



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
SUBESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA:

DRA. SENYASEN SAIRI CASTRO RAMÍREZ

Actividad *in vitro* de cefepime, cefiderocol, piperacilina-tazobactam, ceftazidima-avibactam, cefepime-taniborbactam, ceftolozano-tazobactam, meropenem-varbobactam, imipenem-relebactam, en *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES

DR. RAFAEL FRANCO CENDEJAS
DIRECTOR DE TESIS

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO Y ESPECIALIZACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
FIRMAS DE AUTORIZACIÓN**

Dr. Rafael Vázquez Romo

Jefe de Enseñanza e Investigación
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Patricia Amalia Volkow Fernández

Profesor Titular del Curso de Infectología
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Rafael Franco Cendejas

Subdirector de Investigación Biomédica
Instituto Nacional de Rehabilitación

Dra. Senyasen Sairí Castro Ramírez

Autor de Tesis
Residente de Infectología
Instituto Nacional de Cancerología

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que me han apoyado siempre en todos mis sueños, metas y objetivos

A mi hermana que me apoyó y reconfortó cuando lo necesité.

A mis amigos, que se volvieron una segunda familia, siempre apoyandonos los unos a los otros.

A mis maestras del INCan que me dieron la oportunidad de continuar con mi crecimiento profesional y poder cumplir un sueño, gracias por sus enseñanzas.

A mis maestras del Hospital Manuel GEA González, por las enseñanzas, los consejos, el apoyo, el crecimiento en todos los aspectos de mi vida.

A mis tutores, por creer en mi, sin su apoyo, este proyecto no se podría haber realizado.

Al equipo de microbiología del Laboratorio de Microbiología del INRLGII.

Todas las personas que contribuyeron a que esta tesis se viera realizada.

Pero sobretodo a los pacientes que confiaron en mi y de los que aprendí tanto.

ÍNDICE

.....	1
1. INTRODUCCIÓN	5
2. PRESENTACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	7
MARCO TEÓRICO	7
Microbiología y definiciones	12
Mecanismos de resistencia.....	14
Nomenclatura de las β -lactamasas.....	15
Carbapenemasas tipo GES	18
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVOS	21
a. Objetivo principal:	21
b. Objetivo secundario:	21
7. DISEÑO Y METODOLOGÍA	21
a. Tipo de estudio	21
b. Descripción del universo de trabajo.....	21
c. Definición del grupo control:	22
d. Criterios de Inclusión:.....	22
e. Criterios de eliminación.....	22
f. Criterios de exclusión.....	23
g. Tamaño de la muestra.....	23
h. Descripción de las variables de estudio, unidades de medida y escalas de medición 23	
i. Descripción de los procedimientos	25
c. <i>Análisis estadístico</i>	26
8. RESULTADOS	27
9. DISCUSIÓN	33
10. CONCLUSIONES	36
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

Actividad *in vitro* de cefepime, cefiderocol, piperacilina-tazobactam, ceftazidima-avibactam, cefepime-taniborbactam, ceftolozano-tazobactam, meropenem-vaborbactam, imipenem-relebactam, en *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana global ha generado millones de infecciones y miles de muertes anuales. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos es un patógeno prioritario de acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS)(1) En México, se ha observado un incremento en la prevalencia de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Las carbapenemasas tipo VIM (*Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase*), IMP (*Imipenemase*) y GES (*Guiana Extended-Spectrum*) son de los mecanismos de resistencia más comunes en nuestro país(2). El tratamiento de las infecciones por estas bacterias es complejo y requiere la caracterización del mecanismo de resistencia. Se ha evidenciado el efecto de los nuevos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas en carbapenemasas tipo IMP y VIM (3), pero hay poca información sobre su efecto en las carbapenemasas tipo GES. Se requieren estudios *in vitro* para evaluar la actividad de estos fármacos en *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES.

Objetivo primario:

- Describir la actividad, con base en la concentración mínima inhibitoria, de cefepime, cefiderocol, piperacilina-tazobactam, ceftazidima-avibactam, cefepime-taniborbactam, ceftolozano-tazobactam, meropenem-vaborbactam e imipenem-relebactam en *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES.

Objetivos secundarios:

- Identificar y clasificar las *Pseudomonas spp.* resistentes a carbapenémicos.

- Describir los resultados de las pruebas mMIC y eMIC en las *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES.
- Describir los resultados de la secuenciación de *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES.
- Describir la proporción de otras carbapenemasas mediante PCR en *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES.

Metodología: Estudio experimental de ciencias básicas con cepas clínicas de *Pseudomonas spp.*, consecutivas y no duplicadas, productoras de carbapenemasas tipo GES recolectadas del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

Resultados esperados: Las *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES serán susceptibles en ensayos *in vitro* a los nuevos betalactámicos y combinaciones con nuevos inhibidores de betalactamasas.

Tiempo de duración: 6 meses

2. PRESENTACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

MARCO TEÓRICO

Epidemiología

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) ha aumentado en la última década, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial, los CDC en el 2013 publicaron el primer informe de carga y amenazas que representan los gérmenes resistentes a antibióticos para la salud humana(4), reportaron aproximadamente 2 millones de infecciones causadas por gérmenes resistentes a los antibióticos, con al menos 23,000 muertes anuales en los Estados Unidos de América (E.U.A) (4) en la revisión sobre la resistencia a los antimicrobianos presidida por Jim O'Neill en el 2014(5), menciona que para el 2050 la RAM provocaría la muerte de 10 millones de personas por cada año y una reducción del 2 al 3.5% en producto interno bruto (PIB), con un costo 100 billones de dólares(5).

La OMS en el 2015 puso en marcha el Sistema Mundial de Vigilancia de las Resistencias y Uso de Antimicrobianos, por sus siglas en inglés (GLASS)(6) con 5 objetivos bien definidos: 1) mejorar la conciencia y comprensión de la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y capacitación efectiva, 2) fortalecer la base de conocimientos y pruebas mediante la vigilancia e investigación, 3) reducir la incidencia de infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de infecciones, 4) optimizar el uso de medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal, 5) aumentar la inversión en nuevos medicamentos, herramientas de diagnóstico y vacunas,

tomando en cuenta la necesidad de todos los países(6). Sin embargo, no existe mucha información de RAM a partir del 2020 debido a la pandemia por la COVID-19 y los microorganismos que reportaron, no comprenden *Pseudomonas spp.* (7)(8).

Estimaciones del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) indican que, en 2015, las bacterias resistentes a los antibióticos causaron aproximadamente 600,000 infecciones y 27,000 muertes en Europa (9). Se estima que alrededor del 70% de la morbilidad, tanto en términos de casos como de muertes atribuibles, se debe a bacterias Gram negativas multirresistentes (BGN-MDR) de los cuales *Pseudomonas aeruginosa* MDR aumentó las muertes 1.5 veces más que las cepas susceptibles del 2007 a 2015 (9).

En el informe del 2019 los CDC reportaron que la cantidad de muertes causadas por RAM es casi dos veces mayor que el informe 2013 (1) sin embargo, el trabajo realizado para la prevención de RAM, logró la disminución del 18% en el número de muertes relacionadas por RAM y reducir el 28% muertes por RAM en hospitales (1), lo que sugiere que la prevención y el uso racional de los antibióticos pueden tener un impacto positivo en la disminución de las bacterias resistentes(1), se notificaron 1.2 millones de muertes a nivel mundial atribuibles a la RAM.

Los CDC clasificaron 18 gérmenes en 3 categorías: urgente, grave y preocupante. Entre ellos, destaca la *P. aeruginosa*, clasificada como multirresistente (MDR) en la categoría grave, (1)**Tabla 1.**

URGENTE
<i>Acinetobacter spp.</i> , resistente a carbapenémicos
<i>Candida auris</i>

<i>Clostridioides difficile</i>
<i>Enterobacterales</i> resistentes a carbapenémicos
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a antibióticos

GRAVE
<i>Campylobacter</i> resistente a antibióticos
<i>Candida spp.</i>
<i>Enterobacterales</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)
<i>Enterococcus spp.</i> , resistentes de vancomicina (VRE)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multidrogo resistente (MDR)
<i>Saphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente antibióticos
Tuberculosis resistente a antibióticos
<i>Salmonella</i> no Typhi
<i>Salmonella</i> serotipo Typhi y <i>Shigella</i> resistentes a antibióticos

PREOCUPANTE
<i>Streptococcus</i> grupo A resistente a eritromicina
<i>Streptococcus</i> grupo B resistente a clindamicina

Tabla 1. Clasificación de la CDC para gérmenes resistentes a antibióticos(1).

Se estimaron 4.95 millones de muertes atribuibles a RAM en el 2019, de los cuales el 78.8% se atribuyeron a tres síndromes principales: infecciones de las vías respiratorias y del tórax, infecciones del torrente sanguíneo e infecciones abdominales (10). Seis patógenos fueron responsables de más de 250 000 muertes asociadas a RAM: *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *P. aeruginosa* (10). La mortalidad atribuible únicamente a *P. aeruginosa* fue del 18.9 millones de años de vida perdidos de un total de 340 millones de vida de años perdidos, de la mortalidad asociada con 33 patógenos bacterianos en el 2019 (11).

