



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
CURSO DE ESPECIALIDAD EN INFECTOLOGÍA**

**Actividad sinérgica in vitro con tetraciclinas en
Pseudomonas aeruginosa de muestras clínicas.
Repensando el uso de moléculas**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
SUBESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA**

PRESENTA:

DRA. MÓNICA MERCEDES LIZARAZO CÓMBITA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**DR. LUIS ESAÚ LÓPEZ JÁCOME
DIRECTOR DE TESIS**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2023



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.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a **Dios**, por permitirme llegar hasta este momento y nunca soltarme de la mano,.

A mis **padres (Ana y Alfonso)**, seres maravillosos y entregados, por darme la oportunidad de seguir creciendo, por su apoyo infinito, por que sin ellos nunca hubiese logrado ser lo que hasta el momento y a quienes les entrego este logro.

A este país, **México**, por haberme acogido en sus brazos y darme la oportunidad de en su Universidad Nacional Autonoma de México, lograr convertirme en la especialista que soy en este momento.

A mis **Hermanos**, por ser ese soporte en casa para mis padres, por apoyarlos y siempre brindarme su cariño y buenos deseos.

Al **Instituto Nacional de Cancerología, de Rehabilitación y mis profresores**, toda mi gratitud por sus conocimientos, sabiduría, por haber sido mi casa durante estos dos años y todo el amor que me brindaron.

Tabla de contenido

.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	6
Microbiología y definiciones.....	11
Modos de Resistencia.....	16
β-lactamasas.....	20
Carbapenemasas tipo metalo β-lactamasa.....	24
Metalo β-lactamasa, inhibidores y agentes quelantes.....	26
Tetraciclinas.....	27
Tetraciclinas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
3. Justificación:.....	33
Hipótesis.....	33
Pregunta de investigación:.....	34
Objetivos.....	34
Objetivo general:.....	34
Objetivos específicos.....	34
4. Materiales y métodos.....	35
Diseño.....	35
Criterios de Inclusión.....	35
Criterios de eliminación.....	36
Criterios de exclusión.....	36
Aislamientos clínicos.....	36
Concentración mínima inhibitoria (CIM).....	37
Determinación de carbapenemasas.....	39
Determinación de genes de resistencia.....	42
Concentración Mínima Inhibitoria de tetraciclinas.....	44
Método de inactivación de carbapenemasas con tetraciclinas.....	44
Concentraciones de Zn ⁺⁺	46
Demostración de la actividad quelante sobre el Zinc.....	46
Aleatorización de 30 cepas.....	47
Determinación de CIMs de sinergia entre tetraciclinas y meropenem.....	47

5. <i>Análisis estadístico:</i>	49
6. <i>Resultados:</i>	50
Concentración mínima inhibitoria (CIM).....	53
Concentraciones mínimas inhibitorias de tetraciclinas	55
eMIC modificado con tetraciclinas (teMIC)	56
Concentraciones de Zn ⁺⁺	57
Método de inactivación de carbapenemasas con tetraciclinas.....	58
Comparación de proporciones (eMIC y tMIC).....	61
Demostración de la actividad quelante sobre el Zinc.....	62
Determinación de CIMs según expresión de MBL	65
7. <i>Discusión</i>	66
8. <i>Referencias:</i>	70

1. Resumen

Objetivos: *Pseudomonas aeruginosa* causa un gran espectro de infecciones, desde infecciones urinarias, neumonías, hasta bacteriemias y cuadros de choque séptico. Cuenta con una gran variedad de mecanismos de resistencia dentro de las cuales se encuentra la enzimática como la expresión de metalo β -lactamasas; lo cual ha generado dificultades y limitaciones para su tratamiento con los antimicrobianos actuales; siendo necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad sinérgica *in vitro* combinaciones de tetraciclinas con carbapenémicos como opción terapéutica.

Metodología: Dada la capacidad de las tetraciclinas de quelar el zinc; de manera *in vitro* fue determinada la capacidad inhibitoria el cofactor metálico zinc en 30 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBL, mediante la modificación del eMIC, sustituyendo el EDTA por cada una de las tetraciclinas (tetraciclina, tigeciclina, minociclina y doxiciclina) en combinación con meropenem. Si se identificaba una inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* o disminución de la MIC, ésta sería asumida como actuación de la tetraciclina sobre el zinc de la MBL y la inhibición de la hidrólisis del β -lactámico..

Resultados: Se identificaron 159 cepas MBL, 79%, 24% y 6% VIM, IMP y NDM respectivamente, siendo las biopsias seguido de hemocultivos los sitios de tomas más frecuentes con un 30% y 15% de frecuencia. En cuanto a las MICs para tetraciclina doxiciclina y minociclina presentaron en más del 80% MICs ≥ 32 mg/L; y en lo referente a tigeciclina el 73% con MICs de 8 mg/L. Se aleatorizaron 30 cepas a las que se les realizó MICs y eMIC modificado con tetraciclinas, donde se observó que un tercio de las muestras presentaron una reducción de la MIC con tigeciclina únicamente, sin presentar modificaciones con respecto a las otras; al igual que evidenció un aumento del halo de inhibición con tigeciclina de 10 mm en el 50% de las muestras examinadas.

Conclusiones: La combinación de meropenem y tetraciclinas, especialmente con tigeciclina podría tener un efecto sinérgico para el manejo de *P. aeruginosa* productoras de MBL; es necesario realizar estudios adicionales con mayores concentraciones de tetraciclinas para valorar si existe disminución de MICs y aumento de halos de inhibición.

2. Introducción.

La vigilancia epidemiológica y la resistencia local a los antibióticos ha ejercido un papel fundamental en la actualidad para implementar medidas de control de infecciones⁽¹⁾.

La resistencia antimicrobiana (RAM) fue reconocida desde 1942, poco tiempo después del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming⁽²⁾, la cual viene aumentando de manera progresiva como una amenaza para el tratamiento efectivo de las infecciones. Esta es el resultado del uso excesivo e irracional de los antibióticos. Lo que ha hecho que en la actualidad no contemos con tratamientos efectivos para combatir estas infecciones, lo que ha repercutido también en el aumento en los costos de atención y mortalidad^{(1), (3)}.

En el 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de los patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, patógenos que representan una gran amenaza y para los que se necesitan de manera urgente nuevas opciones terapéuticas, dicha fue actualizada el pasado 2019 por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) clasificándolos según el grado de amenaza en urgentes, graves y preocupantes. **Tabla 1**^{(3),(4)}.

Tipo de amenaza	Definición conceptual
Urgente	<p><i>Acinetobacter</i> resistente a carbapenémicos. <i>Candida auris</i>. <i>Clostridioides difficile</i>. <i>Enterobacteriaceae</i> resistente a carbapenémicos. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a antibiótico.</p>
Grave	<p><i>Campylobacter</i> resistente a antibiótico. <i>Candida</i> resistente a antibiótico. <i>Enterobacteriaceae</i> productores de β-lactamasa de espectro extendido (BLEE). <i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multidrogo resistente (MDR). <i>Salmonella no-typhoidea</i> resistente a antibiótico. <i>Salmonella serotipo typhi</i> resistente a antibiótico. <i>Shigella</i> resistente a antibiótico. <i>Staphylococcus aureus</i> metililino resistente (MRSA). <i>Streptococcus pneumoniae</i>. Tuberculosis resistente a antibiótico.</p>
Preocupantes	<p><i>Streptococcus</i> grupo A resistente a eritromicina <i>Streptococcus</i> grupo B resistente a clindamicina.</p>

Tabla 1. Microorganismos consideradas amenazas urgentes, graves y preocupantes por la CDC 2019^{(4),(5)}.

En un análisis sistemático, publicado en el 2022, se estimó un total de 4.95 millones de muertes en el 2019, asociadas a bacterias resistentes a antibióticos a nivel mundial, en donde 1.27 millones de muertes fueron atribuibles directamente a la RAM⁽⁶⁾, por otro lado, estimaciones por el estadista británico Sir. Jim O’Neill proyectaron que la RAM podría generar cerca de 10 millones de muertes para el año 2050^{(6),(7)}. **Figura 1 y 2.**

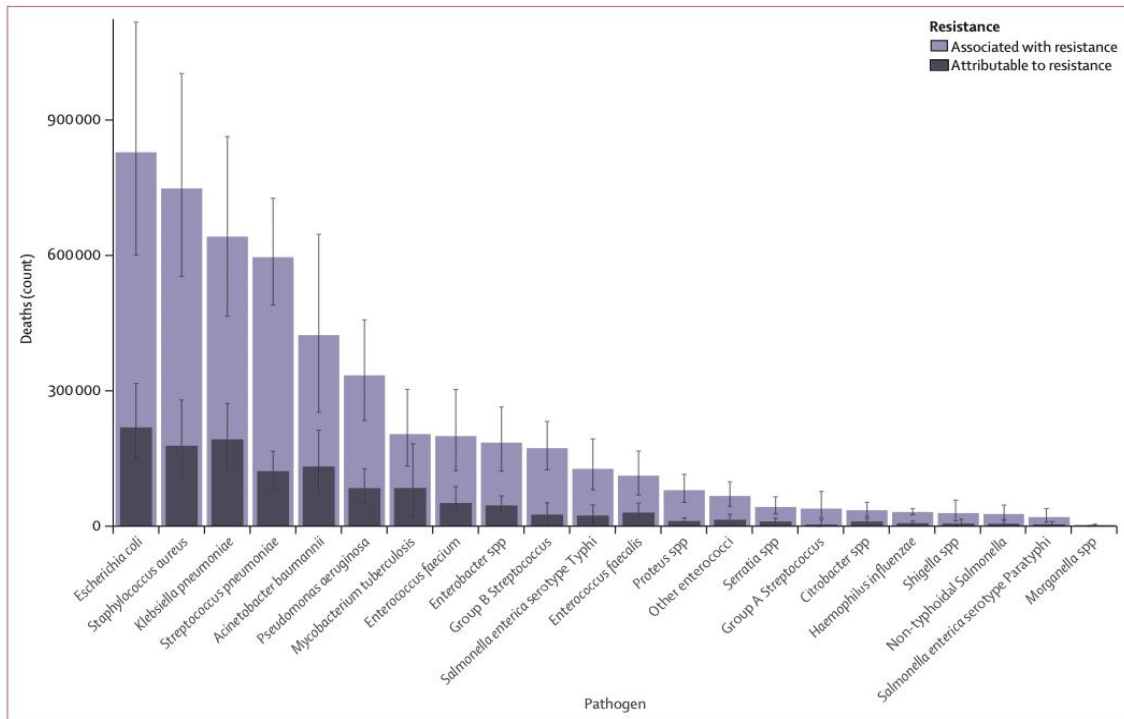


Figura 1. Distribución global de muertes asociadas a bacterias resistentes a antimicrobianos en el 2019⁽⁶⁾.

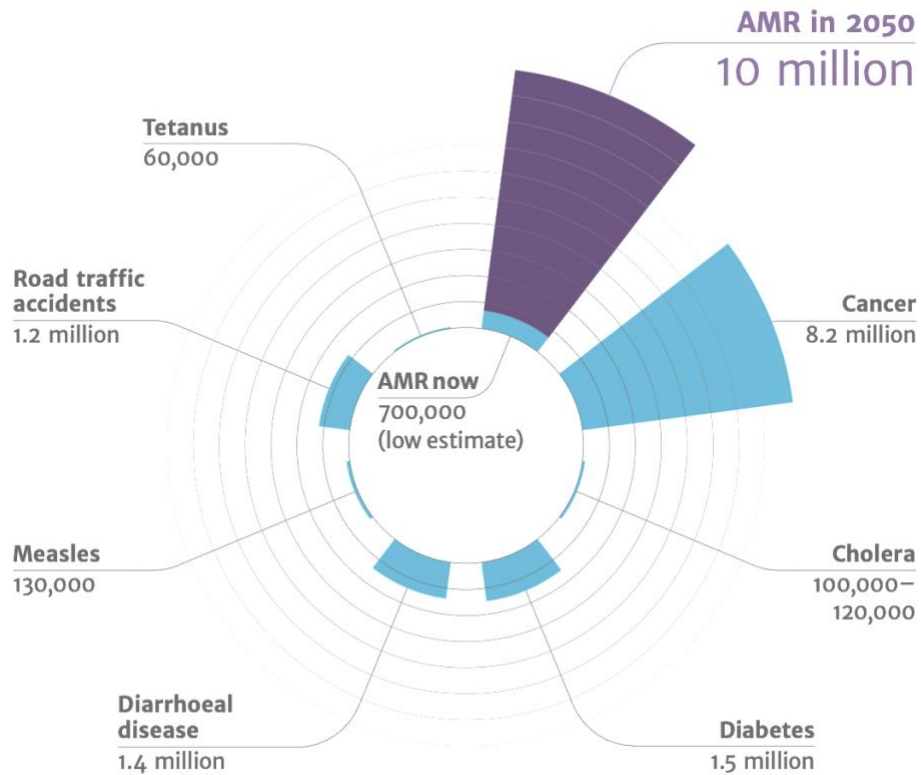


Figura 2. Distribución de mortalidad para el año 2050⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

Con la pandemia de COVID-19 los factores asociados a la resistencia antimicrobiana, como el uso inapropiado de antibióticos, medidas inadecuadas en el control de infecciones, y la falta de desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas se exacerbaron. Evidenciándose un aumento en la tasa de los ingresos a terapia intensiva, estancias hospitalarias y uso de antibióticos, lo que generó un incremento en la RAM al igual que en la mortalidad^{(8), (9)}.

En Estados Unidos, para *P. aeruginosa* se reportó una prevalencia de 7.1% - 7.3% dentro de las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), lo que significó un aumento de la misma a 16.2% del total de las infecciones en los pacientes internados y un 23% especialmente en los hospitalizados en unidad de cuidados intensivos en la última década⁽¹⁰⁾. Con respecto al espectro de resistencia *P. aeruginosa* se ha convertido en un problema de salud pública por la falta de alternativas terapéuticas, por lo que se ha observado que en algunas áreas geográficas una tasa de resistencia del 15% para XDR y 30% para MDR, lo que influye en un aumento proporcionado en la mortalidad⁽¹⁰⁾.

En lo que respecta a México, según lo reportado en por Garza- González en el que participaron 47 centros de 20 entidades federativas en el 2019, se encontró una resistencia a carbapenémicos < 3% para *Escherichia coli*, un 12.5% en *Klebsiella spp.*, y *Enterobacter spp.*; y alrededor del 40% en *P. aeruginosa*, no siendo más alentador con respecto a *Acinetobacter spp.* con resistencias mayores al 50%⁽¹¹⁾. El panorama durante el periodo de pandemia por COVID-19 no cambió mucho con respecto al resto del mundo, de igual manera se encontró un aumento en la resistencia a carbapenémicos en el 37.1%⁽¹²⁾.

En el pasado 2021 fue reportado un estudio sobre la prevalencia y las características de las β -lactamasas de espectro extendido de las bacterias Gram negativas en 52 centros médicos de México donde fue identificado que *P. aeruginosa*, en muestras sanguíneas, presentaba una resistencia a quinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) del 14 – 36%, carbapenémicos 37.1%, cefepime (FEP) 15.5% y a piperacilina/tazobactam (TZP) del 15.6%; dentro de las principales carbapenemasas descritas encontraron a *Verona integron-encoded metallo β -lactamase* (bla_{VIM}), seguido de *Guyana Extended Spectrum* (bla_{GES}) e *Imipenemase* (bla_{IMP})(¹³).

A pesar de la potente actividad antibiótica de los carbapenémicos con y sin inhibidores de β -lactamasas contra *P. aeruginosa* y otros microorganismo, su efectividad se ha visto comprometida por la expresión de diferentes mecanismos de resistencia, dentro de los cuales se encuentran la sobreexpresión de bombas de eflujo, pérdida de porinas Opr y enzimas hidrolíticas de carbapenémicos; especialmente de clase B (metalo- β -lactamasa) de acuerdo a la clasificación de Ambler, las cuales son capaces de hidrolizar el enlace amida de los β -lactámicos(¹⁴), disminuyendo las alternativas terapéuticas para el tratamiento de este tipo de infecciones.

Microbiología y definiciones

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, aislado por primera vez del pus verde en heridas de militares por Gessard en 1882, descrita en 1894 como género *Pseudomonas* por Migula⁽¹⁵⁾. Los miembros de la familia *Pseudomonaceae* son ubicuos (suelo, plantas y entornos acuáticos)^{(15),(16)}, adaptable a diferentes ambientes, capaces de vivir en condiciones deficientes en nutrientes y temperaturas desde los 4 a 42° C⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾. Son capaces de sobrevivir en superficies secas y abióticas hasta por un periodo de 6 meses⁽¹⁷⁾.

La conformación de la pared celular y principalmente la membrana externa, estructura presente en los Gram negativos actúan como barrera selectiva, limitando el paso de algunas moléculas como antibióticos. Esto gracias a la presencia de la bicapa de fosfolipídica, porinas, lipopolisacáridos (LPS) y bombas de eflujo, entre otras⁽¹⁷⁾. **Figura 3.**

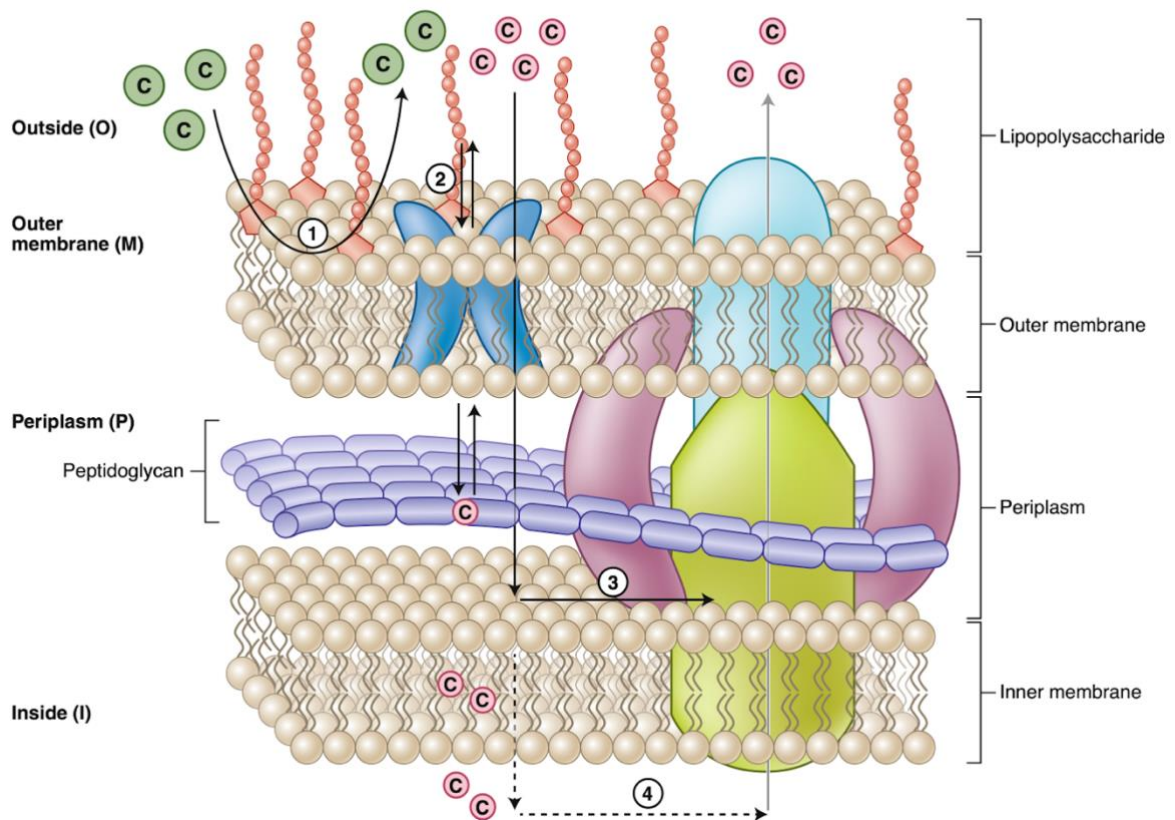


Figura 3. Pared celular de bacterias Gram negativas y vías de flujo de fármacos a través de ella. La pared incluye una red de lipopolisacáridos que limitan la penetración de compuestos grandes hidrofóbicos (**C verde**), canales de porinas que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas (**C rojo**) y bombas de eflujo transmembrana que capturan substratos del periplasma (**3**) o el citosol (**4**) y los bombea fuera de la célula. **Fuera de la célula (o). Membrana externa (M), periplasma (P) y citoplasma (I)**⁽¹⁹⁾.

