

CENTENARIO HOSPITAL MIGUEL HIDALGO  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Diagnóstico molecular de resistencia antimicrobiana,  
epidemiología y desenlaces clínicos de infecciones causadas  
por Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenémicos y  
carbapenemasas asociadas en el Centenario Hospital Miguel  
Hidalgo”**

TESIS PRESENTADA POR  
**Ana Sarahi Tapia Cornejo**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**Especialista en Medicina Interna**

ASESORES

**Dr. Mario González Gámez**

**Dr. José Manuel Arreola Guerra**

**Dra. en C. B. Flor Yazmín Ramírez Castillo**

**Aguascalientes, Ags. A 20 de enero de 2024**



CARTA DE APROBACIÓN

*[Handwritten signature of Dr. Felipe de Jesús Flores Parkman Sevilla]*

DR. FELIPE DE JESÚS FLORES PARKMAN SEVILLA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

*[Handwritten signature of Dr. Jesuha André Munetón Arellano]*

DR. JESUHA ANDRÉ MUNETÓN ARELLANO

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

*[Handwritten signature of Dra. Karla Guadalupe Bazán Ibáñez]*

DRA. KARLA GUADALUPE BAZÁN IBÁÑEZ

PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE POSGRADO DE MEDICINA INTERNA

*[Handwritten signature of Dr. Mario González Gámez]*

DR. MARIO GONZÁLEZ GÁMEZ

TUTOR DE TESIS

*[Handwritten signature of Dr. José Manuel Arreola Guerra]*

DR. JOSÉ MANUEL ARREOLA GUERRA

ASESOR METODOLÓGICO DE TESIS

*[Handwritten signature of Dra. En C. B. Flor Yazmín Ramírez Castillo]*

DRA. EN C. B. FLOR YAZMÍN RAMÍREZ CASTILLO

ASESORA DE TESIS



449 9 94 67 20

[www.issea.gob.mx](http://www.issea.gob.mx)

Av. Manuel Gómez Morín S/N  
Fracc. Alameda, C.P. 20259



CAPÍTULO VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

DR. SERGIO RAMÍREZ GONZÁLEZ  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**PRESENTE**

Por medio del presente como *ASESOR* designado del estudiante **ANA SARAHI TAPIA CORNEJO** con ID 116693 quien realizó la tesis titulada: *DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA, EPIDEMIOLOGÍA Y DESENLACES CLÍNICOS DE INFECCIONES CAUSADAS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS Y CARBAPENEMASAS ASOCIADAS EN EL CENTENARIO HOSPITAL MIGUEL HIDALGO*, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *ella* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**



Dr. Mario González Gámez  
Asesor de tesis

**"Se Lumen Proferre"**  
Aguascalientes, Ags., a 23 de *noviembre* de 2023.

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 17/05/19

**CARTA DE VOTO APROBATORIO  
COMITÉ TUTORAL**

**DR. SERGIO RAMÍREZ GONZÁLEZ**  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTE

Por medio del presente como Miembros del Comité Tutorial designado del estudiante ANA SARAHI TAPIA CORNEJO con ID 116693 quien realizó la tesis titulada: **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA, EPIDEMIOLOGÍA Y DESENLACES CLÍNICOS DE INFECCIONES CAUSADAS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS Y CARBAPENEMASAS ASOCIADAS EN EL CENTENARIO HOSPITAL MIGUEL HIDALGO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *ella* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

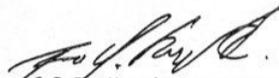
**ATENTAMENTE**



Dr. Mario González Gámez  
Asesor de tesis



Dr. José Manuel Arreola Guerra  
Asesor de tesis



Dra. en C. B. Flor Yazmín Ramírez Castillo  
Asesora de tesis

**"Se Lumen Proferre"**  
Aguascalientes, Ags., a 01 de febrero de 2024.

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 17/05/19



**Aguascalientes**  
Gente de trabajo y soluciones  
El gigante de México  
GOBIERNO DEL ESTADO 2013-2017



Fecha: 15 de diciembre de 2023.

DR. FELIPE DE JESÚS FLORES PARKMAN SEVILLA  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN  
CENTENARIO HOSPITAL MIGUEL HIDALGO

PRESENTE

Estimado Dr. Flores Parkman:

En respuesta a la petición hecha a la médico residente Ana Sarahi Tapia Cornejo relacionada a presentar una carta de aceptación de su trabajo de tesis titulado:

**"DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA, EPIDEMIOLOGÍA Y DESENLACES CLÍNICOS DE INFECCIONES CAUSADAS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS Y CARBAPENEMASAS ASOCIADAS EN EL CENTENARIO HOSPITAL MIGUEL HIDALGO"**

Me permito informarle que, una vez leído y corregido el documento, considero que cumple los requisitos para ser aceptado e impreso como trabajo final.

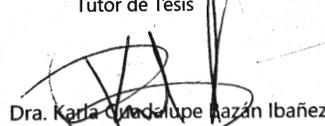
Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para hacerle llegar un cordial saludo.

  
Dr. Mario González Gámez

Tutor de Tesis

  
Dr. José Manuel Arreola Guerra

Asesor Metodológico de Tesis

  
Dra. Karla Guadalupe Azán Ibañez  
Profesora titular del curso de posgrado de Medicina  
Interna

  
Dra. en C. B. Flor Yazmín Ramírez Castillo  
Asesora de tesis

C.C.P. Coordinación de la Investigación CHMH.



Secretaría de Investigación y postgrado del centro de Ciencias de la Salud, BUA

449 9 94 67 20

www.issea.gob.mx

Av. Manuel Gómez Morín S/N  
Fracc. Alameda, C.P. 20259



## COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

CEI-CI/009/23  
Aguascalientes, Ags., a 16 de Enero de 2023

**DRA. ANA SARAHÍ TAPIA CORNEJO**  
INVESTIGADORA PRINCIPAL

En cumplimiento con las Buenas Prácticas Clínicas y la Legislación Mexicana vigente en materia de investigación clínica, el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Investigación del Centenario Hospital Miguel Hidalgo, en su Sesión del día 15 de Diciembre de 2022, sometió a revisión el protocolo con número de registro **2023-R-04** y decidió Aprobar el proyecto de investigación para llevar a cabo en este Hospital, titulado:

**"DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN PATÓGENOS CAUSANTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS"**

Sin otro particular, le recuerdo que deberá presentar a éste Comité los informes semestrales sobre el avance del estudio. En caso de existir modificaciones al proyecto es necesario que sean reportadas al Comité, asimismo solicitar la reaprobación anual si así lo requiere el protocolo arriba mencionado.

ATENTAMENTE

**DR. JAIME-ASAEL LOPEZ VALDEZ**  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN  
SECRETARIO TÉCNICO DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



JMAG/JALV/cmva\*



449 9 94 67 20

www.iseagob.mx

Av Manuel Gómez Morin S/N  
Fracc. Alameda, C.P. 20259



## Evidencia de envío y recepción a publicación de artículo derivado de la tesis

**Recordatorio/Reminder - Por favor, confirme su contribución en "Epidemiology of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: a retrospective study Epidemiología de Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter baumannii resistente..."**

---

De: EIMC [em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)

Para: Ana Sarahí Tapia Cornejo [srhitap.cor@hotmail.com](mailto:srhitap.cor@hotmail.com)

Fecha: lun, 27 de nov de 2023, 3:29 p.m.

---

\*PLEASE, SCROLL DOWN FOR THE ENGLISH VERSION OF THIS LETTER\*

\*Este es un mensaje automático - This is an automated message\*

Revista: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Título: Epidemiology of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: a retrospective study

Epidemiología de Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter baumannii resistentes a carbapenémicos: estudio retrospectivo

Autor para la correspondencia: Dr Alma Lilian Guerrero-Barrera

Coautores: Ana Sarahí Tapia Cornejo, Médico General; Flor Yazmín Ramírez Castillo, Dr; Jose Manuel Arreola Guerra, Dr; Mario González Gámez, Médico Internista; Francisco Javier Avelar Gonzalez, Dr; Abraham Loera Muro, Dr; Carmen Ramos Medellín, Químico Farmacobiólogo; César Adame Álvarez, Químico Farmacobiólogo; Ricardo García Romo, Licenciado en Análisis Químico Biológico

Número de manuscrito:

Estimada/o Ana Sarahí Tapia Cornejo:

El autor para la correspondencia Dr Alma Lilian Guerrero-Barrera le ha incluido a Ud. como coautor del siguiente manuscrito enviado a través del sistema de envío de manuscritos de Elsevier para Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Título del manuscrito enviado: Epidemiology of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: a retrospective study

Epidemiología de Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter baumannii resistentes a carbapenémicos: estudio retrospectivo

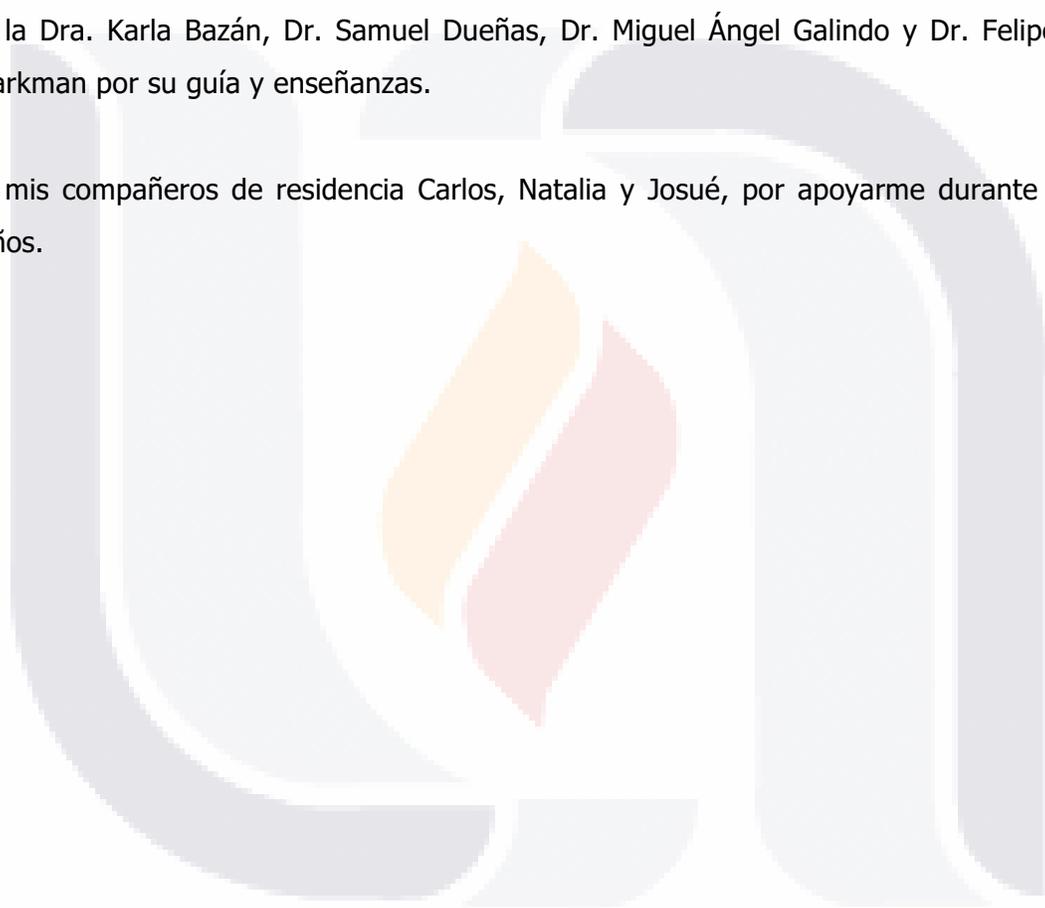
**AGRADECIMIENTOS**

Al Centenario Hospital Miguel Hidalgo por proveerme de un lugar para formarme como médico especialista.

A mis asesores del proyecto, la Dra. Flor Ramírez, Dr. Mario González Gámez y Dr. José Manuel Arreola por permitirme ser parte de este proyecto.

A la Dra. Karla Bazán, Dr. Samuel Dueñas, Dr. Miguel Ángel Galindo y Dr. Felipe Flores Parkman por su guía y enseñanzas.

A mis compañeros de residencia Carlos, Natalia y Josué, por apoyarme durante estos 4 años.



## **DEDICATORIA**

A mi familia, ya que sin ellos no estaría en donde estoy. Gracias por ayudarme a cumplir mi sueño y a nunca dejarme caer.

A mis padres por el apoyo incondicional durante este largo camino. A mi padre, Eduardo Tapia, quien fue mi inspiración para iniciar en el camino de la medicina y quien siempre me ha mostrado lo que significa el amor por esta carrera e impulsado a dar lo mejor de mí. A mi madre, Ana Cornejo, por ser siempre mi guía, por inspirarme a ser mejor mujer y ser ejemplo de sacrificio, amor y entrega en todo lo que hace.

A mis hermanas Ana Karen y Fernanda por ser mi compañía, mis cómplices y mejores amigas.

A mi tía Paty por siempre consentirme.

A mis compañeros de residencia por su dedicación y ayuda. A mis maestros, ya que gracias a ustedes he aprendido día con día el arte de ser médico.

## ÍNDICE GENERAL

1. Índice de tablas	<b>3</b>
2. Índice de gráficas y figuras	<b>4</b>
3. Acrónimos	<b>5</b>
4. Resumen	<b>6</b>
5. Abstract	<b>7</b>
6. Introducción	<b>8</b>
7. Marco teórico	<b>10</b>
a. Mecanismos de resistencia antimicrobiana	<b>10</b>
b. Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos	<b>11</b>
c. Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos en <i>P. aeruginosa</i>	<b>13</b>
d. Métodos de detección de microorganismos resistentes a carpanenémicos, metilina y vancomicina	<b>15</b>
8. Planteamiento del problema	<b>17</b>
9. Justificación	<b>17</b>
10. Pregunta de investigación	<b>19</b>
11. Objetivos	<b>19</b>
a. Objetivo primario	<b>19</b>
b. Objetivos secundarios	<b>19</b>
12. Hipótesis	<b>20</b>
13. Metodología	<b>20</b>
a. Tipo de estudio	<b>20</b>
b. Operacionalización de las variables	<b>20</b>
c. Cálculo del tamaño muestral	<b>20</b>
d. Diseño de oligonucleótidos para la detección de genes de resistencia	<b>20</b>
e. PCR punto final individual y multiplex	<b>21</b>
f. Asociación con desenlaces clínicos	<b>21</b>

14. Análisis estadístico	<b>22</b>
15. Factibilidad	<b>23</b>
16. Recursos	<b>23</b>
17. Aspectos éticos	<b>24</b>
18. Conflicto de interés	<b>24</b>
19. Resultados	<b>25</b>
a. Diseño de oligonucleótidos para la detección de genes de resistencia	<b>26</b>
b. PCR punto final (individual y multiplex)	<b>28</b>
c. Valores predictivos para la prueba PCR multiplex	<b>30</b>
d. Detección de genes codificantes para carbapenemasas en aislados CRPA	<b>31</b>
e. Epidemiología de CRPA	<b>33</b>
f. Asociación con los desenlaces clínicos	<b>37</b>
20. Discusión	<b>40</b>
21. Conclusión	<b>44</b>
22. Glosario	<b>45</b>
23. Referencias	<b>46</b>
24. Anexos	<b>51</b>
a. Anexo A. Lista de secuencias para la detección de genes de resistencia a partir del ADN bacteriano.	<b>51</b>
b. Anexo B. Formato de recolección de datos.	<b>51</b>
c. Anexo C. Cronograma de actividades.	<b>53</b>
d. Anexo D. Operacionalización de las variables	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del resultado de los ensayos de PCR para <i>P. aeruginosa</i> .	31
Tabla 2. Caracterización genotípica de los aislados de CRPA.	32
Tabla 3. Características demográficas de pacientes con infección por <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos	34
Tabla 4. Características demográficas de pacientes con CRPA productora y no productora de carbapenemasas	35
Tabla 5. Desenlaces en pacientes con infección por CRPA productora y no productora de carbapenemasas	38
Tabla 6. Análisis de regresión logística para examinar la influencia de las variables categóricas en la predicción de la mortalidad a 30 días	38
Tabla 7. Modelo de regresión logística para examinar la influencia de los genes que codifican para carbapenemasas en la mortalidad a 30 días en pacientes con infecciones por CRPA.	39

## ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de varios mecanismos de resistencia	10
Figura 2. Diagrama de flujo de pacientes incluidos en el estudio	25
Figura 3. Determinación de la corrida in silico para los primers diseñados para detectar el gen <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	26
Figura 4. Determinación de la corrida in silico para los primers diseñados para detectar el gen <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> .	28
Figura 5. Análisis de la muestra obtenida de DNA mediante espectrofotometría. La concentración y calidad de la muestra se determinó utilizando el nanodrop ThermoFisher, USA.	29
Figura 6. Determinación de <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> (223pb), <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> (320pb) y <i>bla</i> <sub>NDM</sub> (720pb)	29
Figura 7. Determinación de <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> (600pb), <i>bla</i> <sub>IMP</sub> (336pb)	30
Figura 8. Determinación de <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> (600pb), <i>bla</i> <sub>IMP</sub> (336pb), <i>bla</i> <sub>GES</sub> (416pb), <i>bla</i> <sub>VIM</sub> (80pb).	30
Figura 9. Determinación de <i>bla</i> <sub>KPC</sub> (800pb) y <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> (335)	30
Figura 10. Prevalencia de carbapenemasas.	31
Figura 11. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de CRPA.	36
Figura 12. Perfiles de Resistencia de CRPA no productora de carbapenemasas (a) y CRPA productora de carbapenemasas (b)	37
Figura 13. Supervivencia a los a) 30 días y b) 90 días de pues de la infección por cepas CP-PA y CRPA no productoras de carbapenemasas	39

## ACRÓNIMOS

**CRPA:** Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenémicos

**CP-PA:** Pseudomonas aeruginosa productora de carbapenemasas

**CPO:** Organismos productores de carbapenemasas

**No-CPO:** Organismos productores de carbapenemasas

**MDR:** Multi-drogo resistente

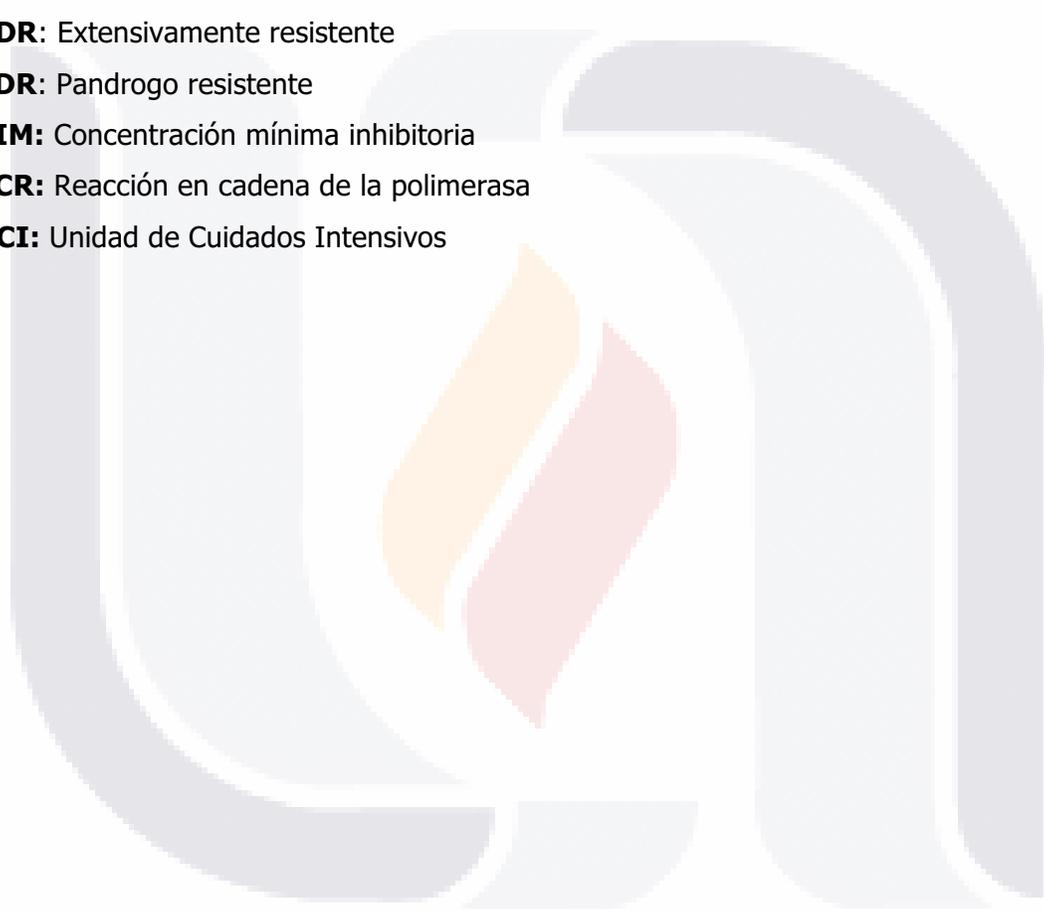
**XDR:** Extensivamente resistente

**PDR:** Pandrogo resistente

**CIM:** Concentración mínima inhibitoria

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos



## RESUMEN

**Antecedentes:** Las bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos son una amenaza global creciente. Estas bacterias son difíciles de tratar debido a los altos niveles de resistencia a los antimicrobianos y altas tasas de mortalidad.

**Objetivos:** Desarrollo de una PCR-multiplex para detección de carbapenemasas y realizar un estudio retrospectivo para describir la epidemiología de CRPA y CRAB e identificar factores de riesgo asociados con la mortalidad.

**Métodos:** Se recolectaron cultivos positivos para CRPA desde junio de 2019 hasta marzo de 2023 en el Hospital Centenario Miguel Hidalgo, Aguascalientes, México. La resistencia a carbapenem se definió como la no susceptibilidad a imipenem y/o meropenem. Los aislados se clasificaron como CPO si resultaron positivos genes de carbapenemasas (*bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, y/o *bla<sub>OXA-1</sub>*). Se recolectaron características demográficas y clínicas de los pacientes con infecciones de CRPA. Se realizó un análisis de regresión logística para identificar la asociación con la mortalidad a 30 días.

**Resultados:** Se incluyeron 44 aislados bacterianos, 56.8% fueron muestras obtenidas de hombres y 43.2% de mujeres. La edad media de los pacientes fue de 53 años. *bla<sub>OXA-5</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* fueron las carbapenemasas más frecuentes. La mayor comorbilidad presentada fue diabetes mellitus (70.5%) seguido de COVID-19 (68.2%) y obesidad (61.4%). La mayoría de las infecciones por CRPA se presentó asociada a la presencia de ventilación mecánica (84.1%) y neumonía asociada a la ventilación mecánica (84.1%), el 86.7% de estas cepas fueron CPO. La duración de la estancia influye en la mortalidad a 30 días (odds ratio 0,85; IC del 95%, 0,74 a 0,99, p=0,032).

**Conclusión:** Las infecciones bacterianas por *P. aeruginosa* CPO parecen influir en la tasa de mortalidad a 30 días. El factor de riesgo asociado a la mortalidad a 30 días encontrado fue los días de estancia intrahospitalaria. *bla<sub>OXA-5</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* se encuentran con mayor dispersión en las infecciones por CRPA en el hospital. Este estudio puede ayudar a reducir la propagación de CRPA. Adicionalmente, identificar el tipo de carbapenemasas puede ayudar a optimizar el tratamiento en los pacientes. Es necesario controlar el uso de antimicrobianos y reducir el uso de carbapenémicos.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia, carbapenemasas, epidemiología, mortalidad, México.

## ABSTRACT

**Background:** Carbapenem-resistant bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* are a growing global threat. These bacteria are difficult to treat due to high levels of antimicrobial resistance and high mortality rates.

**Objectives:** To understand the contribution of carbapenemases to CRPA in the region, a multiplex PCR was developed for the detection of carbapenemases and we performed a smaller retrospective study to describe the epidemiology of CRPA and CRAB and identify risk factors associated with 30-year mortality. days.

**Methods:** CRPA-positive cultures were collected from June 2019 to February 2023 at Hospital Centenario Miguel Hidalgo, Mexico. Carbapenem resistance was defined as no susceptibility to imipenem, meropenem, and/or doripenem. Isolates were classified as carbapenemase producers if were positive at least one carbapenemase (*bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, y/o *bla*<sub>OXA-1</sub>). Demographic and clinical characteristics were collected. Logistic regression analysis was performed to independently identify the association with 30-day mortality.

**Results:** 44 bacterial isolates were included, 56.8% were samples obtained from men and 43.2% from women. The average age of the patients was 53 years. CPO strains predominated in those over 65 years of age. *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> were the most frequent carbapenemases. The highest comorbidity presented was diabetes mellitus (70.5%) followed by COVID-19 (68.2%) and obesity (61.4%). The majority of CRPA infections occurred associated with the presence of mechanical ventilation (84.1%) and pneumonia associated with mechanical ventilation (84.1%), 86.7% of these strains were CPO. No differences were found between 30-day and 90-day mortality rates between CP-PA and non-CP-PA ( $p > 0.999$  and  $p = 0.1025$ , respectively).

**Conclusion:** Bacterial infections due to *P. aeruginosa* CPO appear to influence the 30-day mortality rate. The risk factor associated with 30-day mortality found was the days of hospital stay. *bla*<sub>OXA-5</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> are found with greater dispersion in CRPA infections in the hospital. This study may help reduce the spread of CRPA. Additionally, identifying the type of carbapenemases can help optimize treatment in patients. It is necessary to control the use of antimicrobials and reduce the use of carbapenems.

**Key Words:** *Pseudomonas aeruginosa*, resistance, carbapenemases, epidemiology, mortality, Mexico.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La capacidad de las bacterias, virus u otros microorganismos para resistir los efectos de los antibióticos que inicialmente fueron eficaces contra ellos se conoce como "resistencia a los antibióticos". Esta resistencia, es un proceso evolutivo natural de las bacterias, pero el uso excesivo y la aplicación inadecuada de antimicrobianos en humanos y animales, así como las medidas de prevención inadecuadas, lo han convertido en una de las amenazas más graves para la salud pública en la actualidad, de hecho se pronostica que la resistencia antimicrobiana (AMR) cause 10 millones de muertes cada año para el 2050. Durante el Foro Económico Mundial de 2013 se situó este problema de salud a la par de la proliferación de armas de destrucción masiva y la crisis económica mundial.

En los últimos años, la crisis mundial AMR ha incrementado dramáticamente debido al aumento en el uso de antibióticos para tratar a los pacientes COVID-19. Muchos estudios han demostrado una correlación entre el uso de antimicrobianos y la resistencia. Durante la atención al paciente, el riesgo de infecciones por organismos multi-resistentes se ha convertido en una preocupación cada vez mayor, especialmente en pacientes que contraen infecciones nosocomiales mientras están en una unidad de cuidados intensivos (UCI).

En el 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicó una lista de patógenos prioritarios en resistencia microbiana que a su vez se encuentran implicados en infecciones respiratorias, incluyendo *Acinetobacter baumannii* carbapenémico-resistente, *Pseudomonas aeruginosa* carbapenémico-resistente, enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos, *Klebsiella pneumoniae* carbapenémicos-resistente, *Staphylococcus aureus* meticilina y vancomicina-resistente, entre otros (WHO, 2017). Aunado a esto, la CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2022), reportó un incremento alarmante de infecciones hospitalarias con resistencia a diversas bacterias en Estados Unidos de Norteamérica, aumentando 15% en resistencia del año 2019 al 2022. Este aumento incluye la resistencia de *Acinetobacter* carbapenémicos-resistente (CRAB, 78%), Enterobacteriaceae carbapenémicos-resistente (35%), Enterobacterales productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE, 32%), *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo-resistente (32%), entre otros (CDC, 2022).

En México, se han encontrado patrones de resistencia elevados para la mayoría de los antimicrobianos en infecciones respiratorias, así como un alto porcentaje de bacterias

multi-drogo resistentes, destacando *Acinetobacter* (53%), *Klebsiella spp.* (22.6%) y *Escherichia coli* (19.4%) (Garza-Gonzales, 2019).

Los patógenos ESKAPE, un acrónimo del grupo de bacterias que engloba especies Gram-positivas y Gram-negativas (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de Enterobacterias) son causa común de infecciones nosocomiales caracterizadas por un potencial de mecanismos drogo resistentes catalogándolas en su mayoría como aislados multidrogo resistentes (Santajit and Indrawattana, 2016). Se han considerado un problema de salud pública global debido a la alta mortalidad y morbilidad que producen, el costo elevado en el tratamiento, así como falta de efectividad en el diagnóstico.

En el año 2012 se realizó en el Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León, el primer estudio de vigilancia de bacterias del grupo ESKAPE en México. Se analizaron 1693 patógenos de diferentes muestras clínicas; se encontró que las bacterias del grupo ESKAPE representaban 64 % de los aislamientos. En primer lugar, se encontró *A. baumannii* y, en segundo, *P. aeruginosa*; los cuales fueron caracterizados como multi-drogo resistentes. En 2019 se realizó un estudio en el cual participaron 47 hospitales de 20 estados de México, donde se estudiaron 943 aislamientos en los que se encontró un alto porcentaje de bacterias resistentes a carbapenémicos, más de 50% pertenecían a *A. baumannii*, 40 % de *P. aeruginosa* y 12 % de *Klebsiella spp.* y *E. cloacae*.

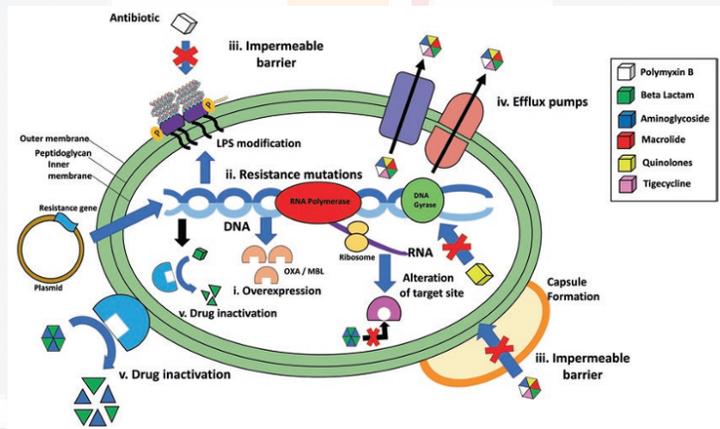
Es por estos antecedentes que la vigilancia epidemiológica es un elemento crucial de las estrategias nacionales de prevención y control para controlar la diseminación de bacterias resistentes. Por lo tanto, la detección temprana de este tipo de bacterias es una de las principales prioridades en las instituciones de salud. Existe una amplia gama de pruebas disponibles para su detección, entre ellos métodos fenotípicos y genotípicos. Sin embargo, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) recomienda el método de inactivación de carbapenem modificado (mCIM), Carba NP y ensayos moleculares, como la PCR, para determinar la presencia de microorganismos resistentes a carbapenémicos.