Dada la carga significativa de enfermedad, la escasez de tratamientos disponibles y el lento desarrollo de nuevos antibióticos, el CDC ha priorizado cuatro bacterias BGN-MDR, con el acrónimo “ESKAPE” que son (12): 1) *Enterobacterales* resistentes a cefalosporinas de

espectro extendido: patógenos que expresa varios tipos de β -lactamasas, incluidas las β -lactamasas de espectro extendido (por sus siglas en inglés BLEE), de la clase Ambler-A y Ambler-C como las AmpC, 2) *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (ERC), 3) *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (PARC) y 4) *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (ABRC)(13).

John P. Mills, en el artículo publicado en el 2021(13) menciona, que existen herramientas para prevenir la adquisición de resistencia de BGN-MDR y son principalmente dos: 1) Evitar la transmisión de paciente a paciente y/o sus elementos genéticos móviles (por ejemplo, carbapenemasas), al colocar en aislamiento a los pacientes que se detecten estas resistencias, ya que el personal de salud suele ser un intermediario. 2) El uso racional de antibióticos evita, la evolución de las bacterias para generar resistencia de *novo*, en la que los aislados susceptibles, bajo presión selectiva de antibióticos, expresen un fenotipo MDR, mediado por la expresión genética cromosómica (por ejemplo, AmpC) así como alteraciones en los canales de porinas de la membrana o bombas de eflujo (13)(14)(15).

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) emitieron una lista de cinco nuevos antibióticos aprobados con actividad contra BGN-MDR, aunque ninguno de ellos presenta un nuevo mecanismo de acción, todos siguieron un camino de desarrollo acelerado que se concede a los medicamentos que abordan necesidades médicas no cubiertas(16).

La implementación de proyectos que fomenten el uso adecuado de antibióticos, como el programa de administración antimicrobiana (antimicrobial stewardship, AS), es una

estrategia para racionalizar el uso de antibióticos solo cuando y donde sea necesario (17), ha impactado favorablemente en la reducción de RAM, uno de los estudios más recientes realizado en Verona Italia en el 2022 (18), demostró que al implementar el programa AS, el consumo mensual de carbapenémicos disminuyó de 50 dosis diarias por 1000 número de días pacientes a 35 dosis diarias por 1000 número de días pacientes (18), otro proyecto importante es el programa de optimización del uso de antimicrobianos (PROA), que tienen como objetivo mejorar los resultados clínicos, minimizar los efectos adversos y reducir los costos asociados con su uso, como la resistencia a antibióticos, que impacta en el aumento de estancia hospitalaria, uso de diversos antibióticos y los estudios necesarios para obtener la susceptibilidad, todo esto se ve reflejado en aumento de costos para el paciente o Institución (19). En el 2020, más del 90% de los hospitales en E.U.A, contaba con un programa de administración de antibióticos, por el importante aumento de resistencia a antimicrobianos secundario a la pandemia por COVID-19 (20).

En México, existen reportes aislados y de grupos de trabajo sobre la resistencia a los antibióticos. En 2018 se publicó la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos, lo que llevó a la formación del grupo nacional denominado Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia (INVIFAR) (21). De acuerdo a los informes de INVIFAR, en el 2018, *P. aeruginosa* reportó el 40% de resistencia a carbapenémicos en todas las muestras (respiratorias, orina, sangre, abscesos, biopsias, entre otras) (22) y el 19% tenían resistencia a piperacilina-tazobactam (TZP) únicamente en las muestras de orina (22). Sin embargo, para el 2020, se observó un incremento en la resistencia de *P. aeruginosa*, a TZP del 29.5% en muestras de orina(2), lo que representa un aumento del 10% en 2 años. Además, se demostró una resistencia del 37.1% a meropenem (MEM) en muestras de sangre(2). Durante la pandemia de la COVID-19,

INVIFAR informó una resistencia a carbapenémicos del 21.7%(23), en comparación con lo publicado por los CDC, durante la pandemia, en el periodo del 2019 al 2020(24), en donde las infecciones por microorganismos resistentes a carbapenémicos, incrementaron un 15% en pacientes hospitalizados y solo para *P. aeruginosa* hubo un aumento del 32%(24).

Microbiología y definiciones

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* capaz de sobrevivir en una amplia gama de entornos (25), posee diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos: intrínsecos, adquiridos y adaptativos (26), que dificultan la elección del antimicrobiano.

En el 2012 se definió *P. aeruginosa* MDR, como que no es susceptible al menos a 3 clases de antibióticos para los que se espera sensibilidad: cefalosporinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos (13), sin embargo, para el 2018 se modificó el concepto a *P. aeruginosa* de “difícil tratamiento” (DTR), y es la que no presenta susceptibilidad a ninguno de los siguientes: piperacilina-tazobactam (TZP), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), meropenem (MEM), imipenem-cilastatina (IPM), ciprofloxacina (CIP) y levofloxacina (LVX) (27). En el 2019, el CDC notificó que el 2-3% de las *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos portan un elemento genético móvil, que produce una enzima carbapenemasa (1)(26).

Los organismos encargados de estandarizar puntos de corte para determinar la susceptibilidad de los antibióticos son el CLSI (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (28) y el EUCAST (Comité Europeo

de Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (29) para fines de este trabajo, se utilizarán los puntos de corte CLSI publicados en la edición 33 del libro M100 y EUCAST Versión 13.0, resumidos en la **Tabla 2 y 3**

Antimicrobiano	Puntos de corte, concentración mínima inhibitoria (CMI) $\mu\text{g/mL}$		
	S	I	R
TZP	≤ 16	32	≥ 64
CZA	≤ 8	-	≥ 16
C/T	≤ 4	8	≥ 16
IPM	≤ 2	4	≥ 8
MEM	≤ 2	4	≥ 8
CAZ	≤ 8	16	≥ 32
FEP	≤ 8	16	≥ 32
FDC	≤ 4	8	≥ 16
ATM	≤ 8	16	≥ 32
I-R	≤ 2	4	≥ 8
MVB	-	-	-

Tabla 2 *Adaptado del CLSI M100 Ed 33 Piperacilina-tazobactam (TZP), ceftazidima-avibactam (CZA), ceftolozano-tazobactam (C/T) ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), cefiderocol (FDC), meropenem (MEM), meropenem-vaborbactam (MVB), imipenem (IPM) imipenem-relebactam (I-R)

Antimicrobiano	Puntos de corte, concentración mínima inhibitoria (CMI) $\mu\text{g/mL}$	
	S	R
TZP	≤ 0.001	> 16
CZA	≤ 8	> 8
C/T	≤ 4	> 4
IPM	≤ 0.001	> 4
MEM	≤ 2	> 8
CAZ	≤ 0.001	> 8
FEP	≤ 0.001	> 8
FDC	≤ 2	> 2
ATM	≤ 8	> 32
I-R	≤ 2	> 2
MVB	≤ 8	> 8

Tabla 3 *Adaptado EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 13.0, valid from 2023-01-01 -Piperacilina-tazobactam (TZP), ceftazidima-avibactam (CZA), ceftolozano-tazobactam (C/T) ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), cefiderocol (FDC), meropenem (MEM), meropenem-vaborbactam (MVB), imipenem (IPM) imipenem-relebactam (I-R)

Hasta el momento no existen puntos de corte para cefepime-taniborbactam (FTB), de acuerdo Hernández-García el artículo publicado en el 2022 (30), utilizan como punto de corte provisional para susceptible $\leq 8/4$ mg/L de cefepime-taniborbactam respectivamente y $> 8/4$ mg/L como resistente.

Mecanismos de resistencia

P. aeruginosa posee diferentes mecanismos de resistencia intrínseca: permeabilidad restringida de la membrana externa, bombas de eflujo e hidrólisis enzimática (31), dentro de esta última se encuentran las betalactamasas de espectro extendido de Guayana (GES).

P. aeruginosa MDR evoluciona como la interacción de múltiples mecanismos de resistencia complejos, incluidos la disminución de porinas de membrana externa, que pueden ser específicas (OprD, OprB, OprE), no específicas (OprF), porinas cerradas (OprC y OprH) y porinas de salida (OprM, OprN y OprJ), OprF promueve la función de formación y unión de la biopelícula (26)(32). Las porinas de salida (OprM, OprN y OprJ), contribuyen a la salida activa de varios antibióticos, incluidos, tetraciclina, norfloxacino, β -lactámicos (33)(26).

Otro mecanismo son las bombas de eflujo o expulsión, las cuales pueden regular al alza los genes de virulencia para mejorar la resistencia a los antibióticos y mantener la homeóstasis bacteriana, se describen cinco componentes en la familia de bombas de eflujo: superfamilia de casete de unión de ATP (ABC), superfamilia de facilitadores principales (MFS) y familia de extrusión de compuestos tóxicos (MATE) de múltiples fármacos, familia de división de nodulación de resistencia (RND) y pequeña familia de resistencia a múltiples fármacos (SMR)(33).

