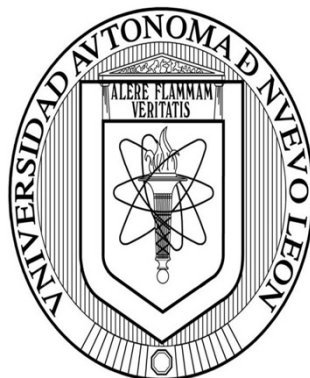


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DE ENTEROBACTERALES RESISTENTES A
CARBAPENÉMICOS EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN MÉXICO

POR

Q.B.P. MIREYA YAMILE OLIVARES MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2025

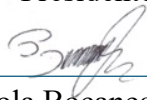
CARACTERIZACIÓN DE ENTEROBACTERIALES RESISTENTES A
CARBAPENÉMICOS EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN MÉXICO

Comité de Tesis



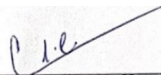
Dra. Licet Villarreal Treviño

Presidente



Dra. Paola Bocanegra Ibarias

Secretario



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal



Dra. Mayra Alejandra Gómez Govea

Vocal



Dra. Verónica Villarreal Salazar

Vocal



Subdirector de Posgrado

Dra. Katiushka Arevalo Nino



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN DE ENTEROBACTERIALES RESISTENTES A
CARBAPENÉMICOS EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN MÉXICO

Dirección de Tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño

Director



Dra. Paola Bocanegra Ibarias

Director externo

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo material contenido en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Licet Villarreal, por brindarme su apoyo y, sobre todo, por confiar en mí para ser mi directora de tesis. Su guía, paciencia y motivación fueron una inspiración constante que me impulsó a dar lo mejor de mí en cada etapa de este trabajo.

A la Dra. Paola Bocanegra, gracias por compartir sus conocimientos con generosidad, por estar siempre dispuesta a ayudar y por recordarme que el aprendizaje es un camino que se recorre con pasión.

Al Consejo nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT), gracias porque su beca no solo financió este trabajo, sino que me permitió dedicarme a él con el compromiso y la entrega que merecía.

A mis tutoras, la Dra. Mayra Gómez y la Dra. Verónica Villarreal, gracias por su tiempo, sus consejos en la ciencia, donde a través de la paciencia, humanidad y dedicación todo se puede hacer.

A mis hermanas, Dayana y Yuliana, gracias por estar siempre escuchándome y apoyándome en cada paso, así como también ayudándome a cuidar a Mocca y a Ron mientras yo estaba ocupada en la fase experimental del trabajo.

A mi novio Emilio Guerrero, gracias por tu apoyo incondicional, por tu paciencia y por entender las largas horas dedicadas a este trabajo. Gracias por estar a mi lado en los momentos de estrés y cansancio, y por animarme a seguir adelante cuando las fuerzas parecían agotarse. Tu comprensión, cariño y compañía fueron un refugio y un impulso para culminar esta etapa.

DEDICATORIAS

A ustedes, **Mireya Martínez** y **Julio Olivares**, mis más grandes maestros y mis más firmes pilares.

Este trabajo es el resultado visible de dos años de esfuerzo, pero detrás de cada página está su amor, su sacrificio y su fe en mí. Gracias por las noches en vela, por las palabras de aliento cuando quise rendirme, por los abrazos que me devolvieron la calma y por los silencios que me dieron fuerza.

Ustedes me enseñaron que los sueños no se alcanzan por casualidad, sino con trabajo, constancia y corazón. Cada paso que doy en la vida lleva impreso su ejemplo, y cada logro que obtengo es una extensión de todo lo que ustedes me han dado.

Este logro es tan suyo como mío. Si algún día mis hijos me ven con el mismo amor y orgullo con que yo los veo a ustedes, sabré que he hecho bien las cosas.

Gracias por darme las alas para volar y las raíces para volver.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades de los Enterobacteriales	3
2.1.1. Género <i>Klebsiella</i> : generalidades y patologías.....	5
2.1.2 Género <i>Escherichia</i> : generalidades y patologías	6
2.1.3 Género <i>Enterobacter</i> : generalidades y patologías	7
2.1.4 Género <i>Citrobacter</i> : generalidades y patologías	8
2.1.5 Género <i>Morganella</i> : generalidades y patologías.....	8
2.1.6 Género <i>Providencia</i> : generalidades y patologías	9
2.2 Factores de virulencia.....	9
2.2.1 Cápsula.....	9
2.2.2. Lipopolisacáridos	10
2.2.3. Sideróforos.....	10
2.2.4. Fimbrias o pili	11
2.3. Resistencia a antimicrobianos.....	11
2.3.1. Mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos.....	12
2.3.1.1. β -lactamasas Clase A.....	13
2.3.1.2 β -lactamasas de clase B	14
2.3.1.3 β -lactamasas tipo AmpC.....	15
2.3.1.4 β -lactamasas clase D	16
2.3.2. Mecanismos no enzimáticos de resistencia a carbapenémicos	16
2.4. Epidemiología de enterobacteriales resistentes a antibióticos e índice de mortalidad	18
2.4.1. Género <i>Klebsiella</i>	18
2.4.2. Género <i>Escherichia</i>	19
2.4.3. Género <i>Enterobacter</i>	20
2.4.4. Género <i>Citrobacter</i>	20
2.4.5 Género <i>Morganella</i>	21
2.4.6 Género <i>Providencia</i>	21
2.5. Diseminación de enterobacteriales resistentes a carbapenémicos	21
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS DEL TRABAJO	27
5.1 Objetivo general	27

5.2 Objetivos específicos	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1. Estrategia general	27
6.2. Aislamientos clínicos.....	27
6.2.1. Selección de aislamientos resistentes a carbapenémicos	28
6.2.2. MALDI-TOF MS.....	28
6.3. Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos	29
6.3.1. Preparación del inóculo	29
6.3.2. Difusión en disco.....	29
6.3.3. Preparación de la placa para Microdilución en caldo.....	30
6.4. Determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos	32
6.4.1. Determinación de la producción de carbapenemasas	32
6.4.1.1. Prueba de CarbaNP	32
6.4.1.2. Método modificado de inactivación de carbapenémicos.....	33
6.4.2.1. Obtención de ADN por lisis térmica	34
6.4.2.2. Detección de β -lactamasas de clase A	34
6.4.2.3. Detección de genes que confieren resistencia a carbapenémicos	35
6.4.3 Caracterización e identificación del plásmido portador de resistencia a carbapenémicos	36
6.4.3.1. Identificación del patrón electroforético de plásmidos.....	37
6.4.3.2. Conjugación bacteriana	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Identificación y origen de los aislamientos clínicos	39
7.2 Detección de producción de carbapenemasas	40
7.3 Detección de genes de BLEE y carbapenemasas.....	40
7.3 Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos	42
7.4 Perfil de plásmidos	44
7.5 Transferencia horizontal de genes de resistencia a carbapenémicos.....	45
8. DISCUSIÓN.....	47
9. CONCLUSIÓN	54
10. Perspectivas	55
11. Bibliografía.....	56