La prueba de (reacción en cadena de la polimerasa) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente, por lo que es una técnica con alta precisión, rápida y accesible para detectar genes de resistencia a carbapenémicos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana puede encontrarse codificada en el cromosoma bacteriano, plásmidos, islas de patogenicidad, integrones, secuencias de inserción y transposones. Las bacterias poseen un amplio rango de mecanismos para utilizar y convertirse en recalcitrantes a la terapia antibiótica entre los que se incluye la expresión de enzimas de inactivación, la sobre regulación de las bombas de expulsión, la modificación del blanco y los cambios en la superficie de las células tales como la alteración de porinas, mutaciones, modificaciones postranscripcionales o postranslacionales (Kishore, 2021) y bloqueo físico a través de la formación de biopelículas (Sriramulu, 2013). Estos mecanismos (Figura 1) a menudo pueden actuar sinérgicamente para prevenir el éxito de una terapia antimicrobiana.



**Figura 1.** Diagrama esquemático de varios mecanismos de resistencia. (1) Sobreexpresión. (2) Mutaciones de resistencia. (3) Barrera impermeable. (4) Bombas de expulsión. (5) Inactivación de drogas (Kishore, 2021).

Una cepa resistente a los antibióticos surge cuando adquiere material genético que le confiere la capacidad necesaria para sobrevivir en un nuevo nicho. Una vez adquirido el material, puede expresarse un nuevo mecanismo de resistencia que evoluciona de acuerdo a la dinámica del microambiente; hay entonces una alta probabilidad de que se transfiera a otras especies o a una cepa virulenta o no, de la misma o diferente especie (Sriramulu, 2013).

Los carbapenémicos son un recurso importante para el tratamiento de infecciones nosocomiales. Los carbapenémicos, tigeciclina y colistina son medicamentos utilizados actualmente para infecciones producidas por estos microorganismos (Harris et al., 2018; Hayden and Won, 2018). Sin embargo, el sobreuso de los mismos ha contribuido a la dispersión de resistencia, dando como resultado que Enterobacteriales carbapenémico-resistentes sean causa común de infecciones hospitalarias (Cruz-López et al., 2022).

## *2.2 Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos*

Los beta-lactámicos son una clase de antibióticos que se unen covalentemente a las proteínas de unión a proteínas (PBPs, penicillin-binding proteins). Las PBPs son enzimas responsables de la formación de peptidoglicano en la pared celular bacteriana. La inhibición de PBPs por beta-lactámicos interrumpe la síntesis de la pared celular y debilita la membrana celular haciendo que la célula estallé por la presión osmótica (Tehrani and Martin, 2018). Sin embargo, este tratamiento es inefectivo en muchos patógenos, incluyendo aquellos que poseen enzimas que son capaces de degradar beta-lactámicos. Estas enzimas inactivan el antibiótico por la hidrólisis del anillo beta-lactámico (Bush y Bradford, 2016). La resistencia a una variedad de grupos de antibióticos beta-lactámicos como las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos es mediada por beta-lactamasas. Las beta-lactamasas se clasifican estructuralmente en cuatro grupos moleculares. Estas incluyen las serin-beta-lactamasas (SBLs) clase A, C, y D; y la clase B o metalo-beta-lactamasas (MBLs) (Ambler 1980; Silveira et al., 2018).

Las carbapenemasas más relevantes clínicamente pertenecen a la Clase A de Ambler (tipo KPC); la Clase B de Ambler que requieren un ion metálico bivalente, usualmente  $Zn^{2+}$ , para su actividad; son llamadas metalo-beta-lactamasas (MBLS), y se incluyen los tipos IMP, VIM y NDM (Hall and Barlow, 2005); y, la Clase D (OXA-48-like, OXA-23, OXA-58, OXA-143 y OXA-51-like).

La Clase A se observa con mayor frecuencia en Enterobacteriales y especies Gram-negativas mediando resistencia a penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido (cefalotina). Esta clase contiene una serina en el aminoácido 70 en el sitio activo y la base general Glu-166 se encuentra involucrada en el proceso catalítico (Yoon and Jeong 2021). Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) que confieren resistencia al espectro

extendido de las cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima), incluyen las variantes TEM, SHV, CTX-M (Tada et al. 2017). TEM (Temoniera), se encuentra distribuido entre las bacterias de la familia Enterobacteriaceae así como en bacterias no fermentadoras como *P. aeruginosa*. La variable de enzimas sulfidril (SHV), SHV-1 es la más relevante clínicamente y se encuentra en *K. pneumoniae* (Zhao et al., 2013). Los genes que codifican las enzimas TEM y SHV tienen altos rangos de mutaciones, resultando en una gran diversidad de tipos de enzimas y de resistencia antimicrobiana (Santajit y Indrawattana et al., 2016). CTX-Ms han sido identificadas en los patógenos ESKAPE. Algunas de las más relevantes clínicamente están presentes en *K. pneumoniae*, especialmente BLEE (Zhao et al., 2013).

Las carbapenemasas de *K. pneumoniae* tipo KPC codificadas en plásmidos se encuentran distribuidas con mayor frecuencia y prevalencia a nivel mundial (Vera-Leiva et al., 2017). Estos son particularmente difíciles de detectar por métodos microbiológicos pues los aislados tienen una concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) contra imipenem o meropenem, que, aunque son elevados, permanecen en el rango de susceptible. Se ha observado a través de estudios *in vitro* que el ertapenem puede ser el sustrato más apropiado para la detección de cepas productoras de KPC (Kanj and Kanafani, 2011). La variante KPC-1 es importante clínicamente pues determina la resistencia a imipenem, meropenem, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, aztreonam y ceftriaxona (Babic et al., 2006).

La Clase B (MBL, incluyendo: New Delhi MBL [NDM], Verona integron-encodes MBL [VIM], imipenemase enzyme [IMP], Seoul imipenemase [SIM] y Dutch imipenemase [DIM]) se observa con mayor frecuencia en *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y Enterobacteriales (Benedic et al., 2014). Las MBLs son enzimas capaces de hidrolizar todos los antibióticos beta-lactámicos incluyendo carbapenémicos, con excepción del aztreonam (Almasaudi 2018). La actividad dependiente de zinc de estas bacterias, puede ser inhibida por EDTA, pero no por inhibidores de beta-lactamasas convencionales como el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam (Jain y Danziger 2004).

La Clase D, que incluye enzimas relacionadas con oxacilinasas (OXA) son comúnmente observadas en Enterobacteriales y *A. baumannii* (Benedic et al., 2014). Tanto la clase C como la D confieren resistencia a cefamicinas y cefalosporinas que incluyen cefoxitina, cefotetan y penicilinas tipo beta-lactamasa.

La Clase C produce cefalosporinas tipo AmpC. La importancia clínica de las beta-lactamasas AmpC radica en el desarrollo de resistencia a penicilina, cefamicina, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (Cruz-López et al., 2022). Estas enzimas incluyen penicilinasas y cefalosporinas como AmpC beta-lactamasas, los cuales resultan en bajos niveles de resistencia a cefalosporinas. AmpC se codifica a nivel cromosomal y se identifica usualmente en *P. aeruginosa* y bacterias de la familia Enterobacteriaceae (Santajit y Indrawattana et al., 2016).

Las enzimas de la Clase D son capaces de hidrolizar eficientemente los beta-lactámicos como la oxacilina, tipo isoxazolil. Esta clase pertenece a una superfamilia de serina beta-lactamasas con una única carboxilación en la Lys-73 responsable de la actividad hidrolítica de las beta-lactamasas (Golmi et al., 2001). El gen *bla<sub>OXA-23</sub>* es particularmente importante ya que se ha diseminado a nivel mundial siendo considerado como un determinante mayor en la emergencia de bacterias CRAB (*Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos), con una concentración mínima inhibitoria > 4µg/ml de imipenem o meropenem. Los genes OXA-40, OXA-48 y OXA-198 han sido identificados también en *P. aeruginosa* (Yoon y Jeong, 2021).

La adquisición y movimiento de ADN nuevo puede determinarse por el análisis de la secuencia que rodean los sitios de inserción. Las Secuencias Insercionales (IS) de las bacterias usualmente son de tamaño corto de entre 0.5 a 2kb (Turton et al., 2006). Uno de los elementos IS relevantes más comunes que se encuentran ligados a la resistencia de carbapenémicos son ISAbal quien ha sido identificado corriente arriba de los genes OXA-23-like, OXA-51-like, OXA-58-like, *eptA* y *ampC* (Proton et al., 2019).

### *2.3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos en P. aeruginosa.*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. Su metabolismo es estrictamente aeróbico, catalasa y oxidasa positivo y se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente. Presenta un conjunto de factores de virulencia y genes de resistencia dentro de su genoma, así como diferentes plásmidos que le confieren una gran versatilidad metabólica y adaptabilidad. Debido a estas propiedades genotípicas y fenotípicas, presentan cambios evolutivos que las vuelven ampliamente resistentes. La *P. aeruginosa* actúa también como un patógeno oportunista,

causando infecciones nosocomiales con una alta tasa de morbilidad y mortalidad, sobre todo en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos.

En *P. aeruginosa*, los fármacos beta-lactámicos son limitados debido a la resistencia intrínseca de la especie debido a la interacción de las betalactamasas codificadas en el cromosoma, ya que existen mutaciones cromosomales que alteran la permeabilidad de la membrana a través de la pérdida de porinas y sobreexpresan la bomba de expulsión de antibióticos, o bien, pueden adquirir genes de resistencia a carbapenémicos.

Los regímenes de beta-lactámicos para la infección por *P. aeruginosa* incluyen penicilinas antipseudomonas en combinación con un inhibidor de betalactamasa, piperacilina-tazobactam y tetraciclina-ácido clavulánico; cefalosporinas solas, o bien, en combinación de cefalosporinas con inhibidores de betalactamasas como ceftazidima con avibactam; ceftolozano con tazobactam; cefoperazona con sulbactam y cefepima; y carbapenems, como imipenem y meropenem. Las nuevas combinaciones de beta-lactámicos con inhibidores de beta-lactamasas, como azteonam-avibactam, meropenem-vaborbactam, e imipenem-relevactan, tienen una eficacia limitada contra las metalo-betalactamasas en *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (Karlowsky et al, 2017, 2020; Lob et al., 2020). Sin embargo, la cefalosporina cefiderocol (Delgado-Valverde et al., 2020) es efectiva contra todas las *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas, incluyendo productoras de MBL.

El mecanismo de resistencia a carbapenémicos preferido por *P. aeruginosa* son las mutaciones cromosomales, incluyendo la pérdida de la proteína de membrana OprD, la cual es un canal para la penetración de imipenem, y que se ve asociado a la reducción de susceptibilidad a los carbapenémicos, principalmente a imipenem (Farra et al., 2008). Además, la sobre expresión de bombas de expulsión, tales como MexAB-OprM, por mutaciones en una región de regulación, contribuye directamente a la resistencia de meropenam (Masuda et al., 2000) y la depresión mutacional de los cromosomas AmpC cefalosporinasa, especialmente en BLEE, juega un rol importante en la resistencia a carbapenémicos (Quale et al., 200, Rodríguez-Martínez et al., 2009). La combinación de la pérdida de porinas, sobre expresión de bombas de expulsión y la depresión de cefalosporinasa AmpC, confieren un alto nivel de resistencia a carbapenémicos, con MICs mayores a 256 y 128 mg/L, respectivamente (Chalhoub et al., 2016).

Estas cepas también incluyen mecanismos enzimáticos de resistencia a través de mutaciones en el cromosoma, o bien a través de elementos móviles encontrados en casets

génicos de integrones clase 1. Entre ellos encontramos para ambos: VIM, IMP, NMP y KPC. Tales mecanismos también se encuentran presentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*.

La Clase A de carbapenemasas son parcialmente inhibidas por ácido clavulónico (Yoon y Jeong, 2021). La presencia de la enzima KPC-1, un ejemplo de la clase A, da como resultado resistencia a imipenem, meropenem, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, aztreonam y ceftriaxona (Santajit and Indrawattana, 2016).

Las beta-lactamasas de la Clase B, o metalo-beta-lactamasas son subclasificadas como B1, B2 y B3, basados en su estructura y puntos funcionales (Frere et al., 2005). En *P. aeruginosa*, *Enterobacterales* y otros Gram-negativos no fermentadores, la subclase B1 contiene los MBLs más clínicamente relevantes. Las MBLs se unen a dos átomos de  $Zn^{2+}$  para la hidrólisis. El ion  $Zn^{2+}$  se une a los sitios 3H (His-His-His) y DCH (Asp-Cys-His). Consecuentemente, su actividad se ve reducida en presencia de un quelador de zinc y otros cationes divalentes como es el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). El sustrato preferido de las MBLs incluye las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, pero excluye al monobactam. Sobre estos, VIM es el gen más diseminado mundialmente, seguido de IMP y NDM (Yoon y Jeong, 2021).

Los carbapenémicos representan una opción importante en la terapia de pacientes con infecciones producidas por organismos como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, así como infecciones multidrogo-resistentes. Se sabe que la resistencia a carbapenémicos conferida por producción de enzimas carbapenemasas se encuentra relacionada con la multidrogo-resistencia. La detección rápida de microorganismos productores de carbapenemasas es crucial para implementar rápidamente el tratamiento adecuado, mejorar la salud del paciente y evitar la diseminación de resistencia.

#### 2.4 Métodos de detección de microorganismos resistentes a carbapenémicos

Actualmente, existen múltiples ensayos para la detección de microorganismos resistentes en laboratorios clínicos. La detección fenotípica de bacterias productoras de carbapenemasas se realiza en combinación de discos con inhibidores (ácido borónico, ácido dipicolínico, EDTA, cloxacilina, etc.), E-test (para metalo-beta-lactamasas) y ensayos

colorimétricos. Además, los ensayos también incluyen la detección de hidrólisis de antibiótico carbapenémico con espectrofotometría de masas y ensayos de inmunocromatografía lateral para la captura inmunológica de epítomos de las diferentes carbapenemasas. La detección de la presencia de *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> es realizada comúnmente mediante PCR y su subsecuente secuenciación.

Uno de los métodos más actuales que se encuentran en el proceso de validación, es el ensayo de susceptibilidad rápida de EUCAST, el cual es llamado RAST (Akerlund et al., 2020). Este método ha sido probado para la detección de cultivos positivos a partir de muestras de sangre en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae*. El método da resultados después de una incubación de 4 a 8 horas, lo cual es un tiempo mucho menor comparado con los resultados del estándar EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) de 16 a 20 horas mediante difusión en disco. Sin embargo, aun se requieren de 4 a 6 horas extra para otorgar el resultado de una manera fiable y algunos diagnósticos como la interpretación de resultados para *K. pneumoniae* resistente a meropenem continua en estandarización (Akerlund et al., 2020).

La generación de microarreglos de DNA para la detección de BLEE y cefalosporinasas mediadas por plásmidos también se ha realizado (Cuzon et al., 2012; Naas et al., 2011; Naas et al., 2010; Rubtsova et al., 2010). Sin embargo, no todos los laboratorios clínicos pueden disponer de esta tecnología debido al costo del ensayo.

El uso de la tecnología MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) (Idelevich et al., 2021; Oviaño et al., 2018; Burckhardt et al., 2018) ha sido probada con una sensibilidad del 92.0% al 92.7% con un tiempo de análisis de 18 horas para susceptibilidad antimicrobiana. La tecnología PNA-FISH (peptide nucleic acid probes fluorescente *in situ* hybridization), se ha utilizado para determinar resistencia a claritromicina en *Helicobacter pylori* (Cerqueira et al., 2011).