Su patogenicidad se encuentra respaldada por numerosos mecanismos de virulencia, definida esta como la capacidad para infectar al hospedero, generar síntomas clínicos por medio de factores que contribuyen a la unión bacteriana, colonización, invasión, interrupción en la integración del tejido del hospedero y el escape al sistema inmune entre otros^{(17),(18)}.

En lo referente a los factores de virulencia de *P. aeruginosa* estos se pueden clasificar en los relacionados a las estructuras de superficie bacteriana, factores secretados y por último a las interacciones bacterianas célula - célula⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾, como se muestra en la **Figura 4 y Tablas 2, 3 y 4.**

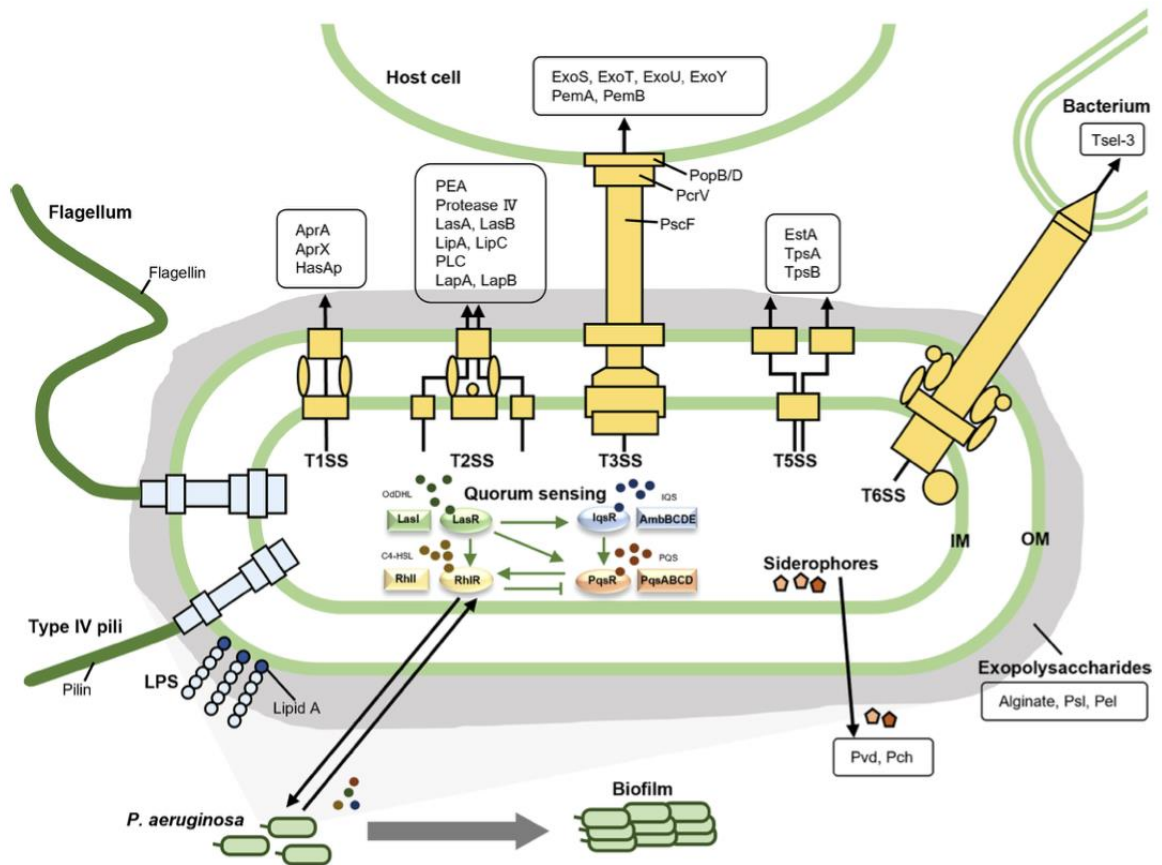


Figura 4. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*⁽¹⁷⁾. **Superficie bacteriana:** pili tipo IV, flagelos, lipopolisacáridos. **Sistemas de secreción:** T1SS, T2SS, T5SS y T6SS. **Interacción célula- célula:** sistema de percepción de quórum y biopelículas.

Categorías	Factores de virulencia	Función
Estructuras de la superficie bacteriana		
Apéndices de superficie	Pili tipo	<ul style="list-style-type: none"> - Fijación a la célula del huésped. - Motilidad de espasmos. - Formación de biopelículas.
	Flagelo	<ul style="list-style-type: none"> - Motilidad de enjambre. - Formación de biopelículas. - Adhesión bacteriana.
Componente de membrana externa	Lipopolisacáridos	<ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de respuesta inflamatoria del huésped. - Resistencia a la fagocitosis.
Sistema de secreción	Sistema de secreción tipo 1 (T1SS)	<ul style="list-style-type: none"> - Secreción de proteasas alcalinas. - Utilización de hierro.
	Sistema de secreción tipo 2 (T2SS)	<ul style="list-style-type: none"> - Secreción de varias enzimas líticas.
	Sistema de secreción tipo 3 (T3SS)	<ul style="list-style-type: none"> - Inyección de factores virulentos en la célula huésped.
	Sistema de secreción tipo 5 (T5SS)	<ul style="list-style-type: none"> - Secreción de proteínas relacionadas con formación y adhesión de biopelículas.
	Sistema de secreción tipo 6 (T6SS)	<ul style="list-style-type: none"> - Entrega de toxinas a bacterias vecinas. - Translocación de efectores a células hospedero, formación de biofilm.

Tabla 2. Factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado de Liao C, et al^{(17), (22)}.

Tabla 3. Factores de virulencia asociados a secreción de factores de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado de Liao C, et al^{(17), (22)}.

Categorías	Factores de virulencia	Función
Secreción de factores		
Exopolisacáridos	Alginato	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de biopelículas. - Evasión de sistema inmune. - Adhesión bacteriana.
	Pel y Psl	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de biopelículas. - Evasión de sistema inmune. - Adhesión bacteriana
Sideróforos	Pioverdina	<ul style="list-style-type: none"> - Quelante de hierro, promoviendo el crecimiento bacteriano. - Contribuye a la virulencia bacteriana.
	Piochelina (Pch)	<ul style="list-style-type: none"> - Quelante de hierro, promueve el crecimiento bacteriano. - Contribuye a la virulencia bacteriana.
Proteasas	Proteasa alcalina (AprA)	<ul style="list-style-type: none"> - Regulación en la detección del quórum. - Protección de la bacteria contra el sistema inmune del huésped.
	Elastasa A y B (LasA y LasB)	<ul style="list-style-type: none"> - Degrada las proteínas en los tejidos del hospedero, causando daño tisular
	Proteasa IV	<ul style="list-style-type: none"> - Degrada las proteínas del hospedero que implican inmunidad contra la infección.
Toxinas	Efectores T3SS (ExoS, ExoT, ExoU y ExoY)	<ul style="list-style-type: none"> - Interrupción del citoesqueleto de actina del hospedero. - Interferencia de las uniones célula a célula. - Inducción de apoptosis de la célula del hospedero.
	Exolisina (ExIA)	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de poros en la membrana de la célula del hospedero.
	Exotoxina A (PEA)	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la síntesis de proteínas que resultan en la muerte celular.
	Lipasa A (LipA)	<ul style="list-style-type: none"> - Inmunomodulador.
	Fosfolipasa C (PLC)	<ul style="list-style-type: none"> - Degrada el surfactante fosfolipídico. - Daña las células del hospedero.
	Lipo-oxigenasa (LoxA)	<ul style="list-style-type: none"> - Interferencia de la señalización lipídica del huésped. - Regulación del proceso de invasión bacteriana.
	Leucocidina	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de las funciones inmunitarias del hospedero.
	Piocianina (PCN)	<ul style="list-style-type: none"> - Suprimir la respuesta inmune citotóxica a las células del hospedero.

Categorías	Función
Interacción bacteriana célula - célula	
Percepción de quórum (QS)	<ul style="list-style-type: none"> - Regulación en la producción de factores de virulencia. - Integración del estrés ambiental. - Modulación en la producción de biopelícula - Modulación en movilidad de enjambre y contracción
Biopelícula	<ul style="list-style-type: none"> - Escapar de la respuesta inmune del hospedero. - Resistencia contra antibióticos. - Persistencia de bacterias en condiciones adversas.

Tabla 4. Factores de virulencia asociados a interacción bacteriana célula célula de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado de Liao C, et al^{(17), (22)}.

Modos de Resistencia.

P. aeruginosa además de tener un variado número de factores de virulencia, adicionalmente cuenta con diferentes modos de resistencia, que se pueden clasificar en tres categorías, adaptativo (formación de biopelículas), intrínseco y mecanismos adquiridos (mutaciones o adquisición de integrones, plásmidos, fagos y transposones)⁽²³⁾ **Figura 5.**



Figura 5. Modos de resistencia de *P. aeruginosa*⁽²³⁾.

A continuación describiremos algunas características y cada uno de los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*. **Figura 6 y Tabla 5, 6.**

Tipo de Resistencia	Cacterística	Acción
Intrínseca	Impermeabilidad de membrana externa.	- Limita el paso de moléculas de gran tamaño
	Barreras estructurales. EPS (<i>Extracellular polymeric Substances</i>)	- Moléculas sintetizadas para defenderse del medio externo. - Pueden formar biopelículas
	Disminución de porinas	- Disminución de porinas no específicas. - Sustitución de porinas por canales selectivos que disminuyen la permeabilidad a antibióticos.
	Bombas de eflujo	- Expulsa tóxicos y antimicrobianos (MexAB-OprM)
	Hiperproducción de AmpC (cromosómica)	- Produce hidrólisis de cefalosporinas.

Tabla 5. Resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa*. Bravo L. Adaptado de Liao C, et al⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²⁴⁾.

Tipo de Resistencia	Característica	Mecanismo
Adquirida	Disminución de porinas	<ul style="list-style-type: none"> - Disminuye porinas OprD por cambios en el gen <i>oprD</i>. - Disminuye la permeabilidad de la membrana a carbapenémicos.
	Sobreproducción de bombas de eflujo	<ul style="list-style-type: none"> - Mutación del gen regulador de MexAB-OprM. - Aumenta resistencia a carbapenémicos. - Mutación del gen regulador de MExXY. - Resistencia a cefalosporinas como cefepime y aminoglucósidos.
	Mutaciones (Genera aumento de la resistencia intrínseca)	<ul style="list-style-type: none"> - Mutación que inactiva el gen represor de AmpC. - Hidroliza los β-lactámicos (TPZ, ticarcilina), monobactámicos y cefalosporinas de 3ra y 4ta generación.
	Tooisomerasa II o DNA girasa	<ul style="list-style-type: none"> - Mutación de genes que codifican topoisomerasa II o DNA girasa (<i>gyrA</i> y <i>gyrB</i>) y/o topoisomerasa IV (<i>parC</i> y <i>parE</i>) - Resistencia a quinolonas.
	PBP	<ul style="list-style-type: none"> - Mutación del gen <i>ftsI</i> que codifica para PBP3.
	BLEE	<ul style="list-style-type: none"> - Genes que codifican para β-lactamasas de espectro extendido (BLEE). - Hidroliza penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos.
Transferencia horizontal de genes (plásmidos)	Carbapenemasas	<ul style="list-style-type: none"> - Metalo β-lactamasas (MBL). - VIM - IMP
	16 rRNA metilasa	<ul style="list-style-type: none"> - Genes que codifican para 16rRNA metilasa. - Enzimas modificadoras de diana de los aminoglucósidos.
	Gen <i>mcr-1</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Codifica para enzimas fosfoetanolamina transferasa, encargada de la adición de fosfoetanolamina al lípido A (compromete la membrana celular). - Altera la diana de colistina.

Tabla 6. Resistencia intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa*. Bravo L. Adaptado de Liao C, et al⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²⁴⁾.

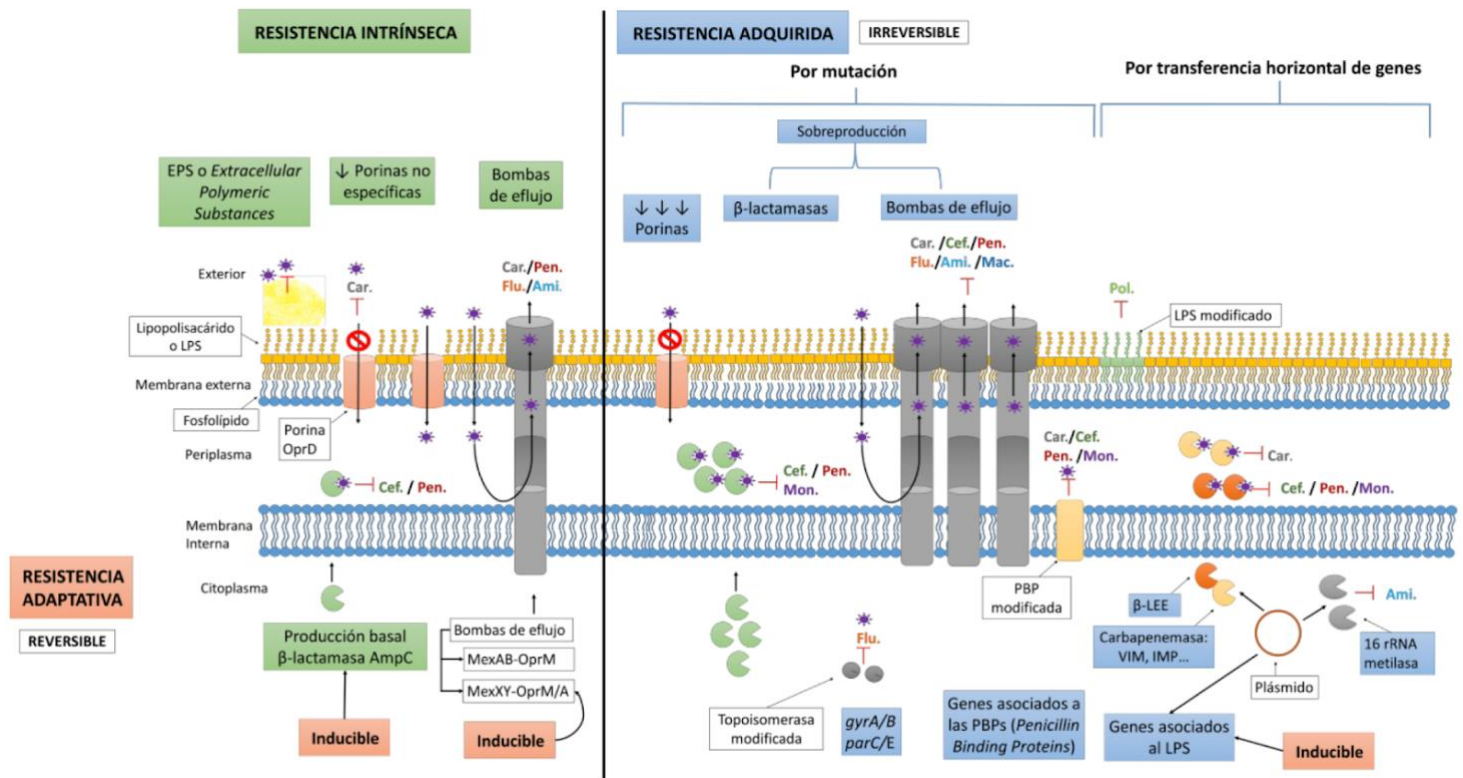


Figura 6. Mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*: **Intrínseca, adquirida y adaptativa.** Las abreviaturas utilizadas para los diferentes antibióticos antipseudomonas (representados con una estrella morada) son las siguientes: **Cef** (cefalosporinas); **Pen** (penicilinas), **Mon** (monobactámicos), **Ami** (aminoglucósidos), **Flu** (fluoroquinolonas); **Mac** (macrólidos) y **Pol** (polimixinas). β-LEE (β-lactamasa de espectro extendido)⁽²²⁾.

β-lactamasas.

Uno de los mecanismos de resistencia más prevalentes de las bacterias Gram negativas es la producción de β-lactamasas; enzimas capaces de romper el anillo β-lactámico y así inactivar estos antibióticos (**Figura 7**). Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse a nivel cromosómico bacteriano o ser transferidos por medio de plásmidos, y ser un reto para el control de las infecciones⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽²¹⁾⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾.

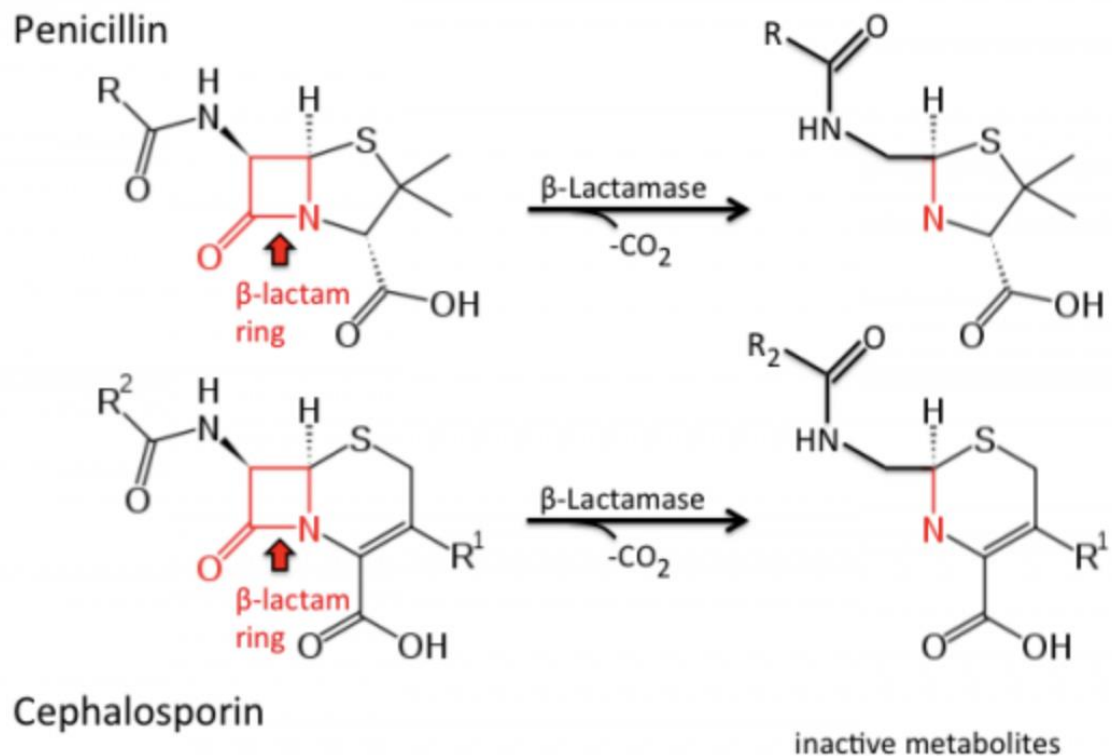


Figura 7. Esquema de hidrólisis de β -lactámicos por la enzima β -lactamasa⁽²⁶⁾.