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias han evolucionado más rápido de lo que pensábamos y con ello las industrias farmacéuticas han tenido grandes retos para el desarrollo de nuevos antibióticos contra estas. Las infecciones ocasionadas por gramnegativos en el ámbito hospitalario son las más alarmantes, debido que estos microorganismos pueden presentar resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo a los carbapenémicos, por lo que el tratamiento para tratar las infecciones de esta índole es muy limitado.

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande de bacilos gramnegativos con importancia clínica, y varios de los microorganismos que conforman esta familia son patógenos oportunistas (Pérez Guerrero *et al.*, 2014). Estos microorganismos pueden presentarse en el ámbito hospitalario, pero también en la comunidad, los factores de riesgo que podemos observar para la propagación de estas bacterias en ambos ámbitos son hacimientos, práctica deficiente de control de infecciones y falta de higiene.

La resistencia a los antimicrobianos es una de las 10 principales amenazas de salud pública, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en febrero del 2017 se extendió una lista con tres categorías indicando la prioridad con el fin de ver la urgencia de nuevos antibióticos. El grupo de prioridad crítica se incluyen *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* primordialmente, además de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp. y *Proteus* spp (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Las bacterias son capaces de inactivar los antibióticos por medio de múltiples mecanismos de resistencia, y el más importante que tienen los enterobacteriales es la producción de carbapenemasas (Suárez y Gudíol, 2009). Estas β -lactamasas son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico para inactivar el antibiótico. Esta resistencia puede ser de manera natural como *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp. con las penicilinas o bien adquirirlas por medio de regiones móviles a través de transposones, plásmidos o intrones (Sánchez *et al.*, 2012).

De acuerdo con la clasificación de Ambler en base a la estructura molecular y secuencia de aminoácidos de las β -lactamasas, las principales carbapenemasas de enterobacteriales

en la actualidad son KPC (clase A), VIM, IMP, NDM (clase B o metalobatalactamasas) y OXA-48 (clase D)(Pintos *et al.*, 2020).

Las infecciones causadas por bacterias resistentes causan mayor morbilidad y mortalidad en la sociedad, la monitorización de estas bacterias resistentes a carbapenémicos debe ser globalizada, para evitar o limitar la propagación a nivel mundial (Ignacio, 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los Enterobacteriales

El orden de Enterobacteriales cuenta con siete familias: *Enterobacteriaceae*, *Budviciaceae*, *Yersiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Morganellaceae* y *Hafniaceae*.

La familia *Enterobacteriaceae* es parte del phylum Proteobacterias y clase: Gammaproteobacteria; este nombre fue propuesto por Rahn en 1937 (Wiley, 2005). Esta familia contiene un gran número de géneros y especies que están relacionada bioquímica y genéticamente, sin embargo, muestran una heterogeneidad sustancial en su ecología, potencial de patogenicidad y rango de huéspedes.

De la familia *Enterobacteriaceae* se tiene una reevaluación constante respecto a la clasificación y nomenclatura de los géneros, especies y subespecies que la constituyen, debido al incremento durante los últimos 25 años de los microorganismos que forman parte de esta familia. En la primera edición de *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* se incluyeron 20 géneros y 76 especies, en 1994 en la novena edición se describieron 30 géneros y 107 especies (Farmer III *et al.*, 2010). En la actualidad con las nuevas técnicas que existen de hibridación y secuenciación de ácidos nucleicos, así como también la comparación de estructuras celulares y proteínas, se reevaluó la clasificación analizando la secuenciación del gen 16S de RNA ribosomal y en base a esto, aumentó el número de géneros y especies de 30 a 53 y de 107 a 170, respectivamente (Mobolaji, 2016).

El 95% de las cepas clínicamente significativas se reduce a 10 géneros y 25 especies, su localización principal es en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, pero también se pueden encontrar en agua y tierra. Estas bacterias están clasificadas como saprófitas. *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Serratia* spp., son las principales especies que causan infecciones intrahospitalarias a nivel mundial (UK Standards for Microbiology Investigations, 2013) y que tienen gran importancia clínica.

Las características que describen a esta gran familia es que son gramnegativos, anaerobios facultativos, con o sin movilidad, no forman esporas, no son ácido alcohol resistente, reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa con o sin presencia de gas, catalasa positiva, oxidasa negativa y se observan al microscopio como bastones rectos de 0.3-1.0 x 1.0-6.0µm (Rock y Donnenberg, 2014).

La familia *Erwiniaceae* describe principalmente el tipo *Erwinia* y los géneros *Buchnera*, *Pantoea*, *Tatunela*, *Paseolibacter* y *Wigglesworthia*, estas bacterias son catalasa positiva, oxidasa negativa y no producen hidrógeno de disulfuro ni indol, la mayoría de las bacterias de esta familia son Voges Proskauer positivos a excepción de algunas de ellas, por ejemplo, *Erwinia toletana* y *Erwinia oleae*. Los géneros de *Erwinia* y *Pantoea* son las principales especies de esta familia que causan patologías en humanos (Segarra, 2021).

La familia *Yersiniaceae* cuenta con seis géneros, de los cuales *Yersinia* y *Serratia* son los géneros tipo. Estas bacterias son móviles y no producen disulfuro de hidrógeno. La especie *Yersinia* es un agente zoonótico causante de tres grandes pandemias que disminuyeron la población mundial (Mobolaji, 2016).

Para la familia *Budviciaceae* encontramos bacterias con ornitina y lisina descarboxilasa negativa, producen sulfuro de hidrógeno y son incapaces de formar colonias en medios de cianuro de potasio. Los géneros que distinguen a la familia son *Budvicia*, *Pragia* y *Leminorella*. El género *Leminorella* spp. cuenta con tres especies capaces de hibridar el DNA causando bacteriemia e infecciones urinarias o en piel (Sharma *et al.*, 2016).

