | | | Puntas de catéter n=10 | | | Urocultivos n=40 | | |
|-------------|-----------------|---|---|-------------------|---|----|-------------------|---|----|----------------------|---|----|------------------------------|---|---|---------------------|---|----|
| | S | I | R | S | I | R | S | I | R | S | I | R | S | I | R | S | I | R |
| MEM | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 19 | 2 | 2 | 96 | 0 | 2 | 17 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 40 |
| IMPM | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 20 | 1 | 2 | 97 | 0 | 0 | 19 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 40 |
| DORY | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 15 | 4 | 4 | 92 | 0 | 2 | 17 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 40 |

*S, sensible; I, indeterminado; R, resistente; MEM, Meropenem; IMPM, Imipenem; DORY, Doripenem.

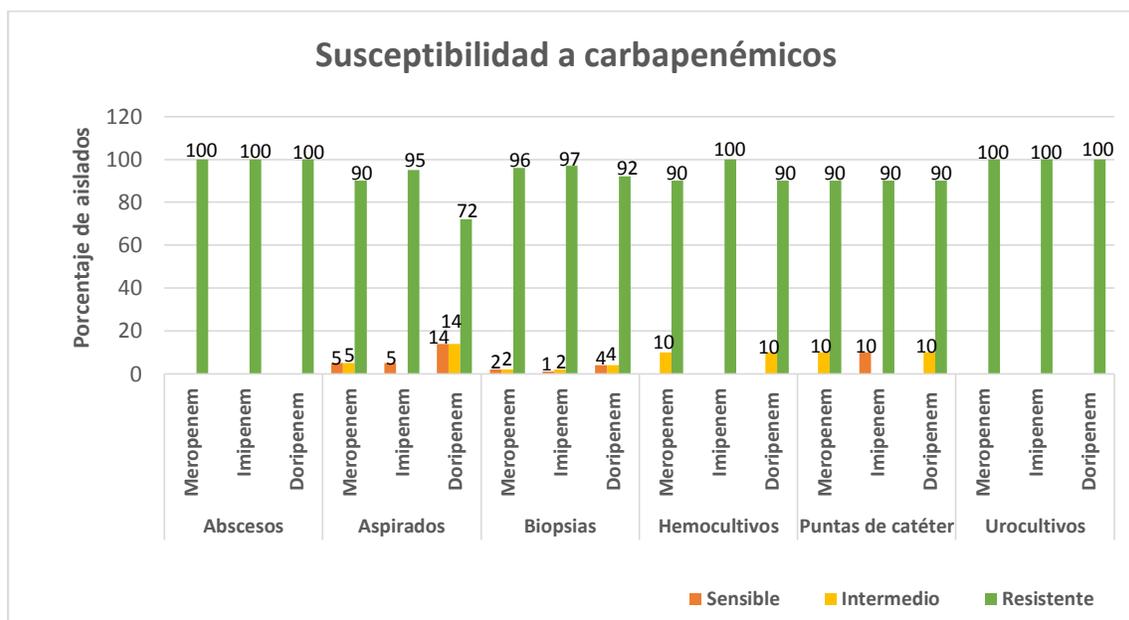


Figura 23. Perfil de susceptibilidad a carbapenémicos en porcentaje de los aislados clínicos por tipo de muestra. n=192.

7.2 Pruebas fenotípicas de detección de cepas productoras de carbapenemasas

Se llevó a cabo la detección fenotípica de cepas productoras de carbapenemasas por el Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado (mMIC) y Carba NP (Figura 24).

7.2.1 Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado (mMIC) y Carba NP

Todos los aislados se sometieron a pruebas de detección de carbapenemasas. Como se puede observar en la Figura 25 para el mMIC se obtuvieron 33 (17%)

aislados positivos, 4 (2%) indeterminados y 155 (81%) negativos; y para Carba NP 21 (11%) aislados positivos, 23 (12%) indeterminados y 148 (77%) negativos.

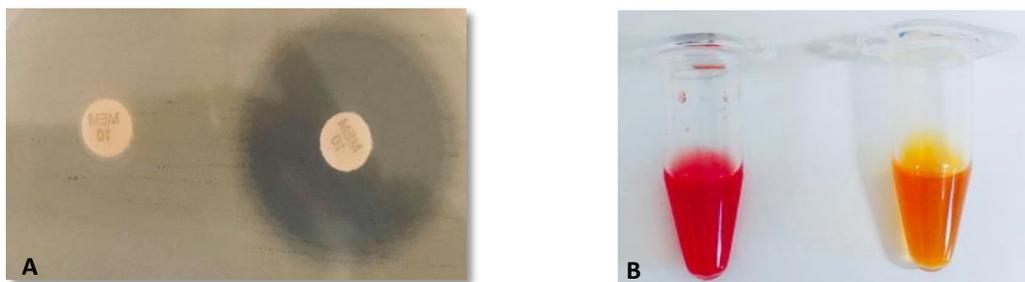


Figura 24. Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas. **A.** Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado (mMIC), el lado izquierdo de la imagen muestra un resultado positivo y el lado derecho un resultado negativo. **B.** Carba NP, en el lado izquierdo de la imagen se observa el tubo control y del lado derecho un resultado positivo.

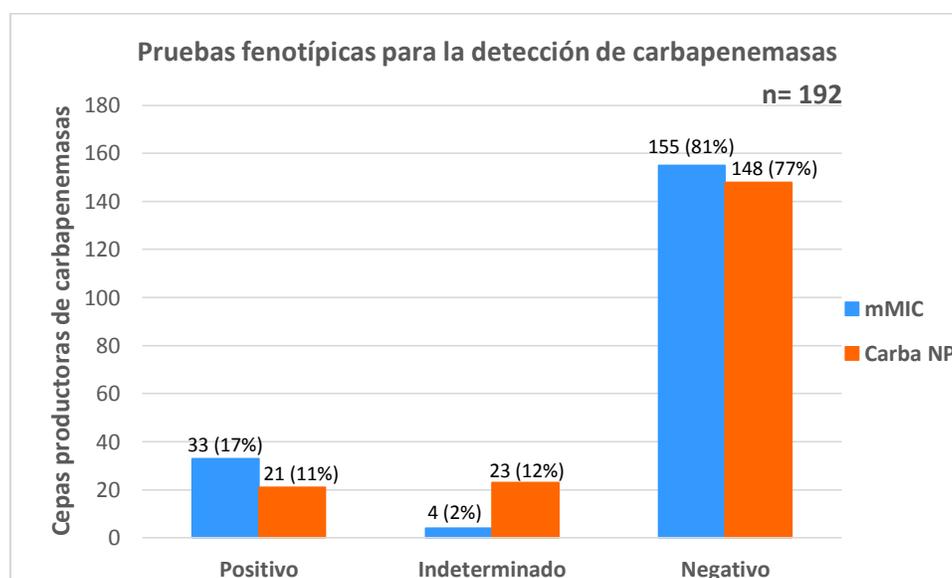


Figura 25. Resultados obtenidos mediante el mMIC y Carba NP para la detección de carbapenemasas. n= 192.

7.3 Pruebas de clasificación fenotípica de carbapenemasas en cepas productoras

Se realizó la clasificación de las cepas productoras de carbapenemasas según los criterios de Ambler.¹⁵ Por el Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado con EDTA (eMIC) se identificaron cepas productoras de MBL y por descarte cepas

productoras de SBL; por otro lado, se realizó la Prueba con inhibidores para la detección de carbapenemasas de clase A, clase B y posiblemente clase D.

7.3.1 Métodos para la búsqueda de MBL

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por el mMIC, se realizó la interpretación de las 33 cepas productoras de carbapenemasas (**Figura 26**), en donde la prueba eMIC detectó la presencia de 22 cepas productoras de MBL (67%), es decir, fue una prueba positiva, y por otro lado, 11 aislados fueron negativos para esta prueba (33%), sugerentes a cepas productoras de SBL. Sin embargo, en la Prueba con Inhibidores, específicamente en el empleo de EDTA, se obtuvieron 23 aislados positivos (70%) y 10 negativos (30%) para esta prueba (**Figura 27**).

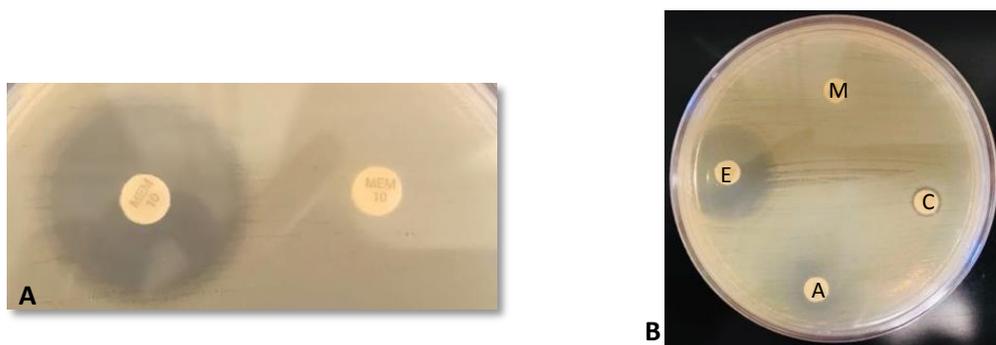


Figura 26. Pruebas fenotípicas para la detección de MBL. **A.** eMIC, el lado izquierdo de la imagen muestra una prueba positiva y el lado derecho una prueba negativa. **B.** Prueba con Inhibidores (EDTA), en la imagen se puede observar un halo de inhibición con EDTA, por lo tanto un resultado positivo para esta prueba. *A, AFB; C, Cloxacilina; E, EDTA; M, Meropenem.

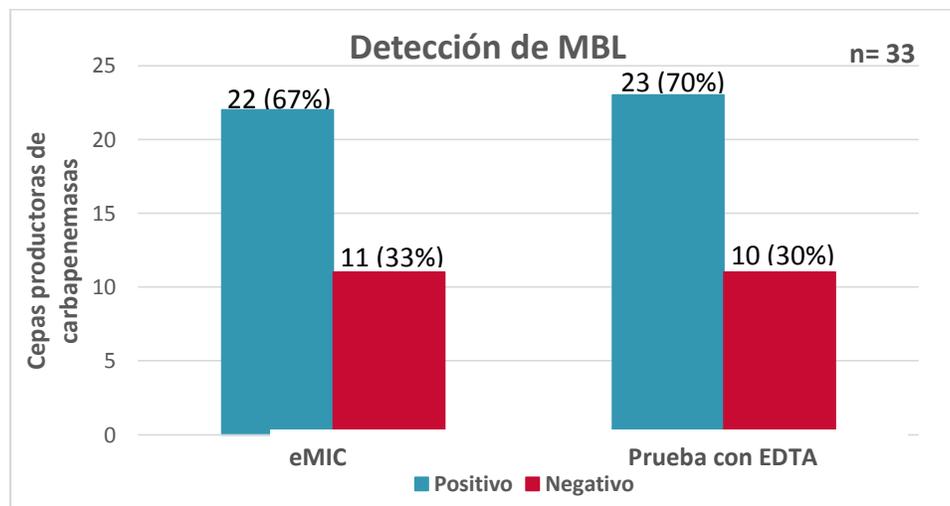


Figura 27. Detección de MBL por eMIC y Prueba con Inhibidores. n=33.

7.3.2 Prueba con inhibidores para la búsqueda de SBL

De igual manera, tomando en cuenta el número de aislados positivos por mMIC, se llevó a cabo la interpretación de la prueba con inhibidores para las 33 cepas productoras de carbapenemasas, en donde como se puede ver en la **Figura 27**, 10 aislados (30%) fueron negativos para MBL, de los cuales 1 aislado (3%) mostró inhibición con AFB y no con cloxacilina, indicando una carbapenemasa de Clase A, y 9 aislados (27%) no presentaron inhibición con las moléculas inhibitoras empleadas, es decir, pueden ser sugerentes para Clase D (**Figura 29**). La **Figura 28** muestra una prueba positiva para carbapenemasa de Clase A, así como una prueba sugerente a Clase D.

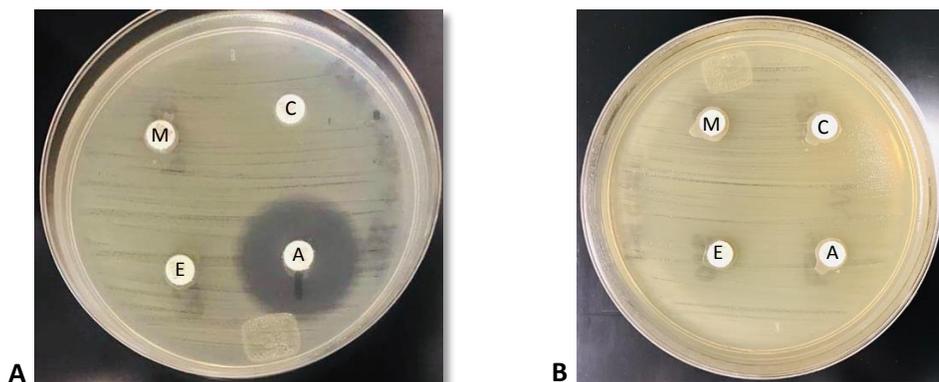


Figura 28. Prueba con inhibidores para la detección de SBL. **A.** Carbapenemasa de Clase A, inhibición con AFB y no con Cloxacilina. **B.** Carbapenemasas sugerente a Clase D, no presenta inhibición. *A, AFB; C, Cloxacilina; E, EDTA; M, Meropenem.