Dentro de la familia de β -lactamasas existen diferentes clases, la primera descrita fue **AmpC β -lactamasa** en 1940 en una cepa de *Escherichia coli* cuya característica especial era la hidrólisis de cefalosporinas de tercera generación, aztreonam e inhibidores de β -lactamasasa⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾; las **β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)** que confieren resistencia a las oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de tercera generación), aztreonam, penicilinas, siendo incapaces de hidrolizar cefamicinas (cefotixina y cefotetán) que son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, entre otros. Por último las **carbapenemasas** que hidrolizan carbapenémicos y otros β -lactámicos⁽²⁷⁾ (**Figura 8**).

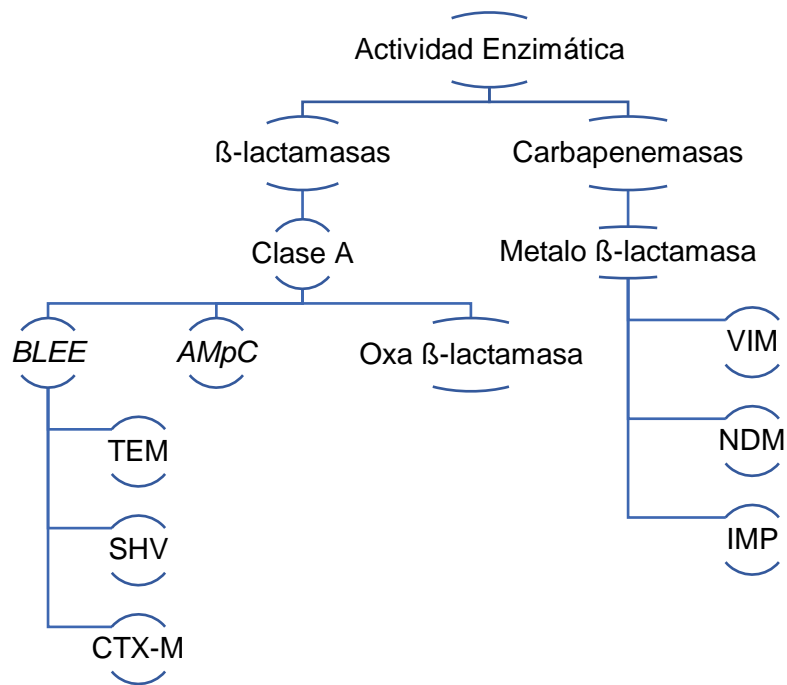


Figura 8. Clasificación de mecanismo de resistencia a los antibióticos de tipo enzimático⁽²⁷⁾.

Ante el descubrimiento de varias β-lactamasas, en 1980 Ambler realizó una clasificación según su estructura, considerando la interacción enzimática y secuencias de aminoácidos, se describen 4 clases: **A, B, C y D**. Las clase A, C y D utilizan serina como centro activo enzimático, que media la hidrólisis; y la clase B utiliza una o dos moléculas de zinc como cofactor metálico, atacando directamente los grupos carbono y amida de todos los β-lactámicos y de esta forma hidrolizar su anillo^{(25), (26), (28)}. (**Figura 9**).

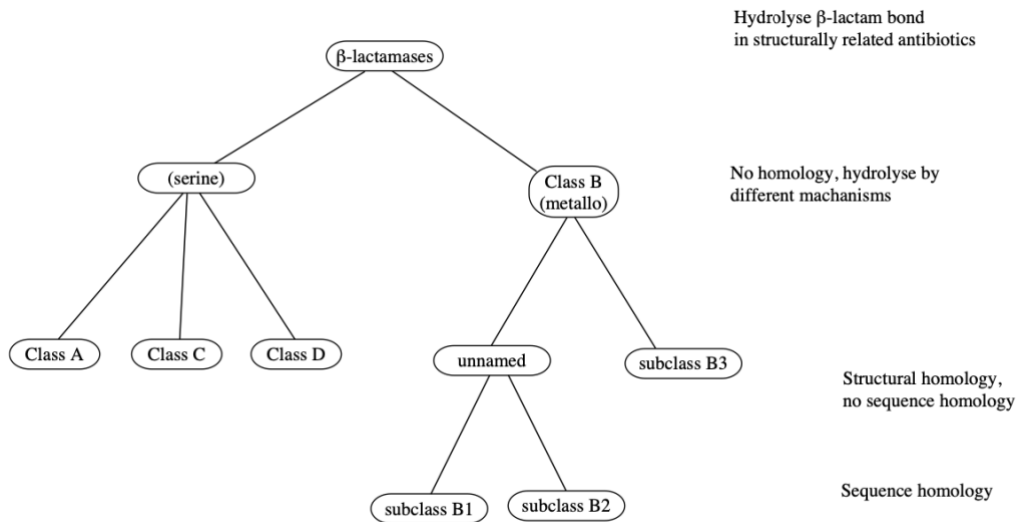


Figura 9. Diagrama de clasificación de Ambler. Tomado de Hall BG⁽²⁵⁾.

En 1995 surgió otra clasificación de tipo funcional realizada por Bush-Jacoby-Medeiros, esta clasificación se basa en aspectos como la degradación de sustratos y sus inhibidores funcionales; se describen tres clases: 1, 2 y 3, actualizada en el 2009, dado el aumento en el número de secuencias de proteínas para las β-lactamasas^{(25) (28)(26)(29)} (**Tabla 7**).

<i>Bush-Jacoby (2010)</i>	<i>Bush-Jacoby-Medeiros (1995)</i>	<i>Clase molecular</i>	<i>Sustrato distintivo</i>	<i>Inhibido por:</i>		<i>Característica</i>	<i>Enzima Representativa</i>
				CA/TZB	EDTA		
2f	2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	Incremente hidrólisis de de carbapenémicos, oxi-amino-β-lactámicos, cefamicinas.	KPC-2, IMI-1, SME-1
2df		D	Carbapenémicos	Variable	No	Hidroliza oxacilina y carbapenémicos.	OXA-23, OXA-48
1e		C	Cefalosporinas	No	No	Incrementa hidrólisis de ceftazidima y a menudo otras oxi-amino-β-lactámicos.	CMY-10
3a	3	B1	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenémicos, pero no monobactámicos.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3a	3	B3	Cefalosporinas	No	Si	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenémicos, pero no monobactámicos.	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B2	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis de preferencia de carbapenémicos.	CphA, SFh-1

Tabla 7. Clasificación de carbapenemasas. **CA:** Clavulanic acid, **TZB:** Tazobactam, **KPC:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa; **IMI;** **SME:** *Serratia marcescens* enzyme; **VIM;** **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid⁽²⁹⁾.

Carbapenemasas tipo metalo β -lactamasa.

Las β -lactamasas de clase B o metalo- β -lactamasa por la clasificación de Ambler⁽²⁵⁾, fueron identificadas por primera vez hace casi 90 años en una cepa de *Bacillus cereus* que requería un cofactor metálico (zinc) para ser activo⁽³⁰⁾. Estas carbapenemasas posee 2 moléculas de Zn^{++} en su centro activo e hidrolizan los anillos de los β -lactámicos; excepto lo monobactámicos como el aztreonam, no son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam o avibactam; más sí por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ⁽³¹⁾.

Las metalo- β -lactamasas (MBL) se dividen en tres subclases, B1, B2 y B3 basado en las diferencias existentes en la secuencia de aminoácidos en su sitio activo, ligandos del zinc^{(30),(31),(32)}. De estas existen unas adquiridas por medio de plásmidos y transposones como las de subclase B1 (IMP, NDM y VIM), haciendo de esta una resistencia transferible a otras cepas⁽³⁰⁾⁽³¹⁾ (**Tabla 8, Figura 10**).

Tipo de MBL	Especie	Enzima	Subclase
Cromosómico	<i>Bacillus cereus</i>	BclI	B1
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	IND	B1
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	BlaB	B1
	<i>Myroides odoratimimus</i>	MUS y MYO	B1
	<i>Bacterioides fragilis</i>	CfiA/CcrA	B1
	<i>Aeromonas spp.</i>	CphA	B2
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	L1	B3
	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	GOB	B3
	Asociado a plásmido	<i>Verona Integron-encoded metallo-β-lactamase (VIM)</i>	β-lactamase (VIM)
New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)		β-lactamase (NDM)	B1
Imipenemase (IMP)		Imipenemase (IMP)	B1
Sao Paulo metallo-β-lactamase (SPM)		β-lactamase (SPM)	B1
German imipenemase (GIM)		Imipenemase (GIM)	B1
KHM		KHM	B1
Dutch imipenemase (DIM)		Imipenemase (DIM)	B1
Serratia metallo-β-lactamase (SMB)		β-lactamase (SMB)	B3
Adelaide imipenemase (AIM)		Imipenemase (AIM)	B2

Tabla 8. Distribución de MBL con transmisión cromosómica y asociada a plásmidos⁽³¹⁾.

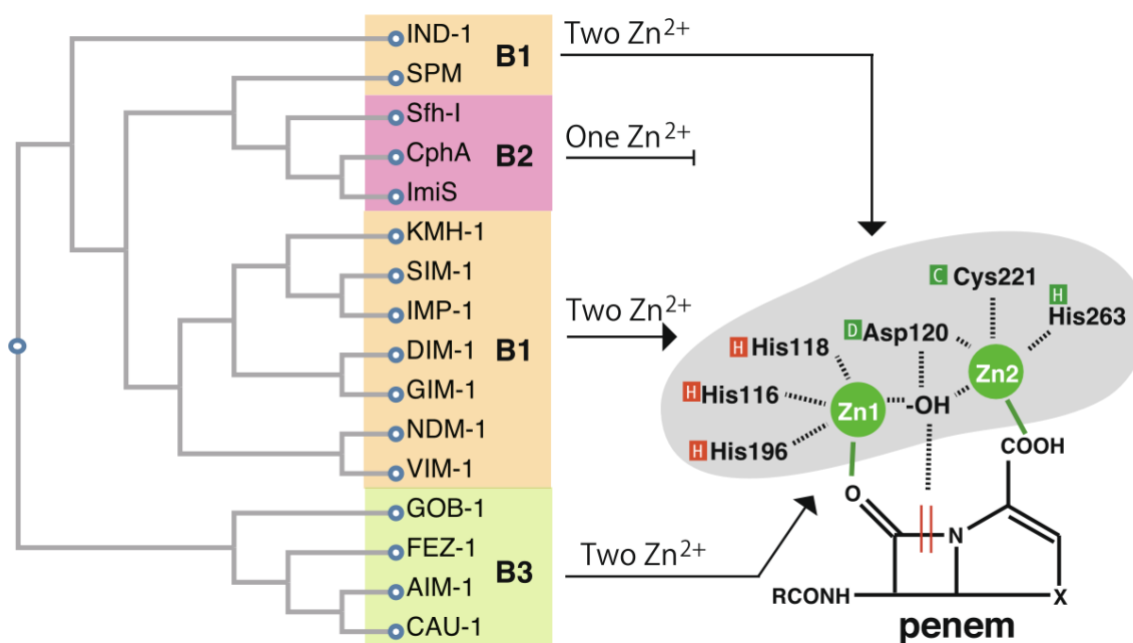


Figura 10. Árbol filogenético de la familia de metalo β-lactamasa de clase B. Las MBL se

clasifican en 3 subclases (B1, B2 y B3) en función de su secuencia de aminoácidos. B1 y B3 tienen dos moléculas de Zn^{++} en el centro activo de la enzima ($Zn1$, $Zn2$). La subclase B2, tiene una sola molécula de Zn^{++} en el centro activo. Tomado de Sawa T, Kooguchi K⁽³⁰⁾.

En cuanto al mecanismo de acción de la metalo- β -lactamasas, estas requieren zinc para la hidrólisis del anillo β -lactámico, mediante la activación de una molécula de agua, que va a generar una apertura del anillo β -lactámico y no por medio de intermediarios covalentes como las serino β -lactamasas⁽³¹⁾.

Metallo β -lactamasa, inhibidores y agentes quelantes.

Dada la presencia de zinc en la estructura de las metalo- β -lactamasas indispensables para la hidrólisis de los anillos β -lactámicos, han sido analizadas algunas moléculas capaces de quelar este metal, como los agentes que contienen tiol (compuesto formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno)⁽³³⁾, dicarboxilatos, hidroxamatos y tetrazoles que de manear *in vitro* logran este objetivo, pero dado que a las metaloproteasas humanas también son vulnerables al mismo, su riesgo de toxicidad en humanos ha impedido su desarrollo clínico⁽³⁰⁾.

Otro medicamento también valorado es el estereoisómero dipéptido L-captopril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) utilizado en el tratamiento de la hipertensión arterial descubierto en 1970, el cual inhibe las MBL al quelar los iones de zinc del sitio activo a través de su grupo tiol, puede potenciar los β -lactámicos⁽³⁰⁾⁽³¹⁾⁽³⁴⁾.

Las bistiazolidinas compuestos bicíclicos que contienen carboxilato, pueden inhibir las MBL a través de un grupo tiol que quela el zinc, ésta inhibición de manera *In vitro*, se considera que restaura la actividad del imipenem en cepas de *E. coli* productoras de NDM-1^{(30),(35)}. En un estudio realizado por González-Kosmopoulou en 2015 sobre el uso de biastiazolidinas como una estructura similar a la de los sustratos de los β -lactámicos, que pueden modificarse para unirse al sitio activo de las MBL, inhibiendo *in vitro* las NDM-1, el estudio fue realizado en cepas de *E. coli* y *A. baumannii* donde fue restaurada la actividad antibacteriana del imipenem al unirse a dichas biastiazolidinas⁽³⁵⁾

Tetraciclinas.

Las tetraciclinas son agentes antibióticos de amplio espectro descubiertas en la década de los 40s por Benjamin Minge Duggar, como una sustancia terapéutica producto de fermentación de bacterias de suelo, de coloración dorada, llamadas *Streptomyces aureofaciens*, *S. rimosus* y *S. viridofaciens*, la cual tiene actividad contra una amplia gama de microorganismos, como bacterias Gram positivas, Gram negativas, organismos atípicos como *Chlamydia spp.*, *Mycoplasma spp.* y *Rickettsia spp.*. Son antibióticos bacteriostáticos basados en un núcleo de dihidroantraceno, que contiene cuatro anillos fusionados³⁴⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾ (**Figura 11**), el primero de ellos fue la clortetraciclina en 1948, poco después se aislaron otras tetraciclinas naturales como tetraciclina. Y desde entonces se han generado muchos otros compuestos de

manera sintética dentro de las más utilizadas la doxiciclina (DOX) y minociclina (MIN)⁽³⁸⁾⁽³⁷⁾⁽³⁹⁾.

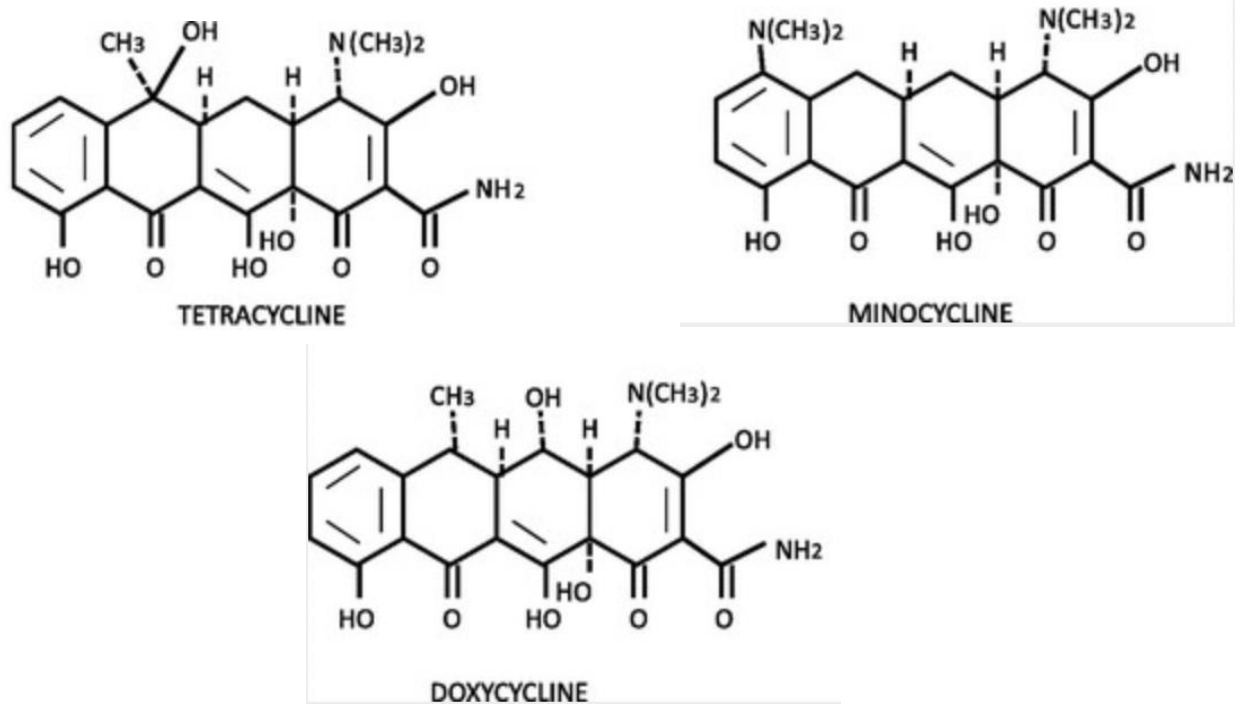


Figura 11. Estructura química de las tetraciclinas. ⁽³⁷⁾⁽³⁹⁾.

La síntesis de proteínas en las bacterias, es realizada por medio de los ribosomas, con las subunidades 30S y 50S, donde el ARN de transferencia ribosomal (ARNt) cargado con un aminoácido, se une al ARNm y contribuye a la elongación de las proteínas. Las tetraciclinas inhiben la subunidad ribosomal 30S, impidiendo la unión del aminoácido al ARNm, impidiendo la síntesis de nuevas proteínas, su replicación y adecuado funcionamiento⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾.

Otra de las propiedades de las tetraciclinas es su capacidad de inhibir las metaloproteínas (MMP), que son una familia de proteasas dependientes de zinc involucradas en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos como la

inflamación, remodelación de tejidos entre otros⁽³⁹⁾. Este mecanismo de acción se cree que es por los efectos anti-proteolíticos por inhibición directa de las MMP como por la inhibición de su expresión⁽³⁹⁾⁽³⁶⁾ (**Figura 12**).