La familia *Hafniaceae* se describió con tres especies en el 2021, todas gramnegativas, capaces de reducir el nitrato, móviles por flagelos peritricos, oxidasa y lisina descarboxilasa negativas. El género tipo es *Hafnia* y los otros dos géneros incluidos en esta familia son *Edwardsiella* y *Obesumbacterium*. Se logran encontrar en la microbiota intestinal del humano y animales, pero también se han identificado en productos lácteos y cárnicos (Abbott y Janda 2007).

El género tipo de la familia *Pectobacteriaceae* es *Pectobacterium* patógeno de plantas, causando la pudrición blanda en la papa. A partir del 2021, por medio de análisis genómicos comparativos del gen ARNr 16S, se cuenta con ocho géneros capaces de producir ácido a partir de N-acetilglucosamina, sin producción de disulfuro de hidrógeno y no desdoblan la molécula de ornitina ni lisina. Estas bacterias son importantes por causar grandes pérdidas económicas al causar daño en los cultivos más importantes como son el arroz, maíz, papa y calla Lily (Guerrero *et al.*, 2021).

Abordando las bacterias de la familia *Morganellaceae* podemos encontrar a *Morganella* como el género tipo y *Arsenophonus*, *Cosenzaea*, *Moellerella*, *Photorhabdus*, *Proteus* y *Xenorhabdus* como los demás géneros involucrados. Estos géneros son oxidasa y arginina

descarboxilasa negativa. Esta familia es importante en infecciones nosocomiales y varias veces se presenta como patógeno oportunista en el tracto urinario (Forst *et al.*, 1997); *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* se asocian con nematodos entomopatógenos que tienen la capacidad sinérgica de reproducir y proliferar bacterias.

2.1.1. Género *Klebsiella*: generalidades y patologías

El termino *Klebsiella* fue nombrado por el bacteriólogo alemán Edwin Klebs. Este bacilo gramnegativo, se encuentra formando parte de la microbiota intestinal, de la boca y transitoriamente de la piel, puede producir enfermedades comunitarias y nosocomiales en humanos. Existen cuatro diferentes clasificaciones del género, en la actualidad se utiliza la de 1984 de Orskov (Cubero, 2015).

El género *Klebsiella* es capaz de fermentar la lactosa, tiene la enzima ureasa, es inmóvil y con la capacidad de formar una cápsula de polisacáridos como método de defensa contra los macrófagos, monocitos o neutrófilos (Vergara, 2015; Darby *et al.*, 2014). Esta bacteria la podemos encontrar en dos hábitats, el primero son las mucosas del tracto intestinal, nasofaríngeas (de humanos, animales) y plantas. El segundo hábitat es en ambientes acuáticos (Ej. aguas residuales, fábricas de papel, acabado de textiles).

El patógeno más importante de este género es *Klebsiella pneumoniae*, y es considerado una grave amenaza para la salud humana en todo el mundo al causar sepsis, neumonía, infecciones en heridas y en el tracto urinario. La tasa de detección intrahospitalaria va del 1- 6%, mientras que en heces patológicas va del 5-38% y en la piel difícilmente la encontramos dado que los gramnegativos no encuentran sus condiciones óptimas de crecimiento, y si se logra localizar simplemente se clasifica como microbiota transitoria (Echeverri y Catano, 2010).

Respecto a *Klebsiella rhinoscleromatis* es el agente causal del rinoscleroma que es un proceso infeccioso crónico granulomatoso que afecta al tracto respiratorio superior (nasofaringe). Esta bacteria es endémica de lugares como India, Indonesia, África central, México y en el resto del mundo ha sido poco reportada (Umphress y Raparia, 2018 ;Navazo y García, 2008). Sin embargo, con el aumento de migración, viajes y globalización se ha expandido a nuevos lugares. Esta bacteria se ha logrado distribuir por los importantes factores de virulencia que posee, por ejemplo, los polisacáridos

capsulares, principalmente el serotipo K3, que protege a la bacteria de la fagocitosis (Brandon y Raparia, 2018).

Klebsiella oxytoca es un patógeno oportunista responsable de infecciones en el tracto urinario, cuadro de gastroenteritis y bacteriemias nosocomiales. La frecuencia con la que encontramos este patógeno en los hospitales es menor que las otras especies.

2.1.2 Género *Escherichia*: generalidades y patologías

El género *Escherichia* comprende seis especies, suelen ser móviles (mediante flagelos peritricos) o no móviles, la mayor parte de las especies producen gas a partir de carbohidratos fermentables como la lactosa y pueden producir indol desdoblando la molécula de triptófano, además, bajo el microscopio se observa una forma de bastón con una pequeña cola.

La cepa tipo del género es *Escherichia coli*, que se localiza en el tracto intestinal de los humanos y otros vertebrados, donde la mayoría no son comensales patógenas, sin embargo, al ser saprófitos entéricos, si ese se encuentra fuera del tracto intestinal se pueden transformar a patógenos. Existen dos espectros de infección en este microorganismo: las infecciones entéricas y extraintestinales.

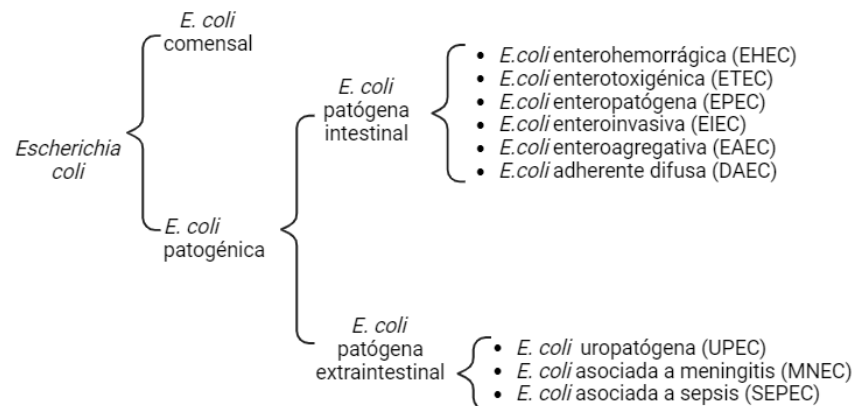


Figura 1. Clasificación de *E. coli* en tres grupos: comensal, patógeno intestinal y patógeno extraintestinal. Las cepas patógenas intestinales de este género son conocidas por causar diarrea, a continuación se describirán cada una de ellas:

- *E. coli* enterohemorrágica: producen diversos tipos de citotoxinas, neurotoxinas y enterotoxinas, incluyendo la toxina Shiga, causando diarrea sanguinolenta, que a la larga causa el síndrome urémico hemolítico. Normalmente es adquirido por el

consumo de carne mal cocida, por falta de higiene o por vía fecal-oral (Zboromyrska y Vila, 2012).