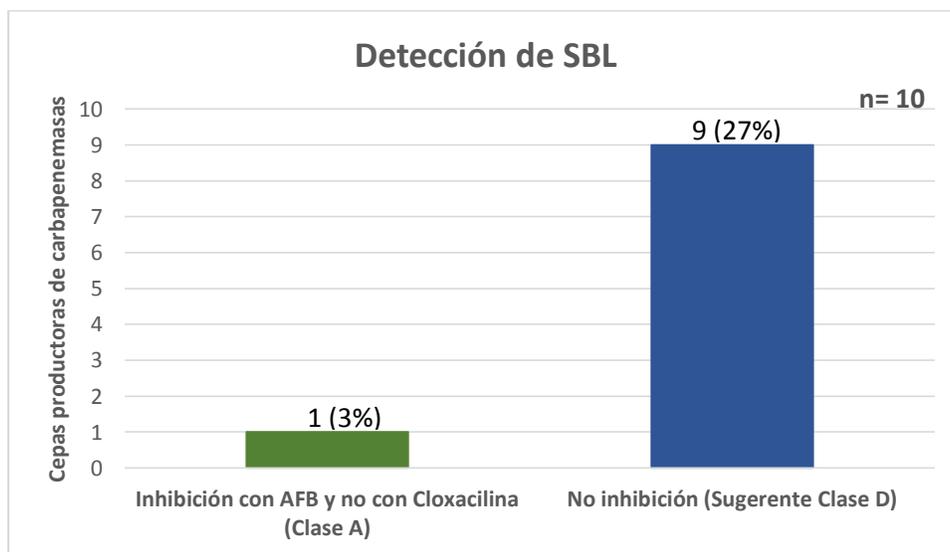


Figura 29. Clasificación de carbapenemasas de tipo SBL por Prueba con inhibidores. n=10.

7.4 Amplificación por PCR punto final para la caracterización genotípica de carbapenemasas

Todos los aislados se sometieron a PCR punto final para la búsqueda de genes que codifican para MBL: *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}; y para SBL: *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} y *bla*_{OXA-48}. Genotípicamente fueron positivos 47 (24%) aislados y 145 (76%) aislados negativos (**Figura 30**). Dentro de los aislados positivos, 11 (24%) fueron aislados positivos para Clase A, 33 (70%) aislados positivos para Clase B, 2 (4%) aislados positivos para Clase B y Clase D, y 1 (2%) aislados presentaban dos genes de Clase B (**Figura 31**).

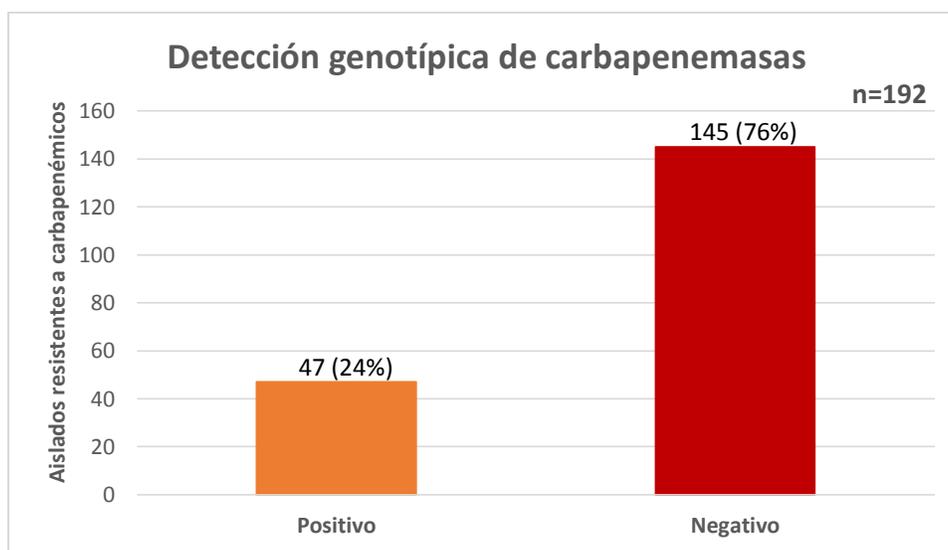


Figura 30. Detección genotípica de los genes que codifican para las carbapenemasas más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa*. n=192.

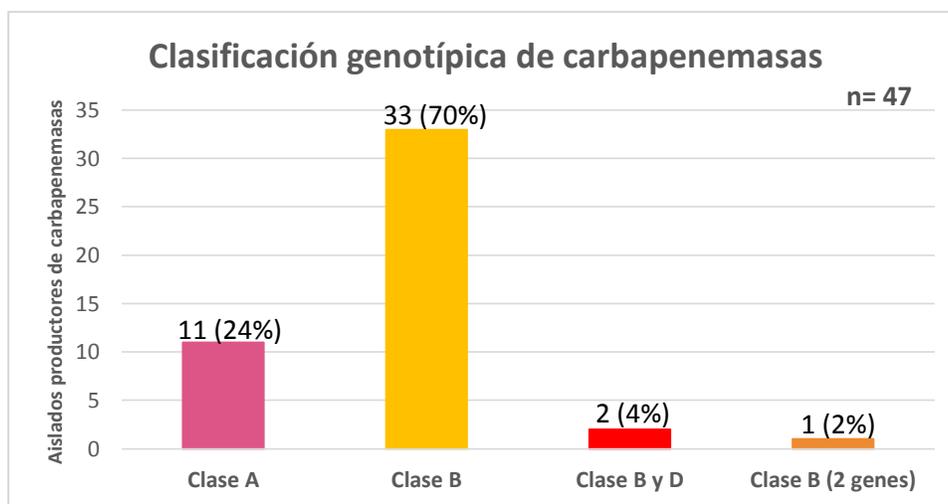


Figura 31. Clasificación genotípica de las carbapenemasas más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa*. n=47.

Tabla 14. Resumen de las carbapenemasas detectadas genotípicamente en los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.

| | Gen | Número de aislados |
|--|------------|---------------------------|
| Clase A | GES | 11 |
| Clase B | VIM | 26 |
| | IMP | 7 |
| Dos genes clase B | IMP | 2 |
| | NDM | |
| Un gen clase B y un gen clase D | IMP | 1 |
| | OXA-23 | |

7.4.1 Aislados productores de carbapenemasas de clase A

Se probaron dos genes que codifican para carbapenemasas de Clase A: KPC y GES (**Figura 32**); 11 (24%) aislados fueron positivos para GES y ninguno amplificó para KPC (**Figura 33**).

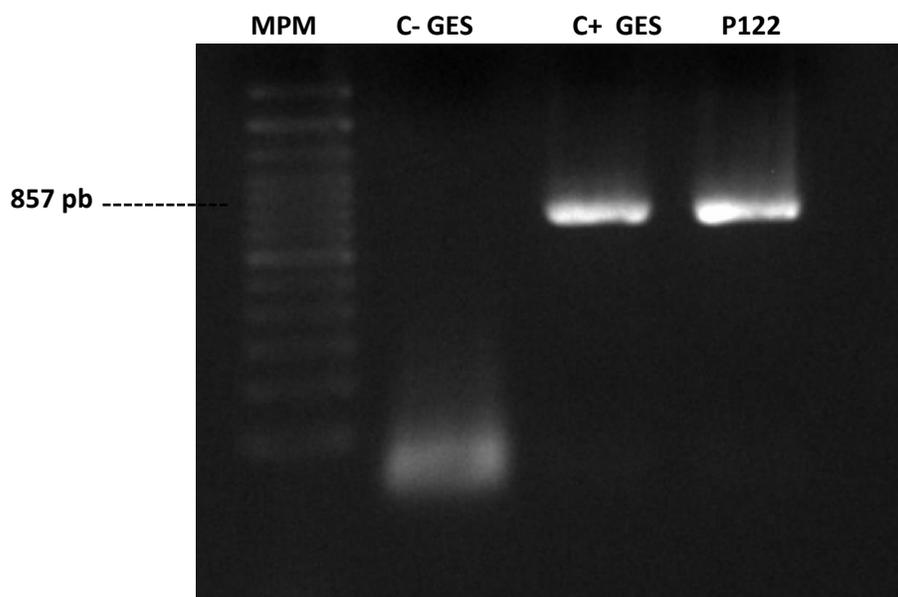


Figura 32. Amplificación por PCR para el gen *bla*_{GES}. *MPM, marcador de peso molecular; C-, control negativo; C+, control positivo; P122, aislado microbiológico positivo para el gen GES.

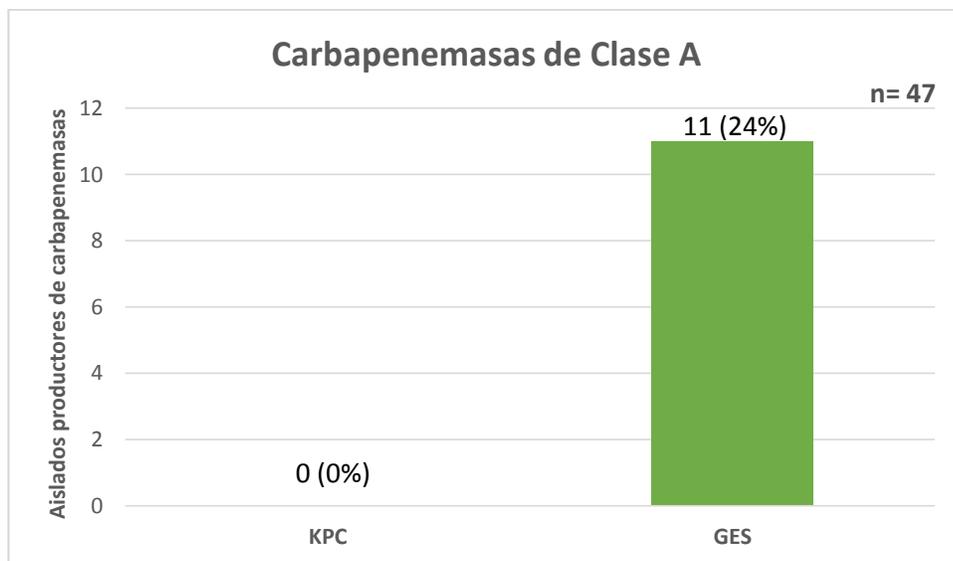


Figura 33. Carbapenemasas de clase A detectadas genótipicamente. n=47.

En la **Figura 34** se muestran los diámetros obtenidos por el método fenotípico (mMIC) sin estrés metabólico para los aislados que presentan carbapenemasas de clase A de tipo GES; 1 de los aislados fue positivo, 1 indeterminado y 9 negativos por esta prueba.

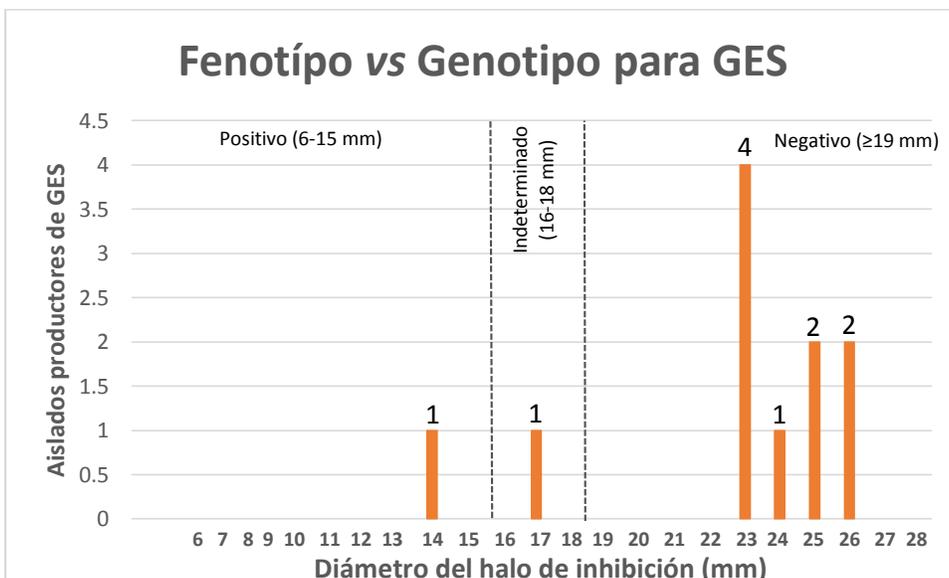


Figura 34. Diámetros obtenidos por mMIC para los aislados productores de GES. n=11.

A continuación en la **Figura 35**, se muestran los patrones de susceptibilidad para diferentes clases de antibióticos. En el caso de los aminoglicósidos (amikacina y gentamicina) y monobactám (aztreonam) la mayoría de los aislados presentaron

CMI's entre 32 y 64 µg/ml, para las cefalosporinas (ceftazidime y cefepime) la mayoría presentaron CMI's de 64 µg/ml, para las fluoroquinolonas (cipofloxacino y levofloxacino) en su mayoría los aislados presentaron CMI's igual a 8 µg/ml, para los carbapenémicos en el caso de doripenem las CMI's más frecuentes fueron de 64 µg/ml y para imipenem y meropenem de 32 y 64 µg/ml; para el lipopéptido (colistina) se obtuvieron CMI's frecuentes de 0.5 µg/ml, y por último para el β-lactámico combinado (piperacilina/tazobactam) la mayoría de los aislados presentaron CMI's de 128/4 µg/ml.

Por su parte, la **Figura 36** muestra la distribución de estos aislados por periodo y servicio; la mayoría de los aislados se ubican dentro del CENIAQ y en el periodo que va de julio a octubre del 2016 se presentaron dos aislados productores de esta SBL.

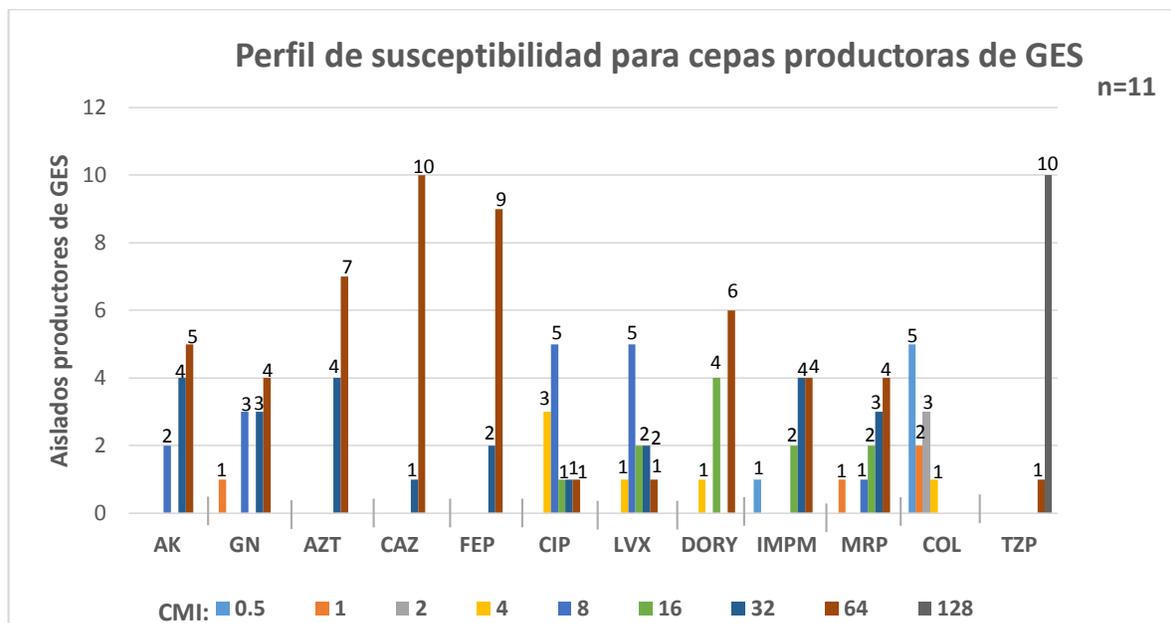


Figura 35. Perfil de susceptibilidad para cepas productoras de carbapenemasas de Clase A de tipo GES, para diferentes grupos de antibióticos. n=11. *AK, Amikacina; GN, Gentamicina; AZT, Aztreonam; CAZ, Cefotaxima; FEP, Cefepime; CIP, Ciprofloxacino; LVX, Levofloxacino; DORY, Doripenem; IMPM, Imipenem; MRP, Meropenem; COL, Colistina; TZP, Piperacilina/Tazobactam; CIM, Concentración Mínima Inhibitoria.