La resistencia mediada por enzimas, surge de la actividad de las β -lactamasas, enzimas producidas por bacterias que hidrolizan la amida del β -lactámico (34), con la adición rápida de una molécula de agua a través del enlace común de β -lactámico, lo que hace que el antibiótico sea ineficaz e incapaz de inhibir las proteínas de unión a penicilinas (por sus siglas en inglés, PBP) (35). **Figura 1.**



Figura 1. (35)Vía de reacción general para la interacción de un β -lactámico con enzimas interactivas con penicilina. Adaptado de Interplay between β -lactamasas and new β -lactamase inhibitors (35)

Las enzimas que interactúan con la penicilina, como la proteína de unión a la penicilina (PBP; designada como E) o una β -lactamasa que tiene un residuo de serina en el sitio activo (E), se unen a un β -lactámico (BL) para formar un complejo reversible (E-BL). Este complejo puede proceder a una enzima acilo estable (E-BL) causada por la reacción del β -lactámico con la serina del sitio activo de la enzima. La adición de agua a la enzima acilo da como resultado la ruptura del enlace β -lactámico, lo que da como resultado un antibiótico microbiológicamente inactivo (BL^*). La hidrólisis de la enzima acilo ocurre rápidamente para una β -lactamasa y lentamente para una PBP.

Se han encontrado más de 2,770 β -lactamasas únicas naturales, que representan una gran amenaza para el uso terapéutico de β -lactámicos, por lo que en la década de los 80's surgió el concepto de desarrollar combinaciones de un inhibidor de β -lactamasa (por sus siglas en inglés, BLI), con una penicilina o cefalosporina microbiológicamente activa formulada con un solo producto, como son amoxicilina con ácido clavulánico y piperacilina con tazobactam. (36)

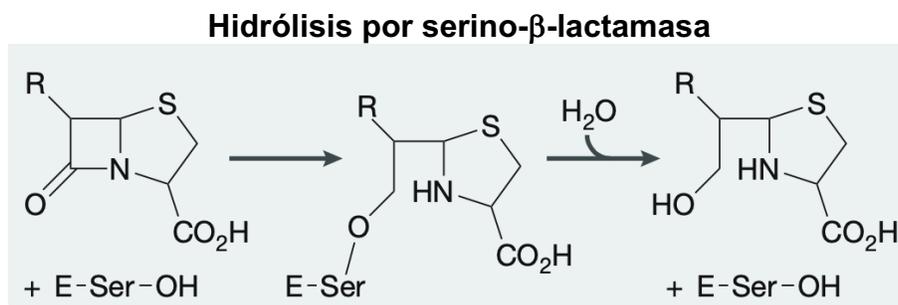
Nomenclatura de las β -lactamasas.

Existen 2 sistemas de clasificación de β -lactamasas, la clasificación molecular de Ambler que separa las β -lactamasas en distintas clases moleculares (A, B, C, D), sobre la base de su secuencia de aminoácidos (37) y la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros que clasifica las β -lactamasas de acuerdo con las similitudes de los perfiles de hidrólisis del sustrato y la respuesta de varios inhibidores. (38)(39). **Tabla 3**

Ambler Clase	Bush-Jacoby-Medeiros	Sustratos	Inhibidos por AC o TZB	Inhibidos por EDTA	Enzimas
C	1	Cefalosporinas	No	No	AmpC, ACT-1
A	2a	Penicilinas	Si	No	PC1
A	2b	Penicilinas, Cefalosporinas	Si	No	TEM-, TEM-2, SHV-1
A	2be	Cefalosporinas espectro extendido, monobactámicos	Si	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
A	2br	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
A	2ber	Cefalosporinas	No	No	TEM-50
A	2c	Penicilinas	Si	No	PSE-1, CARB-3
A	2ce	Carbapenicilinas, Cefepime	Si	No	RTG-4
D	2d	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
D	2de	Cefalosporinas espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
D	2df	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48
A	2e	Cefalosporinas espectro extendido	Si	No	CepA
A	2f	Carbapenémicos	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
B(B1)	3a	Carbapenémicos	No	Si	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
B(B2)	3b	Carbapenémico	No	Si	CphA, Sfh-1

Tabla 3 Clasificación de las β -lactamasas. *Adaptado (39)TEM: Temoneira de β -lactamasa, SHV: Sulfhydryl variable β -lactamasa, OXA: Oxacilina, CTX: cefalosporinasa de espectro extendido, AC: Ácido clavulánico, TZB: tazobactam

Las β -lactamasas de las clases A, C y D de Ambler son serinos β -lactamasas, que contienen un residuo de serina reactiva en su sitio activo (serina- β -lactamasas), mientras que la clase B comprende las metalo- β -lactamasas, que presentan un átomo de zinc divalente catalíticamente funcional (metalo- β -lactamasas, MBL). **Figura 2.** (34) (35).



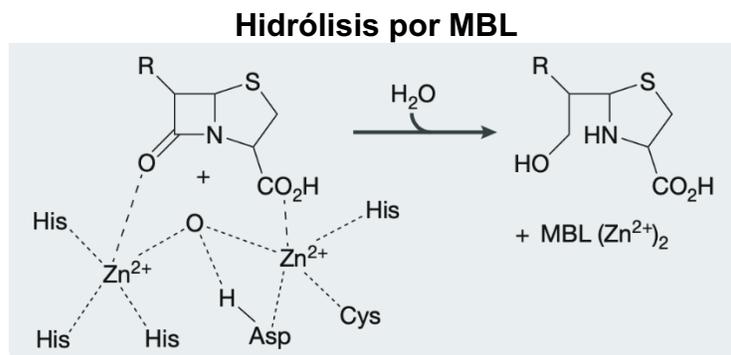


Figura 2. *Adaptado de Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors (35)

Mecanismo general de hidrólisis de β -lactámicos por serina y metalo- β -lactamasas. Para las serino β -lactamasas (indicadas como E-Ser-OH), un carboxilato cargado negativamente, o un grupo con carga similar, en la cadena lateral del anillo de azetidina del β -lactámico es atraído al sitio activo de la β -lactamasa por residuos cargados positivamente. La β -lactamasa forma enlaces de hidrógeno clave con la β -lactamasa, que luego se acila. Posteriormente, se activa una molécula de agua para desacilar el complejo β -lactámico- β -lactamasa, lo que conduce a la generación de una β -lactamasa activa y una molécula con anillo abierto, microbiológicamente inactiva. Las metalo- β -lactamasas (MBL) requieren al menos uno y generalmente dos iones Zn^{2+} , unidos por un ion hidróxido que facilita el ataque de los nucleófilos al átomo de oxígeno del carbonilo del anillo β -lactámico, lo que lleva a la hidrólisis y la inactivación del antibiótico. Un Zn^{2+} se mantiene en su lugar por tres residuos de histidina. Muchas MBL contienen un segundo sitio de unión al zinc, con ligandos de zinc de Asp, Cys y/o His, e His también funcionan en la reacción de hidrólisis.

Para fines de este trabajo nos centraremos en las β -lactamasas tipo serino. Se agrupan en el grupo funcional Bush-Jacoby-Medeiros 2f, incluidas KPC, SME, NMC-A, IMI y algunas variantes de GES (39). Las variantes KPC-2 y KPC-3 tienen la mayor distribución de todas las serinas carbapenemasas (40), en E.U.A las carbapenemasas más frecuentemente encontradas en *P. aeruginosa* son KPC, NDM, VIM e IMP (41), en el estudio multicéntrico ERACE-PA, en el 2021 mostró que el 49% fueron VIM seguidas por GES con el 21%(42), posteriormente en el 2022, se encontró que el 86% fueron VIM seguidos por GES (43).

La información disponible en la literatura sobre las carbapenemasas tipo GES en *P. aeruginosa* es limitada. En un estudio realizado en México que incluyó 52 centros, se analizó la distribución de la resistencia antimicrobiana en diversas bacterias como *E. coli*, *K. pneumoniae*, complejo *Enterobacter cloacae*, complejo *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en muestras clínicas de orina, sangre y muestras respiratorias. Se observó que, en el caso de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, se identificaron 93 aislamientos(2). Los genes más frecuentemente detectados que codifican carbapenemasas fueron *bla_{IMP}* (25.3%),

bla_{GES} (13.1%) y *bla_{VIM}* (13.1%). Además, se encontraron 44 aislamientos (47.31%) que no contenían ninguno de los genes examinados que codifican carbapenemasas (2)

En un estudio realizado por INVIFAR durante la pandemia de la COVID-19 en México, se analizaron los datos de resistencia de microorganismos Gram negativos a carbapenémicos en 23 centros (21 laboratorios hospitalarios y 2 laboratorios externos) durante el periodo del 1 de enero al 31 de agosto de 2021. Se encontró que de los aislamientos de *P. aeruginosa* las carbapenemasas más frecuentes fueron *bla_{VIM}* (n=19), *bla_{GES}* (n=8) y *bla_{IMP}* (n=7)(23).