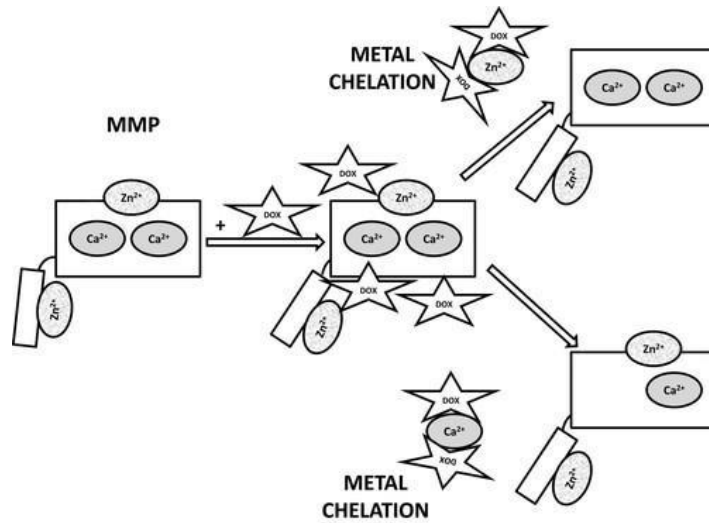


Figura 12. Ilustración de los medios por los cuales la doxiciclina a través de quelación del zinc y calcio puede actuar para inhibir las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Ambos iones son cruciales para permitir la actividad enzimática⁽⁴⁰⁾.

Dentro de los mecanismo de resistencia a las tetraciclinas se plásmidos, estan mutaciones dentro del sitio de unión ribosómico que le confiere protección, bombas de eflujo, e inactivación enzimática⁽³⁶⁾ (**Figura 13**).

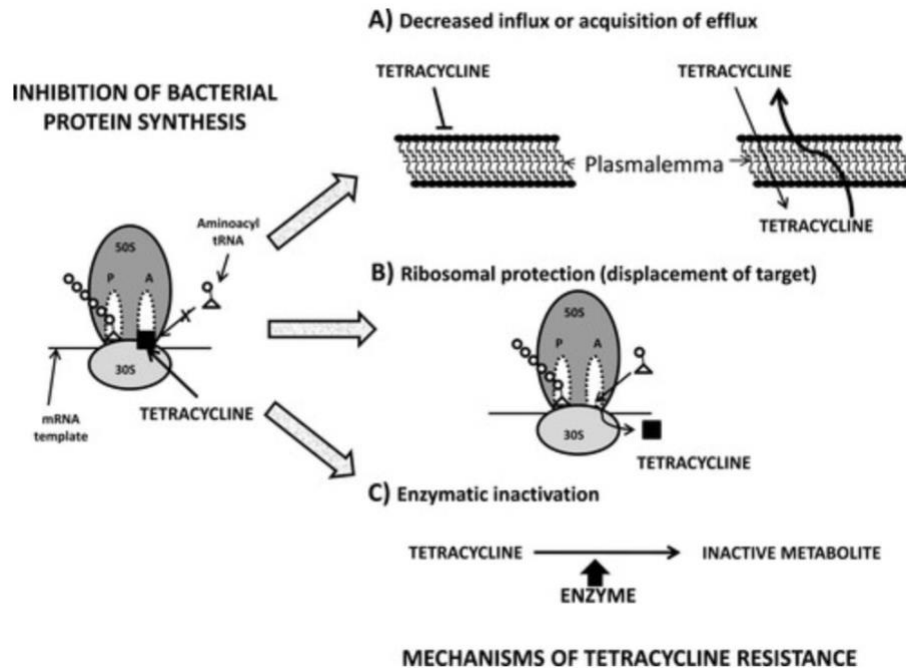


Figura 13. Mecanismos de resistencia por medio de los cuales las tetraciclinas pueden perder su capacidad inhibitoria de síntesis de proteínas. **A.** Aumento de bombas de flujo, disminución de porinas a nivel de membrana celular. **B.** Desplazamiento del objetivo (ribosomas). **C.** Inhibición enzimática⁽⁴⁰⁾.

Tetraciclinas en *Pseudomonas aeruginosa*

En lo que respecta al uso de tetraciclinas en *P. aeruginosa* la gran mayoría de estas muestran grados variables de resistencia intrínseca a diferentes antimicrobianos, como fluoroquinolonas, cloranfenicol y tetraciclinas dada la baja permeabilidad de su membrana externa, el aumento de las bombas de flujo, actividad enzimática y protección a nivel ribosomal⁽³⁶⁾⁽⁴¹⁾. Se reconoce que el sistema de bombas eflujo es altamente específica. Se han descrito *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, *MexXY* y *MexEF-OprN* como las principales bombas involucradas en la expulsión de las tetraciclinas⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾ (**Figura14**).

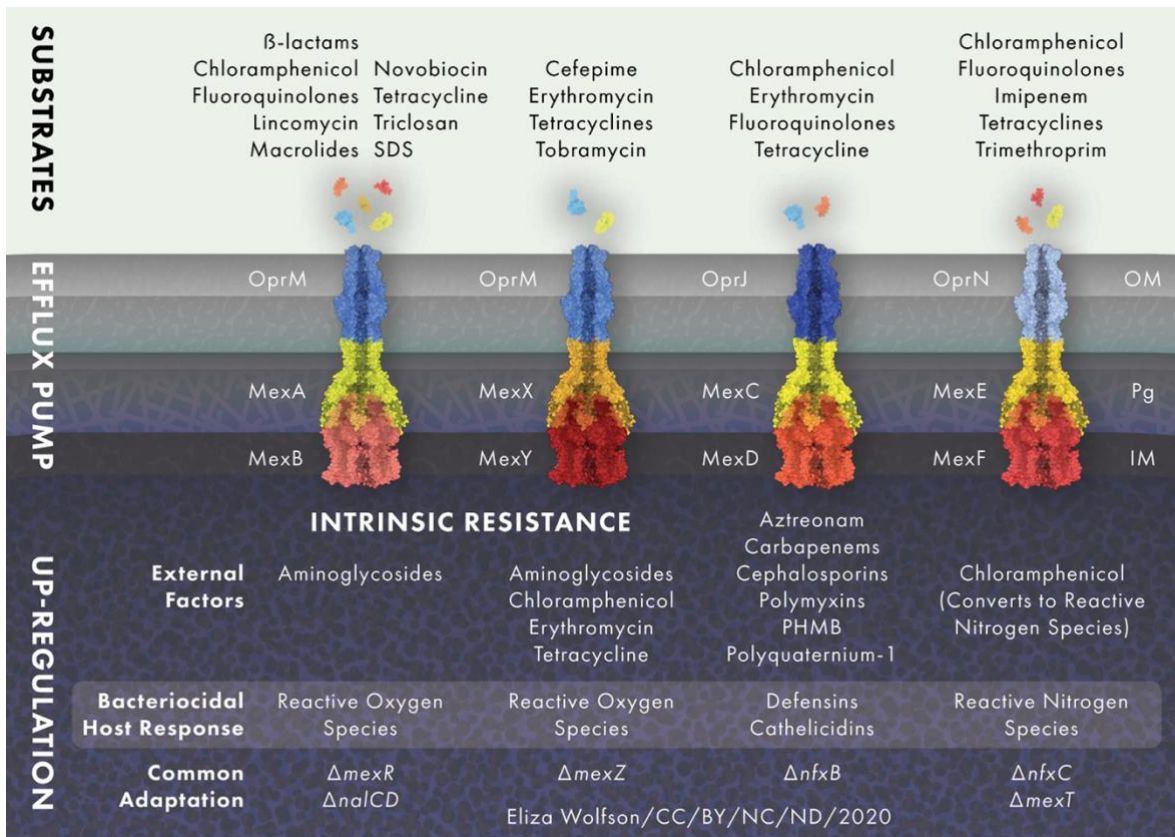


Figura 14. Mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* a las tetraciclinas ⁽⁴²⁾.

La búsqueda de opciones terapéuticas y el uso de antibióticos ya existentes para el manejo de RAM se viene realizando desde hace muchos años, al igual que el utilizar ciertas características de los antibióticos así como de los mecanismos de resistencia; como en el estudio publicado en el 2000 por Saji M. {Citation} de uso combinado de acrinol (Ac) y clorhidrato de tetraciclina (Tc) a dosis de 400 µg/mL contra cepas de *P. aeruginosa* donde fueron medidas concentraciones mínimas bactericidas (CMB) y se logró evidenciarse una disminución hasta niveles indetectables (< 10 ufc/mL) de células viables en el uso sinérgico de estos dos compuestos, previo a un tratamiento con Ac; este paso, podría aumentar la

permeabilidad de la membrana externa de *P. aeruginosa* y un adecuado ingreso de Tc a la célula bacteriana⁽⁴³⁾.

En el 2021 fue realizado un estudio en Brasil⁽⁴⁴⁾ sobre el efecto antimicrobiano de los complejos $Al^{III}(m-OH) M^{II}$ (M= Zn (1) y Cu (2)), en cepas de *P. aeruginosa* ATCC 24853, *S. aureus* ATCC 25923, *Shigella sonnei* ATCC 11060 y *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs); fueron realizadas concentraciones del complejo previamente anotados al 10% donde fue evidenciado una inhibición del crecimiento bacteriano con el uso de las tetraciclinas⁽⁴⁴⁾.

Estudio realizado en Londres, exploró la combinación de tetraciclinas con un quelante de hierro (CP762) para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*, en 9 aislamientos de muestras respiratorias, evaluándose la sinergia del CP762 con tobramicina y 5 miembros de las tetraciclinas (doxiciclina, minociclina, oxytetraciclina, tetraciclina y tigeciclina). Se encontró como resultados que la doxiciclina presentó un efecto inhibitorio más alto en combinación con el quelante de hierro, en comparación cuando se utilizaba únicamente el CP762; lo cual apoyaría la hipótesis de que la sinergia entre el quelante de hierro y la doxiciclina, sería en parte resultado de una protección física que impide la unión del hierro con el antibiótico⁽⁴⁵⁾.

3. Justificación:

Pseudomonas aeruginosa, microorganismo implicado en infecciones asociadas al cuidado de la salud (IAAS), notificado en la actualidad por diferentes organizaciones mundiales (OMS, CDC, OPS) como un patógeno de prioridad crítica por el incremento en la resistencia de antimicrobianos existentes⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾.

La ausencia de desarrollo de nuevas moléculas efectivas y la resistencia a los agentes disponibles en el momento, nos obliga a la búsqueda de alternativas terapéuticas para combatir los patógenos multidrogosresistentes. Tomando en cuenta el efecto quelante con alta afinidad por los metales como el zinc, hierro y cobre por parte de las tetraciclinas, así como la presencia de iones de zinc en los sitios activos de las metalo- β -lactamasa indispensables para catalizar la hidrólisis de los β -lactámicos, incluidos los carbapenémicos⁽³⁰⁾⁽³¹⁾; consideramos que el uso de estas moléculas podría secuestrar el zinc de las metalo β -lactamasas e inhibir su actividad hidrolítica sobre los β -lactámicos y en sinergia con carbapenémicos (meropenem) el efecto antimicrobiano de estos aumentaría los halos de inhibición en las pruebas mMIC.

Hipótesis

El uso sinérgico de tetraciclinas (DOXY, MIN, TE, TGC) con carbapenémicos (meropenem) aumentará halos de inhibición en muestras clínicas de *Pseudomonas*

aeruginosa productoras de metalo β -lactamasa del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

Pregunta de investigación:

¿Tendrán las tetraciclinas un efecto quelante del zinc en *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas e inhibir su actividad hidrolítica sobre β -lactámicos (meropenem)?

Objetivos

Objetivo general:

- Determinar la actividad sinérgica *in vitro* de las tetraciclinas (doxiciclina (DOXY), minociclina (MIN), tigeciclina (TGC) y tetraciclina (TE) como quelantes de zinc junto con carbapenémicos (meropenem (MEM) en *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas (IMP, VIM, NDM) del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

Objetivos específicos:

- Determinar la distribución de metalo β -lactamasas en los aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra entre los años 2018 a 2023.

- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) de tetraciclinas (DOXY, MIN, TGC y TE), carbapenémicos (MEM) en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo β -lactamasas.
- Determinar si existe diferencia en la actividad sinérgica de las tetraciclinas (DOXY, MIN, TGC y TE) según tipo de metalo β -lactamasa (VIM, IMP, NDM) en muestras clínicas de *P. aeruginosa* productora de metalo β -lactamasa.

4. Materiales y métodos.

Diseño

Se realizó un estudio experimental de ciencias básicas.

Criterios de Inclusión.

- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* del cepario del laboratorio de Microbiología Clínica del INR LGII productoras de metalo β -lactamasas, de muestras invasivas como hemocultivos, aspirados endotraqueales, líquido cefalorraquídeo, biopsias músculo esqueléticas y otras muestras como urocultivos entre en 2018 y 2023.

- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas, procedente del hospital general Dr. Manuel Gea González .

Criterios de eliminación.

- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que se encontraran repetidas por paciente, seleccionando únicamente una por paciente.

Criterios de exclusión.

- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos por otros mecanismos que no sean producción de metalo β -lactamasas.

Aislamientos clínicos.

De la base de datos del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra fueron seleccionadas 159 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas entre los años 2018 a 2023. Con el fin de evitar sobrenotificación (sesgo de selección) se eliminaron 64 (40%) muestras repetidas por paciente, para un total de 95.

Se resembraron en agar sangre de carnero al 5% e incubadas a 37°C durante 18 horas para confirmar viabilidad y pureza, posteriormente realización de pruebas

bioquímicas de cribado para corroborar género y especie, las cuales fueron: indol rápido, oxidasa, tinción de Gram, hidrólisis de arginina y crecimiento a 42°C.

Concentración mínima inhibitoria (CIM).

Las concentraciones inhibitorias mínimas se determinaron de acuerdo a las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute*[®] (CLSI) M07 (CLSI, 2023) en placas de 96 pocillos⁽⁴⁶⁾. La interpretación de los puntos de corte se realizó de acuerdo con los Estándares de rendimiento M100-ED33 para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, 33^a edición (CLSI, 2023) (**Tabla 9, 10**). Los antibióticos incluidos fueron amikacina (Sigma Aldrich A1774), gentamicina (Sigma Aldrich G3632), aztreonam (Sigma Aldrich PZ0038), ceftazidima (Sigma Aldrich C3809), cefepime (Sigma Aldrich PHR1763), ciprofloxacino (Sigma Aldrich 17850), levofloxacina (Sigma Aldrich 282 66), doripenem (Sigma Aldrich 32138), imipenem (Sigma Aldrich I0160), meropenem (Sigma Aldrich M2574), colistina (Sigma Aldrich C4461) y piperacilina/tazobactam (Sigma Aldrich P8396/T2820). *P. aeruginosa* ATCC[®] 27853 se usó como control según CLSI (**Figura 15**).

Solución antimicrobiana

Paso	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Origen	Volumen (mL)+	Volumen de CAMHB	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)	Log_2
1	5120	Stock	1	9	512	9
2	512	Paso 1	1	1	256	8
3	512	Paso 1	1	3	128	7
4	512	Paso 1	1	7	64	6
5	64	Paso 4	1	1	32	5
6	64	Paso 4	1	3	16	4
7	64	Paso 4	1	7	8	3
8	8	Paso 7	1	1	4	2
9	8	Paso 7	1	3	2	1
10	8	Paso 7	1	7	1	0
11	1	Paso 10	1	1	0.5	-1
12	1	Paso 10	1	3	.025	-2
13	1	Paso 10	1	7	0.125	-3

Tabla 9. Esquema general de diluciones.

Agente antimicrobiano	Contenido de disco	Categorías interpretativas y puntos de interrupción de MIC $\mu\text{g/mL}$		
		S	I	R
Piperacilina/Tazobactam	100/10 μg	$\leq 16/4$	32/4	≥ 64
Ceftazidima	30 μg	≤ 8	16	≥ 32
Cefepime	30 μg	≤ 8	16	≥ 32
Aztreonam	30 μg	≤ 8	16	≥ 32
Imipenem	10 μg	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem	10 μg	≤ 2	4	≥ 8
Colistina			≤ 2	≥ 4
Amikacina	30 μg	≤ 16	32	≥ 64
Ciprofloxacino	5 μg	≤ 0.5	1	≥ 2
Levofloxacino	5 μg	≤ 1	2	≥ 4

Tabla 10. Puntos de corte para interrupción de la MIC para *Pseudomonas aeruginosa*.

Adaptado de CLSI M100-ED33:2023.

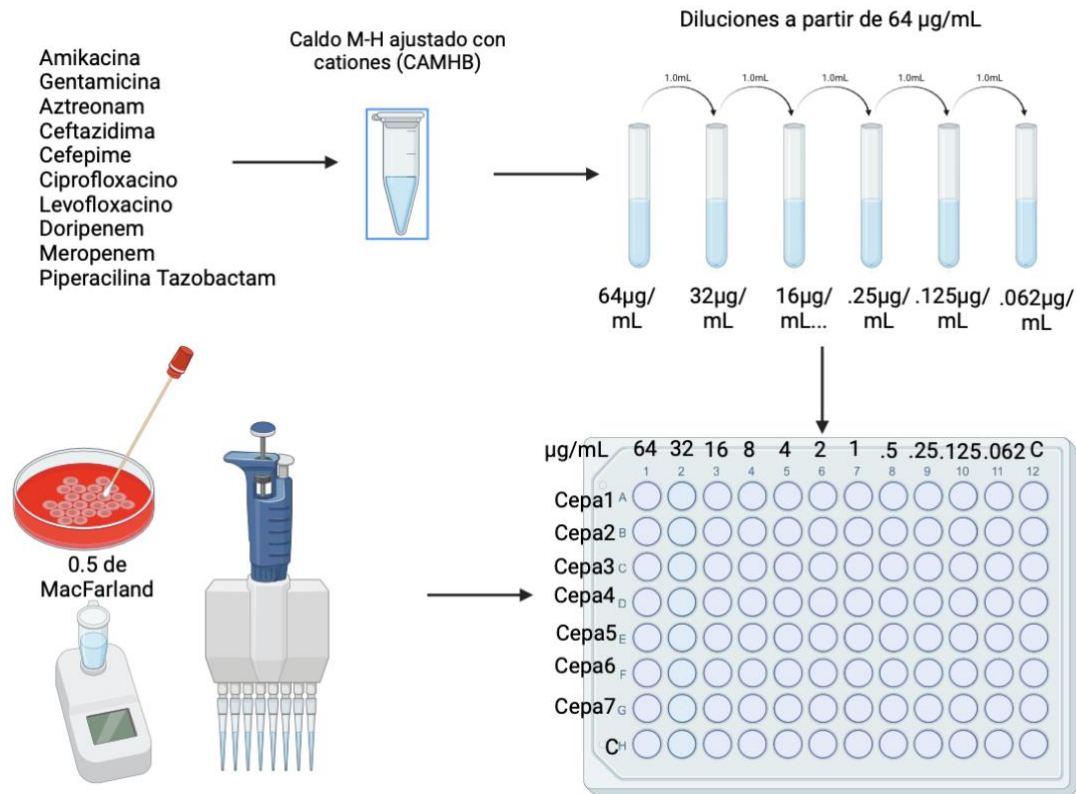


Figura 15: Esquematización de microdilución en caldo.

Determinación de carbapenemasas

Se determinó la presencia de carbapenemasas en cada de las 95 cepas de acuerdo con CLSI M100-ED33 (2023)⁽⁴⁷⁾, mediante el método fenotípico de inactivación de carbapenémicos modificado. Para la identificación de metalo β -lactamasas se realizó la modificación del mMIC (eMIC) con EDTA. La interpretación se realizó de acuerdo a la guía M100.