- *E. coli* enterotoxigénica: también conocida como la diarrea del viajero, produce dos toxinas, una termolábil y otra termoestable, capaces de producir diarreas acuosas con ayuda de las fimbrias (CFA I y CFAII). Esta bacteria se encuentra en infantes en países en vías de desarrollo (Rodríguez, 2012).
- *E. coli* enteropatógena: se asocia a diarreas acuosas agudas y crónicas, endémicas y epidémicas. La adherencia en las células del epitelio intestinal es dada por *coli-adherence-factor* (EAF) su principal factor de patogenicidad, para que la adhesión sea efectiva se necesita la síntesis intimina (proteína de membrana externa), que sirve como señal en la adherencia y esfacelamiento (Farfán *et al.*, 2016).
- *E. coli* enteroinvasiva: se asocia a la invasión del epitelio del colon, requiriendo de la mucinasa y adhesinas. Los genes que tiene esta bacteria para invadir son brindados por un plásmido de 140 MDa llamado *pInv*. Este tipo de diarrea se presenta en niños mayores de seis meses (Lopez, 2021).
- *E. coli* enteroagregativa: las fimbrias que expresa esta bacteria sirven para poder penetrar el epitelio intestinal, al igual que la enteroinvasiva, tiene un plásmido de 60 MDa que codifica para la toxina EASTi, para el incremento de mucosa y secreción para quedarse atrapada en el intestino y causar daño (Rodríguez, 2012).

2.1.3 Género *Enterobacter*: generalidades y patologías

El género *Enterobacter* se caracteriza por tener cepas no pigmentadas, no móviles, DNA-asa negativa, realizar la descarboxilación de la ornitina, es citrato y ureasa positiva; para la identificación a nivel de especie las pruebas como la hidrólisis de la esculina, dulcitol son de utilidad (Silva y Martínez, 2018).

Enterobacter cloacae es un microorganismo de la microbiota intestinal en humanos, a lo largo de los años su importancia a nivel intrahospitalario aumentó por ser un patógeno oportunista causante de bacteriemia, infecciones en el tracto urinario, infecciones respiratorias y abdominales. Sus vías principales de entrada son indirectas por medio de dispositivos de uso hospitalario y por la capacidad que presenta de producir biopelícula

en superficies inertes hasta encontrar el tiempo adecuado de colonizar al paciente (Tato *et al.*, 2016).

2.1.4 Género *Citrobacter*: generalidades y patologías

El género *Citrobacter* carece de cápsula y es móvil mediante flagelos peritricos, con un tamaño de 1.0 x 2.0 a 6.0 μm , fermenta la lactosa y pueden utilizar el citrato. Se localiza en el intestino de humanos y animales, suelos y aguas (Rogers *et al.*, 2016).

Comúnmente encontramos a *Citrobacter* aislada de heces humanas, ocasionando rara vez infecciones serias. En la actualidad se ha asociado a infecciones nosocomiales, infecciones en el tracto urinario, meningitis, bacteriemia, sepsis intraabdominal e infecciones en el tracto respiratorio. En pacientes inmunosuprimidos hospitalizados en unidades de cuidados intensivos infectados con *Citrobacter* se presenta un alto nivel de mortalidad, como por ejemplo, los neonatos con meningitis con la formación de abscesos en el cerebro. *Citrobacter* ocupa el tercer lugar de las especies más comunes en enterobacteriales en causar infecciones nosocomiales después de *K. pneumoniae* y *E.coli* (Kus, 2014).

2.1.5 Género *Morganella*: generalidades y patologías

El género *Morganella* cuenta con solo una especie *M. morganii* con dos subespecies *morganii* y *sibonii*, con la capacidad de movimiento, la producción de ureasa y la presencia de fenilalanina desaminasa (Moya *et al.*, 2001). Se localiza en el medio ambiente y en el intestino de humanos, reptiles y mamíferos como parte de la microbiota intestinal.

Los factores de virulencia (ureasa, hemolisinas y lipopolisacáridos) que tiene *M. morganii* la clasifican como patógeno oportunista que causa principalmente infecciones de heridas y tracto urinario (Hui *et al.*, 2016); la principal vía de entrada es el tracto urinario seguido del tracto hepatobiliar, la piel y el tejido blando, y la sangre. La tasa de mortalidad es alta principalmente en sepsis, abscesos, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, síndrome de bolsa de orina púrpura e infecciones en heridas (Ahlam *et al.*, 2024).

2.1.6 Género *Providencia*: generalidades y patologías

El género *Providencia* cuenta con cinco especies: *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rustigianii* y *P. heimbachae* (C.M. *et al.*, 2000). En terminos bioquímicos todas las especies pueden desaminar la fenilalanina, utilizan la glucosa y lactosa como fuente de carbono y producen gas; y son capaces de moverse debido a los flagelos peritricos. Todas las especies de este género son patógenos oportunistas y estan asociados a infecciones en humanos y animales.

P. rettgeri esta asoaciada a infecciones en el tracto urinario, infecciones en el tracto respiratorio, sangre, heridas, quemaduras, meningitis, endocarditis y gastroenteritis, principlamente en pacientes inmunocomprometidos y que son difíciles de tratar debido a su resistencia a los antibioticos (Rojas *et al.*, 2017).

2.2 Factores de virulencia

Una vez que los microorganismos logran pasar las barreras mecánicas y químicas del humano para invadirlo, también debe emplear estrategias para crecer y protegerse de la respuesta del sistema inmune del humano. Hasta la fecha hay cuatro clases principales de factores de virulencia que han sido bien caracterizados que corresponden a la cápsula, lipopolisacáridos, sideróforos y fimbrias o pili (figura 2)(Paczosa y Mecsas, 2016).