Carbapenemasas tipo GES

La GES-1 se identificó por primera vez en 1998, en un niño trasladado de la Guayana Francesa a Francia, posteriormente en el 2000 se identificó GES-2 a partir de *P. aeruginosa*, es un derivado mutante puntual de la β -lactamasa de espectro extendido GES-1. La GES-2 posee residuos de cisteína que forma puentes disulfuro creando puentes de unión a imipenem (IMP), eficacia catalítica contra IMP 100 veces mayor que GES-1, se han identificado en *K. pneumoniae* y *E. coli* (44)

Por otro lado, se ha observado que la variante GES-5 es la primera en presentar resistencia a carbapenémicos. Esta variante muestra pérdida de ciertas porinas que contribuyen a su resistencia, y también presenta un residuo de serina o asparagina que están asociados con la resistencia a los carbapenémicos (23). Sin embargo, no se dispone de información sobre su susceptibilidad.

Su fenotipo se ha asociado a resistencia C/T y sensibilidad a CZA (45), como una forma de poder identificar en caso de poca disponibilidad de biología molecular.

Hasta el momento, se dispone de poca información sobre la susceptibilidad de las carbapenemasas tipo GES en *P. aeruginosa*. Esto genera la necesidad de realizar estudios que brinden más conocimientos y ayuden a los médicos en la toma de decisiones respecto al uso de antibióticos cuando se enfrentan a estas cepas de *P. aeruginosa* de difícil tratamiento. Es especialmente relevante en el contexto de México, donde según los estudios realizados por INVIFAR, las carbapenemasas tipo GES se posicionan dentro de las tres primeras más frecuente en pacientes hospitalizados. Ampliar nuestro entendimiento de la susceptibilidad de estas enzimas y su implicación clínica permitirá mejorar las estrategias terapéuticas y optimizar el manejo de las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria de *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES para los antimicrobianos β -lactámicos con los nuevos inhibidores?

4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, ha habido un alarmante incremento en el número de infecciones hospitalarias que son causadas por bacterias resistentes a múltiples clases de antibióticos, lo cual dificulta su control y tratamiento. Entre estas bacterias, *Pseudomonas aeruginosa* que portan carbapenemasas tipo GES han generado una creciente preocupación en el ámbito de la salud. En el contexto de nuestro país, las carbapenemasas tipo GES se han

identificado como uno de los mecanismos de resistencia más frecuentes en las cepas de *Pseudomonas spp.*

Sin embargo, a pesar de la relevancia de estas enzimas en la resistencia bacteriana, existe una escasez de información en la literatura científica sobre la actividad de los antibióticos β -lactámicos y los nuevos inhibidores frente a estas carbapenemasas tipo GES. Es fundamental realizar análisis *in vitro* que nos permitan obtener información precisa sobre la susceptibilidad de estos agentes antimicrobianos. Esta información será crucial para guiar y mejorar la elección de terapias más efectivas, lo que a su vez tendrá un impacto positivo en el desenlace clínico de los pacientes afectados por estas infecciones. Por tanto, es necesario llevar a cabo estudios que aborden esta brecha de conocimiento y proporcionen datos valiosos para optimizar el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias portadoras de carbapenemasas tipo GES.

5. HIPÓTESIS

Los antimicrobianos cefepime, cefiderocol, piperacilina-tazobactam, ceftazidima-avibactam, cefepime-tanibobactam, ceftolozano-tazobactam, meropenem-vaborbactam, imipenem-relebactam tendrán CMI en rango de susceptibilidad para *Pseudomonas aeruginosa* productora de carbapenemasas tipo GES

6. OBJETIVOS

a. **Objetivo principal:** Describir la actividad, con base en la concentración mínima inhibitoria, de cefepime, cefiderocol, piperacilina-tazobactam, ceftazidima-avibactam, cefepime-tanibobactam, ceftolozano-tazobactam, meropenem-vaborbactam e imipenem-relebactam en *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES, resguardadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Rehabilitación.

b. **Objetivo secundario:**

- Identificar y clasificar las *Pseudomonas spp.* resistentes a carbapenémicos.
- Describir los resultados de las pruebas mMIC y eMIC en las *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES.
- Describir los resultados de la secuenciación de *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES
- Describir la proporción de otras carbapenemasas mediante PCR en *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES

7. DISEÑO Y METODOLOGÍA

a. **Tipo de estudio:** Experimental de ciencias básicas

b. **Descripción del universo de trabajo:** *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES no duplicadas que se encuentren en resguardo en el cepario del Laboratorio del INRLGII

c. Definición del grupo control:

- i. Se utilizarán cepas ATCC como estándar de calidad para las pruebas de susceptibilidad en caldo.
 - 1. *E. coli* ATCC 25922
 - 2. *E. coli* ATCC 35218
 - 3. *P. aeruginosa* ATCC 27853
 - 4. *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705
 - 5. *E. cloacae* ATCC BAA 2468

d. Criterios de Inclusión:

- i. Se incluirán todas las *Pseudomonas spp* resguardadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del INRLGII que sean productoras de carbapenemasas tipo GES y que reúnan las siguientes características:
- ii. Aislamiento de las siguientes muestras: Hemocultivos, aspirados endotraqueales, biopsias musculoesqueléticas, líquido cefalorraquídeo y orina.
- iii. La primera cepa aislada de muestras no duplicadas.

e. Criterios de eliminación.

- i. *Pseudomonas spp* que no tengan registro ya sea electrónico o físico sobre el lugar de aislamiento.
- ii. Cepas que no se recuperaron en la resiembra

f. Criterios de exclusión.

- i. *Pseudomonas spp* pan-susceptibles
- ii. *Pseudomonas spp* resistentes a carbapenémicos, que no tengan carbapenemasas tipo GES
- iii. Cepas de *Pseudomonas spp.* de aislamientos subsecuentes de un mismo paciente

g. **Tamaño de la muestra.** Serán incluidas todas las muestras clínicas de aislamientos por *Pseudomonas spp.* productoras de carbapenemasas tipo GES que se encuentran en el cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del INRLGII.

h. **Descripción de las variables de estudio, unidades de medida y escalas de medición. Tabla 4.**

Tabla 4

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo	Unidad de medida
Microorganismo	Bacterias de la familia <i>Pseudomonadaceae</i>	Nombre del género y especie de <i>Pseudomonas spp</i>	Nominal Independiente	Ejemplo: <i>P. aeruginosa</i> <i>P. putida</i> <i>P. fluorescens</i>
Tipo de muestra	Sitio anatómico y método de recolección del cultivo	Categorías estandarizadas de los sitios de muestra tal como sigue: -Hemocultivo -Aspirado endotraqueal -Biopsia musculoesquelética	Nominal Independiente	Ejemplo: -Hemocultivo -Biopsia -Aspirado Endotraqueal

		-Biopsia cuantitativa de herida por quemadura -Líquido cefalorraquídeo		
CIM de antibióticos	Unidad de medida en µg/ml que determina la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo o después de su incubación	Se calculará con el método de microdilución en caldo con las reglas y puntos de corte del CLSI 2023, de los siguientes antibióticos: <ul style="list-style-type: none"> FEP, CAZ, FDC TZP, CZA, FEP-TANI, C/T, IPM, MVB, I-R 	Cuantitativa discreta Dependiente	Diluciones en µg/ml preestablecidos de acuerdo al CLSI por cada antimicrobiano
Método de inactivación de carbapenémicos modificado (mMIC)	Ensayo fenotípico para la determinación de carbapenemasas mediante difusión de discos en placas	Se harán pruebas de mMIC en todas las cepas utilizando las recomendaciones descritas por el CLSI 2023	Nominal Independiente	-Negativo (2): Carbapenemasas no detectada -Positivo (1): Carbapenemasas detectada -Indeterminado (0): Ensayo sin resultado para la presencia de carbapenemasas
Método de inactivación de carbapenémicos modificado-EDTA (eMIC)	Ensayo fenotípico para la determinación de carbapenemasas tipo Metallo-β-lactamasas, mediante difusión de discos en placas. Se debe realizar en combinación con el mMIC.	Se harán pruebas de eMIC en aquellas cepas con mMIC+ utilizando las recomendaciones descritas por el CLSI 2023	Nominal Independiente	-0: mMIC negativo o indeterminado, no se realiza eMIC -Negativo (2): Metallo-β-lactamasas no detectada -Positivo (1): Metallo-β-lactamasas detectada

	Si el mMIC es negativo este ensayo no se realiza			
--	--	--	--	--

i. Descripción de los procedimientos

- i. Se revisaron las *Pseudomonas spp.* del cepario del Laboratorio de microbiología para identificar todas las *Pseudomonas spp.* resistentes a carbapenémicos.
- ii. Se realizó una base de datos en Excel con todas las *Pseudomonas spp.* resistentes a carbapenémicos.
- iii. Se seleccionaron y resembraron las *Pseudomonas spp.* resistentes a carbapenémicos de muestras no duplicadas.
- iv. Se les realizó pruebas fenotípicas (mMIC/eMIC) para identificar carbapenemasas en las cepas seleccionadas.
- v. Se clasificaron las cepas seleccionadas con base en los resultados del mMIC/eMIC, en: carbapenemasas tipo serino, carbapenemasas tipo metalo y no productoras de carbapenemasas.
- vi. De las *Pseudomonas spp.* tipo serino se buscó genes constitutivos para las enzimas tipo GES con el ensayo de reacción en cadena de polimerasa (PCR) el cuál consistió: en la amplificación de los genes que codifican para *bla_{GES}*, se realizó PCR por punto final. La reacción contenía 1.25 μ L de buffer 10X Omega Biotek (suplementado con 2 mM MgSO₄), 0.30 μ L de una mezcla de dNTP's [0.2mM] (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) invitrogen, 0.07 μ L de Taq DNA polimerasa Biotek, 10 pmol de cada oligonucleótido T4Oligo y 7.28 μ L de agua ultrapura libre

de DNAsas y RNAsas Sigma-Aldrich y 3 μ L de DNA para tener un volumen final de 12.50 μ L.