Brevemente mMIC, en un tubo Eppendorf de 500 μ L se agregó 200 μ L de caldo Soja Tripticaseína (TSB), se adicionó un bucle de 10 μ L de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* de una placa de agar sangre de carnero, se vortexeó por 10 a 15

segundos, posterior a lo cual se le agregó un disco de meropenem de 10 μg a cada tubo, se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 4 horas. 15 minutos previo a completar el tiempo de incubación se preparó una suspensión de 0.5 de McFarland de *E. coli* ATCC® 25922. Se retiró el disco de meropenem de cada una de las suspensiones que se encontraban en TSB y se colocó en la placa de Mueller-Hinton y se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas y después de la incubación se midieron las zonas de inhibición⁽⁴⁸⁾. **Figura 16.**

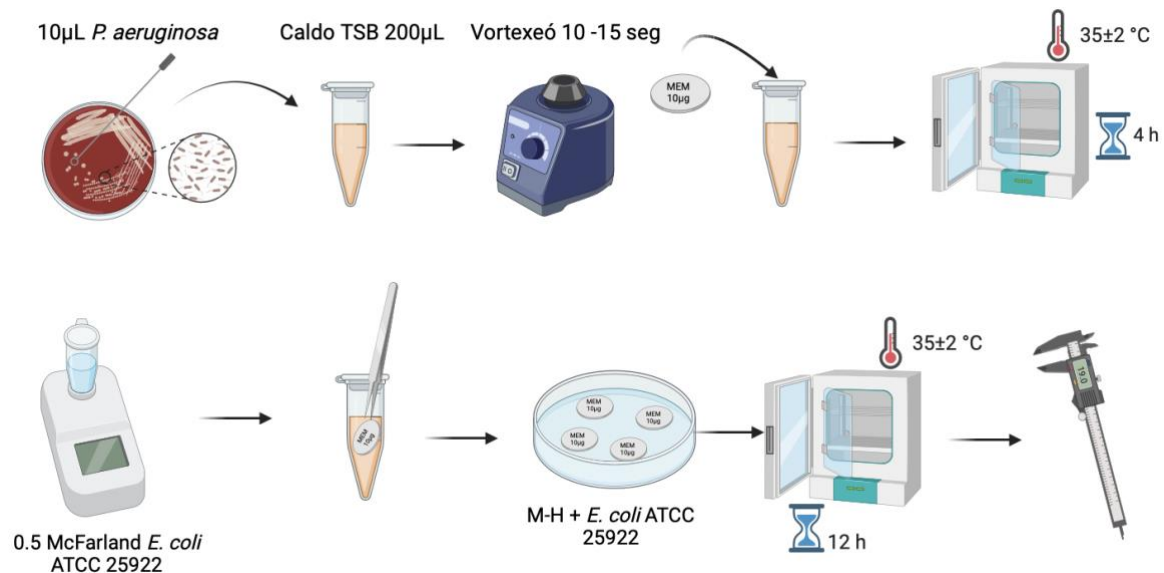
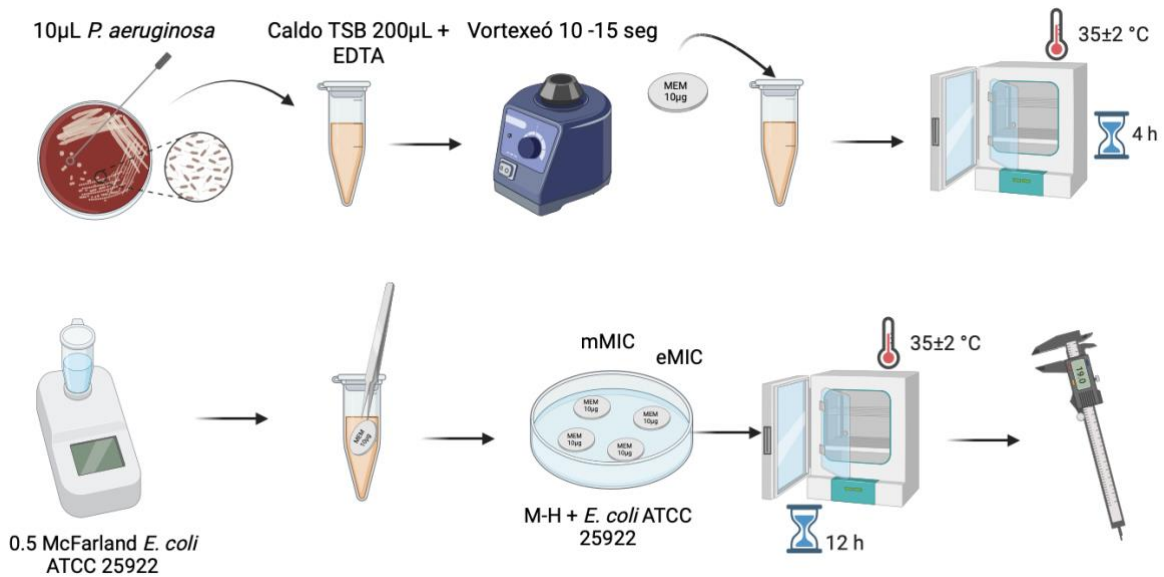


Figura 16. Esquemmatización de mMIC.

Para la diferenciación entre metalo- β -lactamasas y tipo serino carbapenemasas, fue utilizada la prueba eMIC, en un tubo Eppendorf de 500 μL se agregó 200 μL de caldo Soja Tripticaseína (TSB), se agregó 20 μL de ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) de 0.5 M, para obtener una concentración final de 5mM, luego se adicionó un bucle de 10 μL de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* de una placa de agar sangre de carnero, se vortexó por 10 a 15 segundos, posterior a lo cual se le



agregó un disco de meropenem de 10 µg a cada tubo, se incubó a 35°C ±2° C por 4 horas. 15 minutos previo a completar el tiempo de incubación se preparó una suspensión de 0.5 de McFarland de *E. coli* ATCC® 25922. Se retiró el disco de meropenem de cada una de las suspensiones que se encontraban en TSB y se colocó en la placa de Mueller-Hinton y se incubaron a 35°C ±2° C por 24 horas y después de la incubación se midieron las zonas de inhibición⁽⁴⁸⁾. **Figura 17.**

Figura 17. Esquematización de eMIC.

Cada una de estas cepas fueron sembradas por triplicado en agar MacConkey con carbapenémico (doripenem 8 mg) con y sin ácido etilendiaminotetracético (EDTA), confirmándose la expresión de carbapenemasas ante la inhibición en el crecimiento con este quelante.

Determinación de genes de resistencia.

Con el fin de determinar genes de resistencia, las 95 cepas que tenían pruebas fenotípicas positivas fueron llevadas a estudios moleculares por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Brevemente, los aislamientos se sembraron en agar sangre de carnero al 5% y se incubaron por 24 horas a 37°C. Después se extrajo el DNA mediante choque térmico. En un tubo Eppendorf de 500 μ L se agregó 200 μ L de Phosphate Buffered Saline 1X (PBS), se resuspendió la colonia, se homogeneizó y vortexeó. Cada tubo se incubó a 94°C durante 25 minutos, se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf; se conservaron las extracciones a 4°C⁽⁴⁹⁾ (**Figura 18**).

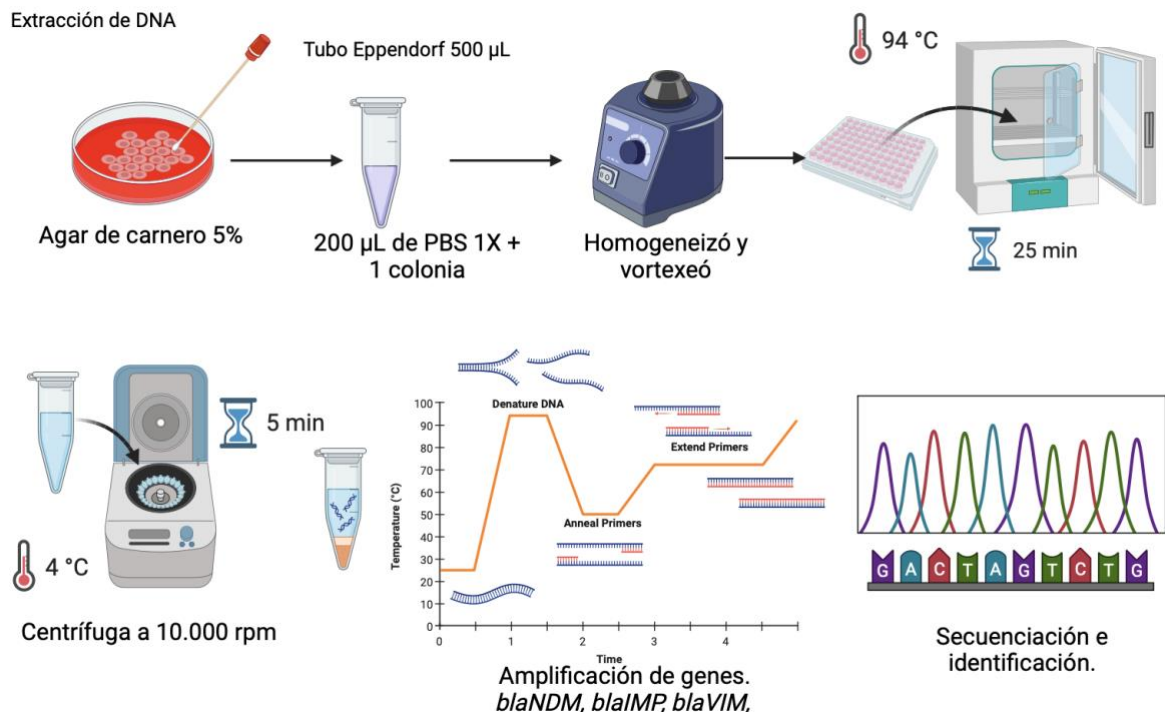


Figura 18. Esquematación de extracción de DNA y procesamiento de muestra para determinación de carbapenemasas.

La amplificación de los genes que codifican para *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* y *bla_{VIM}* se realizó por PCR punto final. La reacción contiene 1.25 μ L de buffer 10X Omega Biotek (suplementado con 2 mM MgSO₄), 0.30 μ L de una mezcla de nucleótidos (dNTP's) [0.2 mM] (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) Invitrogen[®], 0.7 μ L Taq DNA polimerasa Biotek, 10 pmol de cada oligonucleótido T4Olig y 7.28 μ L de agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas Sigma- Aldrich[®] y 3 μ L de DNA par atener un volumen final de 12.50 μ L. La amplificación se realizó mediante un programa de tres etapas: la primera comprendió un ciclo de 1 min a 95°C, la segunda 30 ciclos de 30 s a 95°C, 15 s a 55°C (en el caso de *bla_{VIM}* la temperatura fue de 52°C) y 45 s a 68°C, por último, la tercera etapa, un ciclo de 5 min a 68°C.

Los productos de la PCR se separaron por la técnica de electroforesis en gel en la cual se empleó un gel de agarosa al 1% cargado con 4 μ L de SYBR Green y 10 μ L de muestra, se dejó correr a 100 V durante una hora. **(Tabla 11) (49)**

<i>Gen</i>	<i>Secuencia de oligonucleótidos</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Tamaño del amplicón (pb)</i>	<i>Control positivo</i>
<i>bla_{NDM}</i>	F:5'-GGCGGAATGGCTCATCACGA-3' R:5'-CGCAACACAGCCTGACTTTC-3'	56	620	<i>E. cloacae</i> ATCC-BAA 2468
<i>bla_{IMP}</i>	F:5'-GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT-3' R:5'-GGAATAGAGTGGCTTAATTCT-3'	52	425	<i>P. aeruginosa</i>
<i>bla_{VIM}</i>	F:5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3' R:5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3'	56	415	<i>P. aeruginosa</i>

Tabla 11. Secuencia de oligonucleótidos de genes que codifican para metalo- β - lactamasa

Concentración Mínima Inhibitoria de tetraciclinas

Las concentraciones inhibitorias mínimas se determinaron de acuerdo con Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) M100-ED33 (CLSI, 2019)⁽⁴⁶⁾ en placas de 96 pocillos. Dado a que no existen puntos de corte para tetraciclinas (DOXY, MIN, TE y TGC) para *Pseudomonas aeruginosa*; fueron reportados los valores evidenciados. **(Figura 15)**

Método de inactivación de carbapenemasas con tetraciclinas.

Dado que las metalo- β -lactamasas tienen moléculas de zinc en su sitio activo, los cuales son indispensables para hidrolizar el anillo de los β -lactámicos; se realizó el método de disco modificado para determinar si las tetraciclinas (DOXY, MINO, TE y TGC) inhiben el zinc de las metalo- β -lactamasas.

Una vez que se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de las tetraciclinas, realizamos una modificación del método de inactivación de carbapenémicos modificado con EDTA (tMIC), sin embargo, este último fue sustituido con cada una de las tetraciclinas. Se utilizaron discos de DOXY 30 μ g, MINO 30 μ g, TE 30 μ g y TGC 15 μ g. se realizó de la siguiente manera.

Se colocaron 2 mL de caldo soya tripticaseína en tubos con tapón de rosca. En cada tubo se colocó un disco de cada una de las tetraciclinas antes mencionadas, se

agitaron en vortex y se dejaron en reposo 30 minutos, posterior a ello, con un asa bacteriológica estéril de 10 μ L se tomó el inóculo y se depositó en el tubo con caldo, se agitó vigorosamente con el vortex y se colocó, dentro del tubo, un disco de meropenem (MEM 10 μ g). Los tubos se metieron a incubar 4 h a 37° C. Antes de que acabara el tiempo de incubación (15 minutos antes), se preparó una suspensión al 0.5 de la escala de McFarland con *E. coli* ATCC 25922. La suspensión se inoculó sobre una placa de agar Müeller-Hinton. Al cumplirse las 4 h, se sacó el disco de meropenem y se colocó sobre el agar. Al igual que el eMIC, interpretamos la acción quelante con un aumento > 5 mm con respecto al tubo con meropenem solo (mMIC). **Figura 19.**

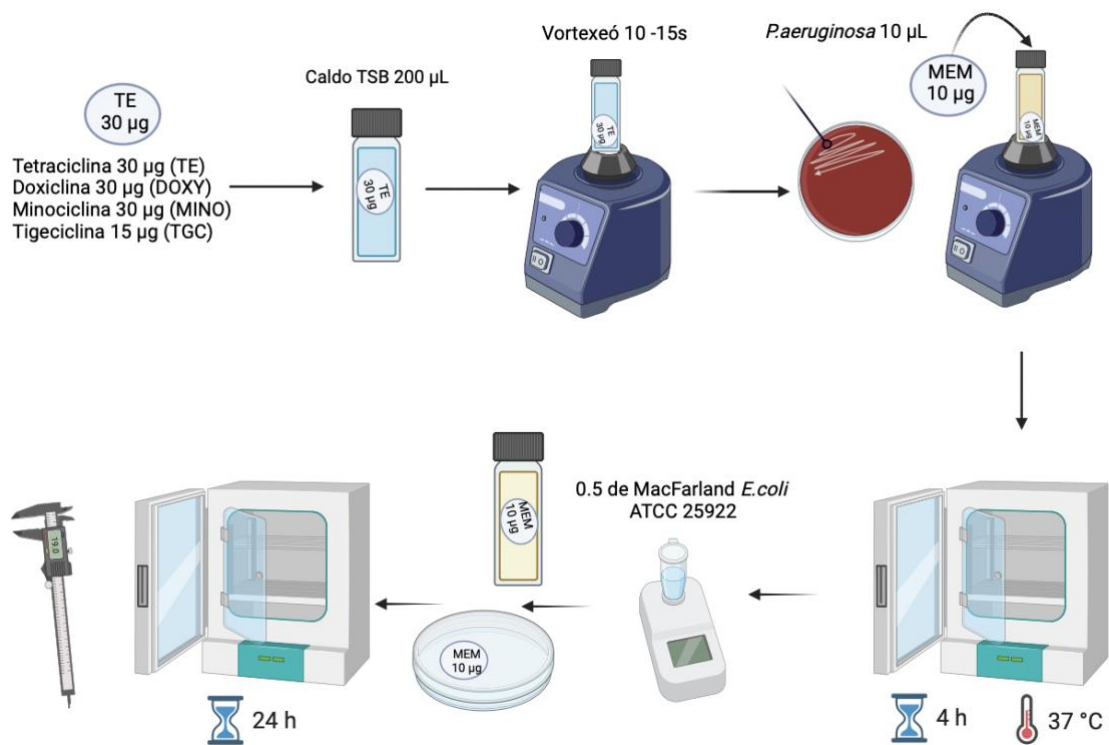


Figura 19. Esquemmatización de método de inactivación de carbapenemasas con tetraciclinas.

Con la finalidad de demostrar que el efecto era asociado a la acción sinérgica, el experimento se realizó únicamente con disco de tetraciclina (cada una de ellas). Los experimentos fueron realizados por triplicado. Se utilizaron las cepas control positivo *E. cloacae* productora de NDM, *P. aeruginosa* productora de IMP y otra de VIM y como control negativo *P. aeruginosa* ATCC 27855, *E. coli* ATCC 23922.

Concentraciones de Zn⁺⁺

Con el fin de determinar el efecto del Zinc sobre el crecimiento de los microorganismos y determinar la dosis de este metal que no inhibiera el crecimiento de las cepas. Se utilizaron cepas control ATCC® *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, una cepa de *Enterobacter cloacae* portadora de NDM y dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de IMP y VIM. Estas cepas fueron cultivadas en caldo soya tripticaseína a 37°C 220 rpm toda la noche. Los cultivos se arrancaron a una DO_{600nm} 0.05 (aprox. 5x10⁵ UFC/mL) 3 ml de caldo, con concentraciones de zinc 5 mM, 10 mM y 20 mM; así como sin presencia de zinc. Las muestras se incubaron a 37° C/24 h. Se realizó una dilución 1:10 de los cultivos y se leyeron en el espectrofotómetro a 600nm (SmartSpec Plus, Bio-Rad, Estados Unidos). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Demostración de la actividad quelante sobre el Zinc.

Para demostrar que las tetraciclinas eran las responsables de la inhibición de las carbapenemasas se procedió a saturar el sistema con Zinc con la finalidad de que el zinc exógeno se uniera a las tetraciclinas y de esta manera, esta molécula no

fuera capaz de secuestrar el zinc de las metalo β -lactamasas, por lo tanto estaríamos esperando que la enzima degradara el antibiótico (MEM). Se utilizó una concentración final de 5 mM de zinc para saturar el sistema. En un tubo de 2 mL con tapón de rosca con 2 mL de caldo soya triptecaseína + Zn 5 mM se agregó el disco de tetraciclina (cada una de ellas) se dejó reposar 30 minutos, posteriormente se inoculó con asa de 10 μ L las muestras de *P. aeruginosa*, se agitaron las muestras vigorosamente con vortex y se agregó un disco de MEM 10 μ g, se incubaron durante 4 h/37° C, nuevamente antes de cumplir las 4 h de incubación se procedió a preparar la suspensión al 0.5 de McFarland con *E. coli* ATCC 25922, se inoculó sobre una placa de Müeller-Hinton, a las 4 h de incubación se tomó el disco de MEM y se puso sobre el agar. Se incubaron las placas a 37° C durante 18 h. Posteriormente se leyeron las muestras y se interpretó el resultado. Consideramos una prueba negativa con valor semejante o igual a su respectivo mMIC **Figura 19**.

Aleatorización de 30 cepas.

Se realizó selección aleatoria de 30 cepas de *P. aeruginosa* productora de metalo β -lactamasas por medio del programa Research Randomizer^{®(50)} para la realización de pruebas de inhibición de carbapenemasas con meropenem y tetraciclinas.

Determinación de CIMs de sinergia entre tetraciclinas y meropenem

La concentración mínima inhibitorias mínimas de tetraciclinas (DOXY, MINO, TE, TGC) en combinación con carbapenémico (MEM) se determinaron de acuerdo con

Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) M07 (CLSI, 2019)⁽⁴⁶⁾ en placas de 96 pocillos por microdilución en caldo.