Existen ventajas potenciales en los métodos de biología molecular para detectar la presencia de mecanismos de resistencia a antibióticos. Estos incluyen la velocidad de obtención del resultado, la alta sensibilidad del ensayo, el análisis realizado directamente de la muestra (por ejemplo; esputo, tejidos, orina, heces fecales y sangre), y el que no se requiere un cultivo puro para realizar el análisis. Un menor tiempo en el diagnóstico podría

ayudar a elucidar el antibiótico apropiado, lo cual impactaría significativamente en el costo de la terapia, la evolución del paciente y la duración del tratamiento (Tan 2003).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A nivel global, *P. aeruginosa* es la causa número uno de neumonías intrahospitalarias, contribuyendo aproximadamente entre el 10 y el 15% de las infecciones nosocomiales, así como la causa más frecuente de neumonías asociadas a la ventilación mecánica, con una mortalidad del 42 al 87%. En los últimos años, la incidencia de la neumonía intrahospitalaria por *P. aeruginosa* se ha duplicado. En EE.UU. se ha atribuido un costo de \$421,000 dls a la neumonía por *P. aeruginosa*, incluyendo procedimientos, laboratorios, estudios diagnósticos y días de estancia intrahospitalaria.

En México, de acuerdo a un informe sobre prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de la Secretaría de Salud, IMSS e ISSSTE publicado en 2011, la cepa *P. aeruginosa* representó el segundo patógeno oportunista más prevalente causante de infecciones nosocomiales y generando grandes costos económicos para los sistemas de salud y los pacientes.

En 2020, se realizó un estudio descriptivo dentro del Centenario Hospital Miguel Hidalgo, Aguascalientes, México sobre microbiología y susceptibilidad antimicrobiana (Beltran et al., 2020). Dentro de los microorganismos Gram negativos, la cepa *P. aeruginosa* se encontró el segundo patógeno más frecuente, siendo el más común en infecciones de vías respiratorias. Adicionalmente, se encontró que del total de aislamientos de *P. aeruginosa*, el 52% eran susceptibles a meropenem.

La asociación descrita entre el uso de antimicrobianos y la presencia de *P. aeruginosa* MDR, refuerza la importancia que tiene la implementación de políticas hospitalarias encaminadas al control del uso de antimicrobianos, que buscan disminuir la incidencia de infecciones por este tipo de bacterias.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

- A) La necesidad de una prueba rápida de susceptibilidad antimicrobiana y de acortar el tiempo de diagnóstico, para aumentar la probabilidad de éxito de la terapia antimicrobiana en pacientes infectados, así como para disminuir la generación de

resistencia antimicrobiana.

- B) El ensayo de diagnóstico de resistencia es importante no solo para determinar la terapia antimicrobiana sino también para monitorear la dispersión de organismos resistentes, sus mecanismos de resistencia y su transmisión a través de hospitales y la comunidad, definir procedimientos estándar y predecir el resultado terapéutico de acuerdo al tiempo y a la locación geográfica.

La necesidad de una prueba rápida de susceptibilidad antimicrobiana en diversas infecciones continúa aumentando. El método de susceptibilidad antimicrobiana por EUCAST y CLSI requieren de 16 a 20 horas de incubación. El método de difusión en disco (DD) es fácil de usar, barato y se realiza en base a guías establecidas; es flexible y rápidamente adaptable a nuevos antimicrobianos. Muchos laboratorios hoy en día manejan este método. Sin embargo, la necesidad de acortar el diagnóstico es urgente para aumentar la probabilidad de éxito de la terapia antimicrobiana en pacientes infectados, así como para disminuir la generación de resistencia antimicrobiana.

El ensayo de diagnóstico de resistencia es importante no solo para determinar la terapia antimicrobiana sino también para monitorear la dispersión de organismos resistentes, sus mecanismos de resistencia y su transmisión a través de hospitales y la comunidad, definir procedimientos estándar y predecir el resultado terapéutico de acuerdo al tiempo y a la locación geográfica.

Actualmente existen sistemas comerciales que resultan en identificación de bacterias en menos de 4 horas, sin embargo, la fiabilidad de estos estudios puede encontrarse en un rango del 55% al 90%, además de que estos métodos requieren la obtención del aislado previamente y no se realiza en ensayo directamente de la muestra del paciente.

Los sistemas de detección basados en ácidos nucleicos ofrecen un método rápido y sensible para detectar la presencia de genes de resistencia y juegan un rol crítico en la elucidación de los mecanismos de resistencia. Mediante técnicas moleculares es posible la detección e identificación de microorganismos, así como propiedades específicas tales como factores de virulencia y resistencia antimicrobiana. La aplicación de esta tecnología es particularmente útil en organismos de bajo crecimiento o microorganismos no cultivables, así como para la detección de mutaciones de ciertos genotipos.

Si bien es cierto que actualmente los métodos moleculares tienen limitaciones, incluyendo la detección de resistencia a múltiples antibióticos en una sola prueba, o bien, la falta de detección de nuevos mecanismos de resistencia de manera rutinaria, estos pueden ayudar a elucidar el diagnóstico de manera oportuna, optimizando el tratamiento.

Es urgente gestionar la contención de los AMR mejorando la detección, caracterización y respuesta rápida ante estas infecciones.

Por lo anterior, se propone desarrollar una técnica de diagnóstico molecular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR multiplex) para la detección de genes de resistencia en bacterias causantes de infecciones respiratorias para antibióticos carbapenémicos; que sea rápida, confiable y transferible a los sistemas de salud, así como determinar las características genotípicas y epidemiológicas de la *Pseudomonas aeruginosa* dentro del Centenario Hospital Miguel Hidalgo, para entender los mecanismos de adquisición, resistencia y dispersión.

## **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Tiene la PCR multiplex una sensibilidad y especificidad >90% para la detección de genes de resistencia a carbapenémicos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*?

## **6. OBJETIVOS**

### *Objetivo primario*

Evaluar el desempeño diagnóstico de las pruebas moleculares para identificar genes de resistencia a carbapenémicos en cultivos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa*.

### *Objetivos secundarios*

1. Evaluar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la PCR multiplex para la detección de genes de resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Caracterización molecular de aislados clínicos de acuerdo a su resistencia antimicrobiana a carbapenémicos.

3. Describir la epidemiología y carbapenemasas asociadas a la *Pseudomonas aeruginosa* del Centenario Hospital Miguel Hidalgo
4. Comparar la sobrevivida de los pacientes con neumonía hospitalaria secundaria a pseudomonas aeruginosa con base en la presencia de genes de resistencia.
5. Describir la mortalidad asociada a los genes de resistencia a carbapenémicos en infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

## 7. HIPOTESIS

1. La PCR multiplex tendrá una sensibilidad y especificidad >90% para la detección de resistencias a carbapenémicos.
2. Existe correlación significativa entre la presencia o ausencia de los genes de resistencia a carbapenémicos, con su perfil de resistencia.
3. Los pacientes con infección por bacterias con genes de resistencia a carbapenémicos tienen mayor mortalidad a 30 días.

## 8. METODOLOGÍA

- 8.1. *Tipo de estudio:* Estudio retrospectivo, descriptivo y analítico, unicéntrico.
- 8.2. *Operacionalización de las variables:*
  - Variables independientes:* Edad, género, fecha de ingreso, fecha de egreso, fecha de toma de muestra, comorbilidades, índice de comorbilidad de Charlson, tipo de egreso, mortalidad a 30 días(se anexa tabla A4).
  - Variables dependientes:* Presencia o ausencia de carbapenemasas.
- 8.3. *Calculo del tamaño muestral*

El tamaño muestral es calculado utilizando el análisis t de student two-tail para la diferencia entre dos medias de variables dependientes, marcando como parámetros un error alfa con probabilidad de 0.05 y un poder de 0.95. Los datos se analizan con el programa G\*Power Versión 3.1.9.7.

- 8.4. *Diseño de oligonucleótidos para la detección de genes de resistencia*

Se llevó a cabo la selección de los genes que codifican a carbapenemasas de acuerdo con su relevancia a nivel mundial. El diseño de oligonucleótidos específicos para la identificación de los genes de resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa* fue realizado mediante la aplicación Geneious Prime Versión 2022.2.2. Copyright © 2005-2022 Geneious, ncbi BLAST, y ncbi Pick primer3. Se realizó el análisis de cada secuencia, así como cada uno de sus parámetros, dentro de los que se incluye: parámetros de longitud de la secuencia, contenido de Guanina-Citocina (GC), temperatura de alineación, peso molecular, coeficiente de extinción, hairpin, homo-dimero y hetero-dimero. El análisis fue realizado mediante el programa OlygoAnalyzer™ Tool, IDT Integrated DNA Technologies Copyright © Rensselaer Polytechnic Institute 2006. Todos los oligonucleótidos diseñados fueron analizados mediante el programa BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information (NCBI), para comparar las secuencias de nucleótidos con las secuencias en las bases de datos y calcular su significancia estadística. El diseño de los PCR punto final individual con templates, controles positivos y control negativo agua libre de nucleasas (OlygoAnalyzer Tool). El diseño de la PCR multiplex y la validación de manera in silico se realizará utilizando el programa bioinformático MPprimer.

#### 8.5. *PCR punto final individual y multiplex*

Para llevar a cabo el PCR en punto final fue necesario la estandarización de la técnica de extracción de ADN por ebullición para los aislados bacterianos. Se corrieron geles de agarosa al 1.5% para observar el producto de la PCR, primero se llevó a cabo la detección de cada uno de los genes de manera individual y luego se generaron varios PCR multiplex para determinar en cada uno dos o tres genes codificantes. Se evaluaron los límites de detección y especificidad de la prueba. SE llevó a cabo la detección de estos genes en cepas de *E. coli*, *A. baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*

#### 8.6. *Asociación con desenlaces clínicos*

El estudio retrospectivo de *P. aeruginosa* fue un estudio de cohorte del Hospital Centenario Miguel Hidalgo. Los datos microbiológicos se recopilaron de pacientes nosocomiales con aislamiento de *P. aeruginosa* en cultivo del torrente sanguíneo, respiratorio, urinario o de tejidos blandos/hueso entre julio de 2019 y marzo de 2023, y de

quienes se disponía de datos hasta 90 días. Sólo se incluyó el primer cultivo positivo por paciente. Los aislados de pacientes se clasificaron como CRPA (*Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos) cuando *P. aeruginosa* no era sensible a imipenem, meropenem y/o doripenem según lo definido por los puntos de corte de concentración inhibidora mínima (CIM) del Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI).

Los datos clínicos se extrajeron de los registros médicos electrónicos del Centenario Hospital Miguel Hidalgo, un repositorio que incluye datos clínicos y administrativos de pacientes y se revisaron hasta los 90 días a partir del día en que se recolectó el cultivo. Este expediente clínico se utilizó para obtener datos demográficos, datos microbiológicos, comorbilidades, duración de la estancia intrahospitalaria, estancia en unidad de cuidados intensivos (UCI), presencia de choque séptico, necesidad de ventilación mecánica, neumonía asociada a la ventilación mecánica y exposición a antibióticos en los 90 días previos a la toma del cultivo. El tipo de muestra de cultivo se clasificó en sangre, orina, vías respiratorias y biopsia de piel/tejidos blandos.

## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la comparación de la prueba con estándar de oro, se llevó a cabo el ensayo de correlación de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana fenotípicamente con el resultado del PCR multiplex. Para la descripción de la epidemiología de estas cepas en el hospital, las variables categóricas fueron comparadas usando Chi-cuadrada o el ensayo de Fisher, de acuerdo a lo correspondiente. Las variables continuas se compararon usando la prueba Mann-Whitney U. Se realizaron varios modelos de regresión logística para ajustar por factores de confusión en la asociación entre carbapenemasas y mortalidad a los 30 días. El análisis de supervivencia se basó en las curvas de Kaplan-Meier.

La comparación de las curvas de supervivencia se probó mediante la prueba de rango largo (Mangel-Cox). Los valores de p de 0,05 o menos se designaron estadísticamente significativos y todas las pruebas fueron bilaterales. Todos los estadísticos de prueba fueron realizados mediante el programa Prism GraphPad, USA.

## **10. FACTIBILIDAD**

- A) Se cuenta con 54 cepas de *P. aeruginosa* resguardadas dentro del laboratorio clínico del Centenario Hospital Miguel Hidalgo, así como el antibiograma de cada una de ellas.
- B) Accesibilidad al registro en el expediente clínico de los pacientes de quienes provienen dichas cepas para evaluar la sobrevivencia a 30 y 90 días, así como sus características demográficas.
- C) Estudio sometido a evaluación por el comité de ética e investigación siendo aprobado.

## **11. RECURSOS**

### 11.1 Recursos humanos:

- 11.1.1 Investigadora de estancia Postdoctoral CONACYT en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Médico residente de Medicina Interna del Centenario Hospital Miguel Hidalgo, Médicos adscritos al servicio de Medicina Interna y Área de Investigación del Centenario Hospital Miguel Hidalgo, personal del Laboratorio Clínico del Centenario Hospital Miguel Hidalgo.

### 11.2 Recursos materiales:

- 11.2.1 Se utilizaron 54 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas del Laboratorio Clínico del Centenario Hospital Miguel Hidalgo.
- 11.2.2 El desarrollo de la PCR se realizó utilizando los recursos e instalaciones del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- 11.2.3 Los datos de los pacientes se obtuvieron del expediente clínico electrónico del Centenario Hospital Miguel Hidalgo usando equipo electrónico personal.

### 11.3 Recursos financieros:

- 11.3.1 Se utilizaron recursos financieros otorgados por la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

## **12. ASPECTOS ÉTICOS**

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Centenario Miguel Hidalgo el 16 de enero de 2023, con el número asignado CEI-CI/009/23.

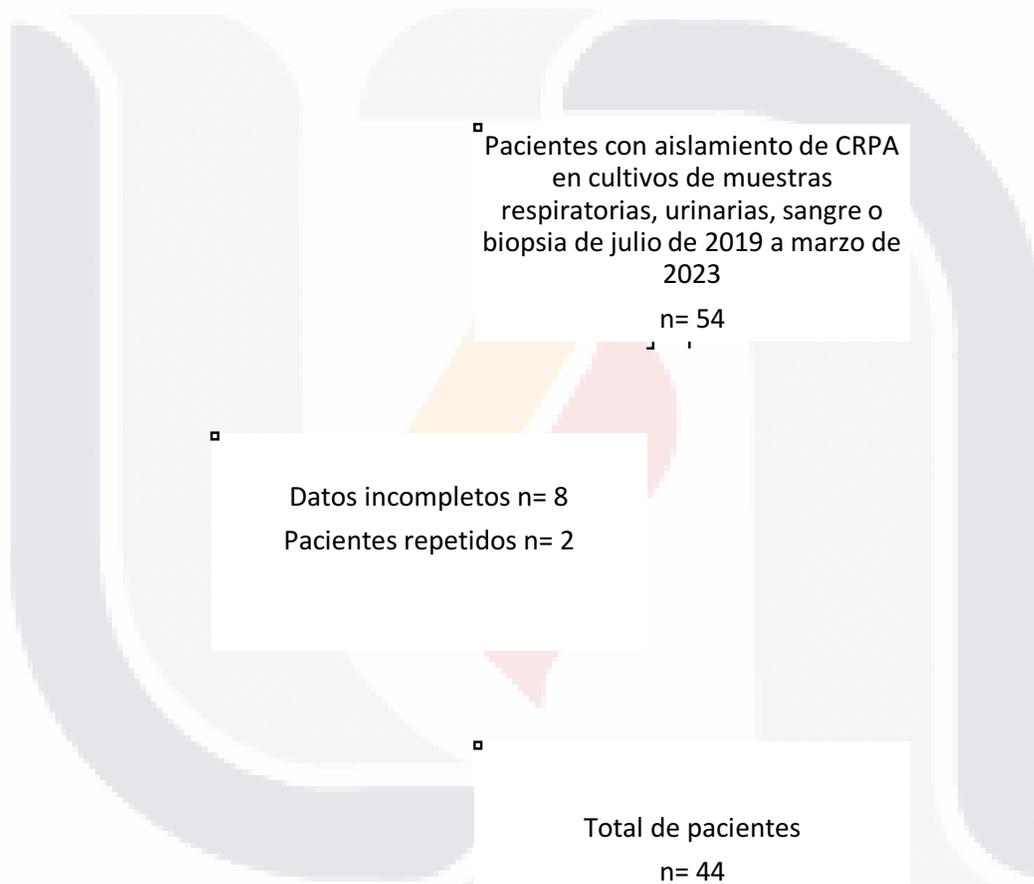
## **13. CONFLICTO DE INTERÉS**

Los participantes de este estudio declaran no tener conflicto de interés derivado de la pretensión de obtener algún beneficio económico, de forma directa o a través de la participación del sector salud.