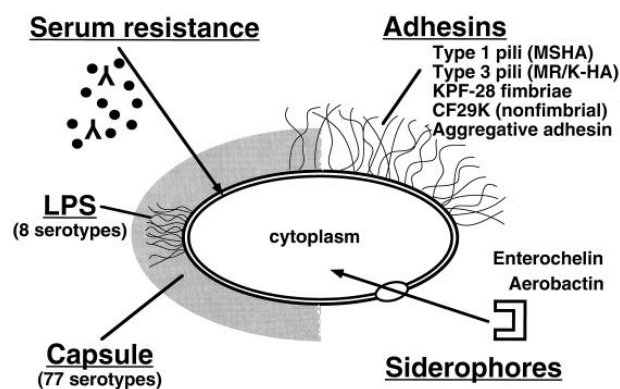


Figura 2. Representación esquemática de los factores de virulencia de gram negativos

2.2.1 Cápsula

El material capsular formado por estructuras fibrilares, llamados antígenos K, cubre toda la superficie de la bacteria en capas masivas, con el fin de protegerse de la fagocitosis por granulocitos polimorfonucleares o de la muerte por factores séricos bactericidas. Existen

160 tipos capsulares, pero K1 y K2, son los que se presentan con mayor frecuencia provocando resistencia a la fagocitosis y la habilidad de evadir el sistema inmune del huésped, por ejemplo la evasión de macrófagos alveolares y neutrófilos. Los genes que codifican para la formación de la cápsula están situados en un operón cromosómico *cps*, que incluye diferentes genes como *wca*, *cpsB*, *cpsG*, *wzi*, *wza*, *gnd*, entre otros (Mendes *et al.*, 2023)

2.2.2. Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes clave de las bacterias gram negativas, conocidos como endotoxinas, la estructura fundamental de los LPS es comprendida por un antígeno O, un lípido A y un polisacárido. Protegen al microorganismo contra las defensas del huésped al activar una respuesta inflamatoria a través del receptor TLR4. Se han identificado nueve tipos de antígeno O, los tipos O1 y O2 son los más comunes. Las cepas con el antígeno O completo son más resistentes a la destrucción por el complemento de la lectina en comparación con las cepas con el antígeno O incompleto, independientemente de la presencia de la cápsula. (Podschun y Ullman, 1998; Wyres *et al.*, 2020; Russo y Marr, 2019).

2.2.3. Sideróforos

Los microorganismos necesitan hierro para crecer, pero el sistema inmune del huésped limita su disponibilidad. Para obtener hierro, secreta sideróforos como aerobactina, enterobactina, salmoquelina y yersiniabactina, que tienen mayor afinidad por el hierro que las proteínas transportadoras del huésped. La expresión de enterobactina y yersiniabactina se logra a través de genes específicos, mientras que la salmoquelina se encuentra en un plásmido. La aerobactina, especialmente asociada con cepas hipervirulentas, se produce en mayor cantidad en estas cepas, lo que les permite adquirir más hierro y aumentar su virulencia. Los sideróforos ayudan a las bacterias a colonizar y crecer en diferentes entornos, incluso en presencia de lipocalina-2, una molécula de defensa del huésped (Paczosa y Mecsas, 2016; Russo y Marr, 2019; Müller *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2023).

2.2.4. Fimbrias o pili

Las fimbrias tipo 1 y 3 son las principales estructuras de adhesión que presentan los microorganismos. Además, se han identificado cuatro adhesinas específicas para especies bacterianas como es el caso de *fimA* y *fimH*. El gen *fimA* codifica la estructura corporal y *fimH* la estructura de la punta de las fimbrias tipo 1, lo que permite la adhesión, formación de biopelícula e invasión celular. Las fimbrias tipo 3, codificadas por genes *mrkABCD*, también contribuyen a la adhesión y formación de biopelícula. Estas estructuras facilitan la adhesión a superficies abióticas y la formación de biopelícula, lo que ayuda a la bacteria a colonizar y persistir en diferentes entornos (Russo y Marr, 2019; Paczosa y Meccas, 2016; Wyres *et al.*, 2020).

2.3. Resistencia a antimicrobianos

La resistencia antimicrobiana es la capacidad de un microorganismo de reprimir los efectos de un antibiótico, esto ocurre debido a que las bacterias tienen la capacidad de evadir el efecto del medicamento o bien adquieren esta capacidad durante algún proceso de intercambio de genes (Bisso, 2018).

Los pacientes hospitalizados que presentan un dispositivo invasivo como catéteres (urinarios, venosos o tubo endotraqueal) o que reciben terapia prolongada de antibióticos son los más expuestos a presentar bacterias resistentes. Los principales factores de riesgo de infección por cepas farmacorresistentes son por la prolongada estancia en unidades de cuidados intensivos, procesos quirúrgicos previos, uso de dispositivos invasivos, terapia antimicrobiana de amplio espectro y la inmunosupresión (Bisso, 2018).

Los altos niveles de resistencia microbiana a antibióticos se dan por las combinaciones de diferentes mecanismos como las bombas de eflujo, cambios de permeabilidad, modificaciones del sitio blanco, entre otros. Este problema es de suma importancia debido a que genera altas tasas de morbilidad y mortalidad (Pérez *et al.*, 2019). En la actualidad existen 700,000 muertes anuales a nivel mundial, y se estima que para el 2050 serán 10,000,000 por causas de tratamientos antimicrobianos inadecuados (Pons *et al.*, 2020).

2.3.1. Mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos

Los carbapenémicos son los antibióticos β -lactámicos de mayor espectro de actividad antimicrobiana y su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared bacteriana. La eficiencia del antibiótico se ve afectada cuando la bacteria presenta mecanismos de resistencia para evitar el efecto de este. Algunos de los mecanismos de resistencia en las bacterias son: la producción de enzimas que hidrolizan el efecto del antibiótico, expulsión de este por medio de bombas de eflujo, modificaciones en el sitio blanco y la alteración de la permeabilidad.

En enterobacterales la producción de carbapenemasas se describe como el mecanismo de resistencia de mayor importancia, al ser un tipo de β -lactamasa capaz de hidrolizar un amplio espectro de β -lactámicos, incluyendo a los carbapenémicos. Las β -lactamasas hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo β -lactámico (figura 3).