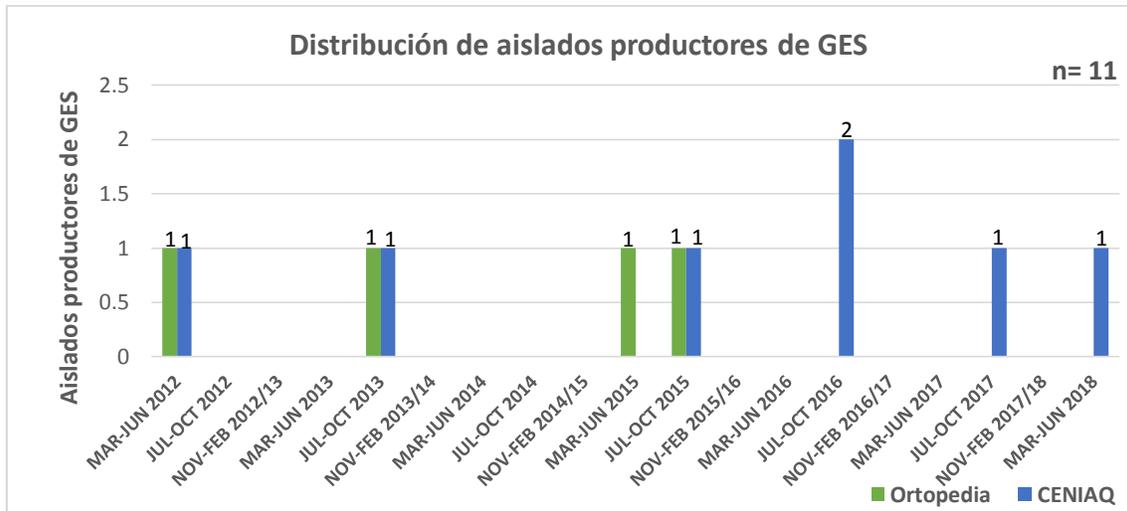


Figura 36. Distribución por periodo y servicio de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de SBL de tipo GES. n=11.

7.4.2 Aislados productores de carbapenemasas de Clase B

Para el caso de las MBL se probaron los genes de las tres carbapenemasas más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa*: NDM, VIM e IMP (**Figura 37**). Para VIM fueron positivos el 55% equivalente a 26 aislados, y por su parte para IMP fueron positivos el 15% equivalente a 7 aislados (**Figura 38**). Hubo un aislado que amplificó para el gen bla_{NDM} , pero al ser un caso especial se presenta en el apartado 7.4.4.

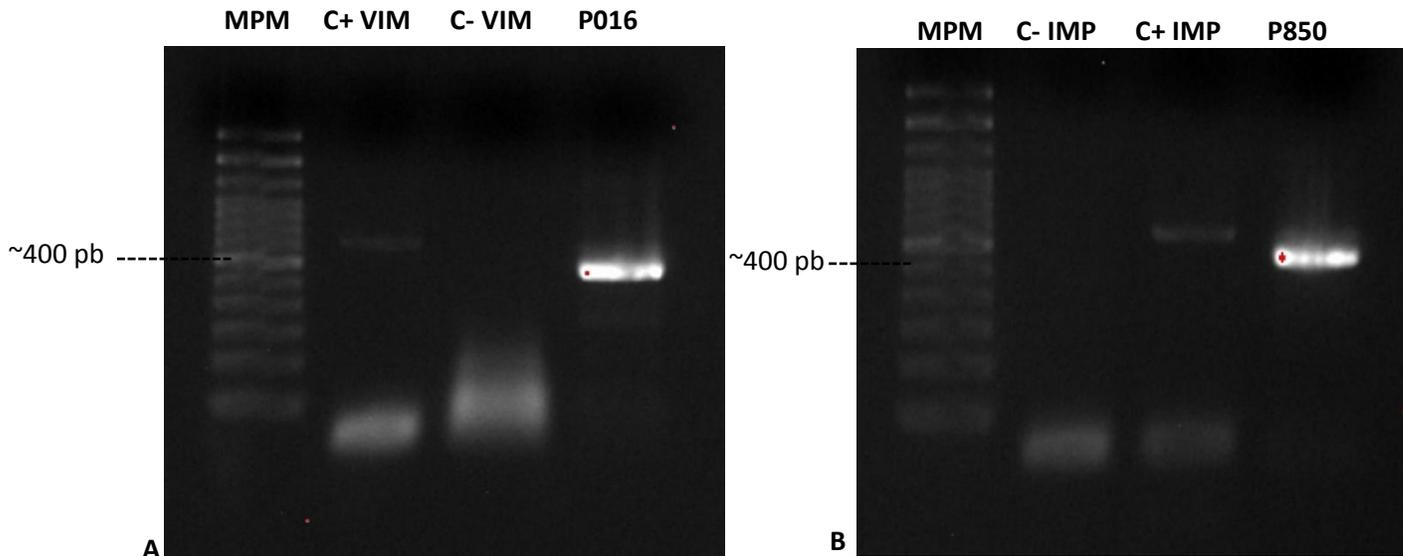


Figura 37. Amplificación por PCR para el gen bla_{VIM} y bla_{IMP} . **A.** Amplificación para el gen bla_{VIM} . **B.** Amplificación para el gen bla_{IMP} . *MPM, marcador de peso molecular; C+, control positivo; C-, control negativo; P016, aislado microbiológico positivo para el gen VIM; P850, aislado microbiológico positivo para el gen IMP.

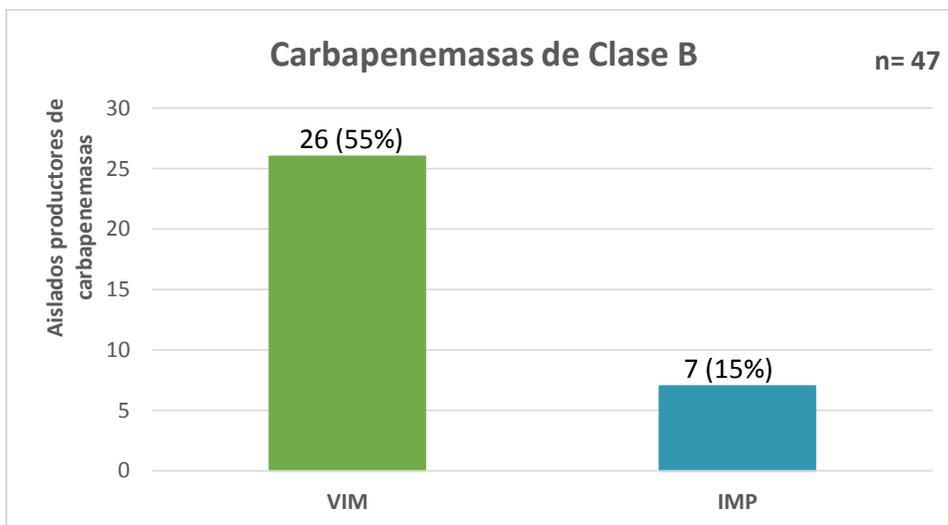
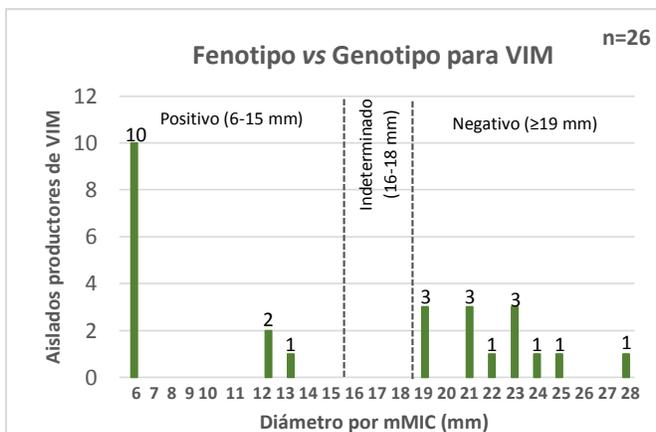
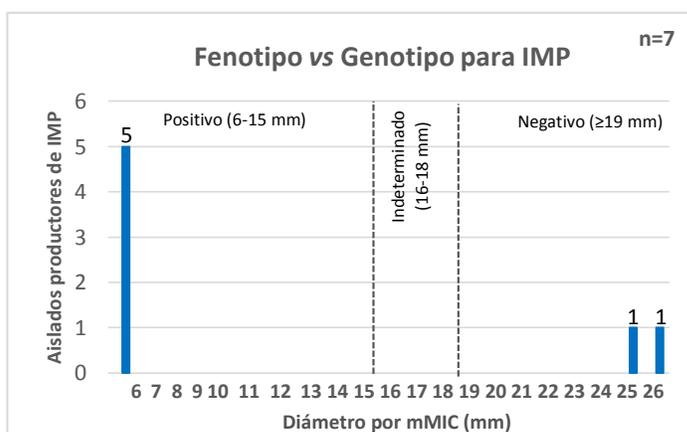


Figura 38. Carbapenemasas de Clase B detectadas genóticamente. n=47.

Los diámetros obtenidos por el método fenotípico se pueden observar en la **Figura 39** para las cepas portadoras de VIM e IMP; donde para VIM 13 aislados fueron positivos y 13 negativos por este método, y para IMP 5 de los aislados fueron positivos y 2 negativos.



A



B

Figura 39. Diámetros obtenidos por mMIC para los aislados productores de MBL. **A.** MBL de tipo VIM, n=26. **B.** MBL de tipo IMP, n=7.

En la **Figura 40** se muestra el perfil de susceptibilidad obtenido para los aislados productores de MBL de tipo VIM e IMP. Para VIM en el caso de los aminoglucósidos (amikacina y gentamicina), cefalosporinas (ceftazidime y cefepime) y carbapenémicos (doripenem, imipenem y meropenem) la mayoría de los aislados presentaron una CMI de 64 µg/ml, para el monobactámico (aztreonam) y para

fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) se mostraron frecuentemente CMI's de 8 µg/ml; para el lipopéptido (colistina) frecuentemente presentaron CMI's 0.5 µg/ml, y para el β-lactámico combinado (piperacilina/tazobactam) la mayoría de los aislados presentaron CMI's de 128/4 µg/ml. Sin embargo el perfil de susceptibilidad para los aislados que presentaron MBL de tipo IMP, frecuentemente se presentaron CMI's de 64 µg/ml para aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenémicos; en el caso de aztreonam en su mayoría se presentaron CMI's de 64 y 128 µg/ml, para colistina una CMI de 0.5 µg/ml y para piperacilina/tazobactam, de igual manera que para VIM, CMI's de 128/4 µg/ml.

En cuanto a la distribución de estos aislados, como podemos ver en la **Figura 41**, el servicio que presenta mayor número de casos productores de MBL de tipo VIM es el CENIAQ en donde en el periodo que va de julio a octubre del 2011 presentó 5 casos, por su parte IMP fue más frecuente en Ortopedia presentando en el periodo de marzo a junio del 2015 dos aislados productores de esta enzima.

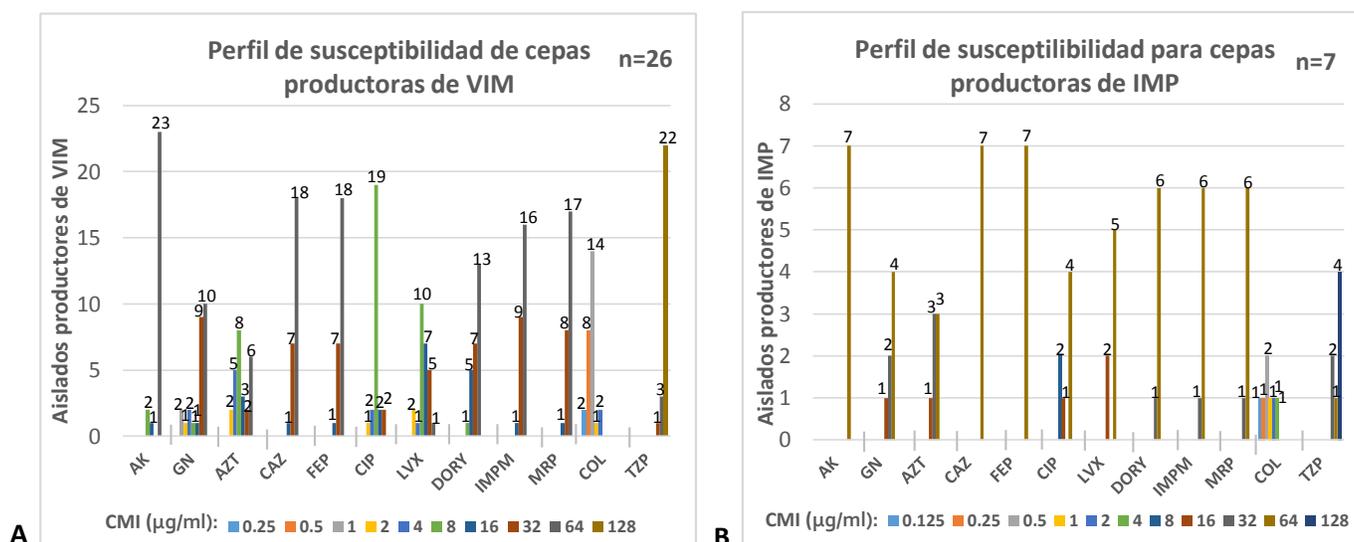


Figura 40. Perfiles de susceptibilidad para cepas productoras de carbapenemasas de Clase B para diferentes grupos de antibióticos. **A.** Carbapenemasas de Clase B de tipo VIM (n=26). **B.** Carbapenemasas de Clase B de tipo IMP (n=7). *AK, Amikacina; GN, Gentamicina; AZT, Aztreonam; CAZ, Ceftazidime; FEP, Cefepime; CIP, Ciprofloxacino; LVX, Levofloxacino; DORY, Doripenem; IMPM, Imipenem; MRP, Meropenem; COL, Colistina; TZP, Piperacilina/Tazobactam; CIM, Concentración Mínima Inhibitoria.