### 14. RESULTADOS

Se recabaron un total 54 aislados bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* del laboratorio clínico del Centenario Hospital Miguel Hidalgo de julio de 2019 a marzo de 2023, de los cuales 10 se descartaron por no tener expediente clínico completo o por corresponder a diferentes muestras del mismo paciente, quedando un total de 44 aislados. De estos, 30 (68.18%) corresponden a muestras de secreción bronquial, 10 (22.72%) de urocultivo, 2 (4.54%) de biopsia de hueso y tejidos blandos, y 2 (4.54%) de hemocultivo.



**Figura 2.** Diagrama de flujo de pacientes incluidos en el estudio

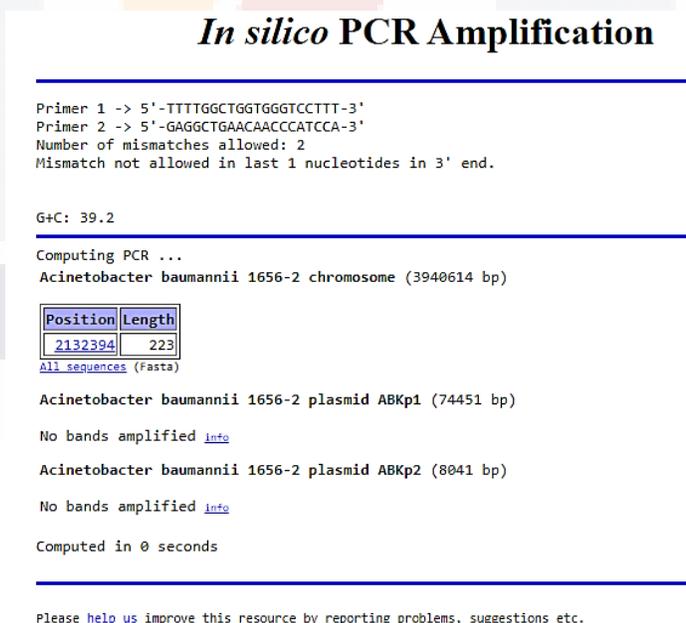
### 14. 1. Diseño de oligonucleótidos para la detección de genes de resistencia

Se realizó el diseño de los oligonucleótidos para identificar los genes que codifican a las carbapenemasas más comunes en el mundo. Para ello, se identificaron regiones conservadas a nivel cromosomal o bien a nivel plásmido. Se tomaron las secuencias base del primer organismo en el que se identificó la carbapenemasa y múltiples alineaciones fueron realizadas para tratar de identificar el mayor número de variantes posibles del mismo gen. Todas las secuencias diseñadas se muestran en la Tabla A1 en anexos. Además de la generación del grupo de carbapenemasas también se realizó el diseño de primers para determinar la resistencia a vancomicina y colistina (para estudios futuros).

Una vez realizado el diseño de los oligonucleótidos se realiza la amplificación *in silico* de cada primer usando la herramienta disponible en:

<http://insilico.ehu.es/PCR/index.php?mo=Acinetobacter>.

Las figuras 2 y 3 muestran el resultado del análisis para la corrida *in silico* del gen *bla*<sub>OXA-51</sub> y *bla*<sub>OXA-23</sub>.



**Figura 3.** Determinación de la corrida *in silico* para los primers diseñados para detectar el gen *bla*<sub>OXA-51</sub>.

### In silico PCR Amplification

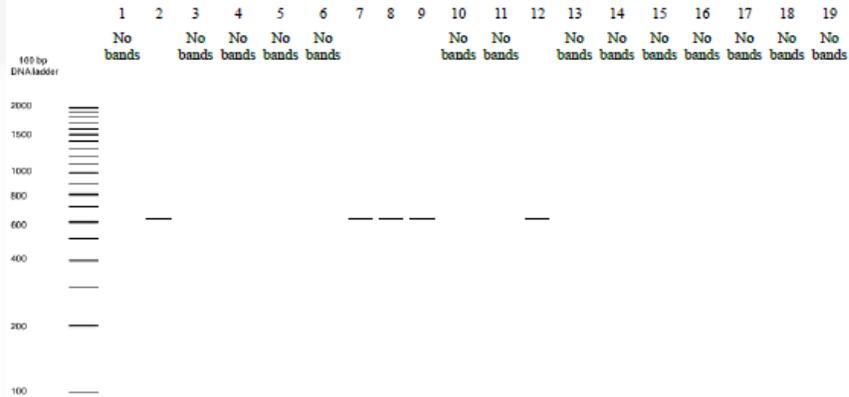
All records related to this experiment will be removed from server after 72 h, or you may [delete](#) them now.

Primer 1 -> 5'-TTCTGGTTGACGGTTCAGCA-3'  
 Primer 2 -> 5'-TGCCCAACCACTCTTCCAA-3'  
 Number of mismatches allowed: 2  
 Mismatch not allowed in last 2 nucleotides in 3' end.

Selected strains

- 7 - Acinetobacter baumannii B24007204
- 8 - Acinetobacter baumannii B3480715
- 9 - Acinetobacter baumannii B3480868
- 10 - Acinetobacter baumannii D1279779
- 11 - Acinetobacter baumannii MDR-T3
- 12 - Acinetobacter baumannii MDR-Z306
- 13 - Acinetobacter baumannii SF6

12 - Acinetobacter baumannii MDR-Z306



Posibles amplicones obtenidos

>NC\_011586 *Acinetobacter baumannii* AB0057 - nucleotides 585887-586502 (616 bp)

```
TTCTGGTTGACGGTTCAGCATAATTTAATAAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGACATAATCAG
GTGATTATCAATACTTTGATGAAAAAACACCTCAGGTGTGCTGGTTATTCAAACAGATAAAAAAATTA
ATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATGTGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAA
TGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGAAAAGG
TCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAAGTCCAGTCTATC
AGGAACTTGCAGCAGTATCGGTCTTGTATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGC
TGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGGTAGGACCATTAAAGGTTACGCCTATTCAAGAGGTA
GAGTTTGTTCCTCAATTAGCACATACACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAATAAATA
TGCTTCTTTAGAAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTTGGAAAGACTGGTTGGGCA
```

>NC\_021726 *Acinetobacter baumannii* B34807104 - nucleotides 1999147-1999762 (616 bp)

```
TTCTGGTTGACGGTTCAGCATAATTTAATAAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGACATAATCAG
GTGATTATCAATACTTTGATGAAAAAACACCTCAGGTGTGCTGGTTATTCAAACAGATAAAAAAATTA
ATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATGTGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAA
TGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGAAAAGG
TCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAAGTCCAGTCTATC
AGGAACTTGCAGCAGTATCGGTCTTGTATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGC
TGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGGTAGGACCATTAAAGGTTACGCCTATTCAAGAGGTA
GAGTTTGTTCCTCAATTAGCACATACACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAATAAATA
TGCTTCTTTAGAAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTTGGAAAGACTGGTTGGGCA
```

>NC\_021733 *Acinetobacter baumannii* B3480715 - nucleotides 1062706-1063321 (616 bp)

```
TTCTGGTTGACGGTTCAGCATAATTTAATAAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGACATAATCAG
GTGATTATCAATACTTTGATGAAAAAACACCTCAGGTGTGCTGGTTATTCAAACAGATAAAAAAATTA
ATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATGTGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAA
TGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGAAAAGG
TCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAAGTCCAGTCTATC
```

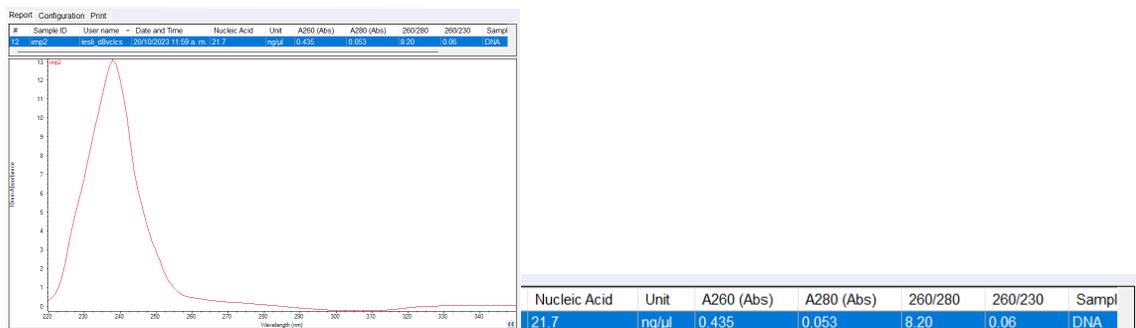
```

AGGAACTTGC GCGACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGC
TGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGGTAGGACCATTAAAGTTACGCCTATTCAAGAGGTA
GAGTTTGGTTCCCAATTAGCACATACACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAAAAATA
TGCTTCTTTAGAAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACTGGTTGGGCA
>NC_021729 Acinetobacter baumannii BJAB0868 - nucleotides 2039066-2039681 (616 bp) (Complementary strand shown)
TTCTGGTTGTACGGTTCAGCATAATTTAATAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGACATAATCAG
GTGATTTCATCAACTTTGATGAAAAAACACCTCAGGTGTGCTGGTTATTCAAACAGATAAAAAAATTA
ATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATGTGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAA
TGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGAAAAGG
TCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAGTCCCAGTCTATC
AGGAACTTGC GCGACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGC
TGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGGTAGGACCATTAAAGTTACGCCTATTCAAGAGGTA
GAGTTTGGTTCCCAATTAGCACATACACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAAAAATA
TGCTTCTTTAGAAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACTGGTTGGGCA
>NC_017171 Acinetobacter baumannii MDR-ZJ06 - nucleotides 2058283-2058898 (616 bp) (Complementary strand shown)
TTCTGGTTGTACGGTTCAGCATAATTTAATAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGACATAATCAG
GTGATTTCATCAACTTTGATGAAAAAACACCTCAGGTGTGCTGGTTATTCAAACAGATAAAAAAATTA
ATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATGTGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAA
TGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGAAAAGG
TCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAGTCCCAGTCTATC
AGGAACTTGC GCGACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGC
TGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGGTAGGACCATTAAAGTTACGCCTATTCAAGAGGTA
GAGTTTGGTTCCCAATTAGCACATACACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAAAAATA
TGCTTCTTTAGAAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACTGGTTGGGCA
    
```

**Figura 4.** Determinación de la corrida *in silico* para los primers diseñados para detectar el gen *bla*<sub>OXA-23</sub>.

#### 14.2. PCR punto final (individual y multiplex)

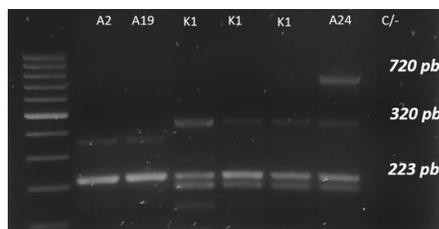
Una vez analizados *in silico* los primers, se llevó a cabo la extracción de DNA de las muestras mediante la técnica de ebullición. En esta técnica la muestra se somete a ebullición por quince minutos para romper la pared celular. Así mismo, se determinó la concentración y la calidad del DNA muestreado, la absorbancia a 260nm, 230nm y 280nm para saber si la muestra era óptima para la determinación por PCR. La Figura 4 muestra un ejemplo de la gráfica mostrada mediante el análisis en nanodrop para determinar la concentración y pureza del DNA obtenido.



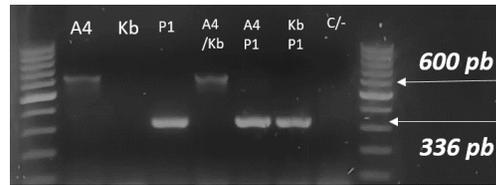
**Figura 5.** Análisis de la muestra obtenida de DNA mediante espectrofotometría. La concentración y calidad de la muestra se determinó utilizando el nanodrop ThermoFisher, USA. La gráfica muestra el pico a la mayor absorbancia obtenida.

Seguido de la obtención de la pureza y concentración de la muestra, se llevaron los PCRs de forma individual. Todos los genes diana se amplificaron con el tamaño de producto esperado, que oscilaba entre 180 pb y 800 pb, y no se observaron amplicones no específicos. De los 54 aislados CRAP previamente caracterizados fenotípicamente, 14 aislados fueron negativos. Debido a que eran resistentes a carbapenemasas, se probó la detección del gen *AmpC*, el cual resultó positivo en la totalidad de estos aislados. Para determinar la especificidad de la prueba, diez aislados susceptibles a los carbapenémicos dieron resultados negativos para la carbapenemasas, incluyendo *E. coli* ( $n=8$ ) y *P. aeruginosa* ( $n=2$ ) susceptible a carbapenémicos.

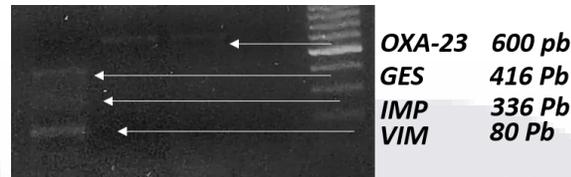
Después de probar los cebadores en un ensayo simple, se probaron posteriormente en un ensayo de PCR múltiple. Nuestra estrategia inicial fue diseñar una PCR múltiple única; sin embargo, a pesar de que todos los cebadores funcionaban como un solo complejo, cuando se combinaban en un formato múltiple, algunos cebadores se cebaban de manera errónea y conducían a múltiples amplicones. Por lo tanto, para tener un múltiple específico, se realizaron tres PCR múltiple diferentes.



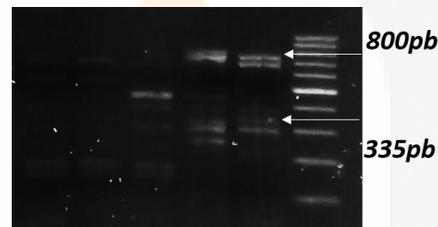
**Figura 6.** Determinación de *bla*<sub>OXA-51</sub> (223pb), *bla*<sub>OXA-1</sub> (320pb) y *bla*<sub>NDM</sub> (720pb).



**Figura 7.** Determinación de *bla*<sub>OXA-23</sub> (600pb), *bla*<sub>IMP</sub>(336pb).



**Figura 8.** Determinación de *bla*<sub>OXA-23</sub> (600pb), *bla*<sub>IMP</sub>(336pb), *bla*<sub>GES</sub>(416pb), *bla*<sub>VIM</sub>(80pb).