- vii. 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 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 15 segundos a 55°C Y 45 segundos a 68°C, por último, la tercera etapa, en 1 ciclo de 5 minutos 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% cargando con 4 μ L de SYBR Green y 10 μ L de la muestra, se dejó correr a 100 V durante una hora y se obtuvo: *bla*_{GES}: F: 5'-

TCATTCACGCHCTATTVCTGGCA-3' R: 5'-

CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3' Amplicón 810 pb

- viii. De las GES verificadas por PCR, se realizó pruebas de susceptibilidad en caldo para determinar los CIM a FEP, FDC, CAZ, TZP, CZA, C/T, MVB e I-R, de acuerdo a los puntos de corte del CLSI 2023 y EUCAST 2023.
- ix. Todas las cepas se desecharon de acuerdo a los lineamientos de desechos orgánicos y manejo de material biológico.

c. Análisis estadístico

La captura de datos se realizó en el programa Excel, para el análisis se utilizó el programa STATA versión 16. Los resultados del análisis descriptivo se reportaron en porcentajes y medias para las variables con distribución normal. Para las variables con distribución no

normal se reportaron en medianas y rangos intercuartiles, las variables nominales se reportaron en frecuencia absoluta.

Las muestras pareadas se les realizó la prueba de Wilcoxon, con la que se diferenció la CIM con y sin inhibidor. Para el análisis de subgrupos se realizó Kruskal-Wallis.

Se trato de encontrar diferencia al comparar un β -lactámico contra el β -lactámico con inhibidor y se realizó la Chi² de McNemar.

Se obtuvo aprobación por el comité de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra con número de registro INRLGII 88/23

8. RESULTADOS

El estudio se realizó con muestras de cultivos (hemocultivos, urocultivos, abscesos, biopsias, punta de catéter, entre otras) de *Pseudomonas spp.*, provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del INRLII, de enero del 2011 a marzo del 2023 como se describe en la **figura 3**, un total de 3,126 *Pseudomonas spp.* de las que se excluyeron 2, 421 por no cumplir con los criterios de inclusión, con las que se obtuvieron 705 *Pseudomonas spp* resistentes a carbapenémicos a las que se les realizó mMIC y eMIC, se obtuvieron las cepas con enzimas serino y se realizó PCR de punto final, con un total 78 *Pseudomonas spp.* de las que el 100% fueron *Pseudomonas aeruginosa* con carbapenemasas tipo GES, como se describe **gráfica 1**.

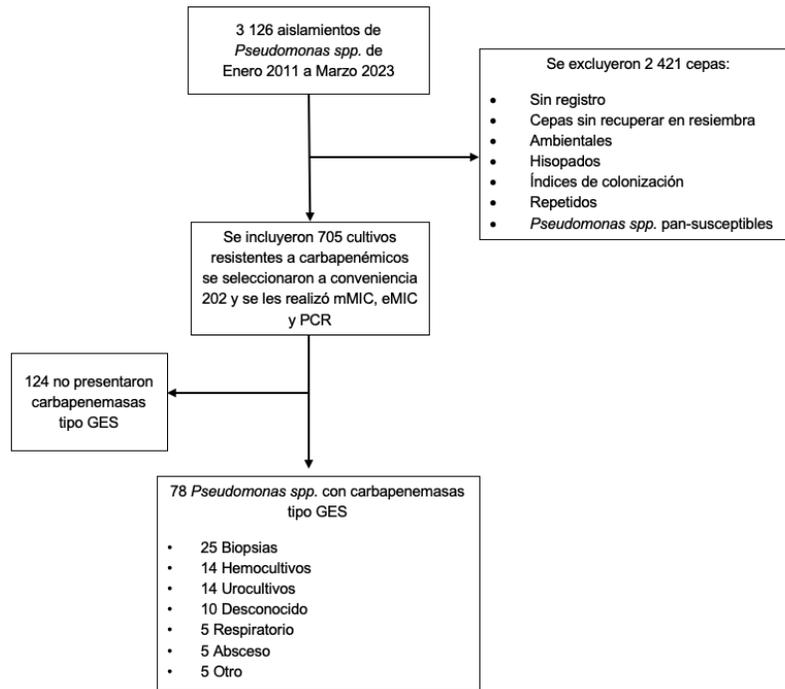
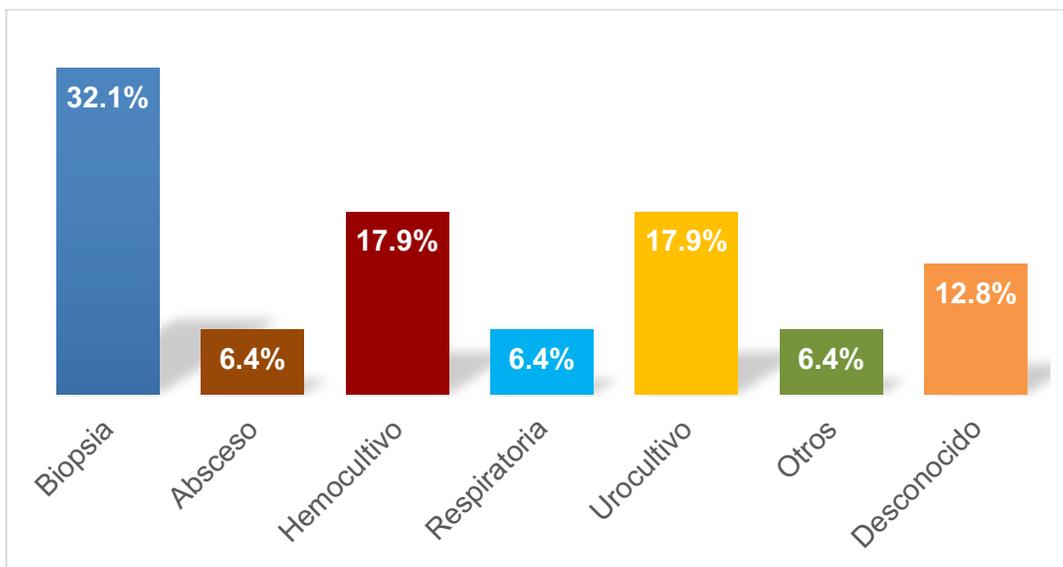


Figura 3. Algoritmo de selección de cepas de *Pseudomonas spp.* con carbapenemasas tipo GES.

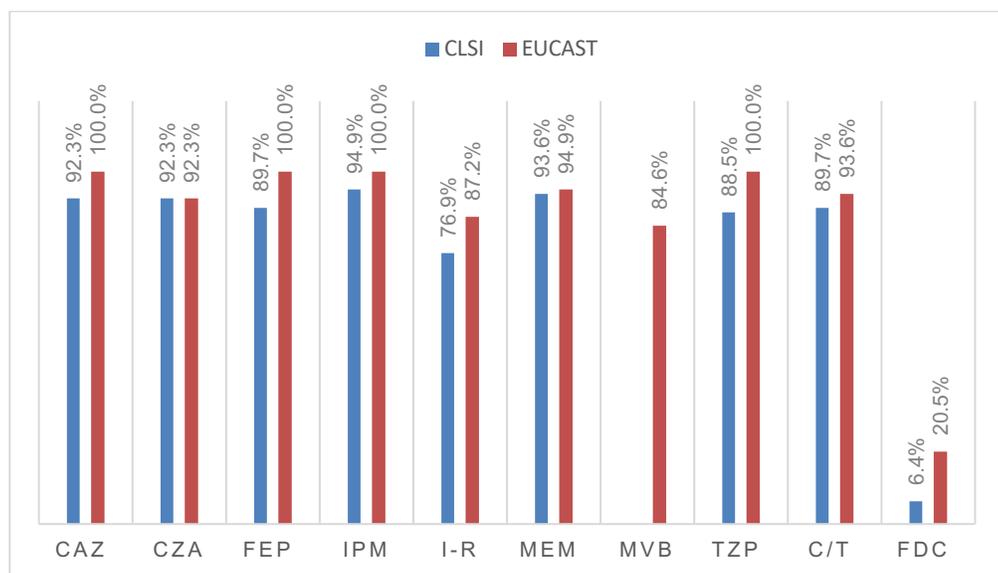


Gráfica 1. Distribución de aislamientos de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas tipo GES