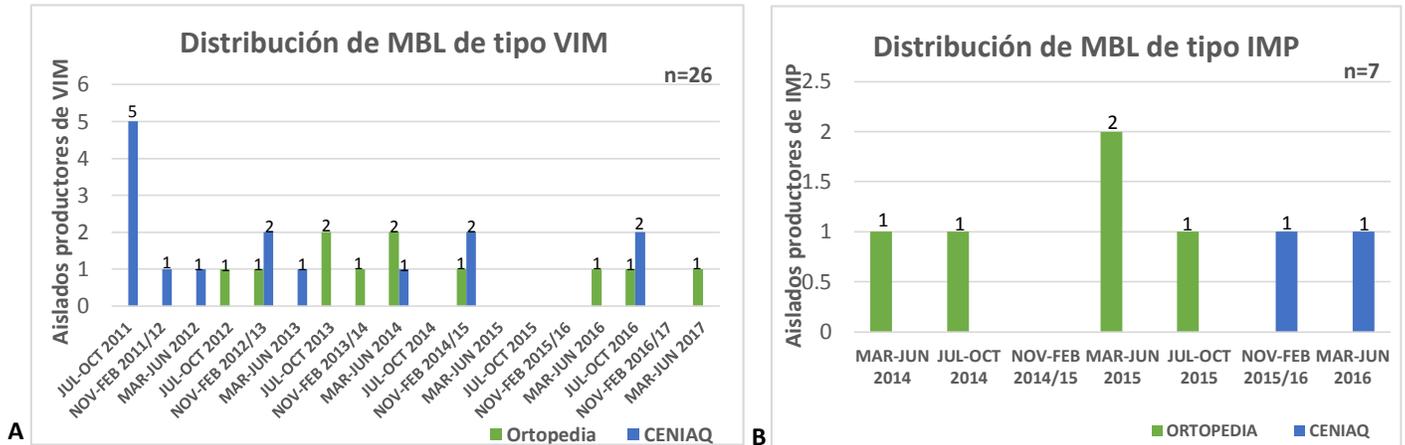


Figura 41. Distribución de MBL por periodo y servicio. **A.** Distribución de carbapenemasas de tipo VIM, n=26. **B.** Distribución de carbapenemasas de tipo IMP, n=7.

7.4.3 Aislados productores de carbapenemasas de Clase B y Clase D

Se probaron tres de los genes más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa* que codifican para carbapenemasas de Clase D (Oxacilinasas): *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} y *bla*_{OXA-48} (**Figura 42**). 2 aislados equivalentes al 4% presentaron el gen *bla*_{OXA-23} y ningún aislado amplificó para el gen *bla*_{OXA-40} y *bla*_{OXA-48}; a su vez el 100% de los aislados portadores del gen *bla*_{OXA-23} también presentaron el gen *bla*_{VIM} (**Figura 43**).

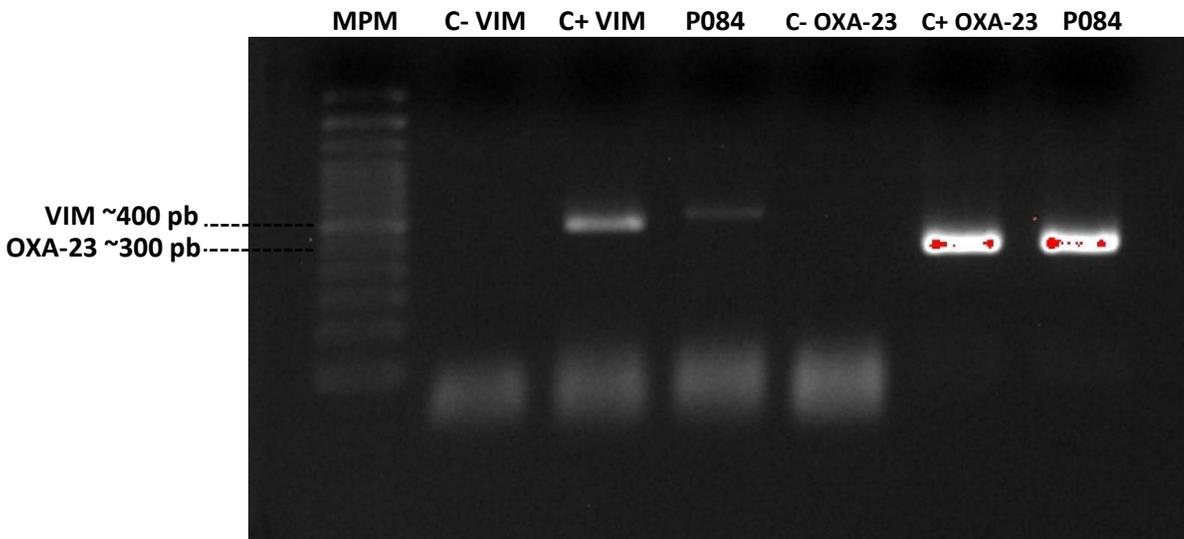


Figura 42. Amplificación por PCR para el gen *bla*_{VIM} y *bla*_{OXA-23}. *MPM, marcador de peso molecular; C+, control positivo; C-, control negativo; P084, aislado microbiológico portador del gen VIM y OXA-23.

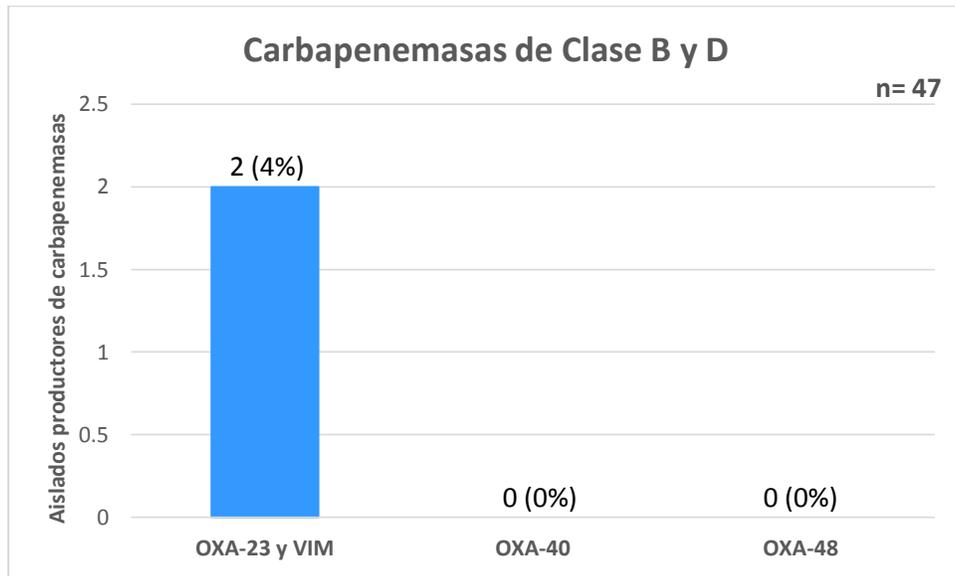


Figura 43. Carbapenemasas de Clase B y D detectadas genóticamente. n=47.

En la **Figura 44** se pueden observar los diámetros obtenidos por el método fenotípico (mMIC) para cada aislado portador de los genes OXA-23 Y VIM; un aislado fue positivo y el otro negativo por este método.

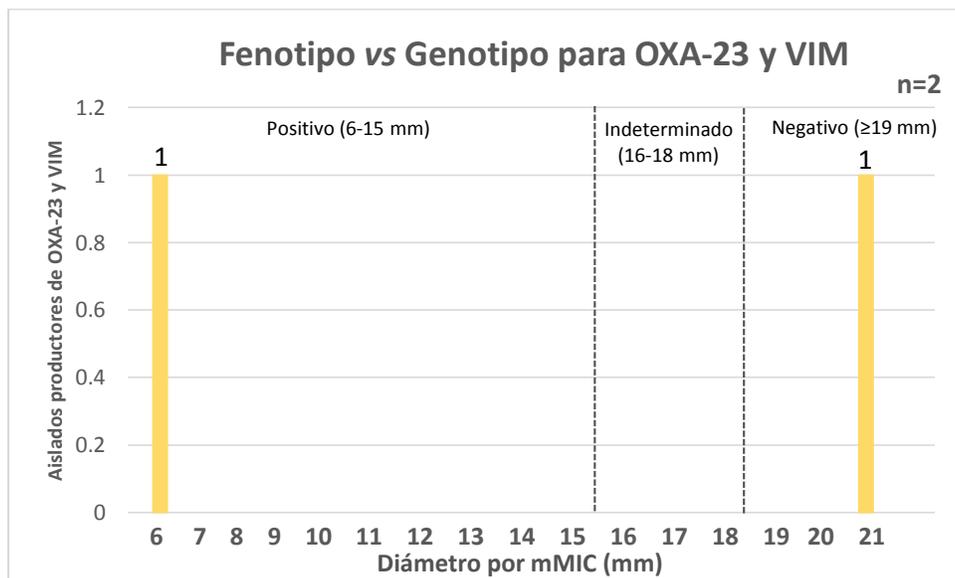


Figura 44. Diámetros obtenidos por mMIC para los aislados productores de OXA-23 y VIM. n=2.

El perfil de susceptibilidad que presentan estos 2 aislados se muestran en la **Figura 45** donde se puede observar que para los aminoglucósidos en el caso de amikacina ambos aislados tienen una CMI de 64 µg/ml, para gentamicina y carbapenémicos como imipenem y meropenem una CMI de 32 µg/ml; sin embargo para doripenem se tienen CMI's de 16 y 32 µg/ml, en cuanto a las cefalosporinas (ceftazidime y cefepime) se observan CMI's entre 32 y 64 µg/ml; para fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) se observaron CMI's bajas que van desde 4 a 8 µg/ml y para piperacilina/tazobactam ambos aislados tuvieron una CMI de 128/4 µg/ml.

Estos aislados en cuanto a la producción de VIM, pertenecen a los mismos periodos en donde se mostró un caso mostrado en la **Figura 41** para los periodos que van de noviembre del 2011 a febrero del 2012 y de marzo a junio del 2013.

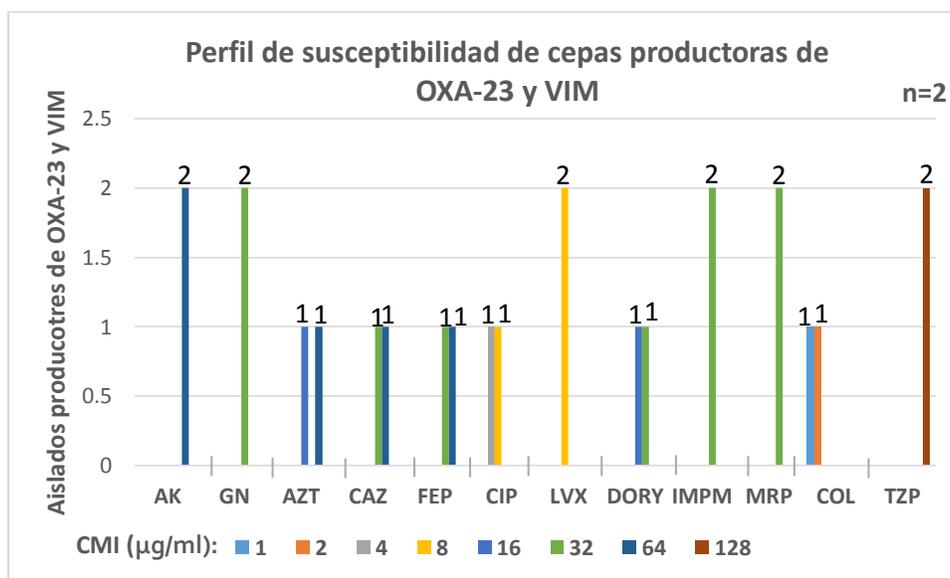


Figura 45. Perfil de susceptibilidad para cepas productoras de carbapenemasas de Clase B de tipo VIM y Clase D de tipo OXA-23 para diferentes grupos de antibióticos. n=2. *AK, Amikacina; GN, Gentamicina; AZT, Aztreonam; CAZ, Ceftazidime; FEP, Cefepime; CIP, Ciprofloxacino; LVX, Levofloxacino; DORY, Doripenem; IMPM, Imipenem; MRP, Meropenem; COL, Colistina; TZP, Piperacilina/Tazobactam; CIM, Concentración Mínima Inhibitoria.

7.4.4 Aislados productores de dos carbapenemasas de Clase B

Al someter a amplificación el DNA de los aislados para la búsqueda de MBL, se lograron encontrar los tres genes probados (Apartado 7.4.2); sin embargo, hubo un aislado que presentó dos carbapenemasas de Clase B, una NDM y VIM (**Figura 46**), lo que equivale al 2% del total de los 47 aislados productores de

carbapenemasas. Este aislado por el método fenotípico mostró un resultado positivo con un diámetro de 6 mm.

Como lo muestra la **Tabla 15**, el aislado P661 portador de ambos genes, presenta una CMI de 64 µg/ml para los aminoglucósidos, monobactámico, cefalosporinas, carbapenémicos y el β-lactámico combinado; para fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) presentan una CMI de 8 µg/ml y 32 µg/ml respectivamente, y en cuanto a colistina este aislado presentó una CMI de 4 µg/ml.