**Figura 9.** Determinación de *bla*<sub>KPC</sub> (800pb) y *bla*<sub>OXA-48</sub> (335).

### 14.3. Valores predictivos para la prueba PCR multiplex

Una vez realizados los PCRs para las cepas carbapenemasa y no-carbapenemasa resistentes, se analizaron la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, rango de descubrimiento falso, rango de omisión falso y valor kappa. La tabla 2 muestra el resumen del resultado de los ensayos para detectar genes de carbapenemasa. En relación a la prueba de sensibilidad, únicamente se logró el 80.61% de sensibilidad.

Debido a que en *P. aeruginosa* las carbapenemasas no son el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos, se probó añadir a la prueba la detección del gen que codifica para AmpC, sin embargo, solo se logró aumentar la sensibilidad al 92% con un valor kappa de 0.482.

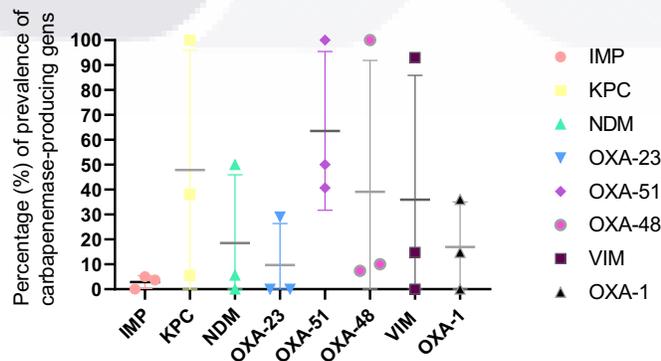
**Tabla 1.** Resumen del resultado de los ensayos de PCR para *P. aeruginosa*.

Prueba	Porcentaje (%)
Sensibilidad	80.61%
Especificidad	100
Valor Predictivo Positivo (PPV)	100
Valor Predictivo Negativo (NPV)	9
Rango de Descubrimiento Falso (FDR)	0
Rango de Omisión Falso (FRO)	0.9

**14.4. Detección de genes codificantes para carbapenemasas en aislados CRPA**

Del total de 44 aislamientos analizados; 30 aislamientos (68.18%) se consideraron productores de carbapenemasas ya que fueron positivos para al menos un gen de carbapenemasa analizado. El 63.33% (n=19) fueron positivas para *bla*<sub>OXA-51</sub>, el 23.33% (n=7) fueron positivas para *bla*<sub>OXA-1</sub>, el 20% (n=6) fueron positivas para *bla*<sub>VIM</sub>, el 13.3% (n=4) fueron positivas para *bla*<sub>OXA-48</sub>, el 6.66% (n=2) fueron positivas para *bla*<sub>IMP</sub>, al igual que para *bla*<sub>KPC</sub> (n=2) y *bla*<sub>NDM</sub> (n=2); solamente una cepa fue positiva para *bla*<sub>GES</sub> (3.33%). Ningún aislamiento fue positivo para *bla*<sub>OXA-23</sub>.

La mayoría de los aislados (60%, n=18) albergan un solo gen productor de carbapenemasa, incluidos: *bla*<sub>OXA-51</sub> (33.3%, n=10), *bla*<sub>OXA-1</sub> (10%, n=3), *bla*<sub>VIM</sub> (6.6%, n=2), *bla*<sub>OXA-48</sub>, (3.3%) n=1, *bla*<sub>GES</sub> (3.3%, n=1), y *bla*<sub>NDM</sub> (3.3%, n=1). Se encontraron 12 aislados (40%) que albergaban más de un gen productor de carbapenemasas. Los perfiles genotípicos se muestran en la Tabla 2.



**Figura 10.** Prevalencia de carbapenemasas.

**Tabla 2.** Caracterización genotípica de los aislados de CRPA.

ID	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Profile
PSHH 1	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 2	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 3	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 4	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 5	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>
PSHH 6	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>
PSHH 8	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 12	-	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	-	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>
PSHH 13	-	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	-	-	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
PSHH 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 16	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 18	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
PSHH 19	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
PSHH 20	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	-	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>
PSHH 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 24	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
PSHH 25	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 26	-	-	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	-	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>
PSHH 27	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 29	-	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
PSHH 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 31	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 32	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 33	-	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 34	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
PSHH 36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 38	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	<i>bla</i> <sub>GES</sub>
PSHH 39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 40	-	-	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	-	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>

PSHH 41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 42	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
PSHH 43	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
PSHH 44	-	-	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	-	-	-	<i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
PSHH 48	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 49	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>
PSHH 50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 51	-	-	-	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	-	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>
PSHH 52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSHH 54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 14.5. Epidemiología de CRPA

Con respecto a las características demográficas (Tabla 3 y 4), 25 aislados (56.8%) correspondían a hombres y 19 (43.2%) a mujeres. Dentro del rango de edades, la edad media de los pacientes fue de 53.45 años (IQ 40-67.75). Las cepas no productoras de carbapenemasas se presentaron con mayor frecuencia entre la categoría de edad de 15 a 49 años (57.1%,  $p=0.036$ ) y fueron obtenidas principalmente de sangre (14.3%,  $p=0.034$ ). En contraste, las cepas productoras de carbapenemasas se encontraron distribuidas mayormente en adultos mayores a 65 años (36.7%).

La mayor comorbilidad presentada fue diabetes mellitus (70.5%) seguido de COVID-19 (68.2%) y obesidad (61.4%). Cabe resaltar, que más de la mitad de las cepas productoras de carbapenemasas se encontraron en pacientes con COVID-19 (66.7%), obesidad (63.3%) y con hipertensión arterial (63.3%), así como en pacientes con índice de Charlson menor a 3 (33.3%).

Adicionalmente, la mayoría de las infecciones por CRPA se presentó cuando los pacientes sufrieron complicaciones tales como la ventilación mecánica (84.1%) y la neumonía asociada a la ventilación mecánica (84.1%), destacando que la mayoría de estas cepas también fueron productoras de carbapenemasas (86.7%).

**Tabla 3.** Características demográficas de pacientes con infección por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos

Características	Total n = 44	
	n	%
<b>Género</b>		
Hombre	25	56.8
Mujer	19	43.2
<b>Edad</b>		
15-49	17	38.6
50-64	13	29.5
>65	12	27.3
<b>Tipo de muestra</b>		
Orina	10	22.7
Respiratoria	30	68.2
Sangre	2	4.5
Biopsia	2	4.5
<b>Comorbilidades</b>		
Diabetes mellitus	21	47.7
Hipertensión arterial	25	56.8
Enfermedad renal crónica	3	6.8
Insuficiencia cardiaca	2	4.5
Hipotiroidismo	4	9.09
Obesidad	28	63.63
COVID-19	30	68.18
<b>Índice de Comorbilidad Charlson</b>		
<3	32	72.72
≥3	12	27.27
<b>Complicaciones</b>		
Ventilación mecánica	37	84.09
Neumonía asociada a la ventilación mecánica	37	84.09
Traqueotomía	25	56.81
Choque séptico	21	47.72
UCI	20	45.45
Días de intubación		18.8 (IQ 11.5- 24.25)
<b>Exposición a antibióticos 90 días previos</b>		
Si	37	84.09090909
No	7	15.90909091

**Tabla 4.** Características demográficas de pacientes con CRPA productora y no productora de carbapenemasas

Características	Total		Cepas CPO		Cepas no-CPO		p
	N=44		N=31		N=13		
	n	%	n	%	n	%	
<b>Género</b>							
Hombre	25	56.81	16	51.6	9	69.2	0.0516
Mujer	19	43.18	15	48.4	4	30.8	0.0064
<b>Edad</b>							
15-49	15	34.09	11	35.5	4	30.8	0.0594
50-64	17	38.63	10	32.3	7	53.8	0.0502
>65	12	27.27	10	32.3	2	15.4	0.2515
<b>Tipo de muestra</b>							
Orina	10	22.72	8	25.8	2	15.4	0.5246
Respiratoria	30	68.18	20	64.5	10	76.9	0.4202
Sangre	2	4.54	1	3.2	1	7.7	0.5164
Biopsia	2	4.54	2	6.5	0	0.0	0.3754
<b>Comorbilidades</b>							
Diabetes mellitus	21	47.72	16	51.6	5	38.5	0.4255
Hipertensión arterial	25	56.81	18	58.1	7	53.8	0.3261
Enfermedad renal crónica	3	6.81	2	6.5	1	7.7	0.8816
Insuficiencia cardiaca	4	9.09	3	9.7	1	7.7	0.8345
Hipotiroidismo	4	9.09	3	9.7	1	7.7	0.8345
Obesidad	28	63.64	18	58.1	10	76.9	0.5526
COVID-19	31	70.45	22	71.0	9	69.2	0.9748
<b>Índice de comorbilidad de Charlson</b>							
<3	31	70.45	21	67.7	10	76.9	0.2515
≥3	13	29.55	11	35.5	2	15.4	
<b>Complicaciones</b>							
Ventilación mecánica	37	84.1	26	83.9	11	84.6	0.9509
Neumonía asociada a la ventilación	37	84.1	26	83.9	11	84.6	0.9509
Traqueotomía	25	56.8	16	51.6	9	69.2	0.2817

Choque séptico	21	26.25	16	51.6	5	38.5	0.4255
UCI	20	25	14	45.2	6	46.2	0.9519
Días de intubación			19.7 (IQ 11- 23.5)		17.1 (IQ 14 -24)		

**Exposición a antibióticos 90 días previos**

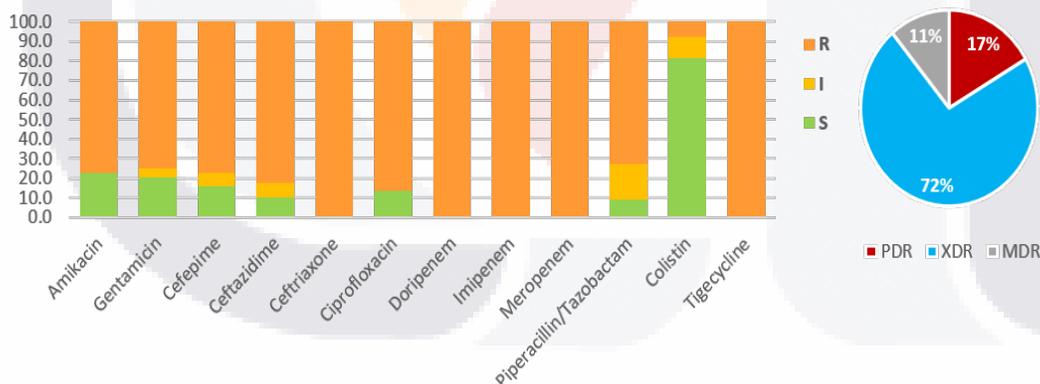
Si	0	28	44.4	9	69.2	0.0810
No	0	3	4.8	4	30.8	

Todos los valores se muestran como n (% del total) o la media (rangos intercuartílicos, Q1-Q3).

\*Los valores p identifican las diferencias significativas entr grupos. P> 0.05 es considerado estadísticamente significativo.

Los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de los aislados CRPA (n=44) se muestran en la Figura 10. Los aislados de *P. aeruginosa* presentaron mayor resistencia a ceftriaxona, imipenem, doripenem, meropenem y tigeciclina (100% cada uno), seguidos de ciprofloxacino (86,4%), ceftazidima (82,5%), cefepima (77,3%), amikacina (77,3%), gentamicina (75%) y piperacilina/tazobactam (72,7%). Destacando la susceptibilidad a la colistina, siendo sólo el 7,9% de la cepa resistente a este antibiótico.

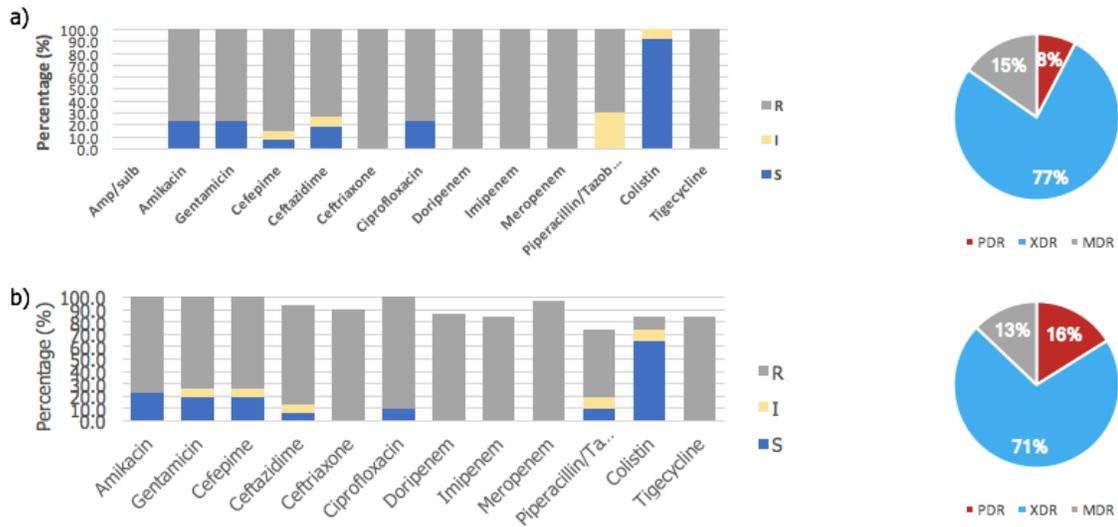
Los aislados de CRPA resultaron en PDR (16,7%), XDR (72,2%) y MDR (11,1%).



**Figura 11.** Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de CRPA.

Cuando comparamos los aislados CP-PA contra los no productores de carbapenemasas (Figura 11), se encontraron algunas diferencias en la resistencia a ceftazidima (96,4% vs 75%, p=0,0284), ciprofloxacino (90% vs 76,9%, p=0,3455), piperacilina/tazobactam (86,4% vs 100%, p=0,5343), colistina (20% vs 8,3%, p=0,6408) y resistencia a tigeciclina

(83,9% vs 100%), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Los aislados productores y no productores de carbapenemasas PDR se distribuyeron de manera similar (16,6% vs 7,1%, respectivamente,  $p = 0,6467$ ), así como los aislados XDR (67,4% vs 78,6%,  $p = 0,7222$ ) y MDR (12,9% vs 14,3%,  $p > 0,9999$ ).



**Figura 12.** Perfiles de Resistencia de CRPA no productora de carbapenemasas (a) y CRPA productora de carbapenemasas (b)

14.6. Asociación con los desenlaces clínicos

Dentro del análisis de los desenlaces clínicos, encontramos que entre los pacientes con infección por CRPA, el 13,63% (n=6) murió dentro de los primeros 30 días, aumentando al 27,7% (n=12) después de 90 días.

La tasa de mortalidad para CRPA fue la misma a los 30 y 90 días (13.63% en ambos casos, Tabla 5). Sin embargo, la mortalidad a los 90 días en pacientes con infecciones causadas por CP-PA, es mayor (16.6%) en comparación con la mortalidad a los 30 días (10%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. La duración de la estancia del paciente en el hospital (LOS) fue ligeramente mayor en pacientes con infecciones por CRPA no productora de carbapenemasa (44.14 días, IQ 12.8-56.8) en comparación con pacientes con infecciones CRAB (42.77 días, IQ 29.3-56.8,  $p = 0.1263$ , Tabla 5).

**Tabla 5.** Desenlaces en pacientes con infección por CRPA productora y no productora de carbapenemasas

Características	Total		Cepas CPO		Cepas no-CPO		p
	N=44		N=31		N=13		
	n	%	n	%	n	%	
Días de estancia			47.4 (IQ 15-58)		41.4 (IQ 28.5-55)		
Mortalidad a los 30 días	6	13.636363	3	9.6774193	3	23.076923	0.237
Mortalidad a los 90 días	6	13.636363	5	16.129032	1	7.6923076	0.456

Se realizó un análisis de regresión logística para examinar la influencia de las variables categóricas en la predicción de la mortalidad a 30 días. Los resultados sugirieron que la duración de la estancia influye en la mortalidad a 30 días (odds ratio [OR], 0,85; IC del 95%, 0,74 a 0,99,  $p=0,032$ , Tabla 6).