A las 78 muestras, se les realizó susceptibilidad de cefepime, cefiderocol, piperacilina-tazobactam, ceftazidima-avibactam, cefepime-taniborbactam, ceftolozano-tazobactam, meropenem-vaborbactam, imipenem-relebactam, se determinaron las CMI de acuerdo a CLSI y EUCAST, con lo que se obtuvo ver **Tabla 5** y al comparar la susceptibilidad de acuerdo a ambas guías hay una diferencia que va del 3.8 al 14.1% ver **gráfica 2**

	n totales			Porcentajes		
	S	I	R	S	I	R
CAZ CLSI	4	2	72	5.1%	2.6%	92.3%
CAZ EUCAST	0	0	78	0.0%	0.0%	100.0%
CZA CLSI	6	0	72	7.7%	0.0%	92.3%
CZA EUCAST	6	0	72	7.7%	0.0%	92.3%
FEP CLSI	5	3	70	6.4%	3.8%	89.7%
FEP EUCAST	0	0	78	0.0%	0.0%	100.0%
IPM CLSI	2	2	74	2.6%	2.6%	94.9%
IPM EUCAST	0	0	78	0.0%	0.0%	100.0%
I-R CLSI	10	8	60	12.8%	10.3%	76.9%
I-R EUCAST	10	0	68	12.8%	0.0%	87.2%
MEM CLSI	3	2	73	3.8%	2.6%	93.6%
MEM EUCAST	3	0	74	3.8%	0.0%	94.9%
MVB EUCAST	12	0	66	15.4%	0.0%	84.6%
TZP CLSI	4	5	69	5.1%	6.4%	88.5%
TZP EUCAST	0	0	78	0.0%	0.0%	100.0%
C/T CLSI	5	3	70	6.4%	3.8%	89.7%
C/T EUCAST	5	0	73	6.4%	0.0%	93.6%
FDC CLSI	70	3	5	89.7%	3.8%	6.4%
FDC EUCAST	62	0	16	79.5%	0.0%	20.5%

Tabla 5. Cantidades y porcentajes de susceptibilidad de antibióticos de acuerdo a CLSI y EUCAST



Gráfica 2 Comparación resistencias de acuerdo a los puntos de corte CLSI vs EUCAST

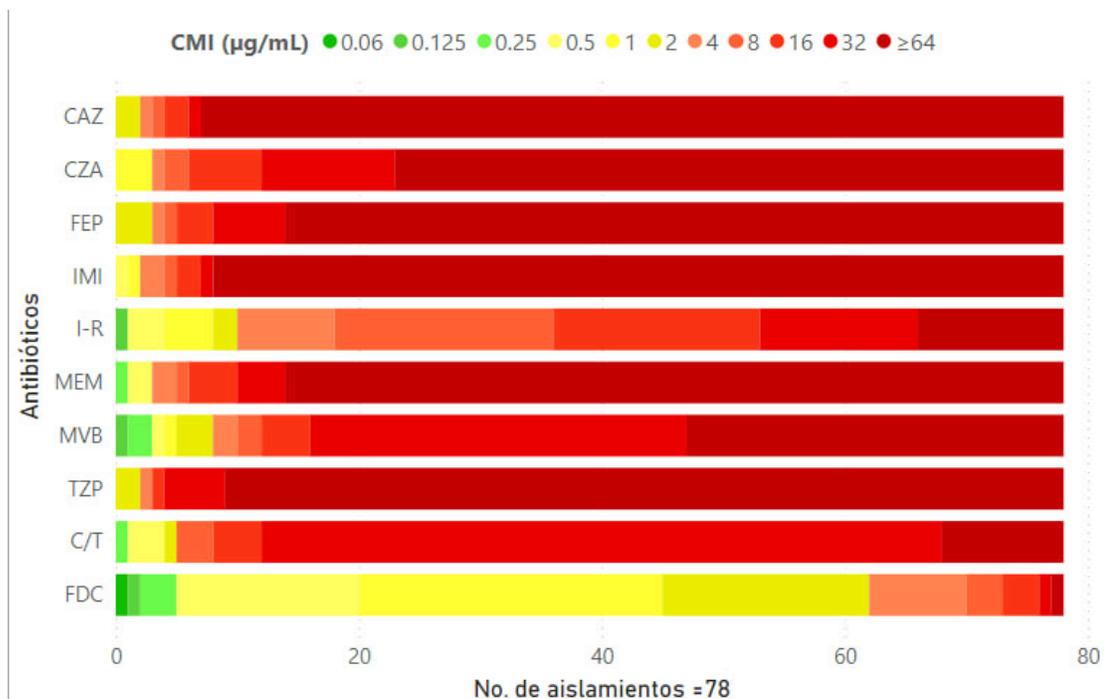
De los 78 aislamientos, FDC fue el agente más activo con 89.74% CMI < 4µg/mL, de acuerdo a CLSI y 79.5% de acuerdo a EUCAST; seguido de FTB con 80.77 % CMI <

8µg/mL con el punto de corte provisional (30), por último, I-R con el 12.8% por CLSI y EUCAST, el único antibiótico que CMI₅₀ y CIM₉₀ se encuentra dentro de los puntos de corte para susceptible es FDC 1 CMI₅₀ y 4 CIM₉₀ ver Tabla 5 y 6.

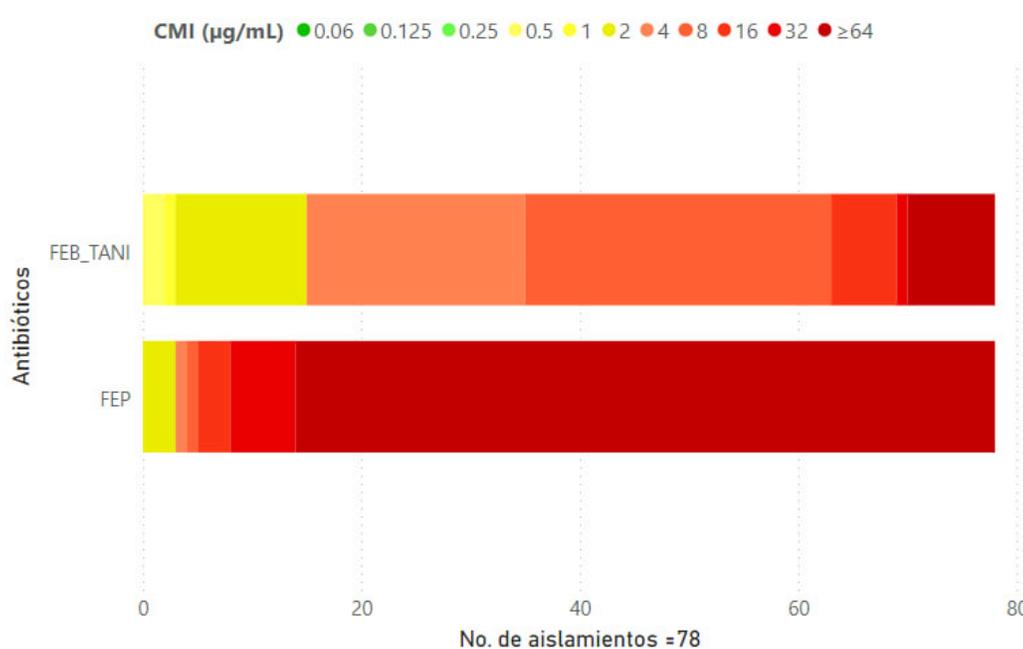
Antibiótico	CMI 50	CMI 90	Nº de asiamientos por CMI										
			0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
CAZ	64	64	0	0	0	0	0	2	1	1	2	1	71
CZA	64	64	0	0	0	0	3	0	1	2	6	11	55
FEP	64	64	0	0	0	0	0	3	1	1	3	6	64
FTB	8	16	0	0	0	2	1	12	20	28	6	1	8
IPM	64	64	0	0	0	1	1	0	2	1	2	1	70
I-R	16	64	0	1	0	3	4	2	8	18	17	13	12
MEM	64	64	0	0	1	2	0	0	2	1	4	4	64
MVB	32	64	0	1	2	1	1	3	2	2	4	31	31
TZP	128	128	0	0	0	0	0	2	1	0	1	5	69
C/T	32	64	0	0	1	3	0	1	0	3	4	56	10
FDC	1	4	1	1	3	15	25	17	8	3	3	1	1

Tabla 6 Rangos de CMI, CMI50 Y CMI90 de antibioticos

P. aeruginosa productora de carbapenemasas tipo GES presenta una resistencia importante a los β- lactámicos y los β-lactámicos con inhibidores, ver **gráfica 3** y **gráfica 4**.