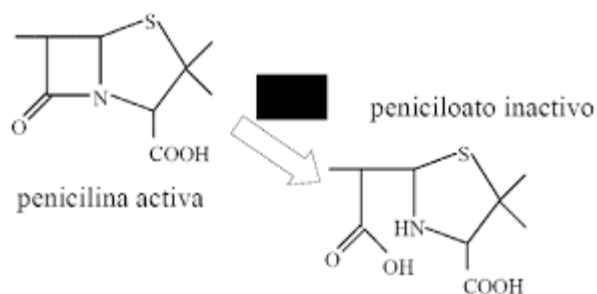


Figura 3. Mecanismo de acción de los β -lactámicos

Estas enzimas se clasifican en cuatro grupos A-D, según Ambler, Jaurin y Grundstrom, en base a su peso molecular, espectro y nivel de homología en la secuencia de aminoácidos. A esta clasificación se le llama de Ambler, pero existe otra clasificación por Bush-Jacoby y Medeiros, donde en base a los criterios antes mencionados y otros nuevos, como codificación plasmídica o cromosómica, espectro de inhibición, entre otros (Ayala *et al.*, 2018). Las carbapenemasas se encuentran en los grupos de clasificación de Amber A y D donde podemos encontrar β -lactamasas que tienen un residuo de serina en su sitio activo y la clase B que tiene uno o dos iones de zinc como cofactor enzimático, en el caso de Bush-Jacoby y Medeiros se encuentran en la clase 2df, 2f y 3 (Vera *et al.*, 2017).

2.3.1.1. β -lactamasas Clase A

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son capaces de hidrolizar y conferir resistencia a penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas incluidas las de amplio espectro (con excepción de cefoxitina). Estas enzimas son inhibidas reversible o irreversiblemente por sustancias estructuralmente similares a los β -lactámicos pero sin acción antimicrobiana y corresponden al clavulanato, tazobactam, sulbactam, avibactam, relebactam y vaborbactam. Las BLEE se determinan principalmente por pruebas fenotípicas basadas en la actividad inhibitoria *in vitro* del tazobactam o el ácido clavulánico por la técnica de difusión en disco o microdilución en caldo (Navarro *et al.*, 2011).

Las carbapenemas de clase A son las más diversas dado que se logran encontrar en diferentes phylums bacterianos como actinobacterias, cianobacterias y proteobacterias. En la actualidad se conocen cinco tipos de carbapenemasas de clase A en enterobacterales, estos tipos son IMI, SME y NMCse codifican en el cromosoma bacteriano, mientras KPC y GES se codifican en plásmidos y logran realizar transferencia horizontal de manera más sencilla (De lastra *et al.*, 2010).

A nivel mundial se ha detectado la presencia del gen KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) en plásmidos asociado al transposon *Tn4401* (Navarro *et al.*, 2011), en mayor presencia en cepas de *K. pneumoniae*, pero con el paso de los años se ha logrado localizar en cepas de *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli.*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa.*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp. y *C. freundii* (Gómez *et al.*, 2014).

En Londres en el año de 1982, debido a dos cepas clínicas de *S. marcescens* que interacturaron, se identificó la carbapenemasa SME-1, con la presencia de serina (70) y glutamato (166) en el sitio activo (Vidhu *et al.*, 2022). Hasta el momento no se ha encontrado esta enzima fuera del cromosoma de *S. marcescens*. Actualmente países como EE.UU., Suiza, Canadá, Australia y Argentina son los únicos que han tenido el reporte de SME-2 donde la única diferencia con SME-1 es un cambio de aminoácido (Creighton *et al.*, 2023).

En 1990, la enzima NMC-A fue aislada de *E. cloacae* NOR-1, siendo una de las primeras carbapenemasas descritas en enterobacterales. En la actualidad se presentan menos aislamientos de *E. cloacae* en comparación con otras especies de *Enterobacter* con

carbapenemasas de tipo NMC (*non* metallocarbapenemase), sin embargo, *Enterobacter* spp. presenta a la par carbapenemasas de tipo IMI (*imipenemase*) codificadas cromosómicamente. Las variantes de IMI-2 e IMI-6 que se han encontrado en plásmidos transferibles de *E. coli* y *E. cloacae*, cuentan con pequeñas variaciones de aminoácidos (Boyd *et al.*, 2017).

En 1998, en un hospital de Francia en un asilamiento de *K. pneumoniae* se identificó la enzima GES y en la actualidad ya se conocen 27 variantes de esta. alguna de las variantes de GES como GES-4 ha sido localizada en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (Navarro *et al.*, 2011), GES-5 y GES-2 en se han encontrado en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. mercescens* de muestras obtenidas de México y Argentina, respectivamente (Mercedes *et al.*, 2019).

2.3.1.2 β -lactamasas de clase B

La hidrólisis que realizan las enzimas de esta clase, depende de la interacción del antibiótico con el ion zinc o iones zinc que están presentes en el sitio activo de la enzima. Al tener este ion en su sitio activo, se les denomina a estas enzimas metalo β -lactamasas (MBL). Estas metalo β -lactamasas pueden ser inhibidas por agentes quelantes metálicos como el ácido mercaptoacético y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Morejón, 2012).

Las metalo β -lactamasas tienen un amplio espectro de sustrato y pueden inhibir la hidrólisis de casi todos los antibióticos β -lactámicos con excepción de los monobactámicos. Estas enzimas no son inhibidas con inhibidores de la clase A como el clavulanato, tazobactam o sulbactam, debido a que no cuentan con un sitio activo de serina (Palzkill, 2013). Las MBL se subdividen en tres clases (B1, B2, B3) según su homología de la secuencia de aminoácidos primarios. Los aminoácidos que se unen alrededor del zinc del sitio activo de los subgrupos son:

- B1: H116-H118-H196 y D120-C221-H263
- B2: N116-H118-H196 y D120-C221-H263
- B3: H/G116-H118-H196 y D120-H121-H262

(Morejon, 2012; Palzkill, 2013)

La enzima *imipenemase* (IMP) fue la primer enzima de carbapenemasas de esta familia descrita. En 1990 en Japón en un aislamiento de *P. aeruginosa* y de *S. marcescens* fue detectada en un plásmido conjugativo. En Latino América el primer reporte de esta enzima fue en una muestra de sangre de un paciente de 75 años con neumonía por *K. pneumoniae*. A la fecha se han descrito más de 85 variantes de esta carbapenemasa a nivel mundial (Boyd *et al.*, 2020).