La producción de carbapenemasas parece no influir en la mortalidad a los 30 días en las infecciones por CRPA (Tabla 7).

Adicionalmente, se realizó un análisis simple de supervivencia (curvas Kaplan-Meier), donde las diferencias significativas se evaluaron mediante el análisis Log-rank. No se encontraron diferencias entre las tasas de mortalidad a 30 días y 90 días entre CP-PA y no CP-PA ( $p>0,999$  y  $p=0,1025$ , respectivamente, Tabla 4). Sin embargo, los porcentajes de supervivencia a los 30 días fue mayor comparada con el de los 90 días ( $p<0.0001$ ), sugiriendo una mayor mortalidad a los 90 días.

**Tabla 6.** Análisis de regresión logística para examinar la influencia de las variables categóricas en la predicción de la mortalidad a 30 días

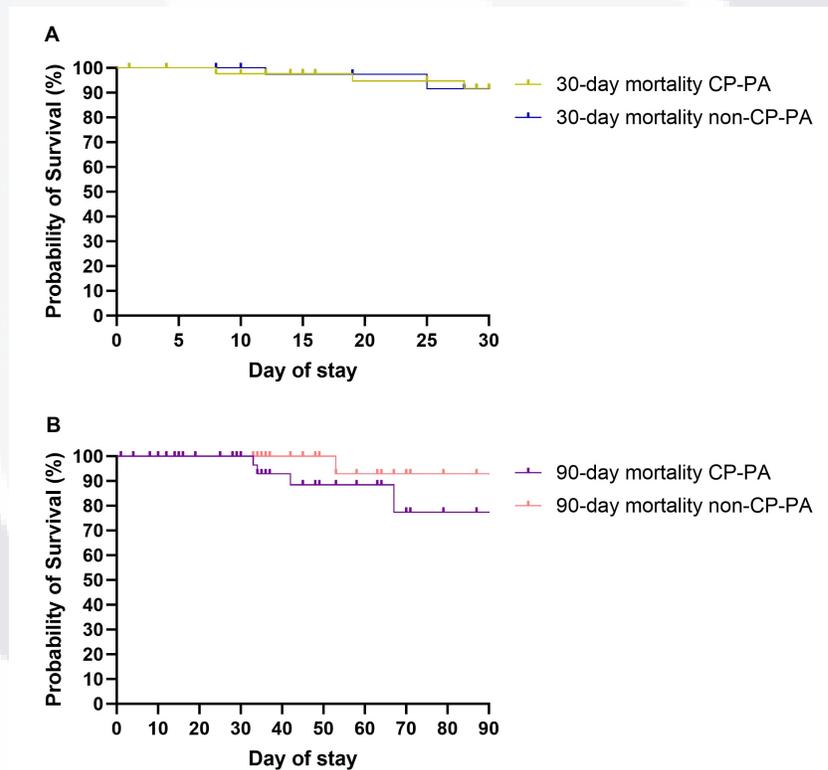
	Coefficient B	P	Odds Ratio	95% conf. interval
Constante	1.55	0.382	4.73	0.14 - 154.67
Días de intubación	0.12	0.115	1.13	0.97 - 1.31
Días de estancia	-0.16	<b>0.032</b>	0.85	0.74 - 0.99
ICU	-1.45	0.315	0.24	0.01 - 3.95

\*El análisis de regresión logística mostró que el modelo fue significativo ( $p = 0.006$ ,  $n = 44$ ).

**Tabla 7.** Modelo de regresión logística para examinar la influencia de los genes que codifican para carbapenemasas en la mortalidad a 30 días en pacientes con infecciones por CRPA.

Gen codificante	p-value	Odds Ratio	IC 95%
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	0.242	6.49	0.28 - 149.13
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	0.283	3.21	0.38 - 27.07
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	0.339	3.56	0.26 - 47.83
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	0.795	1.39	0.12 - 16.27

\*Logistic regression analysis showed that the model as a whole was not significant (Chi-squared = 3.35, p = 0.501, n = 44).



**Figura 13.** Supervivencia a los a) 30 días y b) 90 días de pues de la infección por cepas CP-PA y CRPA no productoras de carbapenemasas.

## 15. DISCUSIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la resistencia antimicrobiana representa un problema mundial, catalogando a ciertos patógenos como especies de prioridad crítica. En México, estudios previos han demostrado una alta frecuencia de resistencia a medicamentos en infecciones por *P. aeruginosa* (Morfin-Otero et al., 2012; Morfin-Otero et al., 2013; Alcázar-Curiel et al., 2014). Es por este motivo que decidimos realizar el presente estudio para el desarrollo de una PCR que nos permita realizar la detección de las carbapenemasas más prevalentes, así como describir las características epidemiológicas, demográficas y desenlaces clínicos en pacientes con cultivos positivos para *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, así como sus carbapenemasas asociadas.

La PCR es una técnica con alta precisión y un tiempo de respuesta rápido que actualmente es económica. Si bien existe el antecedente de PCR múltiple para detectar carbapenemasas, es importante conocer la prevalencia del tipo de carbapenemasas más prevalentes en nuestro medio para posteriormente desarrollar una prueba que nos permita detectar dichos genes. En el presente estudio, encontramos que se logró 80.61% de sensibilidad, esto debido a que existen otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos, por lo que de acuerdo a estos resultados se decidió agregar la dirección del gen para AmpC, con lo que aumentó la sensibilidad a un 92%, con una especificidad del 100%, otorgándole a esta prueba un valor predictivo positivo del 100%. Considerando que es un estudio fácilmente reproducible, con bajo costo y que tenemos al alcance de nuestro hospital, es una alternativa viable para realizar la detección de genes para las carbapenemasas con mayor prevalencia y así iniciar un tratamiento óptimo de manera oportuna.

En un estudio prospectivo publicado en 2023 describiendo la epidemiología global y desenlaces clínicos en infecciones por CRPA se encontró que en las infecciones causadas por CRPA eran más comunes en hombres (64%) que en mujeres (36%), con mayor prevalencia dentro del grupo de 47-73 años. De igual manera, se encontró una asociación significativa entre la presencia de comorbilidades (diabetes, enfermedad renal crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardíaca, índice de comorbilidad de Charlson <3) y la presencia de infección por CRPA. Dentro de los resultados obtenidos en nuestro estudio, encontramos que la mayor

proporción de pacientes que desarrollaron infección por CRPA corresponden a hombres, con una mayor frecuencia dentro del grupo de 15 a 49 años de edad. Las comorbilidades fueron altas en la mayoría de los pacientes, encontrando una mayor asociación a obesidad, la necesidad de ventilación mecánica invasiva y choque séptico. Encontramos que las dos últimas se encontraron mayormente asociadas a la presencia de cepas productoras de carbapenemasas, junto con la coinfección por COVID-19.

En 2018 se creó la Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia (INVIFAR) para estudiar la resistencia antimicrobiana en México. Si bien, en el estudio INVIFAR se encontró que la estancia en una unidad de cuidados intensivos aumenta el riesgo de adquirir infecciones por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, en nuestro estudio no se encontró una asociación significativa entre la estancia en UCI y la infección por dicha bacteria.

En nuestro estudio, se encontró una relación entre mayor cantidad de días de estancia intrahospitalaria con infecciones por CRPA, sobre todo en aquellas cepas productoras de carbapenemasas. En relación a la exposición a antibióticos en los 90 días anteriores a la toma de la muestra, encontramos que existe una correlación significativa con la presencia de cepas productoras de carbapenemasas. Los pacientes con mayor cantidad de días de estancia intrahospitalaria fueron aquellos hospitalizados fuera de la unidad de cuidados intensivos. Esto concuerda con otros estudios en los que la exposición previa a antibióticos se asoció con la adquisición de organismos multirresistentes y mayores probabilidades de mortalidad (Gontjes et al., 2022; Serra-Burriel et al., 2020). Esto es relevante, ya que sugiere que se deben tener mejor control de antimicrobianos fuera de UCI, así como medidas de prevención como lavado de manos y aislamiento de pacientes con infecciones por bacterias multirresistentes.

En un estudio prospectivo realizado en 2023 describiendo la epidemiología global de carbapenemasas y desenlaces clínicos en CRPA en un total de 972 muestras, se reportó que 18% de los pacientes con infección por CRPA morían dentro de los primeros 30 días de la infección, mientras que 25% morían dentro de los primeros 90 días. De igual manera, se describió que aquellos pacientes con infección por CRPA productoras de carbapenemasas tenían mayor mortalidad comparados con aquellos CRPA no productoras de

carbapenemasas (22% vs 12%). En nuestro estudio, encontramos una mayor mortalidad a los 90 días en pacientes con infecciones por CRPA. Así mismo, aquellos pacientes con infección causada por cepas productoras de carbapenemasas, tuvieron una mayor mortalidad a los 30 días comparado con aquellas cepas no productoras de carbapenemasas, aunque esta relación no fue significativa.

En el estudio INVIFAR se reportó que, de las muestras obtenidas, 29.7% correspondían a *P. aeruginosa* MDR, y 79.1% a *A. baumannii* MDR. En nuestro estudio, encontramos que de los aislados de *P. aeruginosa*, el 11.1% correspondían a la clasificación MDR, mientras que el 72.2% corresponden a XDR. Estos hallazgos son alarmantes, ya que esto traduce que en nuestro medio existe una mayor proporción de cepas extensivamente resistentes y panresistentes comparado con otros estados de la República Mexicana, lo cual dificulta el tratamiento efectivo de dichas infecciones ya que estos antibióticos tienen un alto costo y en muchas ocasiones no se encuentran disponibles en nuestro medio.

Si bien existen reportes sobre la epidemiología de carbapenemasas en diferentes especies de Enterobacterias en México, no encontramos algún estudio previo que reporte la prevalencia de genes para carbapenemasas en *P. aeruginosa* en nuestro país.

En la literatura mundial, se han descrito diferentes carbapenemasas encontradas en *P. aeruginosa*, donde se ha detectado la presencia de VIM, NDM, VEB, IMP y GES. En un estudio prospectivo realizado en 2023 describiendo la epidemiología global de carbapenemasas en CRPA en un total de 972 muestras, se reportó que 22% de las cepas resistentes a carbapenémicos portaban un gen para carbapenemasas, siendo KPC-2 la más común, seguido por VIM-2, NDM-1, IMP-1 y GES-5, se reportó que únicamente un aislado tenía presencia de un gen para carbapenemasas de clase D, OXA-23. En una revisión publicada en 2016 sobre la epidemiología de carbapenemasas en Latinoamérica, se describe que en México ha sido reportada la presencia de VIM-2 y VIM-11 en *P. aeruginosa*.

Dentro del grupo de bacterias productoras de carbapenemasas, encontramos una mayor proporción de blaOXA-51, seguido por blaVIM, así como la combinación de blaIMP - blaOXA-51, blaOXA-51 – blaVIM y bla-OXA-51 – blaOXA-1. Encontramos algunas diferencias entre

los perfiles de resistencia antimicrobianas entre aquellas bacterias productoras de carbapenemasas y las no productoras de carbapenemasas, aunque estas no fueron significativas.

Entre los perfiles de resistencia a los antibióticos se encontraron grandes tasas de resistencia. Estas resistencias eran esperadas ya que nuestro criterio de inclusión fue la presencia de organismos resistentes a carbapenémicos y varias cepas fueron aisladas durante la pandemia de COVID-19, que interfieren en los protocolos de control de infecciones y administración de antibióticos, y podrían haber afectado la difusión de la infección por CRPA en el hospital (Serapide et al., 2022, Segala et al., 2021; Vivo et al., 2022). Cabe destacar que se encontraron niveles más altos de susceptibilidad en CRPA a la colistina, lo que sugiere una mejor alternativa para tratar estas infecciones. Además, cuando comparamos organismos productores de carbapenemasas versus no productores, notamos una mayor resistencia a ceftazidima (98,4% vs 75%, respectivamente,  $p = 0,0114$ ) y colistina (63,9% vs 8,3%,  $p=0,0007$ ), lo que sugiere colistina nuevamente como una mejor alternativa para tratar organismos no productores de carbapenemasas.

## 16. CONCLUSIÓN

La infección por *P. aeruginosa* es una de las principales causas de infecciones riesgo a nivel nosocomial, lo cual implica un reto para el tratamiento de los pacientes portadores de esta infección, sobre todo en aquellos casos de cepas resistentes a antibióticos las cuales han aumentado en los últimos años. Primero, por la resistencia antimicrobiana intrínseca que albergan frente a beta-lactamasas, como AmpC para ambos organismos y, en segundo lugar, a la enorme plasticidad que albergan las bacterias para superar las defensas del huésped y el tratamiento antibiótico, que incluye la mutación de fármacos y la capacidad de las cepas de adquirir fácilmente plásmidos que median la resistencia a una gran variedad de antibióticos, incluidos los carbapenémicos.

Las pruebas moleculares para detección de genes de resistencia a carbapenémicos son un estudio altamente sensible y específico para detectar infecciones por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, lo cual es útil para iniciar tratamiento dirigido de manera temprana y evitar la propagación de cepas resistentes, así como los desenlaces clínicos desfavorables presentes en pacientes con infecciones causadas por este tipo de microorganismos.

Los patrones de carbapenemasas más prevalentes en las cepas de CRPA de nuestro hospital son blaOSA-51, bla-OXA-1, blaVIM, blaIMP - blaOXA-51, blaOXA-51 – blaVIM y bla-OXA-51 – blaOXA-1.

Nuestro estudio muestra que existe una asociación entre la presencia de comorbilidades tales como obesidad, infección por COVID19, así como la necesidad de ventilación mecánica invasiva y exposición previa antibióticos con la presencia de infecciones causadas por CRPA productoras de carbapenemasas, presentando mayor mortalidad a los 30 días.

Estos hallazgos nos permitirán establecer una vigilancia epidemiológica dentro de nuestro hospital, así como orientación sobre el tipo de antibióticos que son más útiles en las infecciones causadas por estas bacterias para lograr un mayor control en el uso de antibióticos de amplio espectro.

## 17. GLOSARIO

**-Antibiograma:** recopilación que presenta el porcentaje de organismos susceptibles a un antimicrobiano determinado.

**-Antimicrobiano/antibiótico:** medicamento usado para tratar las infecciones causadas por bacterias y otros microorganismos.

**-Bacteria Gram positiva:** aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram.

**-Bacteria Gram negativa:** aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram y lo hacen de un color rosado tenue.

**-Cultivo microbiológico:** un cultivo es la forma en la que se hacen crecer los microorganismos (colonias) en una superficie sólida (agar) o en medio líquido (caldo) e incluso en células (línea celular) y es utilizado como el método principal para poder estudiar a los agentes causales de enfermedades, y saber si se trata de bacterias, hongos, virus, parásitos o algas.

**-Microorganismo susceptible (S):** cuando un microorganismo se inhibe in vitro con una concentración de antimicrobiano asociado a una alta probabilidad de éxito terapéutico.

**-Microorganismo con susceptibilidad intermedia (I):** cuando un microorganismo se inhibe in vitro a una concentración de antimicrobiano con probabilidad incierta de éxito terapéutico.

**-Microorganismo resistente (R):** cuando un microorganismo se inhibe in vitro a una concentración de antimicrobiano asociado a una alta probabilidad de falla terapéutica.