Gráfica 3 Gráfica de calor que muestra la actividad de antibióticos en aislamientos de *P. aeruginosa* con carbapenemasas tipos GES



Grafica 4 Gráfica de calor que muestra la actividad de antibióticos en aislamientos de *P. aeruginosa* con carbapenemasas tipo GES con cefepime-taniborbactam (FTB) y cefepime (FEP)

Al realizar la prueba de Wilcoxon de la CMI con y sin inhibidor podemos observar que existe significancia estadística [$p < 0.001$] entre el β -lactámico contra el β -lactámico con inhibidor, es decir que hay una disminución de aproximadamente 2 diluciones al aplicar el betalactámico con inhibidor en las *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas tipo GES, ver **Tabla 7**.

Antibiótico	CMI	CMI con inhibidor	<i>p</i>
CAZ	64 (64-64)	64 (32-64)	<0.001
FEP	64 (64-64)	64 (32-64)	<0.001
IPM	64 (64-64)	16 (8-32)	<0.001
MEM	64 (64-64)	2 (2-2)	<0.001

Tabla 7. CMI con y sin inhibidor prueba de Wilcoxon

Al realizar la prueba de Chi² de McNemar comparando la proporción de cepas que son susceptibles β-lactámico vs β-lactámico con inhibidor, de las 78 muestras se demostró que existe significancia estadística en IPM vs I-R tanto en CLSI como EUCAST, con lo que aumentaron de tener 2 cepas susceptibles al IPM a 10 cepas susceptibles con I-R, $P= 0.007$ y MEM vs MVB con EUCAST de 3 cepas susceptibles con MEM a 12 cepas susceptibles con MVB, $P= 0.003$, ver **Tabla 8**.

CEPAS SUSCEPTIBLES				
ANTIBIÓTICO	CLSI	P	EUCAST	P
CAZ	3	0.5	4	0.25
CZA	6		6	
IPM	2	0.007	2	0.007
I-R	10		10	
MEM	-	-	3	0.003
MVB	-		12	

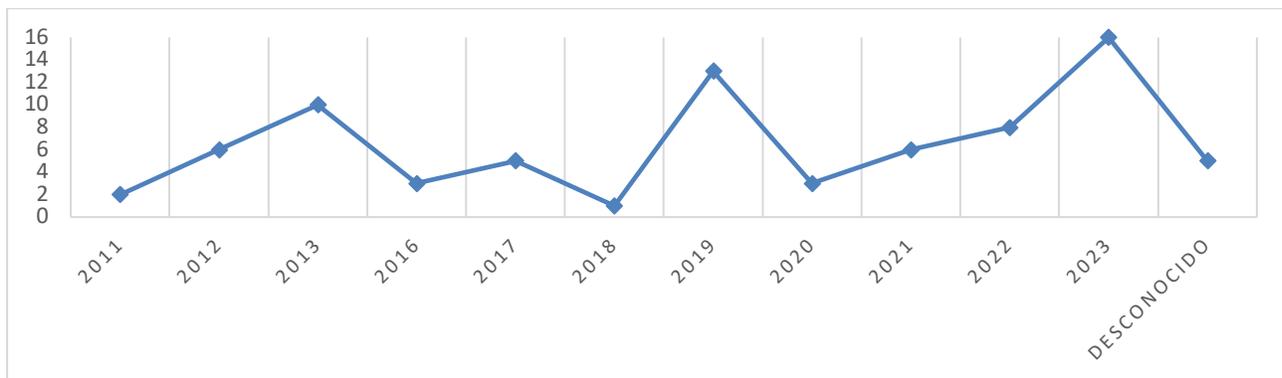
Tabla 8. Prueba de Chi² de McNemar CLSI vs EUCAST

Respecto a FEP y FTB al hacer comparar la proporción de cepas susceptibles β-lactámico (CLSI vs EUCAST) vs β-lactámico con inhibidor, tenemos una significancia estadística de $P= < 0.001$ ver **Tabla 9**

CEPAS SUSCEPTIBLES				
ANTIBIÓTICO	CLSI	P	EUCAST	P
FEP	5	0.001	4	0.001
FTB (provisional)	63		63	

Tabla 9. Prueba de Chi² de McNemar CLSI vs EUCAST, con FTB provisional

P. aeruginosa con carbapenemasas tipo GES es susceptible a FDC en más de un 80%. Comparando las 78 muestras de *P. aeruginosa* con carbapenemasas tipo GES por año, se observa un incremento en su detección a partir del 2019, probablemente sea secundario a la pandemia por SARS-CoV-2, como se describe en la **gráfica 5**.



Grafica 5. Detección anual de las 78 muestras *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas tipo GES.

Las muestras que fueron más representativas, por tener mayor número de aislamientos fueron 3: Biopsias 25, Hemocultivos 14 y urocultivos 14, en el análisis entre los subgrupos, Kruskal-Wallis, no detectó diferencia entre las muestras.

Para descartar la presencia de otras carbapenemasas se realizó PCR y se obtuvo: 6 (7.69%) GES+VIM; 4 (5.12%) GES+ IMP; no se encontró presencia de KPC, NDM, OXA-48

9. DISCUSIÓN

La resistencia a carbapenémicos es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, ha reducido las opciones terapéuticas disponibles para combatir las infecciones de difícil tratamiento, la eficacia de los β -lactámicos y la combinación de β -lactámicos con inhibidores como CZA, C/T, I-R, MVB, FTB, para tratar las infecciones causadas por microorganismos resistentes a carbapenémicos, como lo es *P. aeruginosa*, disminuye cada vez más (46–48).

Este trabajo buscó encontrar la susceptibilidad de *P. aeruginosa* con carbapenemasas tipo GES a los nuevos fármacos; se encontró que FDC es el β -lactámico con mejor susceptibilidad 89.7% de acuerdo a los puntos de corte por CLSI y 79.5% al EUCAST, seguido por el nuevo FTB un nuevo β -lactámico con inhibidor que recientemente se aprobó por la FDA para su uso, de acuerdo al punto de corte provisional, presentó la mejor susceptibilidad de los β -lactámicos con inhibidor disponibles, 80.77%.

El taniborbactam es el primer inhibidor de β -lactamasas con actividad contra enzimas metalo- β -lactamasas, NDM y VIM(49), los estudios *in vitro* han demostrado buena actividad contra las serino- β -lactamasas, comparado con otras combinaciones de β -lactámicos, los resultados publicados por Hernández-García et al, la susceptibilidad *in vitro* con FTB contra las *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas tipo GES fue de 93.8% de susceptibilidad un MIC \leq 8 mg/dL, concordantemente con nuestros resultados del 80.77%.

En otro estudio *in vitro*, taniborbactam redujo la CMI de FEP de 5 a 2 diluciones <16 mg/dL en 86% de *P. aeruginosa* productoras de MBL(50), en nuestro estudio disminuyó la CMI de 4 a 2 diluciones con una CMI₅₀ 64 y CMI₉₀ 64 para FEP y CIM₅₀ 8 y CMI₉₀ 16 para FTB, con lo que demuestra que tiene buena actividad contra *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas tipo GES.

Se ha comprobado la poca susceptibilidad de C/T que tiene *P. aeruginosa* con carbapenemasas de la clase A (51)(52), lo que también se demuestra en este estudio, al presentar una resistencia de 90%.

El uso de aztreonam en GES(53), ha demostrado resistencia en combinación con CZA, por lo que no sería una opción terapéutica en las infecciones.

Hasta el momento no hay mucha información sobre la susceptibilidad de *P. aeruginosa* con carbapenemasas tipo GES, en la actualidad las enzimas tipo GES se encuentran dentro de las tres carbapenemasas aisladas con mayor frecuencia (22,30).

Usar los β -lactámicos y la combinación de β -lactámicos con inhibidores en carbapenemasas tipo GES de manera empírica fue una herramienta necesaria para poder conocer la susceptibilidad de las *P. aeruginosa* con carbapenemasas tipo GES ya que aún no existen estudios que demuestren la mejor opción de tratamiento disponible.

Una probable respuesta a la poca susceptibilidad de los β -lactámicos y la combinación de β -lactámicos con inhibidores, en *P. aeruginosa* con carbapenemasas tipo GES, es que las *P. aeruginosa* pudo presentar algún otro tipo mecanismo de resistencia como bombas de eflujo o porinas.

La resistencia del 100% en hemocultivos que presentó *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas tipo GES, probablemente fue secundaria a la exposición previa de antibióticos, es decir, en muestras de biopsias o urocultivos, se trataban de infecciones localizadas, al estar en torrente sanguíneo y ser una infección diseminada, probablemente estuvo expuesta a antibiótico previo.

Un punto fuerte, es que el presente estudio es el primero que demuestra la susceptibilidad de las carbapenemasas tipo GES, a los β -lactámicos y la combinación de β -lactámicos con inhibidores, demostrando que FTB y FDC son una opción terapéutica para esta resistencia.