Este aislado también productor de IMP se ubicó en Ortopedia en el periodo que va de marzo a junio del 2014 en donde como se muestra en la **Figura 41** también se presentó un caso.

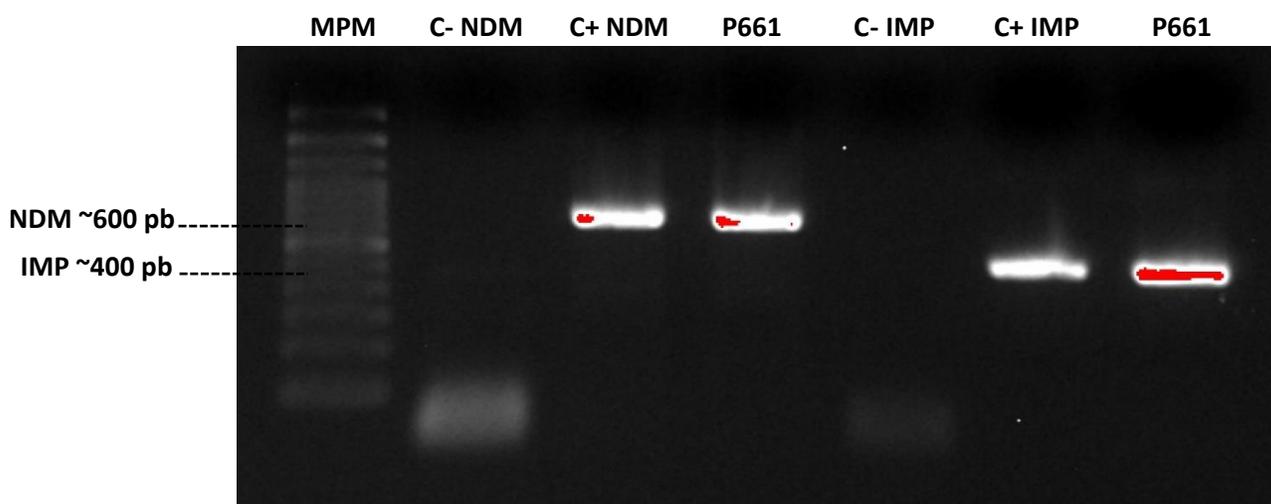


Figura 46. Amplificación por PCR para el gen *bla_{VIM}* y *bla_{NDM}*. *MPM, marcador de peso molecular; C+, control positivo; C-, control negativo; P661, aislado microbiológico portador del gen VIM y NDM.

Tabla 15. Perfil de susceptibilidad del aislado productor de dos MBL de tipo NDM y VIM (µg/ml). n=1.

| | Aminoglucósidos | | Monobactámico | Cefalosporinas | | Fluoroquinolonas | | Carbapenémicos | | | Lipopéptido | β-lactámico combinado |
|-------------|-----------------|----|---------------|----------------|-----|------------------|-----|----------------|------|-----|-------------|-----------------------|
| | AK | GN | AZ | CAZ | FEP | CIP | LVX | DORY | IMPM | MRP | COL | TZP |
| P661 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 | 8 | 32 | 64 | 64 | 64 | 4 | 64/4 |

*AK, Amikacina; GN, Gentamicina; AZT, Aztreonam; CAZ, Ceftazidime; FEP, Cefepime; CIP, Ciprofloxacino; LVX, Levofloxacino; DORY, Doripenem; IMPM, Imipenem; MRP, Meropenem; COL, Colistina; TZP, Piperacilina/Tazobactam.

7.5 Detección y clasificación fenotípica de carbapenemasas por métodos convencionales, así como por modificaciones al método estándar.

Tras llevar a cabo la recuperación de los 47 aislados microbiológicos que amplificaron para los genes probados que codifican para carbapenemasas y someterlos a estrés metabólico, se realizaron pruebas de detección y clasificación convencionales como mMIC, eMIC y Prueba con Inhibidores, así como algunas modificaciones al método estándar de detección de carbapenemasas (mMIC) empleando NaCl, Tris HCl y sonicación.

7.5.1 Serino β -lactamasas de tipo GES

En la **Tabla 16** se presentan los resultados de la realización de métodos fenotípicos de detección como mMIC en donde el 100% de los aislados fueron positivos; y también se realizaron métodos de caracterización como eMIC y Prueba con Inhibidores (EDTA) para la búsqueda de MBL en donde para eMIC el 100% fue negativo, pero en el empleo de EDTA en la prueba con inhibidores el 91% fue negativo. En cuanto a la búsqueda de SBL con inhibidores como AFB y cloxacilina, el 100% para ambos casos fue negativo.

Tabla 16. Resultados obtenidos tras la realización de diferentes pruebas fenotípicas en condiciones de estrés metabólico a partir de los resultados obtenidos por el método genotípico, positivos para GES; n=11.

| | mMIC | | eMIC | | Prueba con Inhibidores | | | | | |
|---------------------------------------|------|---|------|----|------------------------|----|-----|----|-------------|----|
| | | | | | EDTA | | AFB | | Cloxacilina | |
| | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Aislados de productores de GES | 11 | 0 | 0 | 11 | 1 | 10 | 0 | 11 | 0 | 11 |

*mMIC, Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado; eMIC, Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado con EDTA; EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético; AFB, Ácido fenilborónico; +, positivo; -, negativo.

Por otro lado, en la **Figura 47** se esquematizan gráficamente los diámetros obtenidos para las modificaciones en los aislados productores de GES donde el 100% para los cuatro casos incluyendo el método estándar (mMIC, Sonicado, Tris-HCl y NaCl) fueron positivos.

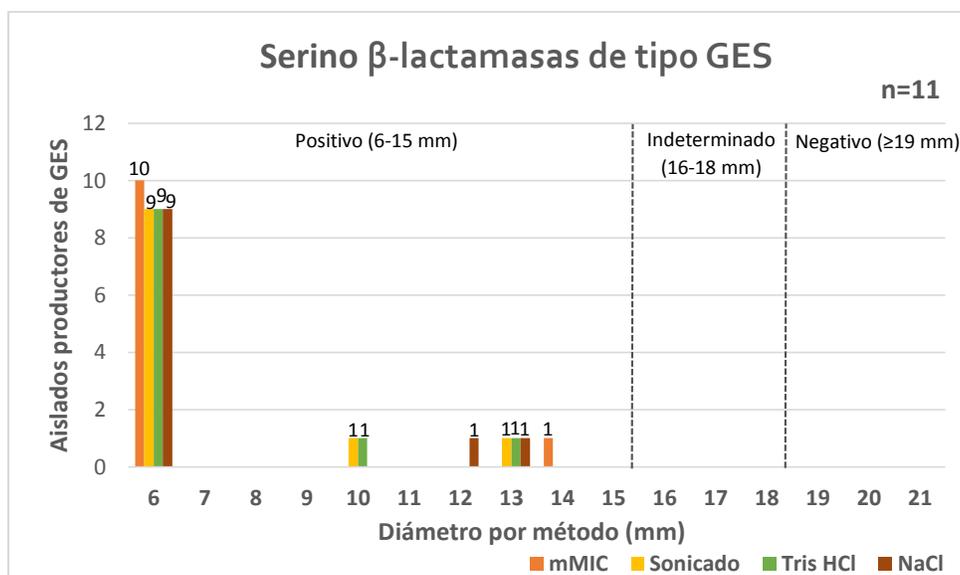


Figura 47. Diámetros obtenidos por el método estándar (mMIC) y las diferentes modificaciones para los aislados productores de GES. n=11.

7.5.2 Metalo β-lactamasas de tipo VIM e IMP

La **Tabla 17** muestra los resultados que se obtuvieron para los diferentes métodos fenotípicos de detección y caracterización de carbapenemasas convencionales, lo cual refleja que para VIM por mMIC se detectaron el 81% de los aislados, al igual que por eMIC, con EDTA en la prueba con Inhibidores solo el 73% fue positivo y para los inhibidores de SBL se mostró un 100% negativo para la inhibición con AFB y cloxacilina. Para IMP se detectaron el 100% de los aislados productores, por los métodos de detección para MBL como lo es eMIC y Prueba de Inhibidores con EDTA se detectaron solo el 43% y el 86%, respectivamente, para los inhibidores que se emplean para la búsqueda de SBL (AFB y cloxacilina) el 100% en ambos casos fueron negativos a la inhibición.

Tabla 17. Resultados obtenidos tras la realización de diferentes pruebas fenotípicas en condiciones de estrés metabólico a partir de los resultados obtenidos por el método genotípico, positivos para MBL de tipo VIM (n=26) e IMP (n=7).

| | mMIC | | | eMIC | | Prueba con Inhibidores | | | | | |
|---------------------------------------|------|---|---|------|---|------------------------|---|-----|----|-------------|----|
| | | | | | | EDTA | | AFB | | Cloxacilina | |
| | + | I | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Aislados de productores de VIM | 21 | 2 | 3 | 21 | 5 | 19 | 7 | 0 | 26 | 0 | 26 |
| Aislados productores de IMP | 7 | 0 | 0 | 3 | 4 | 6 | 1 | 0 | 7 | 0 | 7 |

*mMIC, Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado; eMIC, Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado con EDTA; EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético; AFB, Ácido fenilborónico; +, positivo; I, indeterminado; -, negativo.

La **Figura 48** esquematiza los diámetros obtenidos por mMIC y las distintas modificaciones, y se puede observar para el caso de ambos genes que por sonicado, empleo de Tris HCl y NaCl, el 100% de los aislados fueron positivos presentando diámetros de 6 mm, pero para el mMIC los diámetros fueron aún mayores, incluso para el caso de VIM dos aislados equivalentes al 8% fueron indeterminados y el 12% negativos para esta prueba; en el caso de IMP aunque los diámetros fueron mayores, cayeron dentro del rango considerado como positivo.

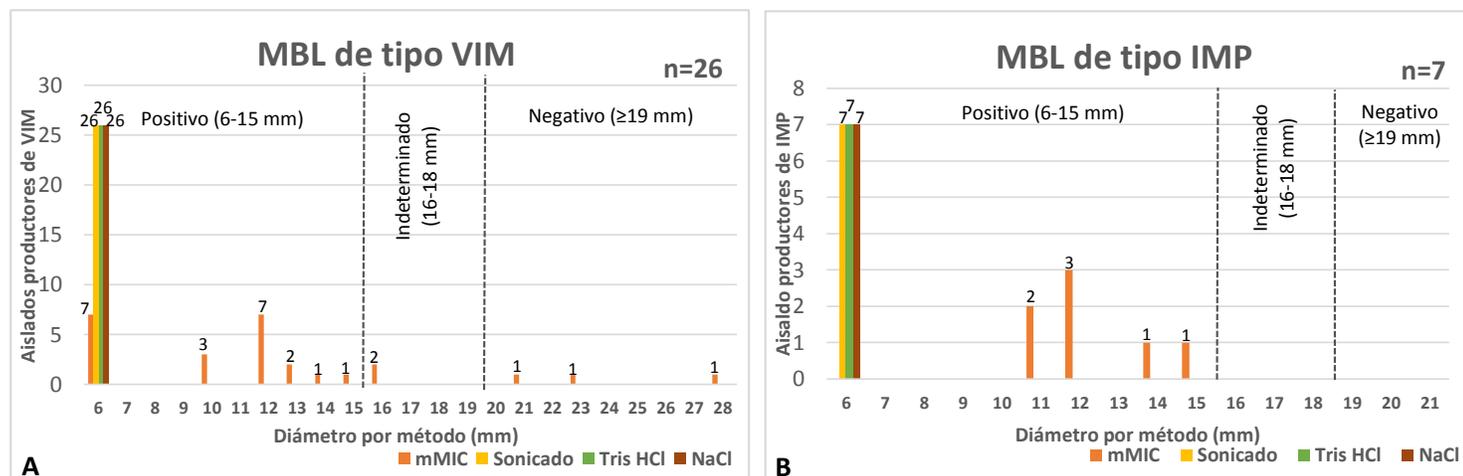


Figura 48. Diámetros obtenidos por el método estándar y las diferentes modificaciones para los aislados productores de VIM e IMP. **A.** Tipo VIM. n= 26. **B.** Tipo IMP. n=7.

7.5.3 Serino β -lactamasa de Clase D de tipo OXA-23 y Metalo β -lactamasa de tipo VIM

En cuanto a los dos aislados productores de dos carbapenemasas, una SBL y una MBL, de tipo OXA-23 y VIM respectivamente se muestra en la **Tabla 18** que se detectaron el 100% de estos aislados productores y también el 100% de las MBL por eMIC y Prueba con Inhibidores; por su parte para las SBL el 100% fueron negativos para la inhibición por estas moléculas. Estos aislados por el método convencional tuvieron un diámetro de 10 y 12 mm respectivamente, y para las tres modificaciones se obtuvieron diámetros de 6 mm (**Figura 49**).

Tabla 18. Resultados obtenidos por pruebas fenotípicas a partir de resultados genotípicos positivos para SBL de tipo OXA-23 y MBL de tipo VIM; n=2.

| | mMIC | | eMIC | | Prueba con Inhibidores | | | | | |
|--|------|---|------|---|------------------------|---|-----|---|-------------|---|
| | | | | | EDTA | | AFB | | Cloxacilina | |
| | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Aislados de productores de OXA-23 y VIM | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |

*mMIC, Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado; eMIC, Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado con EDTA; EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético; AFB, Ácido fenilborónico; +, positivo; -, negativo.