Procedimiento: Fueron pesados cada uno de los antibióticos (tetraciclinas) de acuerdo a la fórmula presentada en CLSI M07-A10 a una concentración de 5120 µg/mL, preparadas las diluciones de cada uno de los antibióticos (doxiciclina (Sigma Akdrich), minociclina (Sigma Akdrich), tetraciclina (Sigma Aldrich) y tigeciclina 25 mg (Cayman Chemical Company)), como en la tabla Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI M100-S25)⁽⁵¹⁾ hasta concentraciones finales de 0.062µg/mL. Fueron realizadas pruebas con las siguientes concentraciones (**Figura 20**):

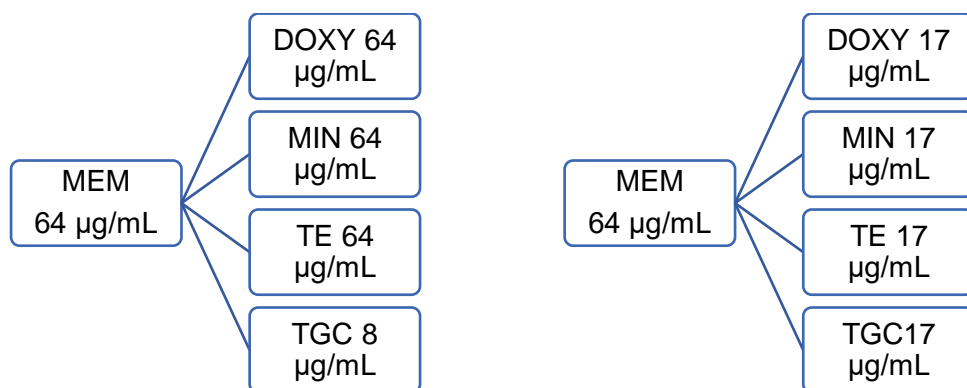


Figura 20: Distribución de dosis de antibióticos (tetraciclinas y meropenem) para las pruebas MIC

Cada pozo fue cargado 100 µL con caldo Müller-Hinton suplementado con cationes y antibiótico. A partir de la columna 1 a la 11 se realizaron concentraciones seriadas dobles (64 - 0.062 µg/mL), la columna 12 únicamente con caldo como control de crecimiento de la cepa problema (**Figura 21**).

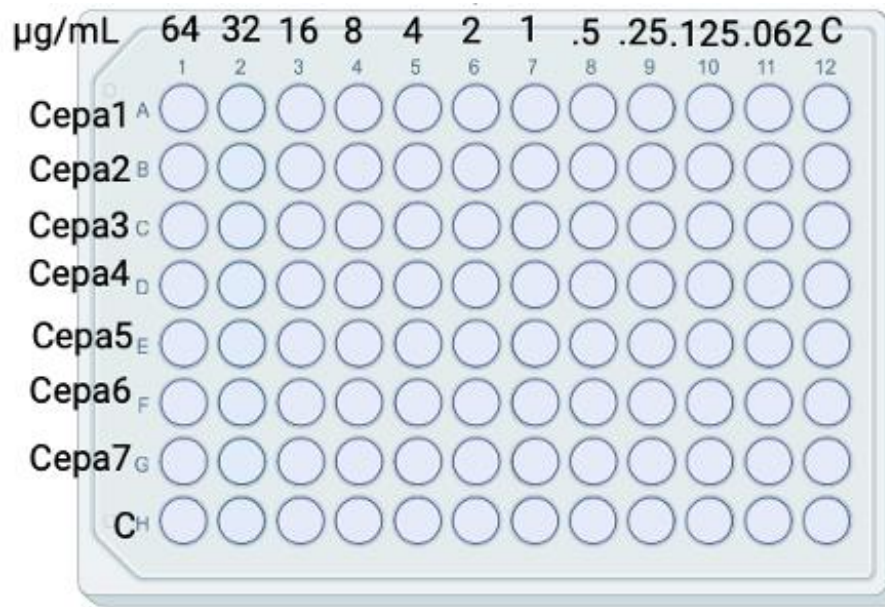


Figura 21. Esquematización de distribución de diluciones en caja de 96 pocillos.

Posterior a la preparación de las placas, estas fueron inoculadas con 10 μL de la dilución 1:20 del inóculo primario al 0.5 de la escala de McFarland para tener un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL. Cada fila fue inoculada por una cepa diferente A-G. La fila H se cargó únicamente con caldo y sirvió como control de esterilidad del procedimiento. Las placas fueron incubadas 24 h/oras a 37°C. La interpretación de la CIM se realizó observando el crecimiento en cada uno de los pozos. Dado que no hay valores de corte. Estos ensayos se hicieron por triplicado.

5. Análisis estadístico:

- Se creó una base de datos en el programa Microsoft Excel®.
- En el programa estadísticos IBM SPSS versión 26⁽⁵²⁾, se determinaron medidas de tendencia central y frecuencias absolutas para las variables nominales (mediana, moda y media).

- Se realizó una comparación de proporciones de muestras pareadas con test de McNemar (comparar de eMIC con tMIC de cada una de las tetraciclinas), se tomó como valor significativo una $p=0.05$.

6. Resultados:

Se incluyeron un total de 159 cepas de *P. aeruginosa* procedentes del cepario del Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra y Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se eliminaron 64 muestras (40%) por encontrarse por paciente, para un total de 95 aislados clínicos. Las cepas fueron inoculadas además en agar MacConkey con doripenem por lo que esos 95 aislamientos eran productores de metalo β -lactamasas. Y fueron corroborados mediante pruebas fenotípicas descritas (mMIC y eMIC).

Se procedió a la identificación molecular del gen que codifica para la metalo β -lactamasa. La metalo β -lactamasas más frecuente fue de tipo VIM (79%) expresaban VIM, 17 (17.8%) aislados eran tipo IMP y por último el 3.15% eran NDM. (Figura 22).

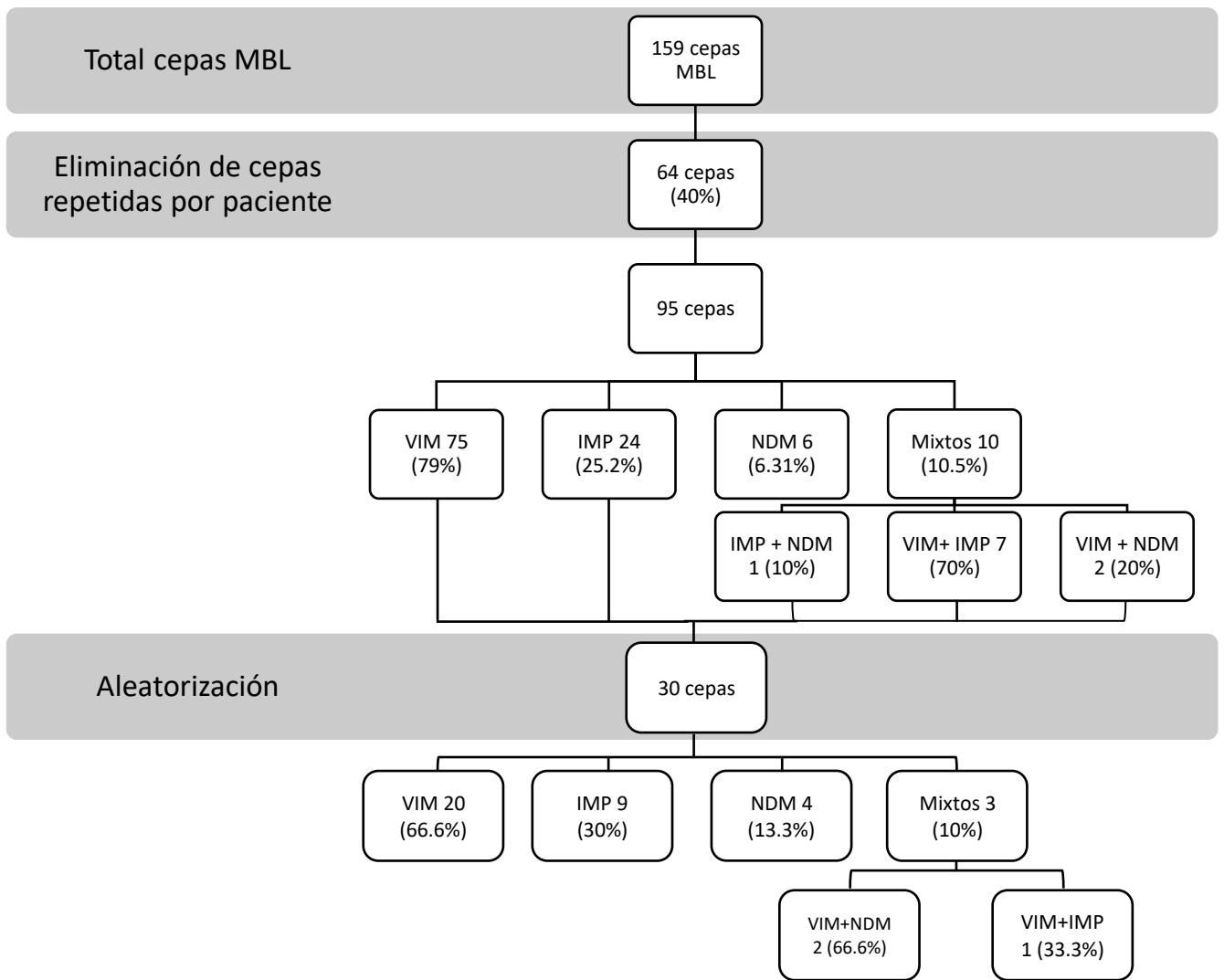


Figura 22. Diagrama de selección de muestras para el estudio.

Con respecto al tipo de muestras el tipo de muestras el 30.5% fueron biopsias, seguido de hemocultivos en un 15.7% y un 7.37% tanto para aislamientos respiratorios como de origen urinario. **(Tabla 12)**

Tipo de muestra	Total	Porcentaje	Sitio anatómico	Frecuencia	Porcentaje
Biopsia	29	30.53	Cuantitativa	20	21.05
			Músculo	4	4.21
			Tejido celular subcutáneo	5	5.26
Hemocultivo	15	15.79	Central	9	9.47
			Periférico	3	3.16
			Punta de catéter	3	3.16
Respiratoria	7	7.37	Aspirado endotraqueal	5	5.26
			Derrame pleural	1	1.05
			Secreción bronquial	1	1.05
Urinario	7	7.37	Urocultivo	7	7.37
Abscesos	1	1.05	Cuerpo vertebral	1	1.05
Otros	36	37.89	Otros	36	37.89
Total	95				100.00

Tabla 12. Distribución de tipo de muestras de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

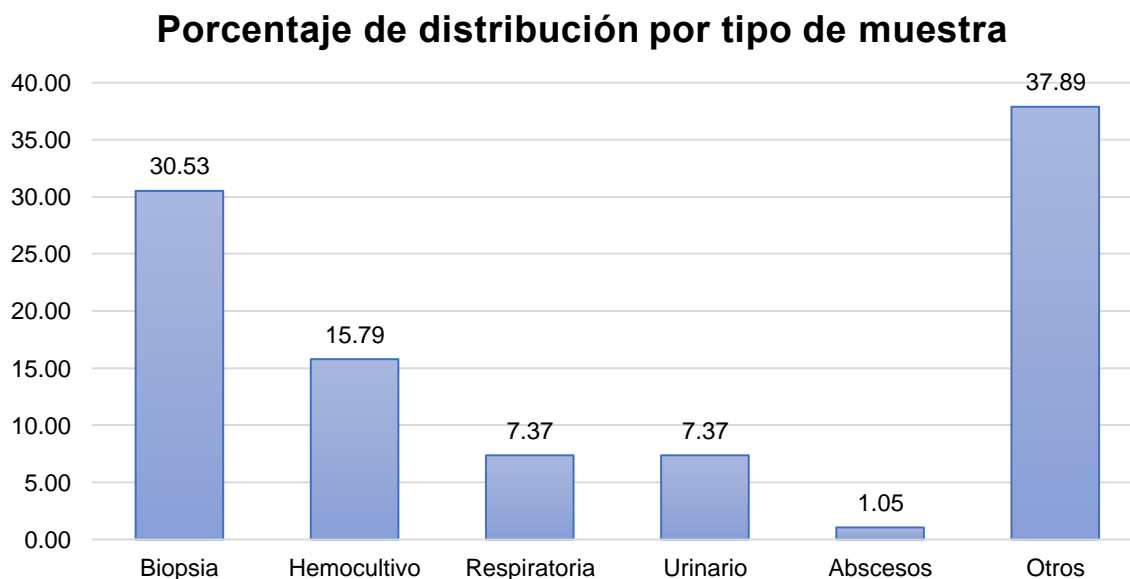


Figura 23. Grafica de distribución de tipo de muestras de *P. aeruginosa* productora de MBL.

Concentración mínima inhibitoria (CIM)

Se realizaron CIM para cada uno de los antibióticos estandarizados por CLSI 2023⁽⁵³⁾ como se reporta en la **Tabla 13, Tabla 14, Figura 24 y 25**, donde se destaca que más del 92% de las muestras tenían CIMs $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ para carbapenémicos (DORY, IMI, MEM), para quinolonas el 90% de los aislamientos clínicos eran resistentes, en lo que respecta a colistina el 70% tenía susceptibilidad intermedia.

Antibiótico	128/4 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.25 $\mu\text{g/mL}$	0.125 $\mu\text{g/mL}$	0.062 $\mu\text{g/mL}$
AK	0	80.85	10.64	2.13	2.13	2.13	0.00	1.06	0.00	1.06	0.00	0.00
GEN	0	44.21	5.26	24.21	9.47	8.42	3.16	2.11	2.11	1.05	0.00	0.00
AZT	0	27.17	10.87	29.35	9.78	19.57	3.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CAZ	0	91.30	2.17	3.26	2.17	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
FEP	0	72.04	9.68	8.60	6.45	1.08	2.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CIP	0	19.15	5.32	13.83	20.21	28.72	3.19	3.19	1.06	2.13	2.13	1.06
LEV	0	18.60	3.49	26.74	19.77	20.93	2.33	2.33	2.33	1.16	2.33	0.00
DORY	0	42.39	11.96	7.61	30.43	4.35	2.17	0.00	0.00	1.09	0.00	0.00
IMI	0	50.53	9.47	31.58	4.21	3.16	1.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MEM	0	53.68	4.21	31.58	5.26	2.11	2.11	0.00	1.05	0.00	0.00	0.00
COL	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	30.53	6.32	33.68	27.37	2.11	0.00
PZT	70.37	18.52	7.41	2.47	0.00	1.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 13. Distribución de CIM de antibióticos estandarizados por CLSI 2023⁽⁵³⁾ de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

Distribución de CIM de *P. aeruginosa* productora de MBL

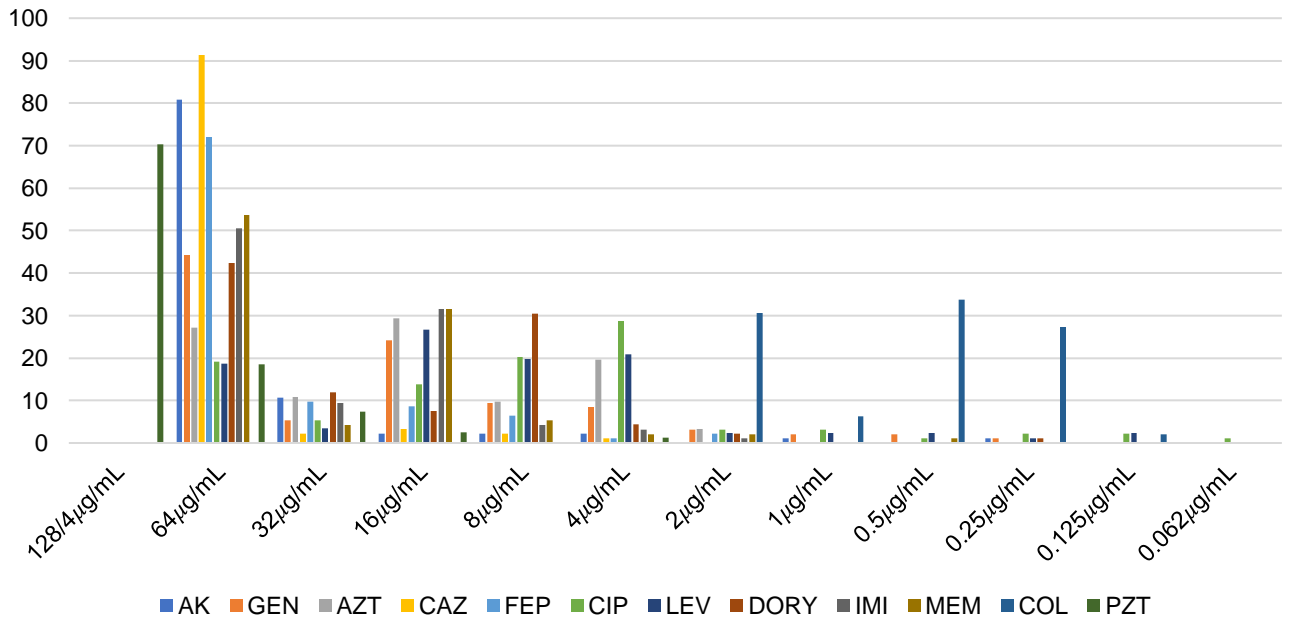


Figura 24. Distribución de CIM de antibióticos estandarizados por CLSI 2023⁽⁵³⁾ de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

Distribución de porcentaje de susceptibilidad antibiótica de *P. aeruginosa* productora de MBL

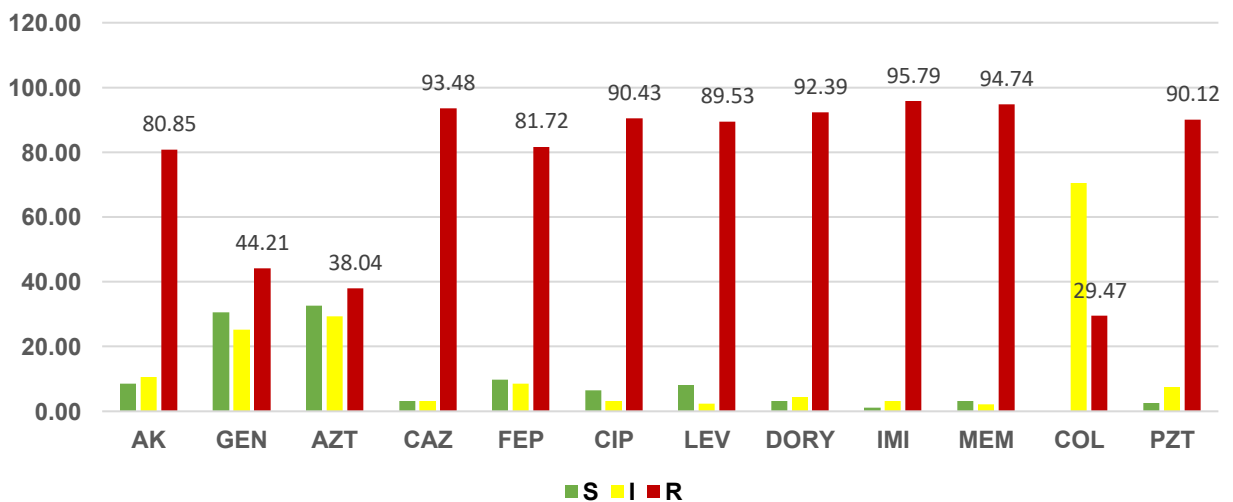


Figura 25. Distribución de perfil de susceptibilidad de *P. aeruginosa*, según lo estandarizado por CLSI 2023⁽⁵³⁾.