El subgrupo más grande de las metalo β -lactamasas de la subclase B1 es VIM (*metalo- β -lactamasas codificada por el intron verona*) con más de 69 variantes. En los años 90, en Italia en un aislamiento de *P. aeruginosa* se encontró la enzima VIM-1 en el cromosoma bacteriano asociado a un casete genético que estaba insertado en un integron de clase 1 (Mercedes *et al.*, 2019).

La metalo β lactamasa más prevalente en enterobacteriales es NDM (*New Delhi metalo- β -lactamasa*) que se identificó por primera vez en el 2008 en un aislamiento de *K. pneumoniae* de un paciente que viajó de Nueva Delhi, India a Suecia. Los microorganismos portadores de estas enzimas presentan una alta resistencia a un gran número de antibióticos β -lactámicos. Existen 29 variantes de NDM, y antes del 2008 fue detectada en India, Pakistán y Bangladesh (Boyd *et al.*, 2020 ; Castanheira *et al.*, 2011).

2.3.1.3 β -lactamasas tipo AmpC

Esta son del grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, son serin- β -lactamasas con un espectro de acción hidrolítico hacia las cefalosporinas y todos los antibióticos β -lactámicos con excepción de cefepime y carbapenémicos.

La presencia y expresión de AmpC se puede clasificar en tres:

- I. Resistencia cromosómica inducible se asocia a una expresión desreprimida, es decir, cuando existe una mutación en los genes *ampR* y *ampD*, niveles bajos de AmpC en forma natural y en presencia de inductores (antibióticos β -lactámicos), se aumenta la producción de AmpC a comparación de los niveles basales. Esto se observa en *C. freundii*, *Providencia* spp., *M. morganii* y *Enterobacter* spp. (Jacoby, 2009)
- II. Resistencia cromosómica no inducible (constitutiva): se da en la ausencia de los genes reguladores tipo *ampD* o *ampR*, expresando un fenotipo natural de

resistencia, así mismo, se presenta por alguna mutación en la región promotora o atenuadora, provando una hiperproducción de AmpC, este es el caso de *E. coli*, *Shigella* spp. y *A. baumannii* (Martínez, 2009).

- III. Resistencia mediada por plásmidos, teniendo como modelo a *K. pneumoniae* y algunas especies de *Salmonella* spp. (Tamma *et al.*, 2019).

Desde 1989, se conocen los genes de AmpC codificado por plásmidos, se conocen 43 alelos de CMY, 7 variedades para FOX, 4 variedades para ACC, MIR y LAT, 3 variedades para ACT y MOX, y 2 variedades para DHA (Tamma *et al.*, 2019; Martínez, 2009).

2.3.1.4 β -lactamasas clase D

La clase D de β -lactamasas son de tipo oxacilinasas (OXA), por la capacidad de hidrolizar la oxacilina, cloxacilina, penicilinas, cefalosporinas y algunos carbapenémicos. No pueden ser inhibidos por los inhibidores de β -lactamasas de espectro extendido ni EDTA. Se han identificado más de 498 variantes y se subdividen en nueve grupos de acuerdo a la secuencia de aminoácidos que presenten.

La primera OXA se identificó en 1993, en un aislamiento de *A. baumannii* en un hospital escocés. En enterobacteriales OXA-48 like es el grupo más importante de esta clase e hidroliza penicilinas, carbapenémicos y débilmente cefalosporinas. OXA-48 permanece a la familia OXA-48, además de OXA-162, OXA-163, OXA-405, entre otras. Los brotes reportados por OXA-48 son principalmente en *K. pneumoniae*, pero esporádicamente por *E. coli* y *E. cloacae* (Galan *et al.*, 2012).

2.3.2. Mecanismos no enzimáticos de resistencia a carbapenémicos

Los mecanismos no enzimáticos de resistencia a carbapenémicos son basados en la sobreexpresión de bombas de expulsión activas y alteración o pérdida de porinas impidiendo la llegada de los carbapenémicos a su sitio de acción (Estepa *et al.*, 2017).

Las bombas de eflujo o de expulsión son capaces de expulsar las sustancias nocivas del citoplasma o periplasma del microorganismo para la supervivencia de este. Las bombas de eflujo pueden ser específicas o inespecíficas para un sustrato, dependiendo de la familia de proteínas transportadoras conforme a su homología de secuencias aminoacídicas, el

tamaño y estructuras secundarias. Existen cinco superfamilias de bombas de eflujo dependiendo su filogenia como se observa en la figura 4 (Opazo *et al.*, 2009):

- I. Familia de casete de unión a ATP (ABC)
- II. Superfamilia de facilitador mayor (MFS)
- III. Familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE)
- IV. Familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR)
- V. Familia de resistencia a división por nodulación (RDN)

La alteración en porinas o proteínas de membrana externa (OprD) es el mecanismo con mayor resistencia a imipenem. La inclusión, delección o presencia de codones de paro prematuros de secuencias aminoacídicas reprime la funcionalidad de OprD, brindando resistencia a carbapenémicos. No existe una posición en específico donde se ubiquen los cambios aminoacídicos ni su direccionalidad o la familia de secuencia de inserción (IS) para conferir dicha resistencia. *P. aeruginosa* presenta el principal casete genético de integrones de clase 1, que brinda resistencia a β -lactámicos o aminoglucósidos (Estepa *et al.*, 2017).

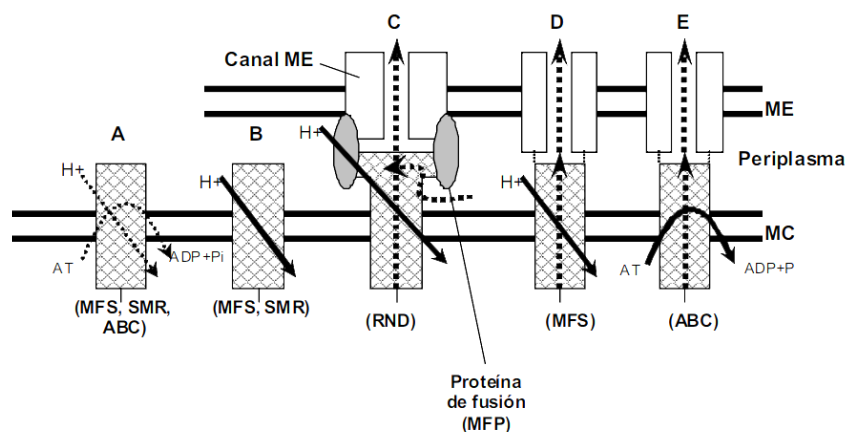


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes tipos de transportadores. A: Transportador simple que cataliza el eflujo a través de la membrana citoplasmática (MC) por gradientes de protones (MFS-SMR) o por ATP (ABC). B: Transportador simple. C: Transportador multicompuesto tipo RND con canales de membrana externa (canal ME) y proteínas de fusión periplásmica. D: Transportadores multicompuesto tipo MFS. E: Transportador multicompuesto tipo ABC energizado por hidrólisis de ATP. (Marchetti *et al.*, 2011).