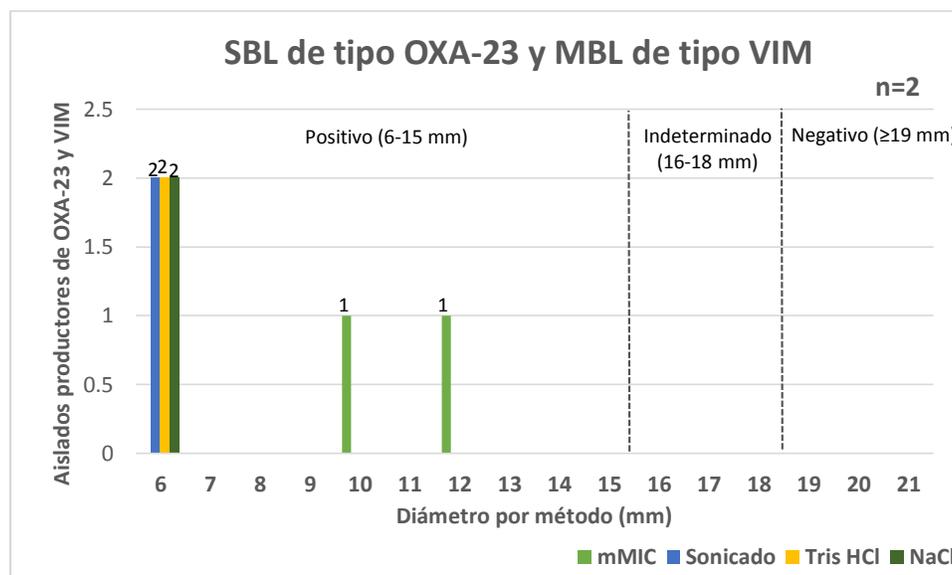


Figura 49. Diámetros obtenidos por el método estándar (mMIC) y las diferentes modificaciones para los aislados productores de OXA-23 y VIM. n=2.

7.5.4 Metalo β-lactamasas de tipo IMP y NDM

Las pruebas realizadas para el aislado que era productor de NDM y IMP tras estrés metabólico, arrojaron los resultados que se muestran en la **Tabla 19** en donde se puede ver que se detectaron y clasificaron el 100%; este aislado en el método convencional de detección tuvo un diámetro de 12 mm y en las modificaciones para los tres casos, tuvo un diámetro del 6 mm.

Tabla 19. Resultados obtenidos por pruebas fenotípicas a partir de resultados genotípicos positivos para MBL de tipo IMP y NDM; n=1.

| | mMIC | | eMIC | | Prueba con Inhibidores | | | | | |
|--|------|---|------|---|------------------------|---|-----|---|-------------|---|
| | | | | | EDTA | | AFB | | Cloxacilina | |
| | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Aislado de productor de IMP y NDM | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |

*mMIC, Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado; eMIC, Método de Inactivación del Carbapenémico Modificado con EDTA; EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético; AFB, Ácido fenilborónico; +, positivo; -, negativo.

7.6 Características fenotípicas adicionales

Se realizaron pruebas fenotípicas para evaluar algunas características adicionales como mucosidad, producción de pigmento, hemólisis e iridiscencia. Los resultados se esquematizan de manera gráfica en la **Figura 50** donde se puede observar que los aislamientos portadores de los genes GES y VIM en su mayoría no presentaron mucosidad; sin embargo, los aislados portadores del gen IMP la mayoría presentaron mucosidad moderada al igual que el aislado que presentó dos MBL (NDM e IMP); en cuanto a los aislados que presentaban los genes OXA-23 y VIM mostraron mucosidad negativa y moderada, respectivamente. Otra característica que se evaluó fue la producción de pigmento en AMH lo que dio como resultado que para casi todos los casos con excepción de GES, la mayoría de los aislados fueron negativos para esta prueba y para GES la mayoría de los aislados tuvieron una producción leve de pigmento, en general en esta prueba solo se mostró una producción negativa o leve.

En cuanto a la hemólisis como característica adicional que pudieran mostrar los aislados, se observó que para GES y VIM, la mayoría de los aislados presentaron una producción leve al igual que el aislado que presentó las dos MBL (NDM e IMP); por otro lado, para el caso de IMP la mayoría de los aislados fueron negativos y el 100% de los que presentaron OXA-23 y VIM también lo son. Y por último, para la evaluación de iridiscencia, la mayoría de los aislados portadores del gen GES y OXA-23/VIM pertenecían a la agrupación de negativo o leve, para el caso de VIM los aislados mostraron con mayor frecuencia una leve iridiscencia y para IMP el resultado predominante fue moderado al igual que el aislado productor de NDM/IMP.

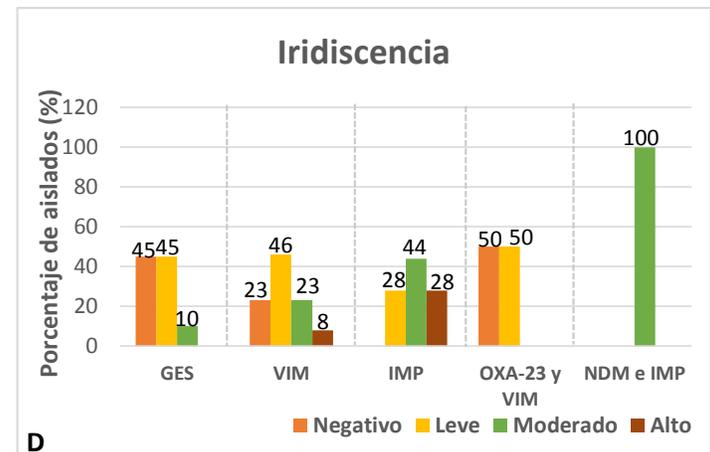
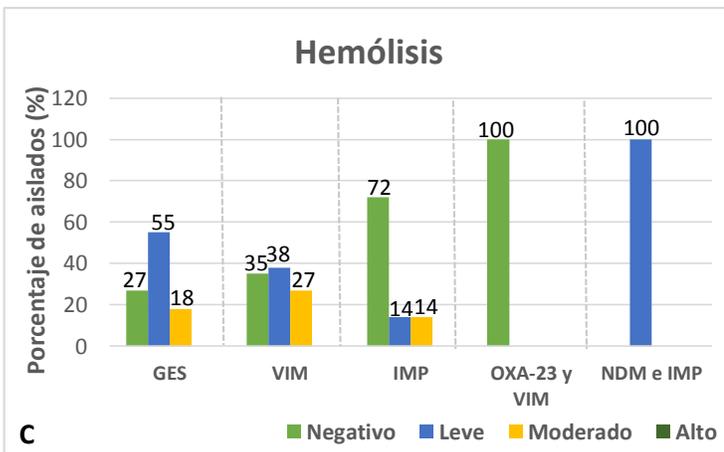
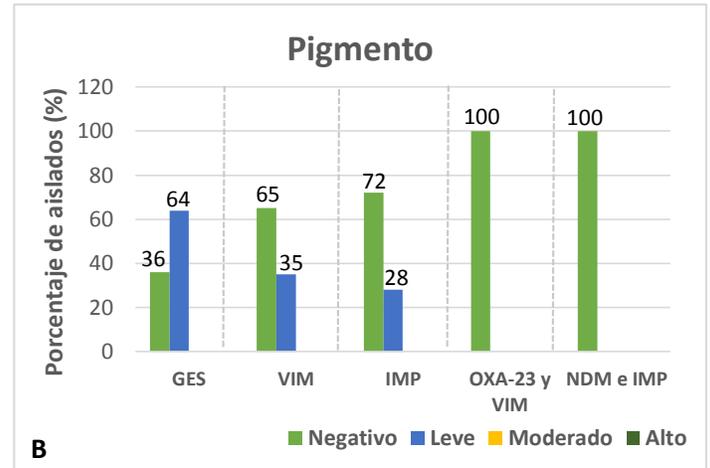
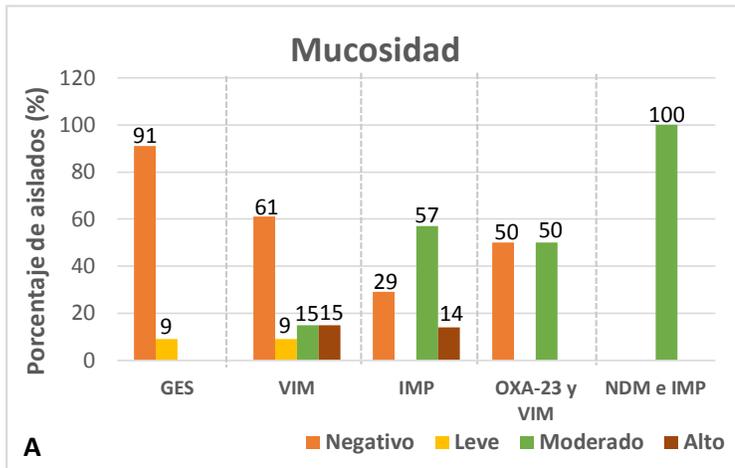


Figura 50. Porcentaje de aislados evaluados para ciertas características fenotípicas adicionales para cada gen o combinación de genes encontrados. **A.** Mucosidad. **B.** Producción de pigmento. **C.** Hemólisis. **D.** Iridiscencia.

7.7 Indicadores de eficiencia

En la **Tabla 20** se muestran los resultados obtenidos de los indicadores de eficiencia para las pruebas bajo estrés metabólico en los 47 aislados positivos genotípicamente; en donde casi todos los métodos alcanzaron una sensibilidad del 100% con excepción de la prueba de inhibidores (96%).

Tabla 20. Sensibilidad y especificidad, pruebas bajo estrés metabólico.

| Método | Sensibilidad | Especificidad |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------|
| mMIC | 100% | - |
| Sonicado | 100% | - |
| NaCl | 100% | - |
| TRIS HCl | 100% | - |
| eMIC | 100% | 55% |
| Prueba con inhibidores (EDTA) | 96% | 55% |

8. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana es un problema de salud que va en aumento en todo el mundo, ya que día tras día aparecen y se propagan nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad de los profesionales de la salud para tratar enfermedades infecciosas comunes.³⁶ Es tan grande el problema que en febrero del 2017 la OMS publicó por primera vez una lista de patógenos prioritarios dirigida a la investigación y búsqueda de nuevos antibióticos en donde aparece como prioridad crítica *Pseudomonas aeruginosa* por su alta resistencia intrínseca y la facilidad con la que este microorganismo ha logrado desarrollar mecanismos que le confieren resistencia a distintos antibióticos entre ellos los carbapenémicos, unos de los mejores antibióticos para el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes y los cuales son considerados antibióticos de última elección debido a su amplio espectro de acción.⁴²

Este patógeno no fermentador comúnmente presenta mecanismos de resistencia no enzimáticos como la expresión disminuida de porinas y la sobreexpresión de bombas de eflujo, así como mecanismos enzimáticos que incluyen la sobreexpresión de AmpC y la producción de carbapenemasas,⁴⁶ este último como el mecanismo más frecuente e importante actualmente asociado a las mayores tasas de mortalidad, ya que al ser elementos genéticos móviles tienen la facilidad de propagarse entre especies por lo que resulta de gran importancia detectar de manera eficiente y rápida a todos los aislados productores de carbapenemasas y de esta manera prevenir su propagación, de hecho, de acuerdo a la información publicada por la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica en su informe anual del 2015, *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra entre los principales microorganismos aislados en brotes epidemiológicos.⁴⁷ En Tijuana (México) se detectó un brote en febrero del 2019 asociado a infecciones en sitios quirúrgicos causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos productoras de Metallo β -lactamasas de tipo VIM.⁴⁸

Al inicio de este estudio se mostraba una tendencia entre 11, 12 y 14 aislados por periodos correspondientes a 6 meses que van de agosto del 2011 a enero del 2015, en los periodos que comprenden los meses de febrero del 2015 a enero del 2017 se presentó un incremento de manera significativa en el número de aislados recuperados, siendo el periodo que va de febrero a julio del 2016 el que mostró el mayor número de aislados resistentes a carbapenémicos; de febrero del 2017 a julio del 2018 se recuperaron los menores números de aislados, lo que podría evidenciar importante información epidemiológica.

La vigilancia es fundamental para la prevención y el control de brotes epidemiológicos y se debe reforzar, junto con la capacidad de los laboratorios, para mejorar la detección de infecciones causadas por bacterias resistentes a los carbapenémicos, definiendo prácticas y manejando correctamente los antimicrobianos. Los aislados que se trabajaron en este estudio mostraron elevadas

concentraciones mínimas inhibitorias según los rangos reportados en la guía M100 del CLSI del 2017 para *Pseudomonas aeruginosa* para carbapenémicos como doripenem, imipenem y meropenem,⁶ de los cuales se consideraron como resistentes el 91%, 97% y el 95% del total de los aislados, respectivamente; lo que evidencia la presencia de algún mecanismo que confiere la resistencia a carbapenémicos y según lo descrito anteriormente como principal sospecha la presencia de carbapenemasas, sin descartar otros mecanismos e incluso la combinación de algunos.