Antibiótico	S	I	R
AK	8.51	10.64	80.85
GEN	30.53	25.26	44.21
AZT	32.61	29.35	38.04
CAZ	3.26	3.26	93.48
FEP	9.68	8.60	81.72
CIP	6.38	3.19	90.43
LEV	8.14	2.33	89.53
DORY	3.26	4.35	92.39
IMI	1.05	3.16	95.79
MEM	3.16	2.11	94.74
COL		70.53	29.47
PZT	2.47	7.41	90.12

Tabla 14. Distribución de CIM de antibióticos estandarizados por CLSI 2023⁽⁵³⁾ de *P. aeruginosa* productoras de MBL según su interpretación.

Concentraciones mínimas inhibitorias de tetraciclinas

De igual manera, se realizaron CIMs de cada una de las tetraciclinas (**Tabla 15 y Figura 26**) donde destaca que para doxiciclina el 91.6% de los aislamientos presentaron CIMs 64µg/mL. Minociclina el 80% tenía CIMs 64µg/mL, en lo que respecta a tetraciclina el 91.6% se encontraban 32µg/mL, y por último para tigeciclina el 27.6% con CIMs <8µg/mL.

CIM	64µg/mL	32µg/mL	16µg/mL	8µg/mL	4µg/mL	2µg/mL
DOXY	91.58	6.32	1.05	0.00	1.05	0.00
MINO	80.00	6.32	12.63	0.00	0.00	1.05
TE	2.11	89.48	8.42	0.00	0.00	0.00
TGC	0.00	0.00	0.00	72.34	12.77	14.90

Tabla 15. Distribución de porcentaje de CIMs de tetraciclinas en cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

Distribución de porcentaje de CIM de tetraciclinas en *P. aeruginosa* MBL

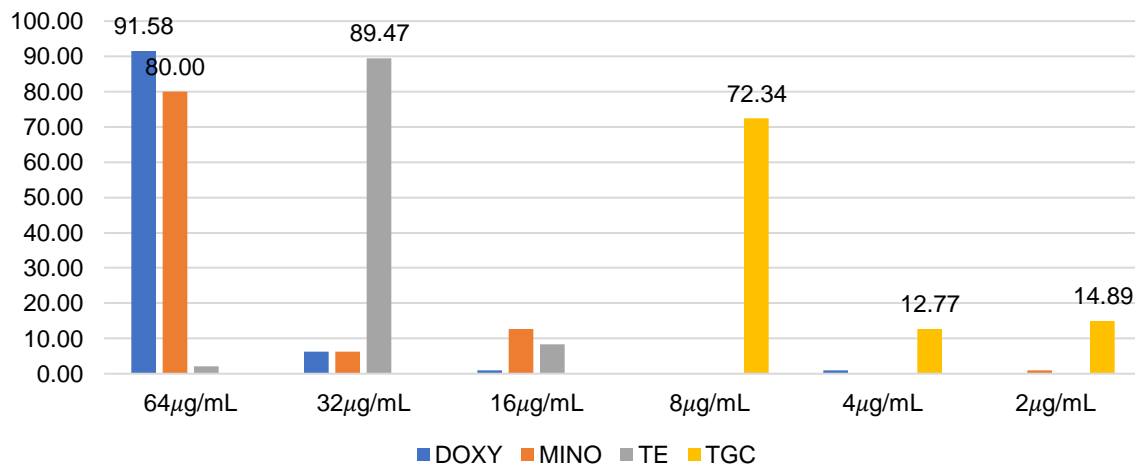


Figura 26. Distribución de porcentaje de CIMs de tetraciclinas en cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

eMIC modificado con tetraciclinas (teMIC)

Se realizó eMIC modificado con tetraciclinas (tMIC) donde se observó que el 91.58% de las cepas de *P. aeruginosa* para doxiciclina tenían diámetro de 6 mm; para minociclina y tetraciclina el diámetro de 6 mm en un 85.2 y 86.32% respectivamente. Con respecto a tigeciclina el 6.31% tenían diámetro ≥ 16 mm sin presencia de crecimiento de colonias dentro del halo (**Tabla 16, Figura 27 y 28**).

Antibiótico	19mm	18mm	16mm	15mm	14mm	13mm	12mm	11mm	10mm	8mm	6mm
DOXY	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.11	3.16	0.00	3.16	0.00	91.58
MINO	0.00	0.00	0.00	2.11	2.11	4.21	1.05	2.11	1.05	2.11	85.26
TE	0.00	0.00	0.00	3.16	1.05	0.00	5.26	0.00	3.16	1.05	86.32
TGC	1.05	4.21	1.05	0.00	0.00	0.00	3.16	3.16	8.42	1.05	77.89

Tabla 16. Distribución de porcentajes de teMIC (halos de inhibición con tetraciclinas) en cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

Distribución de porcentaje de teMIC (halos de inhibición) de tetraciclinas en cepas de *P. aeruginosa* productora de MBL

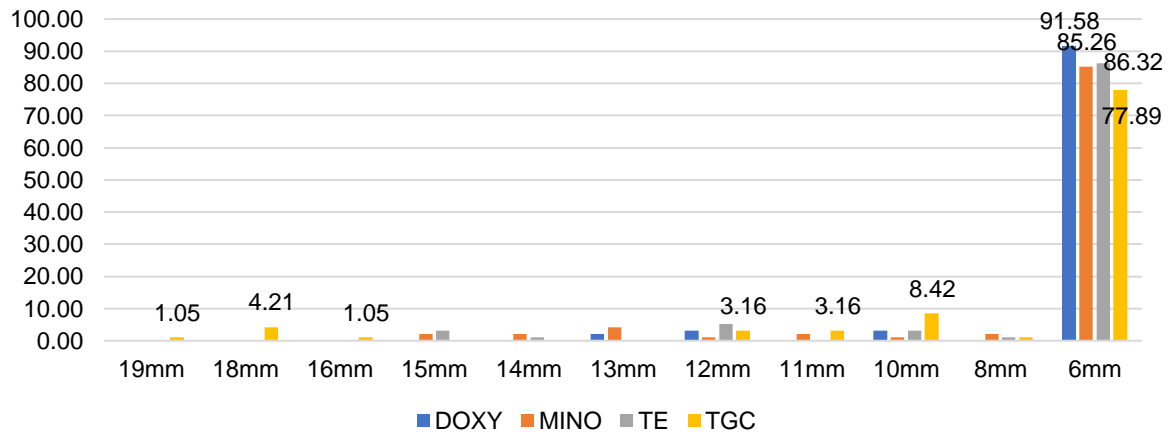


Figura 27. Distribución de porcentajes de teMIC (halos de inhibición con tetraciclinas) en cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

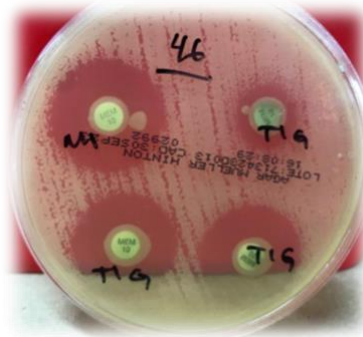


Figura 28. Halos de inhibición con tetraciclinas (tMIC) de cepa de *P. aeruginosa* (P-1740) con tigeciclina.

Concentraciones de Zn⁺⁺

En la **tabla 17** y **figura 29** se reportan los resultados de la determinación de densidades ópticas de concentraciones de Zn⁺⁺, donde se identificó que en el 80% de las cepas su crecimiento fue inhibido a concentraciones mayores de 5 mM, por lo que se definió la concentración de zinc a utilizar de 5mM.

Cepa/ Do600nm	Sin ZN	Zn 5 mM	Zn 10 mM	Zn 2 mM
<i>E. cloacae</i> NDM	6.16	0.57	0.66	0.7
<i>P. aeruginosa</i> IMP	1.93	0.91	0.28	0.23
<i>P. aeruginosa</i> VIM	1.27	1.6	0.09	0.25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27855	2.21	1.49	0.18	0.48
<i>E. coli</i> ATCC 23922	4.33	0.42	0.37	0.32

Tabla 17. Distribución de porcentaje de DO₆₀₀ en cepas control con Zn ++.

Distribución de porcentajes de DO600 en cepas control con Zn++

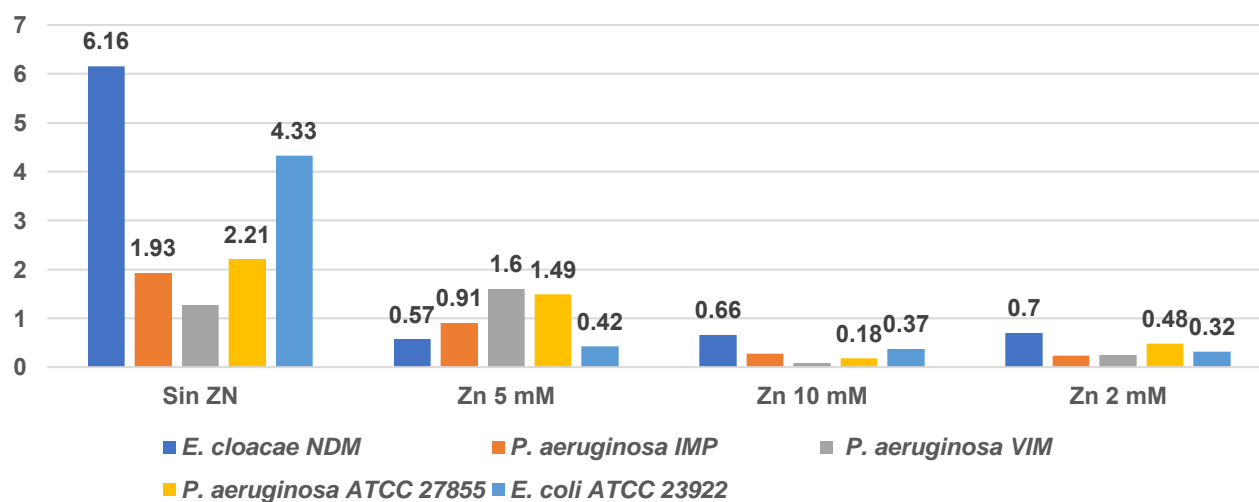


Figura 29. Distribución de porcentaje de DO₆₀₀ en cepas control con Zn ++.

Método de inactivación de carbapenemasas con tetraciclinas.

Posterior a la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de tetraciclinas (DOXY, MINO, TE y TGC), se realizó el tMIC para cada una de ellas y se identificó el percentil 90 para doxiciclina de 23 mm, percentil 50 de 13mm y 6 mm como el halo de inhibición más frecuente. En lo que respecta a minociclina sus pecentiles fueron de 15.5 mm para el 50 y de 24 mm para el 90 con halo de inhibición

de 14 mm como moda. Con tetraciclina se encontró 23.8 mm y 12.5 mm como los percentiles 90 y 50 respectivamente, con 6 mm de diametro, y por último para tigeciclina se evidenció un percentil 90 de 22 mm y el 50 de 15,5 mm, como se muestra en la **tabla 18, tabla 19**; cabe anotar que con cada una de las tetraciclinas (DOXY, MINO Y TE) se evidenció presencia de colonias dentro del halo, caso no ocurrido con tigeciclina.

	Percentil 90	Percentil 50	Moda
eMIC	25.2 mm	13.5 mm	6 mm
tMIC DOXY	23.8 mm	13 mm	6 mm
tMIC MINO	24 mm	15.5 mm	6 mm
tMIC TE	23.8 mm	12.5 mm	6 mm
tMIC TGC	22 mm	15.5 mm	15 mm

Tabla 18. Distribución de percentiles 90 y 50 de eMIC basal y cada una de las tetraciclinas (tMIC).

Cepa	mMIC	tMIC DOXY	tMIC MINO	tMIC TE	tMIC TGC
P1346	25	10	13	10	14
P1358	6	6	11	6	12
P1363	24	24	19	22	16
P1367	24	24	19	22	16
P1377	6	6	12	6	11
P1382	6	6	8	6	22
P1387	6	6	12	6	15
P1389	6	6	15	6	15
P1395	6	6	12	6	13
P1396	16	15	18	16	17
P1547	24	14	21	17	15
P1641	6	20	17	17	20
P1647	6	9	20	14	14
P1740	19	22	24	24	24
P1825	6	19	19	18	14
P1845	6	21	21	21	22
P1870	12	12	14	12	15
P1876	6	11	14	11	15
P1891	15	6	13	6	15
P1948	18	14	11	6	16
P1969	20	15	18	10	20
P1986	23	26	26	27	25
P2058	21	9	24	13	22
P2453	16	22	24	25	20
P3026	27	6	15	6	18
P3058	6	17	14	15	17
P3059	6	15	16	16	15
P3070	28	11	14	11	14
P3194	12	11	15	12	13
P3253	30	22	19	20	20

Tabla 19. Distribución de halos de inhibición de 30 cepas de *P. aeruginosa* basales mMIC y con cada una de las tetraciclinas (tMIC).

Comparación de proporciones (eMIC y tMIC)

Con el fin de valorar significancia estadística entre el eMIC y tMIC de cada una de las tetraciclinas, se realizó test de McNemar donde se encontró que para antibióticos como minociclina y tigeciclina valores de $p < 0.05$. (Tablas 20, 21, 22 y 23).

	EMIC +	eMIC -	TOTAL
TMIC DOXY +	7	7	14
tMIC DOXY -	4	12	16
TOTAL	11	19	30

McNemar's $\chi^2 = 0.82$ $p = 0.5488$

	EMIC +	eMIC -	TOTAL
TMIC MINO +	9	13	22
tMIC MINO -	2	6	8
TOTAL	11	19	30

McNemar's $\chi^2 = 8.07$ $P = 0.0074$

	EMIC +	eMIC -	TOTAL
TMIC TE +	6	8	22
tMIC TE -	5	11	8
TOTAL	11	19	30

McNemar's $\chi^2 = 0.69$ $Prob = 0.5811$

	EMIC +	eMIC -	TOTAL
TMIC TGC +	9	13	22
tMIC TGC -	2	6	8
TOTAL	11	19	30

McNemar's $\chi^2 = 8.07$ $P = 0.0074$

Tablas 20, 21, 22 y 23. Tablas de contingencia y prueba estadística McNemar's con eMIC y cada una de las tetraciclinas evaluadas.

Demostración de la actividad quelante sobre el Zinc.

Al administrar 5mM de zinc y realizar el tMIC con cada una de las tetraciclinas se evidenció un diámetro de inhibición en el 90% de los casos de 18 mm para el caso de la doxiciclina con presencia de colonias dentro del halo y un percentil 50 de 13 mm; en lo que respecta a minociclina se encontró un diámetro de 19.1 mm y 14 mm tMIC₉₀ y tMIC₅₀ respectivamente, todos ellos con colonias dentro del halo de inhibición. Con tetraciclina se reportó un tMIC₉₀ de 22 mm seguido de 19 mm como tMIC₅₀ y por último con tigeciclina se reportó 19 mm (tMIC₉₀) y 14 mm (tMIC₅₀) con presencia de colonias dentro del halo en todos los experimentos (**Tabla 24**).

	tMIC ₉₀	tMIC ₅₀	Moda
tMIC DOXY	18	13	6
tMIC MINO	19.1	14	6
tMIC TE	22	19	20
tMIC TGC	19	14	6

Tabla 24. Distribución de percentiles 90 y 50 de tMIC de cada una de las tetraciclinas con 5 mM de zn⁺⁺.

Determinación de CIMs de sinergia entre tetraciclinas y meropenem

Se llevó a cabo determinación de CIMs de meropenem en conjunto con cada una de las tetraciclinas (DOXY, MINO, TE y TGC) a diferentes concentraciones de 64µg/mL del carbapenémico y las tetraciclinas 17µg/mL donde se observó como se muestra en la **Tabla 25 y Figura 30**, que el 100% de las cepas de *P. aeruginosa*

tenían CIMs de 64µg/mL al igual que minociclina. En lo que respecta a tetraciclina el 86.6% reportó CIMs de 64µg/mL y por último con tigeciclina el 30% reportaron CIM menores de ≤4µg/mL.

MICs MEM 64mg	Mic 64	Mic 4	Mic 2	Mic 0.5	Mic 0.25	Mic 0.125
DOXY 17 mg	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MIN 17 mg	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TE 17 mg	96.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TGC 17 mg	70	3.33	3.33	3.33	10.00	10.00

Tabla 25. Distribución de porcentaje de CIMs de *P. aeruginosa* con tetraciclinas (DOXY, MINO, TE) de 17 mg y meropenem 64 mg.

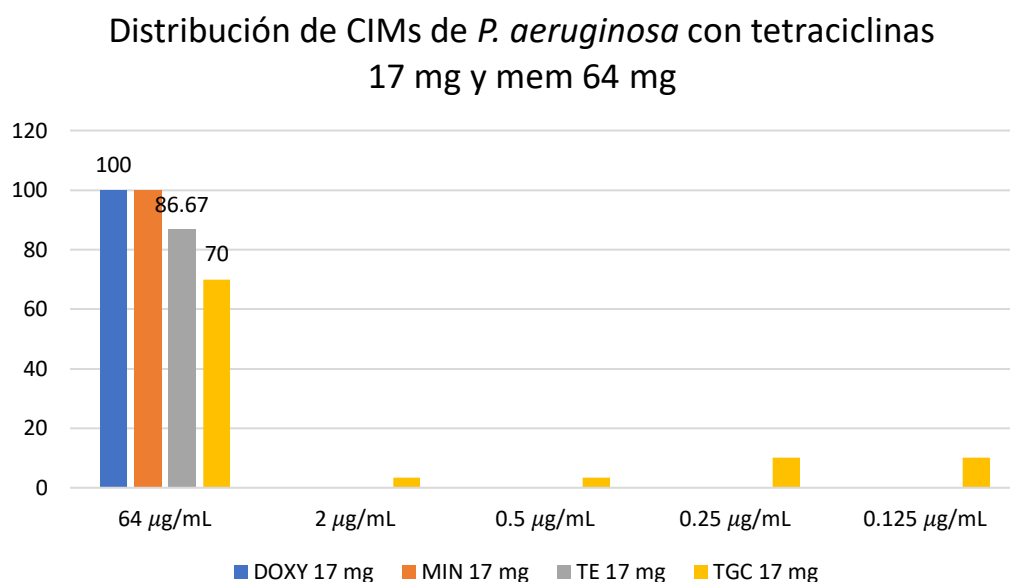


Figura 30. Distribución de porcentaje de CIMs de *P. aeruginosa* con tetraciclinas (DOXY, MINO, TE) de 17 mg y meropenem 64 mg.

Se realizaron de igual manera a concentraciones de 64µg/mL del carbapenémico y las tetraciclinas (DOXY, MINO, TE) de 64 µg/mL y TGC dde 8 µg/mL, donde se

observó como se muestra en la **Tabla 26 y Figura 31**, que el 100% de las cepas de *P. aeruginosa* tenían CIMs de 64 µg/mL al igual que minociclina. En lo que respecta a tetraciclina el 93.3% se reportó 64 µg/mL como CIMs y por último con tigeciclina el 13.34% reportaron CIM menores de 16 µg/mL.

CIMs	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	0.125 µg/mL
DOXY 64 mg	100.00	0.00	0.00	0.00
MIN 64 mg	100.00	0.00	0.00	0.00
TE 64 mg	93.33	6.67	0.00	0.00
TGC 8mg	83.33	3.33	6.67	6.67

Tabla 26. Distribución de porcentaje de CIMs de *P. aeruginosa* con tetraciclinas (DOXY, MINO, TE) de 64 mg, tigeciclina de 8 mg y meropenem 64 mg.