Las limitaciones, es un estudio *in vitro*, la respuesta clínica puede superar a la respuesta microbiológica, además de no contar con estos antibióticos en el mercado, FTB, y en nuestro país FDC. Se incluyeron cepas de un solo centro hospitalario, lo que no puede representar la actividad de otros sitios. La información incluida es de cepas de sitios específicos, por lo que no descartaríamos el movimiento de algunos porcentajes.

10. CONCLUSIONES

La resistencia a los antimicrobianos es una crisis que debe gestionarse con la máxima urgencia. A medida que el mundo entra en la nueva y ambiciosa era del desarrollo sostenible, no podemos permitir que los logros en materia de salud obtenidos con tanto esfuerzo se vean erosionados por el fracaso de nuestros principales medicamentos.

Es necesario que se realicen estudios en México y el mundo para determinar la susceptibilidad para estas *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas tipo GES, que al parecer es de difícil tratamiento.

Actualmente debemos continuar con el fomento al uso adecuado de antibióticos, para evitar aumento de resistencia a diferentes tipos de antibióticos, parece que las bacterias adquieren más resistencias conforme pasa el tiempo y nosotros no tenemos nuevas

opciones terapéuticas, es importante que se invierta más en la investigación de nuevos antibióticos y en su distribución en el mundo.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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 3 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
2. 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.
3. Lee YL, Ko WC, Hsueh PR. In vitro activities of ceftazidime–avibactam, ceftolozane–tazobactam, meropenem–vaborbactam and other comparators against *Pseudomonas aeruginosa* isolates with discrepant resistance to carbapenems: Data from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) program, 2012–2021. *Int J Antimicrob Agents*. agosto de 2023;62(2):106867.
4. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic Resistance Threats in the United States [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2013. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
5. Jim O’Neill. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: Review on Antimicrobial Resistance. 2014.
6. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citado el 5 de agosto de 2023]. 28 p. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736>
7. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021 [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336>
8. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022 [Internet]. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240062702>
9. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. enero de 2019;19(1):56–66.
10. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet Lond Engl*. el 12 de febrero de 2022;399(10325):629–55.
11. GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Lond Engl*. el 17 de diciembre de 2022;400(10369):2221–48.
12. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. enero de 2009;48(1):1–12.
13. Mills JP, Marchaim D. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Infection Prevention and Control Update. *Infect Dis Clin North Am*. diciembre de 2021;35(4):969–94.
14. Bogan C, Marchaim D. The role of antimicrobial stewardship in curbing carbapenem resistance. *Future Microbiol*. agosto de 2013;8(8):979–91.
15. Tal Jasper R, Coyle JR, Katz DE, Marchaim D. The complex epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Future Microbiol*. 2015;10(5):819–39.
16. World Health Organization. 2021 ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL AND

- PRECLINICAL DEVELOPMENT- an overview and analysis.pdf [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655>
17. Doron S, Davidson LE. Antimicrobial stewardship. *Mayo Clin Proc.* noviembre de 2011;86(11):1113–23.
 18. Carrara E, Sibani M, Barbato L, Mazzaferri F, Salerno ND, Conti M, et al. How to ‘SAVE’ antibiotics: effectiveness and sustainability of a new model of antibiotic stewardship intervention in the internal medicine area. *Int J Antimicrob Agents.* noviembre de 2022;60(5–6):106672.
 19. Horcajada JP, Grau S, Paño-Pardo JR, López A, Oliver A, Cisneros JM, et al. Antimicrobial stewardship in Spain: Programs for Optimizing the use of Antibiotics (PROA) in Spanish hospitals. *Germs.* el 3 de septiembre de 2018;8(3):109–12.
 20. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). 2021 Update Antibiotic Use in the United States Process and Opportunities [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/pdfs/stewardship-report-2021-H.pdf>
 21. Arredondo-García JL, Soriano-Becerril D, Solórzano-Santos F, Arbo-Sosa A, Coria-Jiménez R, Arzate-Barbosa P. Resistance of uropathogenic bacteria to first-line antibiotics in Mexico City: A multicenter susceptibility analysis. *Curr Ther Res.* marzo de 2007;68(2):120–6.
 22. 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.
 23. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Sánchez-Pérez A, et al. Carbapenemase-Encoding Genes and Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria During the COVID-19 Pandemic in Mexico: Results from the Invifar Network. *Microb Drug Resist.* el 1 de junio de 2023;29(6):239–48.
 24. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022 [Internet]. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases; 2022 jun [citado el 9 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/117915>
 25. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev.* julio de 2011;35(4):652–80.
 26. 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.
 27. Kunz Coyne AJ, El Ghali A, Holger D, Rebold N, Rybak MJ. Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Dis Ther.* abril de 2022;11(2):661–82.
 28. EM100 Connect - CLSI M100 ED33:2023 [Internet]. [citado el 10 de agosto de 2023]. Disponible en: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED33:2023&sbssok=CLSI%20M100%20ED33:2023%20TABLE%202B-1>
 29. EUCAST Breakpoint Tables. 12.
 30. Hernández-García M, García-Castillo M, Ruiz-Garbajosa P, Bou G, Siller-Ruiz M, Pitart C, et al. In Vitro Activity of Cefepime-Taniborbactam against Carbapenemase-Producing Enterobacteriales and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* el 15 de marzo de 2022;66(3):e0216121.
 31. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* enero de

- 2019;37(1):177–92.
32. Samanta S, Bodrenko I, Acosta-Gutiérrez S, D’Agostino T, Pathania M, Ghai I, et al. Getting Drugs through Small Pores: Exploiting the Porins Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis*. el 12 de octubre de 2018;4(10):1519–28.
 33. Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CDN, Tuon FF, Faoro H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. el 13 de diciembre de 2022;23(24):15779.
 34. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. octubre de 2018;62(10):e01076-18.
 35. Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol*. mayo de 2019;17(5):295–306.
 36. Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*. mayo de 1977;11(5):852–7.
 37. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. el 16 de mayo de 1980;289(1036):321–31.
 38. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. junio de 1995;39(6):1211–33.
 39. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. marzo de 2010;54(3):969–76.
 40. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. el 18 de marzo de 2020;33(2):e00047-19.
 41. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* - an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect*. diciembre de 2022;11(1):811–4.
 42. Gill CM, Aktap E, Alfouzan W, Bourassa L, Brink A, Burnham CAD, et al. The ERACE-PA Global Surveillance Program: Ceftolozane/tazobactam and Ceftazidime/avibactam in vitro Activity against a Global Collection of Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. diciembre de 2021;40(12):2533–41.
 43. Gill CM, Aktap E, Alfouzan W, Bourassa L, Brink A, Burnham CAD, et al. Multicenter, Prospective Validation of a Phenotypic Algorithm to Guide Carbapenemase Testing in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Using the ERACE-PA Global Surveillance Program. *Open Forum Infect Dis*. febrero de 2022;9(2):ofab617.
 44. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. marzo de 2002;49(3):561–5.
 45. Gill CM, Nicolau DP, ERACE-PA Global Study Group. Phenotypic and genotypic profile of ceftolozane/tazobactam-non-susceptible, carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. el 23 de diciembre de 2022;78(1):252–6.
 46. Losito AR, Raffaelli F, Del Giacomo P, Tumbarello M. New Drugs for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with Limited Treatment Options: A Narrative Review. *Antibiot Basel Switz*. el 26 de abril de 2022;11(5):579.
 47. Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Microbiol Rev*. el 11 de noviembre de 2020;34(1):10.1128/cmr.00115-20.
 48. Vázquez-Ucha JC, Arca-Suárez J, Bou G, Beceiro A. New Carbapenemase Inhibitors: Clearing the Way for the β -Lactams. *Int J Mol Sci*. enero de 2020;21(23):9308.
 49. Liu B, Trout REL, Chu GH, McGarry D, Jackson RW, Hamrick JC, et al. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- and Metallo- β -lactamase

- Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J Med Chem.* el 26 de marzo de 2020;63(6):2789–801.
50. Meletiadis J, Paranos P, Georgiou PC, Vourli S, Antonopoulou S, Michelaki A, et al. In vitro comparative activity of the new beta-lactamase inhibitor taniborbactam with cefepime or meropenem against *Klebsiella pneumoniae* and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* noviembre de 2021;58(5):106440.
 51. Teo JQM, Lim JC, Tang CY, Lee SJY, Tan SH, Sim JHC, et al. Ceftolozane/Tazobactam Resistance and Mechanisms in Carbapenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. Bradford PA, editor. *mSphere.* el 24 de febrero de 2021;6(1):e01026-20.
 52. Fournier D, Carrière R, Bour M, Grisot E, Triponney P, Muller C, et al. Mechanisms of Resistance to Ceftolozane/Tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa*: Results of the GERPA Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother.* el 20 de enero de 2021;65(2):e01117-20.
 53. Khan A, Erickson SG, Pettaway C, Arias CA, Miller WR, Bhatti MM. Evaluation of Susceptibility Testing Methods for Aztreonam and Ceftazidime-Avibactam Combination Therapy on Extensively Drug-Resistant Gram-Negative Organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* el 18 de octubre de 2021;65(11):e00846-21.