Actualmente se han descrito diferentes métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas definidos por el CLSI como el Carba NP y el mMIC, pero a pesar de que el Carba NP puede ofrecer resultados hasta en 2 h, presenta una menor sensibilidad y especificidad en comparación con mMIC.^{24,48} Estas enzimas fueron detectadas en este trabajo mediante estos dos métodos fenotípicos donde el mMIC detectó un mayor número de aislados positivos en comparación con carba NP, el cual presentó un porcentaje mayor en comparación con el mMIC en cuanto a los aislados indeterminados para esta prueba, lo que coincide con lo reportado en la literatura, ya que al ser un método colorimétrico podría resultar subjetiva la lectura al criterio del operador.^{65,66} Esto es considerado como una de las limitaciones que el método presenta, y pese a lo anterior fue de gran utilidad como un método de cribado.^{25,6}

En este microorganismo comúnmente pueden encontrarse carbapenemasas de clase A, clase B y clase D, sin tomar en cuenta la β -lactamasa de clase C y la carbapenemasa de clase D que presenta de forma intrínseca. Las carbapenemasas de clase A y clase B presentan una mayor actividad hidrolítica en comparación con las enzimas de clase D, y esta es una de las características de las oxacilinasas que ha puesto ciertas limitantes para su detección fenotípica; por ejemplo, el método Carba NP presenta una baja sensibilidad para la detección de estas enzimas, que muchas veces se ha atribuido al indicador de pH que emplea esta prueba. Actualmente se han desarrollado modificaciones a este método rápido en la que usan como indicador de pH el azul de bromotimol, ya que presenta un intervalo de viraje más alto en comparación con el rojo de fenol y que se sugiere que tiene la capacidad de detectar de manera eficiente los cambios en el pH causados por estas enzimas.^{49,50} En cuanto a la caracterización fenotípica de estas enzimas por métodos de sinergia, como Prueba con inhibidores también existe una limitante y es que no se han descrito de manera formal inhibidores que puedan ayudar a facilitar su detección, aunque estudios recientes proponen una molécula llamada temocilina como un posible inhibidor.²⁰ por su parte, en el caso de las enzimas de clase A y clase B, existen al menos dos inhibidores Para cada uno, por ejemplo, para las enzimas de clase A existen inhibidores como el AFB o el ácido clavulánico, pero para distinguirlas de las β -lactamasas de clase C que también se ven inhibidas por estas moléculas, se emplea cloxacilina la cual hace diferencia entre estas, ya que las carbapenemasas de clase A no se ven inhibidas por éste.⁵² En el caso de

las de clase B o también llamadas Metallo β -lactamasas se emplean como inhibidores quelantes de metales, comúnmente se emplea EDTA, pero también se ven inhibidas por EGTA y ADP, por mencionar algunos.¹⁷ En este estudio se emplearon dos métodos de detección para las enzimas de clase B, uno descrito por el CLSI que no está recomendado para *Pseudomonas aeruginosa* y que es el eMIC y la Prueba con Inhibidores empleando EDTA, en donde se encontró que del total de las cepas productoras de carbapenemasas por el mMIC, el 67% fueron positivas por eMIC y el 70% por el método de sinergia con EDTA; por su parte, para la búsqueda de Serino β -lactamasas de Clase A se usó el método de sinergia empleando AFB y cloxacilina, lo cual reveló que solo un aislado, equivalente al 3% del total era positivo; y para las de clase D al no emplear un inhibidor se pudo sospechar de su presencia si fue positivo para el mMIC y no se inhibía con ninguna molécula, lo que arrojó como resultado que el 27% podía ser portador de oxacilinasas. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura para *Pseudomonas aeruginosa* pues este patógeno es productor principalmente de carbapenemasas de clase B.^{18,57,60,80}

Pese a que las pruebas fenotípicas pueden presentar una alta sensibilidad y especificidad, no son del todo confiables, ya que por ejemplo para el caso de eMIC si un aislado es portador de dos o más clases de enzimas, este método puede arrojar como resultado el fenotipo de la enzima con mayor actividad hidrolítica; por esta razón siempre es necesario realizar pruebas moleculares que por mucho tiempo se han considerado como el estándar de oro.⁴⁸ Es por esto que se confirmaron los resultados por amplificación por PCR para los genes más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa* de las tres clases de carbapenemasas, en donde 47 (24%) de los aislados fueron positivos; enzimas de clase A en el 24%, de clase B en el 70%, clase B y clase D en un mismo aislado en el 4% y dos enzimas de clase B en el 2% del total de los aislados positivos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Como se documenta en la literatura, el mayor porcentaje esperado y obtenido fue para las enzimas de clase B, en donde el 55% pertenece a VIM y el 15% a IMP, e incluso VIM también se encontró en el 4% de los aislados productores de dos tipos de carbapenemasas y por su parte IMP en el 2% atribuido al aislado portador de dos MBL. La presencia de dos enzimas en estos aislados puede sugerir una mayor actividad de resistencia puesto que ambos son mecanismos que confieren inactividad antimicrobiana. En cuanto a las carbapenemasas de clase A lo obtenido concuerda con lo reportado para este patógeno, pues la que se ha descrito con mayor frecuencia para esta clase es GES (24%).^{46,87}

En cuanto a la distribución de VIM, en el periodo que va de julio a octubre del 2011 se mostraron cinco casos en el CENIAQ lo que podría ofrecer información importante sobre un posible brote, ya que estos aislados presentan patrones de susceptibilidad similares; sin embargo, es necesario llevar a cabo pruebas como PFGE para encontrar una posible relación clonal entre estas cepas.⁶¹

Debido a que la correlación que existió entre los resultados fenotípicos obtenidos por mMIC y lo obtenido por el método molecular no fue buena, especialmente para GES, que solo detectó un aislado equivalente al 9%, se procedió a realizar la recuperación de los aislados positivos genotípicamente y mantenerlos siempre bajo estrés metabólico, ya que como se ha descrito en la literatura, es importante tomar en cuenta que algunos genes necesitan expresarse por arriba de un nivel umbral para poder conservar o mantener activo su fenotipo, tomando en cuenta que ésta podría ser una limitante para poder detectar fenotípicamente a estos aislados.⁶² De igual manera, se realizaron nuevamente bajo estas condiciones las pruebas fenotípicas iniciales y algunas modificaciones al método convencional basadas en algunos métodos de liberación enzimática como sonicación, choque osmótico y por buffer de lisis, este último ya se ha desarrollado anteriormente e incluso ofrece muy buenos resultados en cuanto a la especificidad y sensibilidad del método.²³ En este estudio se encontró que bajo estrés metabólico para casi todos los casos se pudieron identificar el 100% de los aislados por mMIC, con excepción de la MBL VIM pues solo se detectaron el 81%, este último dato no concuerda con lo descrito para las MBL pues como se puntualizó anteriormente, son las enzimas con mayor actividad hidrolítica pero que pudo verse afectado por la presencia de algún otro mecanismo de resistencia, por la presencia de alguna carbapenemasa de otro tipo que no se haya probado como SPM o GIM e incluso algunas SBL como IMI o SME, que compitiera con ella por el sitio activo y que pudo inhibir el método; o bien, basándonos en algunas características físicas como la presencia de mucosidad en estos aislados no detectados, la cual caía dentro del rango de alta mucosidad y que esta barrera pudiera interferir con la liberación enzimática para posteriormente inactivar al sustrato, aunque esta posible limitante en el mMIC no se muestra en la literatura.^{18,19} Por su parte para el caso de la búsqueda de MBL por eMIC y prueba con inhibidores para el caso de VIM e IMP no se detectaron el 100% y estos resultados se esperaban según la literatura ya que no es un método recomendado por el CLSI para *Pseudomonas aeruginosa* pero que la incorporación de otro agente quelante podría ofrecer mejores resultados como el ADP;⁶³ sin embargo, en la prueba con inhibidores para la búsqueda de SBL especialmente en el caso de GES se esperaba que el 100% se inhibiera con AFB y el 100% fue negativo a la inhibición y a pesar de que no hay mucho sobre esto reportado en la literatura, esto lo podemos atribuir a que la concentración de AFB no es la suficiente para poder inhibir a la enzima, que se puedan obtener mejores resultados con Ácido clavulánico o que incluso presentara alguna otra característica que interfiriera en esta inhibición como el aspecto mucoso pero para estos aislados esta posibilidad se descarta ya que en su mayoría dieron negativos a esta prueba.^{54,55,67,68} Siguiendo con las modificaciones al método de detección basadas en métodos de liberación enzimática, se detectaron el 100% de los aislados positivos para todos los casos, e incluso en el caso de VIM lo que podría sustentar la propuesta de que la mucosidad en algunos aislados fue el posible factor que influyó para que no pudiera liberarse de manera exitosa la enzima, ya que al impulsar y/o forzar la liberación mediante la

ruptura de la membrana externa por sonicado, empleo de buffer de lisis (Tris-HCl) y choque osmótico (NaCl), se pudieron detectar de manera eficiente.^{5,70} Estas modificaciones pueden ser prometedoras pues en los aislados probados la interpretación fue muy clara, puesto que en casi todos los casos se presentaron halos de inhibición de 6 mm correspondientes al diámetro del disco, lo que podría indicar una inactivación completa del sitio activo del sustrato por la actividad hidrolítica que puedan presentar estas enzimas; además de que no se mostró ninguna interferencia como inhibición del método en la presencia de dos tipos de enzima en un mismo aislado, ni siquiera en la modificación con NaCl que pudo afectar a las enzimas de clase D.⁷² El método que involucra Tris-HCl ya se ha probado anteriormente y se han reportado sensibilidades y especificidades cercanas al 100% para *Pseudomonas aeruginosa*, con este trabajo se confirma lo reportado en la literatura.^{24,35} El empleo del sonicado y NaCl, es algo que no se ha reportado para este fin y son alternativas que ofrecen resultados altamente confiables, sin perder de vista que al igual que el uso de Tris-HCl para esta prueba son modificaciones que no afectan el costo del método significativamente y que se pueden llevar a cabo de manera fácil y accesible con la seguridad de que los resultados que ofrecen son confiables, sin dejar a un lado las técnicas de biología molecular confirmatorias para la búsqueda de estos genes.^{58,74}

La sensibilidad encontrada en las pruebas diseñadas en el presente proyecto mostraron una sensibilidad del 100% a excepción de la prueba con inhibidores (96%). Con base en lo reportado en la literatura,²⁴ encontramos un aumento en este indicador de eficiencia. Sin embargo, sólo nos fue posible realizar los ensayos pertinentes para el cálculo de la especificidad en 2 de estas pruebas: eMIC y prueba con inhibidores. Como se mencionó anteriormente, eMIC y la prueba con inhibidores (EDTA) no están recomendadas para la búsqueda de MBL en *Pseudomonas aeruginosa*. Consecuentemente, no se cuenta con valores de referencia de indicadores de eficiencia para las mismas.

Los resultados obtenidos en este estudio revelan que la producción de carbapenemasas no es el mecanismo de resistencia más frecuente en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos; sin embargo, revela datos que pueden ayudar a mejorar la detección de estas enzimas e incluso al estudio y búsqueda de otros mecanismos de resistencia.

9. CONCLUSIONES

- La producción de carbapenemasas no es el principal mecanismo de resistencia en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.
- El Método de Inactivación del Carbapenémico modificado mostró un mejor desempeño en cuanto a la detección de carbapenemasas en comparación con el método colorimétrico Carba NP.
- La caracterización fenotípica de carbapenemasas tuvo ciertas limitantes, pues no todas las MBL se vieron inhibidas por EDTA y las SBL de tipo GES no mostraron inhibición por AFB a una concentración de 400 µg/ml.
- El Método de Inactivación del Carbapenémico con EDTA y el método de sinergia en la Prueba con EDTA no es recomendado para *Pseudomonas aeruginosa*.
- Las carbapenemasas más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa* son las Metalo β-lactamasas de tipo VIM, seguidas por las Serino β-lactamasas de clase A de tipo GES.
- La correlación entre pruebas fenotípicas convencionales y genotípicas sin estrés metabólico no fue muy buena, sin embargo, la detección bajo estrés metabólico mostró buenos resultados, aunque no detectó todas las carbapenemasas de tipo VIM.
- Las modificaciones realizadas al método convencional permitieron una excelente liberación enzimática, lo que permitió que el método bajo estas condiciones se viera favorecido para la detección de carbapenemasas, incluso estas modificaciones no muestran aumentos significativos a la prueba y ofrece buenos resultados.
- La modificación que emplea NaCl [0.5 M], no presentó actividad inhibitoria para la detección de OXA-23.
- Un aislado microbiológico puede presentar dos o más tipos de carbapenemasas e incluso los aislados probados con los genes más frecuentes para todas las clases de carbapenemasas no están exentos de ser productores de algún otro

tipo como IMI, SME, GIM, o alguna otra variante de OXA como OXA-198, por mencionar algunos.

- La presencia de algunas características fenotípicas como la hemólisis, iridiscencia, producción de pigmento y mucosidad no influyeron de manera significativa en los resultados obtenidos en los métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas.

- Pese a que existen pruebas fenotípicas de detección y caracterización de carbapenemasas es de suma importancia realizar técnicas de biología molecular para la búsqueda de genes asociados a carbapenemasas en aislados que muestren resistencia a carbapenémicos.

- La búsqueda de un método de detección rápido sigue siendo un reto importante para tener un diagnóstico oportuno y por lo tanto un tratamiento dirigido, así como la búsqueda de otros mecanismos de resistencia implicados en estos patógenos nosocomiales para la toma de medidas preventivas enfocados en la aparición de brotes epidemiológicos y la disminución de la aparición de estos aislados.

10. PERSPECTIVAS

- Buscar cual es el mecanismo de resistencia más frecuente en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.
- Probar diferentes tiempos de incubación a las modificaciones al mMIC, para de esta manera poder disminuir los tiempos de interpretación.
- Añadir un indicador de pH, como el azul de bromotimol, al caldo inicial de la prueba convencional para poder evidenciar un resultado preliminar pasado el tiempo de incubación.
- Llevar a cabo la comparación de pruebas rápidas como Carba NP y Blue Carba.
- Realizar mejoras a los métodos de detección de MBL mediante el empleo de diferentes quelantes de metales como ADP e incluso probar el EDTA a diferentes concentraciones. En cuanto a la búsqueda de SBL, para las de clase A en especial las de tipo GES, probar como inhibidor ácido clavulánico e incluso ajustar la concentración de AFB; por su parte para las de clase D probar como inhibidor temocilina y/o NaCl a una concentración mayor de 0.5 M.
- Buscar genes específicos para obtener la variante correspondiente a cada aislado.
- Buscar en todos los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos alguno de los otros genes que codifican para carbapenemasas que no se probaron en este estudio.
- Hacer pruebas de clonalidad como PFGE para observar la relación clonal que pudiera existir en estos aislados.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
2. Soberon, G. (s.f.). *Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 20 agosto, 2019, de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/capitulo.html>
3. Rojo, V., Vázquez, P., Reyes, S., Puente, L., & Cervero, M. (2018). Factores de riesgo y evolución clínica de las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en un hospital universitario de España. Estudio de casos y controles. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(5), 427–434.
4. Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., & Pfaller, M. (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (9ª ed.). Washington, USA: American Society for Microbiology Press.
5. Ochoa, S., Montiel, F., Escalona, G., Cruz, A., & Dávila, L. (2013). Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 136–150. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010
6. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (2018). Wayne, New Jersey, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (28th ed.).
7. Zincke, D., Silver, L., & Mathee, K. (2018). Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme, PoxB, in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 936–945. <https://doi.org/10.1128/AAC.01807-15>
8. Todar, K. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 12 agosto, 2019, de <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
9. Suárez, C., & Gudiol, F. (2008). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 42(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
10. Nicola, F., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2012). Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(4), 290–302. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213025174010>
11. Fariñas, M., & Martínez, L. (2013). Multiresistant Gram-negative bacterial infections: Enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and

other non-fermenting Gram-negative bacilli. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>

12. Nicolau, C., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(1), 19–28. <http://www.elsevier.es> el 24/03/2010.

13. Fast, W., & Sutton, L. (2013). Metallo- β -lactamase: Inhibitors and reporter substrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1, 1648–1659. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.024>

14. Yaghi, J., Chamy, L., Maround, R., Khalil, G., & Akkawi, C. H. (2019). Unusually High Prevalence of Cosecretion of Ambler Class A and B Carbapenemases and Nonenzymatic Mechanisms in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Lebanon. *Microbial Drug Resistance*, 1–10. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0040>

15. Calvo, J., Cantón, R., Cuenca, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1, 1–54.

16. Naas, T., Dortet, L., & Iorga, B. (2016). Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Current Drug Targets*, 17, 1006–1028.