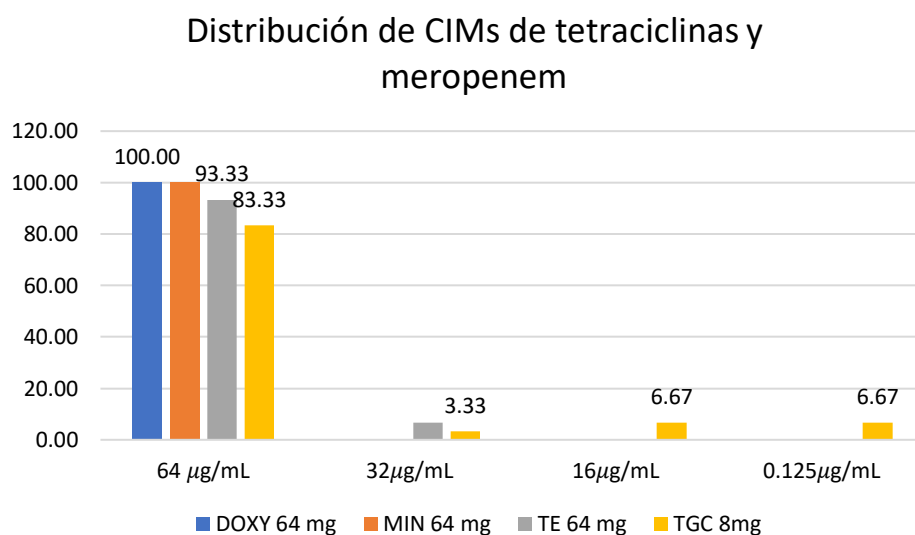


Figura 30. Distribución de porcentaje de CIMs de *P. aeruginosa* con tetraciclinas (DOXY, MINO, TE) de 64 mg, tigeciclina de 8 mg y meropenem 64 mg.

Determinación de CIMs según expresión de MBL

Se determinó la concentración mínima inhibitoria según el tipo de MBL expresada donde se encontró que el 60% de las cepas con expresión de *bla_{VIM}* tenían CIM de 64 µg/mL y el 35% ≤ de 0.5 µg/mL; en lo que respecta a *bla_{NDM}* su CIM fue del 100% ≥32 µg/mL, y por último con *bla_{IMP}* el 89% fue de 64 µg/mL. (Tabla 27 y Figura 31)

	64/17 mg	64 µg/mL	32 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.125 µg/mL
VIM		60	0	0	5	5	15	15
NDM		75	25	0	0	0	0	0
IMP		88.89	0	11.11	0	0	0	0

Tabla 27 Distribución de porcentaje de CIMs de *P. aeruginosa* con tetraciclinas (DOXY, MINO, TE) de 17 mg y meropenem 64 mg por tipo de MBL expresada

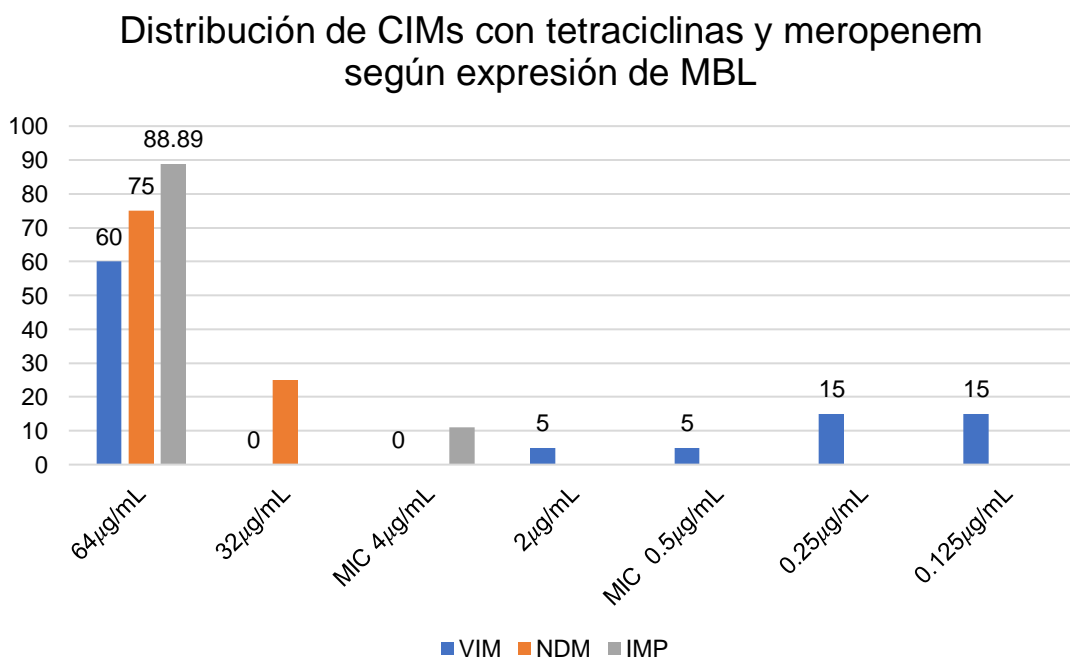


Figura 31 Distribución de porcentaje de CIMs de *P. aeruginosa* con tetraciclinas (DOXY, MINO, TE) de 17 mg y meropenem 64 mg por tipo de MBL expresada.

7. Discusión

La resistencia a los antimicrobianos (RAM), es un problema preocupante en todo el mundo, especialmente de los *Enterobacterales* y los no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*, debido a las limitaciones en disposición de terapias antibióticas efectivas contra las mismas y rápida instauración de mecanismos de resistencia que han desarrollado o adquirido⁽⁵⁰⁾. En lo que respecta de la resistencia en México, en un estudio realizado en el 2019 en 47 centros médicos Mexicanos, se encontró una resistencia a carbapenémicos hasta en el 40 % de las cepas de *Pseudomonas aeruginosas*, y a piperacilina tazobactam mayor al 50%; con un 4.4% de posibles PDR y un 8.8% de MDR⁽¹⁴⁾. En este estudio se encontró que más del 92% de las cepas de *P. aeruginosa* eran resistentes a carbapenémicos (DORY, IMI, MERO), quinolonas el 90%, en lo referente a aminoglucósidos oscila entre 44% para gentamicina y 80% para ampicacina, con PZT el 90% de las mismas, solo evidenciando una susceptibilidad intermedia para colistina en el 70% de los casos, lo cual nos refleja el alto grado de resistencia en las cepas procesadas en nuestra instituciones y por consiguiente las limitaciones para una terapia antimicrobiana efectiva. En lo referente a tipo de metalo β -lactamasa expresada en el 79% de los casos fue *blaVIM*, seguido de *blaIMP*, mmixtos un 10.5% y NDM como las menos frecuentes con un 6.31%.

Son bien conocidos los mecanismos de resistencia tanto intrínsecos, adquiridos y adaptativos de las *Pseudomonas aeruginosa* como el aumento de bombas de expulsión, disminución en la permeabilidad de la membrana, actividad enzimática, formación de biopelículas, la disminución en la permeabilidad de la membrana externa, entre otros⁽⁵⁰⁾. La pérdida de la permeabilidad está dada por la disminución en la expresión de porinas y en conjunto con el aumento de bombas de flujo, juegan un papel importante en la resistencia de *P. aeruginosa* frente a las tetraciclinas; razón por la cual esta familia de antibióticos no son utilizados en el manejo de infecciones por este microorganismo, y por lo tanto, tampoco hay puntos de corte para la interpretación de los resultados⁽²¹⁾. En este estudio se determinaron CIM donde se encontró que para doxyciclina, minociclina y tetraciclinas estas estaban en más del 80% de los casos $\geq 32\mu\text{g/mL}$ y en el 27.6% de los casos $\leq 4\mu\text{g/mL}$ para tigeciclina. Hallazgos que fueron replicados por la eMIC modificado con tetraciclinas donde más del 95% de los aislamientos reportaron un diámetro de 6 mm para DOXY, MINO y TE y con TE 6.31% mayor o igual a 16 mm sin presencia de colonias dentro del halo de inhibición.

Por otro lado, las metalo β -lactamasas de clase B, son enzimas dependientes de zinc; dado que en su estructura poseen este metal que es indispensable en la hidrólisis de los anillos de los β -lactámicos⁽⁵⁴⁾. Por esta razón, y ante la propiedad que tienen las tetraciclinas de quelar metales como zinc, magnesio en este estudio se consideró que el uso de tetraciclinas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en

combinación con β -lactámicos tipo carbapenémicos, quelaría el zinc de las metalo β -lactamasas y de esta manera se impediría la hidrólisis de carbapenémicos y por consiguiente estos últimos ejercerían su acción ante *Pseudomonas aeruginosa*; logrando inhibición de su crecimiento o disminución de la concentración mínima inhibitoria. En nuestro estudio con el método de inactivación de carbapenemicos se encontró que el uso de tetraciclinas, especialmente minociclina y tigeciclina presentaron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la inhibición del crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* productora de metalo β -lactamasas.

Como debilidades de nuestro estudio logramos evidenciar una disminución de las MICs de *Pseudomonas aeruginosa* en un tercio de las cepas evaluadas, únicamente con zinc; probablemente no se obtuvieron mejores resultados dada la concentración de tetraciclinas utilizadas; en la literatura existe reportes de concentraciones plasmáticas de tetraciclina de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde se logró una disminución hasta niveles indetectables ($< 10\text{ufc}/\text{mL}$) de células de *P. aeruginosa*, todo ello previo al uso de otro compuesto como acriol que podría aumentar la permeabilidad de la membrana externa y permitir el ingreso adecuado del antibiótico, y en nuestro estudio se utilizaron concentraciones de 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, hay que considerar factores confusores como los metales presentes en el agua utilizada para la realización de los ensayos, que pudieron disminuir el efecto de las tetraciclinas sobre el anillo de las metalo - lactamasas. Y tercero el número de muestras utilizadas para el estudio.

Como fortalezas, se logró evidenciar el patrón de resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de la institución y de dos hospitales generales de la ciudad; lo cual nos brinda información sobre opciones terapéuticas; al igual de considerar reforzar medidas de control de antibióticos y medidas de aislamiento con el fin de disminuir la transmisión de estos mecanismo de resistencia.

Como conclusiones, nuestros resultados nos permitieron valorar el perfil de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de nuestras cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo - lactamasas; predominando las tipo VIM en el 79% de los casos, seguido de IMP y por último NDM. Se evidenció que el uso combinado de tetraciclinas y carbapenémicos de manera general no logró inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*; encontrándose únicamente en un tercio de las cepas una disminución de la MIC en el manejo con tigeciclina de manera conjunta.

Este estudio sirve de base para considerar continuar con la búsqueda de opciones terapéuticas para manejo de infecciones por microorganismos multidrogo resistente.

8. Referencias:

1. Stamm W, Grayson M, Nicolle L, Powell M. Who Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2001. 98 p. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66860/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.2.pdf
2. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? 2017. 90(1):135–45.
3. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. el 16 de marzo de 2020;25(6):1340.
4. WHO. Organización mundial de la salud. 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
5. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2019 nov [citado el 5 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
6. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. febrero de 2022;399(10325):629–55.
7. O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations [Internet]. London: Review on Antimicrobial Resistance; 2014. 1–14 p. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
8. De Souza GHDA, De Oliveira AR, Dos Santos Barbosa M, Rossato L, Da Silva Barbosa K, Simionatto S. Multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients with COVID-19: An epidemiological and clinical study. *J Infect Public Health*. agosto de 2023;16(8):1184–92.
9. Shrestha Y, Shivalingegowda RK, Avinash MJ, Kenchegowda SBH, Moktan

JB, Doddasamiah SM, et al. The rise in antimicrobial resistance: An obscure issue in COVID-19 treatment. Katoto PD, editor. PLOS Glob Public Health. el 13 de julio de 2022;2(7):e0000641.

10. Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*. diciembre de 2021;81(18):2117–31.

11. Garza-González E, Morfín-Otero R, Mendoza-Olazarán S, Bocanegra-Ibarias P, Flores-Treviño S, Rodríguez-Noriega E, et al. A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. Shafer WM, editor. PLOS ONE. el 26 de marzo de 2019;14(3):e0209865.

12. López-Jácome LE, Fernández-Rodríguez D, Franco-Cendejas R, Camacho-Ortiz A, Morfín-Otero M del R, Rodríguez-Noriega E, et al. Increment Antimicrobial Resistance During the COVID-19 Pandemic: Results from the Invifar Network. *Microb Drug Resist*. el 1 de marzo de 2022;28(3):338–45.

13. Garza-González E, Bocanegra-Ibarias P, Bobadilla-del-Valle M, Ponce-de-León-Garduño LA, Esteban-Kenel V, Silva-Sánchez J, et al. Drug resistance phenotypes and genotypes in Mexico in representative gram-negative species: Results from the infivar network. Woźniakowski G, editor. PLOS ONE. el 17 de marzo de 2021;16(3):e0248614.

14. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. el 15 de abril de 2008;197(8):1079–81.

15. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2009;22(4):582–610.

16. Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat: This article is part of the Microbe Profiles collection. *Microbiology*. el 1 de enero de 2020;166(1):30–3.

17. Rigane E, Dutoit R, Matthijs S, Brandt N, Flahaut S, Belghith KS. Characterization of Putative Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Strain RBS Isolated from a Saltern, Tunisia: Effect of Metal Ion Cofactors on the Structure and the Activity of LasB. *BioMed Res Int*. el 23 de julio de 2020;2020:1–13.

18. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* Story: Editorial. *Environ Microbiol*. el 7 de junio de 2010;12(6):1377–83.

19. Saati-Santamaría Z, Peral-Aranega E, Velázquez E, Rivas R, García-Fraile P. Phylogenomic Analyses of the Genus *Pseudomonas* Lead to the Rearrangement of Several Species and the Definition of New Genera. *Biology*. el 16 de agosto de 2021;10(8):782.
20. Tamilselvi A, Nethaji M, Mugesh G. Antibiotic Resistance: Mono- and Dinuclear Zinc Complexes as Metallo- β -Lactamase Mimics. *Chem - Eur J*. el 16 de octubre de 2006;12(30):7797–806.
21. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Kudva IT, Zhang Q, editores. *Microbiol Spectr*. el 25 de marzo de 2016;4(2):4.2.15.
22. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. el 25 de junio de 2022;7(1):199.
23. Ye R, Tan C, Chen B, Li R, Mao Z. Zinc-Containing Metalloenzymes: Inhibition by Metal-Based Anticancer Agents. *Front Chem*. el 19 de mayo de 2020;8:402.
24. Bennett J, Dolin R, Blaser M. Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. España: Elsevier; 2016. 2656–2670 p.
25. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. el 1 de junio de 2005;55(6):1050–1.
26. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. diciembre de 2020;8(1):13.
27. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. 2008;12(3):227–32.
28. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. marzo de 2010;54(3):969–76.
29. Sahuquillo-Arce JM. Carbapenemases: A worldwide threat to antimicrobial therapy. *World J Pharmacol*. 2015;4(1):75.
30. Wang Z, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ. Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol*. octubre de 1999;3(5):614–22.
31. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. Metallo- β -Lactamases:

Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother.* el 21 de septiembre de 2020;64(10):e00397-20.

32. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol* [Internet]. 2014 [citado el 6 de agosto de 2023];4. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00422/abstract>

33. Quimica.es. Tiol. Disponible en: <https://www.quimica.es/enciclopedia/Tiol.html#>

34. Brem J, Van Berkel SS, Zollman D, Lee SY, Gileadi O, McHugh PJ, et al. Structural Basis of Metallo- β -Lactamase Inhibition by Captopril Stereoisomers. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2016;60(1):142–50.

35. González MM, Kosmopoulou M, Mojica MF, Castillo V, Hinchliffe P, Pettinati I, et al. Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase. *ACS Infect Dis.* el 13 de noviembre de 2015;1(11):544–54.

36. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* abril de 2016;6(4):a025387.

37. Askari Rizvi SF. Tetracycline: Classification, Structure Activity Relationship and Mechanism of Action as a Theranostic Agent for Infectious Lesions-A Mini Review. *Biomed J Sci Tech Res* [Internet]. el 25 de julio de 2018 [citado el 5 de agosto de 2023];7(2). Disponible en: <https://biomedres.us/fulltexts/BJSTR.MS.ID.001475.php>

38. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* junio de 2001;65(2):232–60.

39. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol-Cell Physiol.* septiembre de 2010;299(3):C539–48.

40. Liu J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders. En: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Elsevier; 2017 [citado el 5 de agosto de 2023]. p. 355–420. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117317300637>

41. Li XZ, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 1994;38(8):1732–41.
42. Langendonk RF, Neill DR, Fothergill JL. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. *Front Cell Infect Microbiol.* el 16 de abril de 2021;11:665759.
43. Saji M, Fujii K, Irie N, Kato F, Ohkuni H, Osono E. Synergistic bactericidal effects of acrinol and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother.* 2000;6(2):86–92.
44. Camargo TP, Oliveira JAF, Costa TG, Szpoganicz B, Bortoluzzi AJ, Marzano IM, et al. New AlIII ZnII and AlIII CuII dinuclear complexes: Phosphatase-like activity and cytotoxicity. *J Inorg Biochem.* junio de 2021;219:111392.
45. Chan DCK, Guo I, Burrows LL. Forging New Antibiotic Combinations under Iron-Limiting Conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* el 21 de febrero de 2020;64(3):e01909-19.
46. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically.* 11th ed. 1–112 p.
47. CLSI. Procedure for Confirming the Acceptability of Mueller-Hinton Agar Sources for Subsequent Use in CLSI and/or EUCAST Studies to Establish Disk Diffusion Quality Control Ranges M23S3 ED1:2023 [Internet]. 1era ed. Vol. 43. Estados Unidos; 2023. Disponible en: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M23S3%20ED1:2023&scope=user>
48. CLSI M100-ed 29:2019. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. 29a ed. Vol. 35. Pennsylvania: CLSI; 2019. Disponible en: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED29:2019&sbssok=CLSI%20M100%20ED29:2019%20TABLE%203C&format=HTML&hl=Carbapenemase>
49. CLSI. Use of Molecular Assays for Resistance detection. Disponible en: <https://clsi.org/media/2597/clsi-use-of-molecular-assays-for-resistance-detection.pdf>
50. Geoffrey C. Research Randomizer [Internet]. Lancaster, Pennsylvania; 1997. Disponible en: <https://www.randomizer.org/about/>

51. CLSI. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty- Fifth Informational Supplement. 20a ed. Vol. 35. Pennsylvania: CLSI; 2015. 1–240 p.
52. IBM L. Spftware IBM SPSS [Internet]. IBM; Disponible en: https://www.ibm.com/mx-es/spss?utm_content=SRCWW&p1=Search&p4=43700077515785267&p5=p&clid=CjwKCAjw29ymBhAKEiwAHJbJ8iFv-MF2-EtPh9G091JNfl7GRnmmv4OCOA9VJLe4ZBp0zUoEB6pzqBoCk4oQAvD_BwE&gclid=aw.ds
53. CLSI. CLSI M100-ED33:2023 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. [Internet]. 33a ed. Pennsylvania: CLSI; Disponible en: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED33:2023&sbssok=CLSI%20M100%20ED33:2023%20TABLE%20B-1&format=HTML&hl=Pseudomonas%20aeruginosa>
54. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev.* el 18 de septiembre de 2019;32(4):e00031-19.