**-Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana:** aquellas pruebas que permiten detectar resistencias antimicrobianas en patógenos comunes para poder establecer un tratamiento en infecciones específicas. Están basadas en la disminución o inhibición del crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo en presencia de cantidades conocidas de antimicrobianos.

**-Resistencia antimicrobiana:** capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de uno o más antimicrobianos.

**-Tinción de Gram:** tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias.

## 18. REFERENCIAS

1. Almasaudi, S.B. (2018). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci* 25(3):586–596
2. Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289(1036):321–33
3. Åkerlund, A., Jonasson, E., Matuschek, E., Serrander, L., Sundqvist, M., Kahlmeter, G., the RAST Study Group, (2020). EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(11): 3230–3238. doi: 10.1093/jac/dkaa333
4. Bedenic, B., Plecko, V., Sardelic, S., Uzunovic, S., and Godic-Torkar, K. (2014). Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria: Laboratory Detection and Clinical Significance. *Biomed. Res. Int.* 841951. doi: 10.1155/2014/841951
5. CDC. (2022). COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; <https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>
6. Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, Carneiro F, Dinis-Ribeiro M, Figueiredo C, Keevil CW, Azevedo NF, Vieira MJ. (2011). PNA-FISH as a new diagnostic method for the determination of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol.* (14)11:101. doi: 10.1186/1471-2180-11-101. PMID: 21569555; PMCID: PMC3112065.
7. Chalhoub, H., Saenz, Y., Rodriguez-Villalobos, H., Denis, O., Kahl, B. C., Tulkens, P. M., et al. (2016). High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 740–743. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.012
8. Cruz-López F., Martínez-Meléndez A., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Maldonado-Garza, H.J., Garza-González, E. (2022). Efficacy and In vitro activity of novel antibiotics for infections with carbapenem-resistant Gram-Negative pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:884365. doi: 10.3389/fcimb.2022.8844365
9. Delgado-Valverde, M., Conejo, M. D. C., Serrano, L., Fernandez-Cuenca, F., and Pascual, A. (2020). Activity of cefiderocol against high-risk clones of multidrug-resistant *Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

- aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J. Antimicrob. Chemother. 75, 1840–1849. doi: 10.1093/jac/dkaa117
10. Farra, A., Islam, S., Stralfors, A., Sorberg, M., and Wretling, B. (2008). Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. Int. J. Antimicrob. Agents 31, 427–433. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.12.016
  11. Frere, J. M., Galleni, M., Bush, K., and Dideberg, O. (2005). Is it necessary to change the classification of beta-lactamases? J. Antimicrob. Chemother. 55, 1051–1053. doi: 10.1093/jac/dki155
  12. Garza-González, et al. (2019) A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. PLoS One. 14(3): e0209865
  13. Hayden, M. K., and Won, S. Y. (2018). Carbapenem-sparing therapy for extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: The search continues. JAMA 320 (10), 979–981. doi: 10.1001/jama.2018.12565
  14. Hall, B. G., and Barlow, M. (2005). Revised Ambler Classification of {Beta}-Lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 55 (6), 1050–1051. doi: 10.1093/jac/dki130
  15. Harris, P. N. A., Tambyah, P. A., Lye, D. C., Mo, Y., Lee, T. H., Yilmaz, M., et al. (2018). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E. coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream Infection and ceftriaxone resistance: A randomized clinical trial. JAMA 320 (10), 984–994. doi: 10.1001/jama.2018.12163
  16. Idelevich EA, Nix ID, Busch JA, Sparbier K, Drews O, Kostrzewa M, Becker K. (2021). Rapid Simultaneous Testing of Multiple Antibiotics by the MALDI-TOF MS Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay. Diagnostics (Basel). Sep 29;11(10):1803. doi: 10.3390/diagnostics11101803. PMID: 34679499; PMCID: PMC8534412.
  17. Jain, R., Danziger, L.H. (2004). Multidrug-resistant Acinetobacter infections: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother 38(9):1449-1459.
  18. Karlowsky, J. A., Kazmierczak, K. M., De Jonge, B. L. M., Hackel, M. A., Sahm, D. F., and Bradford, P. A. (2017). *In vitro* activity of aztreonam-avibactam against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolated by clinical

- laboratories in 40 countries from 2012 to 2015. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00472-17. doi: 10.1128/AAC.00472-17
19. Karlowsky, J. A., Lob, S. H., Raddatz, J., Depestel, D. D., Young, K., Motyl, M. R., et al. (2020). *In vitro* activity of imipenem/relebactam and ceftolozane/tazobactam against clinical isolates of Gram-negative bacilli with difficult-to-treat resistance and multidrug-resistant phenotypes - SMART United States 2015-2017. *Clin. Infect. Dis.* doi: 10.1093/cid/ciaa381 [Epub ahead of print].
  20. Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. (2000). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3322–3327. doi: 10.1128/aac.44.12.3322-3327.2000
  21. Medina, M-J., Legido-Quigley, H., Yang-Hsu, L. (2020). Antimicrobial resistance in one health. In: Masys, A., Izurieta, R., Reina Ortiz, M. (eds) *Global Health Security. Advanced Sciences and Technologies for Security Applications*. Springer, Cham. doi: 10.1007/783-030-2341-1\_10
  22. McCarthy, R.R., Larrouy-Maumus, G.J., Meiqi Tan, M.G.C., Wareham, D.W. (2021). Antibiotic Resistance Mechanisms and Their Transmission in *Acinetobacter baumannii*. In: Kishore, U. (eds) *Microbial Pathogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1313. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-030-67452-6\_7
  23. Mlynarcik P., Roderova M., and Kolar M. (2016). Primer evaluation for PCR and its application for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 9:1 doi: 10.5812/jjm.29314
  24. Nass, T., Oxacelay, C., Nordmann P. (2007). Identification of CTX-M-Type extended-spectrum- $\beta$  lactamase genes usign real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob Agemts Chemother.* 51(1):223-230. doi. 10.1128/AA.00611-06
  25. Potron A, Vuillemenot J, Puja H, Triponney P, Bour M, Valot B et al., (2019) ISAbal-dependent overexpression of eptA in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin. *J Antimicrob Chemother* 74:2544–2550
  26. Santajit S, Indrawattana N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:2475067. doi: 10.1155/2016/2475067. Epub 2016 May 5. PMID: 27274985; PMCID: PMC4871955.

27. Stone, M.R.L. Butler, M.S., Phentsang, W., Cooper, M.A., Blaskovich, M.A.T. (2018). Fluorescent antibiotics: new research tools to fight antibiotic resistance. *Trends in biotechnology*, 3(5), 523-53. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.01.004
28. Tada, T., Shimada, K., Satou, K., Hirano, T., Pokhrel, B. M., Sherchand, J. B., et al. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in nepal coproducing metallo-beta-lactamases and 16S rRNA methyltransferases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00694-17. doi: 10.1128/AAC.00694-17
29. Tan, T. Y. (2003). Use of molecular techniques for the detection of antibiotic resistance in bacteria. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3(1), 93–103. doi:10.1586/14737159.3.1.93
30. Tehrani KH, Martin, NI. (2018)  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: an update. *Medchemcomm* 9(9):1439–1456
31. Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., and Landman, D. (2006). Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1633–1641. doi: 10.1128/aac.50.5.1633-1641.2006
32. Rodriguez-Martinez, J. M., Poirel, L., and Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4783–4788. doi: 10.1128/aac.00574-09
33. Silveira MC, Azevedo da Silva R, Faria da Mota F, Catanho M, Jardim R, Guimarães ACR et al (2018) Systematic identification and classification of  $\beta$ -lactamases based on sequence similarity criteria:  $\beta$ -lactamase annotation. *Evol Bioinform Online* 14:1176934318797351
34. Vasala A., et al., (2020). Modern tools for rapid diagnostics of antimicrobial resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:308. doi: 10.3389/fcimb.2020.00308
35. Vera-Leiva, A., Barria-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Doínguez, M., Bello.Toledo, H., gonzález-Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>

36. Watanhiki, M., et al., (2020). Single-Tube multiplex polymerase chain reaction for de detection of genes encoding Enterobacteriaceae carbapenemase. *JPN. J. Infect. Dis.*, 73, 166-172
37. WHO (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Obtenido de: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. 01.Dic.2022
38. Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., and Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* Infections: A century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 30 (1), 409–447. doi: 10.1128/CMR.00058-16
39. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Apr;47(4):399-403. doi: 10.1093/jac/47.4.399. Erratum in: *J Antimicrob Chemother* 2001 Jul;48(1):161. PMID: 11266410.
40. Yoon, E-J., Jeong, S.H. 2021. Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicv.2021.1405
41. Zhao W.-H., Hu Z.-Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology.* 39(1):79–101. doi: 10.3109/1040841x.2012.691460

## 19. ANEXOS

**Anexo A.** Lista de secuencias para la detección de genes de resistencia a partir del ADN bacteriano.

GRUPO DE CARBAPENEMASAS	TAMAÑO DEL AMPLCON	SECUENCIA DE PRIMERS	Tm (°C)	REERENCIAS
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	335	5'-ATT ATC GGA ATG CCT GCG GT-3'	57	Este estudio
		5'-CGT CGA GCC AGA AAC TGT CT-3'	57.1	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	185	5'-CGA AAA ACA CAG CGG CAC TT-3'	56.8	Este estudio
		5'-GAA TCT CGT TCC CCT CTG CC-3'	57.7	
<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	223	5'-TTT TGG CTG GTG GGT CCT TT-3'	57.4	Este estudio
		5'-GAG GCT GAA CAA CCC ATC CA-3'	57.7	
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	720	5'-ATA TTA TGC ACC CGG TCG CG-3'	57.7	Este estudio
		5'-TCA TCA CGA TCA TGC TGG CC-3'	57.7	
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	800	5'-GCC GTC TAG TTC TGC TGT CT-3'	56.7	Este estudio
		5'-CGC TGT GCT TGT CAT CCT TG-3'	56.8	
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	420	5'-GCA GCG CCA GTG CAT CAA C-3'	60.3	Maynard et al., 2003
		5'-CCG CAT CAA ATG CCA TAA GTG-3'	54.8	
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	600	5'-TTC TGG TTG TAC GGT TCA GCA-3'	56.6	Este estudio
		5'-TGC CCA ACC AGT CTT TCC AA-3'	57.1	
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	336	5'-TCA CTT GGT TTG TGG AGC GT-3'	57.1	Este estudio
		5'-TTT GCG TCA CCC AAA TTG CC-3'	54.7	
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	416	5'-TCA CTT GGT TTG TGG AGC GT-3'	57.1	Este estudio
		5'-TTT GCG TCA CCC AAA TTG CC-3'	57.1	

## Anexo B. Formato de recolección de datos

Expediente:

Diagnóstico:

Edad:

Lugar dónde se tomó la muestra:

Sexo:

Fecha de toma de muestra:

Fecha de ingreso:

Sitio anatómico de muestra:

Fecha de toma de cultivo:

Aislamiento:

Días transcurridos del ingreso a la toma decultivo:

Perfil de resistencia

:

Características	Número de cepa
<b>Género</b>	
Hombre	

Mujer	
<b>Edad</b>	
15-49	
50-64	
>65	
<b>Tipo de muestra</b>	
Orina	
Respiratoria	
Sangre	
Biopsia	
<b>Comorbilidades</b>	
Diabetes mellitus	
Hipertensión arterial	
Enfermedad renal crónica	
Insuficiencia cardiaca	
Hipotiroidismo	
Obesidad	
COVID-19	
<b>Índice de Comorbilidad Charlson</b>	
<3	
≥3	
<b>Complicaciones</b>	
Ventilación mecánica	
Neumonía asociada a la ventilación mecánica	
Traqueotomía	
Choque séptico	
UCI	
Días de intubación	
<b>Exposición a antibióticos 90 días previos</b>	
Si	
No	
<b>Carbapenemasas detectadas</b>	

### **Anexo C.** Cronograma de actividades.

**FASE 1.** Objetivo: Obtención de aislados bacterianos con perfiles de resistencia a carbapenémicos.

<b>Fecha</b>	<b>Objetivo</b>
06 de enero de 2023	Entrega de microtubos con medio de cultivo BHI + glicerol, para la recolección de las muestras.
13 de enero de 2023	Recolección de microtubos con cepas aisladas.
20 de enero de 2023	Recolección de microtubos con cepas aisladas.
27 de enero de 2023	Recolección de microtubos con cepas aisladas.
03 de febrero de 2023	Recolección de microtubos con cepas aisladas.
10 de febrero de 2023	Recolección de muestras biológicas.

**FASE 2.** Objetivo: Desarrollo de PCR Multiplex

<b>Fecha</b>	<b>Objetivo</b>
17 de febrero de 2023	Diseño de oligonucleótidos
24 de febrero de 2023	Análisis de secuencias
03 de marzo de 2023	Diseño de PCR in silico
10 de marzo de 2023 – 19 de mayo de 2023	Extracción de ADN, Geles de agarosa y producto de PCR de cada gen
23 mayo de 2023 – 2 de junio de 2023	Evaluar sensibilidad y especificidad

**FASE 3.** Objetivo: Asociación con desenlaces clínicos y análisis estadístico

<b>Fecha</b>	<b>Objetivo</b>
3 de julio de 2023 – 31 de agosto de 2023	Recopilación de datos clínicos de cada paciente de registro electrónico
1 de septiembre de 2023 – 30 de septiembre de 2023	Análisis estadístico
1 de octubre de 2023 – 31 octubre de 2023	Descripción de resultados

### **Anexo D.** Operacionalización de las variables

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Unidad de medición</b>	<b>Valores posibles</b>
<b>Variables dependientes</b>				
<b>Mortalidad a 30 días</b>	Tasa de muerte a los 90 días	Categorica	N/A	N/A
<b>Variables independientes</b>				

<b>Edad</b>	Años que ha vivido la persona a su ingreso	Continua	años	18-99
<b>Sexo</b>	Característica fisiológica y sexual con la que se nace	Dicotómica	N/A	Mujeres- 0 Hombres-1
<b>Obesidad</b>	Índice de masa corporal mayor o igual a 30	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Hipertensión arterial sistémica</b>	El paciente tiene antecedente de padecer hipertensión arterial sistémica	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Diabetes mellitus</b>	Se refiere si el paciente tiene antecedente de padecer diabetes mellitus	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Insuficiencia cardiaca congestiva</b>	Se refiere si el paciente tiene antecedente de padecer insuficiencia cardiaca congestiva	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>COVID-19</b>	Enfermedad por coronavirus 2019 con prueba PCR-RT para SARS-CoV2 positiva	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Hipotiroidismo</b>	Síndrome resultado de la disminución de la producción de tiroxina y triiodotironina por la glándula tiroides	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Ventilación mecánica invasiva</b>	Procedimiento de respiración artificial mediante intubación orotraqueal o traqueotomía	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Neumonía asociada a la ventilación mecánica</b>	Neumonía adquirida 48 horas después de la intubación orotraqueal	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Traqueotomía</b>	Procedimiento quirúrgico mediante el	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0

	cual se realiza una incisión en la tráquea			
<b>Choque séptico</b>	Infección generalizada que ocasiona insuficiencia orgánica e hipotensión con requerimiento de amins vasoactivas	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Estancia en Unidad de Cuidados Intensivos</b>	Requerimiento del paciente de estancia en una Unidad de Cuidados Intensivos	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Días de intubación</b>	Días de duración de intubación orotraqueal para mantener ventilación mecánica invasiva	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Exposición a antibióticos 90 días previos</b>	Haber recibido al menos un esquema antibiótico 90 días previos a la toma del cultivo	Dicotómica	N/A	Si-1 No-0
<b>Carbapenemasas</b>	Gen que codifica a una carbapenemasa detectado mediante PCR Multiplex	Categorica	N/A	Presencia-1 Ausencia-0