17. Chen, A., Thomas, P., Cheng, Z., Xu, N., Tierney, D., Fast, W., Cohen, S. (2019). Investigation of Dipicolinic Acid Isosteres for the Inhibition of Metallo-B-Lactamases. *ChemMedChem*, 14, 1–13. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900172>

18. Hong, D., Bae, I., Jang, I., & Lee, K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Chemotherapy*, 47(2), 81–97. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>

19. Makena, A., Brem, J., Rydzik, A., Abboud, A., & Saral, A. (2016). Comparison of Verona Integron-Borne Metallo-Lactamase (VIM) Variants Reveals Differences in Stability and Inhibition Profiles. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 60(3), 1377–1384. <https://doi.org/10.1128/AAC.01768-15>

20. Covaco, L., Hansen, F., Hill, R., Woodford, N., & Hello, S. (2018). Evaluation of temocillin for phenotypic carbapenemase screening of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates in relation to the presence of genes encoding ESBLs

and carbapenemase production. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 1–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dky493>

21. Gutierrez, S., Correa, A., Hernández, C., Cadena, E., Pallares, C., & Villegas, M. (2019). Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 40, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.02.004>

22. Pasteran, F., Veliz, O., Faccone, D., Guerriero, L., Rapoport, M., Mendez, T., & Corso, A. (2011). A simple test for the detection of KPC and metallo- β -lactamase carbapenemase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1438–1441. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03585.x>

23. Humphries, R. (2019). CIM City: the Game Continues for a Better Carbapenemase Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(7), 1–5

24. Tamma, P., & Simner, P. (2018). Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 62(1) 1–31. <https://doi.org/10.1128/JCM.01140-18>

25. Simner, P., Johnson, J., Brasso, W., & Anderson, K. (2017). Multicenter Evaluation of the Modified Carbapenem Inactivation Method and the Carba NP for Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, (62) 1, 1–24. <https://doi.org/10.1128/JCM.01369-17>

26. Peña, A., Arroyo, A., Gómez, A., & Tapia, R. (2004). *Bioquímica* (2ª ed.). México, México: Limusa.

27. Phenylboronic acid [Ilustración]. (2019). Recuperado el 18 septiembre, 2019, de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/phenylboronicacid121939880611?lang=es®ion=MX>

28. EDTA, Disodium Salt, Dihydrate, Molecular Biology Grade - CAS 6381-92-6 - Calbiochem [Ilustración]. (2019). Recuperado el 18 septiembre, 2019, de http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/EDTA-Disodium-Salt-Dihydrate-Molecular-Biology-Grade-CAS-6381-92-6-Calbiochem,EMD_BIO-324503

29. Cloxacilina molécula de fármaco antibiótico. Fórmula esquelética. [Ilustración]. (2019). Recuperado el 18 septiembre, 2019, de https://es.123rf.com/photo_89059141_cloxacilina-mol%C3%A9cula-de-f%C3%A1rmaco-antibi%C3%B3tico-f%C3%B3rmula-esquel%C3%A9tica-.html

30. Gautier, G., Guillard, T., Podac, B., Bercot, B., Vernet, V., & Champs, C. (2018). Detection of different classes of carbapenemases: Adaptation and assessment of a

phenotypic method applied to *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, and proposal of a new algorithm. *Journal of Microbiological Methods*, 147, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.013>

31. González, L., Moreno, D., Bonomo, R., & Vila, A. (2014). Host-Specific Enzyme-Substrate Interactions in SPM-1 Metallo- β -Lactamase Are Modulated by Second Sphere Residues. *PLOS one*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003817>

32. Bernal R., M., & Guzmán, M. (2016). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3-4), 112-121. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>

33. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 3(3), 70–78.

34. Brown, T. (2007). *Genomas* (3ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

35. Uechi, K., Tada, T., Arakaki, M., & Nakasone, I. (2017). A Modified Carbapenem Inactivation Method, CIMTris, for Carbapenemase Production in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(12), 3405–3410. <https://doi.org/10.1128/JCM.00893-17>

36. Resistencia a los antibióticos. (2018, 5 febrero). Recuperado el 31 octubre, 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

37. Liakopoulos, A., Mavroidi, A., & Katsifas, E. (2013). Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infectious Diseases*, 13(505), 1–4. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-505>

38. Pasteran, F., Gonzalez, L., & Albornoz, E. (2016). Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 640–649. <https://doi.org/10.1128/JCM.01298-15>

39. Pierce, V., Simner, P., & Lonsway, D. (2017). Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae*. *Journal Clinical Microbiology*, 55(8), 2321–2333. <https://doi.org/10.1128/JCM.00193-17>

40. Wi, Y., Greenwood, K., & Schuetz, A. (2018). Activity of Ceftolozane-Tazobactam against Carbapenem-Resistant, Non-Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Associated Resistance Mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1), 1–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.01970-17>

41. Ruan, Z. (2018). Spread of GES-5 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan due to clonal expansion of ST235. *PLoS One*, 13(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207134>
42. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. (2017, 27 febrero). Recuperado el 3 noviembre, 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
43. Narro Robles, J., Kuri Morales, P., Meljem Moctezuma, J., Velasco González, M., & Ruíz Matus, C. (2016). Informe anual 2015. RHOVE. Recuperado el 31 octubre, 2019, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212974/infoanual_rhove_2015.pdf
44. Österblad, M., Hakanen, A., & Jalava, J. (2014). Evaluation of the Carba NP Test for Carbapenemase Detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7553–7556. <https://doi.org/10.1128/AAC.02761-13>
45. Noël, A., Huang, T., & Berhin, C. (2017). Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), 510–518. <https://doi.org/10.1128/JCM.01853-16>
46. Yaghi, J., Fattouh, H., Chammy, L., Akkawi, C. H., Maround, R., & Khalil, G. (2019). Unusually High Prevalence of Cosecretion of Ambler Class A and B Carbapenemases and Nonenzymatic Mechanisms in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Lebanon. *Microbial Drug Resistance*, 1–10. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0040>
47. Simner, P., Johnson, J., & Brasso, W. (2018). Multicenter Evaluation of the Modified Carbapenem Inactivation Method and the Carba NP for Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/JCM.01369-17>
48. Infección por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos - México. (2019, 5 marzo). Recuperado el 1 noviembre, 2019, de <https://www.who.int/csr/don/5-march-2019-carbapenem-resistant-p-aeruginosa-mex/es/>
49. Pires, J., Tinguely, R., Thomas, B., Luzzaro, F., & Endimiani, A. (2012). Comparison of the in-house made carba-NP and blue-carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Journal of Microbiological Methods*, 1, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.01.002>

50. Pires, J., Novais, A., & Peixe, L. (2013). Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4281–4283. <https://doi.org/10.1128/JCM.01634-13>
51. Mombini, S., Kiyani, L., Motamedi, H., & Elham, S. (2019). Diversity and metallo- β -lactamase-producing genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from filters of household water treatment systems. *Journal of Environmental Management*, 231, 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.068><https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.024>
52. Kamel, N., Mansour, M., & Aboshanab, K. (2018). Phenotypic screening and molecular characterization of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli recovered from febrile neutropenic pediatric cancer patients in Egypt. *PLOS One*, 13(8), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202119>
53. Guo, J., Chen, R., Wang, M., Fang, N., & Yang, R. (2017). Characterization of a novel class A carbapenemase PAD-1 from *Parabacteroides desertii* A-3-ET, a strain highly resistant to β -lactam antibiotics. *Nature. Scientific Reports*, 1(9), 7–8370. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07841-1>
54. Huigens, R., Richards, J., Ballard, E., Melander, C. H., & Deora, R. (2007). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation with Bromoageliferin Analogues. *American Chemical Society*, 129(1), 6966–6967. <https://doi.org/10.1021/ja069017t>
55. Harmsen, M., Yang, L., Tolker-Nielsen, T., & Tim, S. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *Federation of European Microbiological Societies. Immunology and Microbiology*, 59(1), 253–268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>
56. Literacka, E., Herda, M., & Baraniak, A. (2017). Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.*, and its practical use in the routine work of a national reference laboratory for susceptibility testing. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(11), 72281–72287. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3062-0>
57. Rabine, S., Bradford, P., Hackel, M., & Sahm, D. (2016). Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 60(2), 1067–1078. <https://doi.org/10.1128/AAC.02379-15>
58. Gauthier, L., Bonnin, R., Dortet, L., & Naas, T. (2017). Retrospective and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *PLOS One*, 12(2), 124–131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170769>

59. Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Rapid Identification of Carbapenemase Types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* by Using a Biochemical Test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(12), 6437–6440. <https://doi.org/10.1128/AAC.01395-12>
60. Saffari, M., Firoozeh, F., & Zibaie, M. (2016). Evaluation of Metallo- β -Lactamase-Production and Carriage of bla-VIM Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wound Infections in Isfahan. *Archives of Trauma Research*, *5*(4), 106–118. <https://doi.org/10.5812/at.34343>
61. Zamudio, M., Meza, A., Martínez, J., & Campos, J. (2011). Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Revista Peruana de Medicina experimental y Salud Pública*, *28*(1), 1–8.
62. Jensen, P., Zhu, Z., & Opijnen, T. (2017). Antibiotics Disrupt Coordination between Transcriptional and Phenotypic Stress Responses in Pathogenic Bacteria. *Cell Reports*, *20*(7), 1705–1716. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.062>
63. Shina, K., Sona, B., Hongb, S., & Kimc, J. (2008). Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *62*, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.015>
64. Byun, J., Gim, J., Jum, J., Yong, D., Lee, K., & Chong, Y. (2019). Modification and evaluation of the Triton Hodge test for screening carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *62* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114872>
65. Zwaluw, K., Haan, A., Pluister, G., & Schouls, L. (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*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
66. Simner, P., Johnson, J., Brasso, W., & Anderson, K. (2017). Multicenter Evaluation of the Modified Carbapenem Inactivation Method and the Carba NP for Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, *(62)* 1, 1–24. <https://doi.org/10.1128/JCM.01369-17>
67. Cercenado, E. (2015). Detección de Enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Revista Española de Quimioterapia*, *28*(1), 8–11. https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_sup1_cercenado.pdf

68. Streling, A., Barbosa, P., Marcondes, M., Nicoletti, A., & Gales, A. (2018). Genetic and biochemical characterization of GES-16, a new GES-type β -lactamase with carbapenemase activity in *Serratia marcescens*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.003>
69. Lin, K., Lauderdale, T., Wang, J., & Chang, S. (2016). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.01.005>
70. Moradali, M., Ghods, S., & Rehm, B. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(39), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
71. Chen, R., Guo, J., Cui, Y., & Song, Y. (2017). Characterization of a novel class A carbapenemase PAD-1 from *Paramesorhizobium desertii* A-3-ET, a strain highly resistant to β -lactam antibiotics. *Nature*, 7(8370), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07841-1>
72. Leiva, A., Loaiza, C., Carrasco, S., Lima, C., Reyes, A., Domínguez, M., & Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 34(5), 1–9. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
73. Berleur, M., Massias, L., & Poujade, J. (2018). Activity of fosfomicin alone or combined with temocillin in vitro and in a murine model of peritonitis due to KPC-3- or OXA-48-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology Chemotherapy*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.1093/jac/dky283>
74. Chan, K., Wong, S., Wong, P., Yu, P., & Hardick, J. (2016). A Rapid and Low-Cost PCR Thermal Cycler for Infectious Disease Diagnostics. *PLOS One*, 11(2), 1061–1072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149150>
75. Smiljanic, M., Kaase, M., Nejad, P., & Ghebremedhin, B. (2017). Comparison of in-house and commercial real time-PCR based carbapenemase gene detection methods in *Enterobacteriaceae* and non-fermenting gram-negative bacterial isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(48), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0223-z>
76. García, J., Cantón, R., Gomez, M., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2000). Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1–39.

77. Song, W., Hong, S., & Yong, D. (2015). Combined Use of the Modified Hodge Test and Carbapenemase Inhibition Test for Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas* spp. *Annals of Laboratory Medicine*, 35(2), 212–219. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.2.212>
78. Ballaben, A., Galetti, R., Neves, L., Ferreira, J., Oliveira, D., & Silva, P. (2019). Plasmid carrying blaCTX-M-2 and blaGES-1 in extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from cerebrospinal fluid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.00186-19>
79. Bonnin, R., Bogaerts, P., & Girlich, D. (2018). Molecular Characterization of OXA-198 Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), 2496–2507. <https://doi.org/10.1128/AAC.02496-17>
80. Joji, R., Kamal, N., & Mubarak, K. (2019). Detection of VIM and NDM-1 metallo-beta-lactamase genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in Bahrain. *Journal Lab Physicians*, 11(2), 138–143. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_118_18
81. Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012a). Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3773–3776. <https://doi.org/10.1128/JCM.01597-12>
82. Zwaluw, K., Haan, A., & Pluister, G. (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), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
83. Campana, E., Chuster, S., & Silva, I. (2017). Modified Carba NP test for the detection of carbapenemase production in gram-negative rods: optimized handling of multiple samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.015>
84. Cuzon, G., Bogaerts, P., & Bauraing, C. (2016). Spread of Plasmids Carrying Multiple GES Variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 5040–5043. <https://doi.org/10.1128/AAC.00360-16>
85. Gallagher, L., Roundtree, S., & Lancaster, D. (2015). Performance of the CLSI Carba NP and the Rosco Carb Screen Assays Using North American Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(10), 3370–3373. <https://doi.org/10.1128/JCM.01547-15>
86. Ghani, S., Thomson, G., & Snyder, J. (2015). Comparison of the Carba NP, Modified Carba NP, and Updated Rosco Neo-Rapid Carb Kit Tests for

Carbapenemase Detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(11), 3539–3542.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01631-15>

87. Hong, J., Lee, H., Yoon, E., & Jeong, S. (2016). Clonal Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 235 Isolates Carrying blaIMP-6 and Emergence of blaGES-24 and blaIMP-10 on Novel Genomic Islands PAGI-15 and -16 in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7216–7223.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01601-16>