2.4. Epidemiología de enterobacteriales resistentes a antibióticos e índice de mortalidad

Los reportes de enterobacteriales resistentes a carbapenémicos han ido en aumento a lo largo de los últimos años, por las facilidades de movilización entre ciudades, países y continentes. El ambiente hospitalario también ha sido un punto rojo alarmante, por la diseminación de plásmidos con genes que confieren resistencia a carbapenémicos, elevando las pérdidas anuales de productividad para los ciudadanos, por ejemplo, en el 2013 Estados Unidos de América tuvo una pérdida de 35 mil millones de dólares, a causa de infecciones relacionadas a bacterias resistentes a carbapenémicos (Doi y Duin, 2017).

2.4.1. Género *Klebsiella*

De este género las tres especies de importancia en la salud del humano con resistencia a antimicrobianos son: *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* y *K. oxytoca* (Falconí *et al.*, 2018).

Un estudio mundial realizado por SMART en el 2008-2009 indicó que la morbi-mortalidad de *K. pneumoniae* es muy alta debido a la resistencia a carbapenémicos. Los porcentajes del estudio por SMART de aislamientos reportados con resistencia para América latina fueron 34.6%, 10% en Norte América, 19.7% en Europa, 25.6% en Asia y 32.2% en África (Merchán y Ortiz, 2021). En el 2016 la Organización Mundial de la salud catalogó las bacterias con resistencia a antibióticos, ocupando *K. pneumoniae* una de las bacterias con prioridad crítica, por la creciente farmacorresistencia y la capacidad de propagación de estos microorganismos (Bengoechea y Pessoa, 2019).

La prevalencia registrada en China desde el año 2005 a 2018 es de 30,862 aislamientos por año, donde a inicio del periodo de investigación se contaba con 2.5% de aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (CRKP) y al final un 15.8% (Yanyan, 2020; Xuemei, 2022). En Estados Unidos se ha encontrado un incremento del 1.6% al 10.4% de aislamientos resistentes a carbapenémicos de *K. pneumoniae*, con la resistencia asociada a la producción de carbapenemasas tipo KPC y con un índice de mortalidad del 60% en las infecciones nosocomiales (López *et al.*, 2014; Cuaical *et al.*, 2019). En México, la incidencia de infección de *K. pneumoniae* en neonatos se observa de 4 a 15.4 casos por 1,000 nacidos (Rodríguez *et al.*, 2003). En el 2020, en un estudio realizado en

el Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca”, se estudiaron 370 recién nacidos con una edad gestacional de 31 semanas, donde el 21.9% presentó sepsis neonatal por *K. pneumoniae*. El 61.1% de los neonatos con sepsis temprana murieron a causa del uso inadecuado de antibióticos (Cordero *et al.*, 2020).

Durante la pandemia del COVID-19, hubo un incremento del 3.8% de frecuencia de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, esto asociado principalmente por la terapia inmunosupresora que recibieron los pacientes o el tiempo prolongado en las unidades de cuidados intensivos (Dumitru *et al.*, 2021). En un estudio realizado en Italia durante la pandemia en los meses de marzo a abril del 2020, las bacterias resistentes a carbapenémicos pasaron de ser 5% en promedio en el 2019 al 50% durante los meses mencionados, esto debido a deficiencias en la higiene del personal de salud al momento de poner al paciente en posición de pronación o al manipular los ventiladores mecánicos (Tiri *et al.*, 2020).

A partir de 1982, se ha reportado brotes a nivel mundial de microorganismos resistentes a antimicrobianos β -lactámicos, incluyendo las cefalosporinas, con porcentajes de mortalidad de hasta 25% en casos detectados (García *et al.*, 1985). En España en el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (HUPHM), entre el primero de enero del 2014 al 31 de diciembre del 2016 se reportaron 28 casos de *K. oxytoca* portadoras de carbapenemasas tipo OXA-48 (Pintos *et al.*, 2020). En América Latina entre el 2004 y 2015 se obtuvieron 409 aislamientos, de los cuales el 16.4% de los microorganismos fueron productores de carbapenemas (Vega y Dowzicky, 2017). En México, se han reportado casos de cepas productoras de carbapenemasas en el IMSS en Mérida, y se obtuvieron porcentajes de resistencia de 80.0% para cefazolina y de 66.7% para aztreonam (Uc *et al.*, 2019).

2.4.2. Género *Escherichia*

Entre el 2002 al 2017 en China se realizó un estudio sobre la resistencia a carbapenémicos en aislamientos de *E. coli*, se consiguieron 5,796 muestras de las cuales 58 presentaron resistencia. De estos 58 aislamientos todos fueron resistentes a ertapenem y 65% fueron no susceptibles a imipenem (Tian *et al.*, 2020).

Un estudio realizado en México en ocho diferentes estados de la república entre 1999 - 2005, indicó que el principal foco de infección nosocomial fue por *E.coli* en el tracto urinario (Salame *et al.*, 2018). Las infecciones en el tracto urinario representan el 14% de defunciones en pacientes que ingresan al hospital y que requieren la colocación de un catéter urinario (Camacho, 2013). En pacientes neutropénicos se ha observado que en infecciones del tracto urinario así como en infecciones del torrente sanguíneo, su índice de mortalidad varía entre el 12 al 42% al presentar bacteriemia por *E. coli* resistente a antimicrobianos y al estar en unidades de cuidados intensivos el índice de mortalidad sube hasta 83% (Juárez, 2013).

2.4.3. Género *Enterobacter*

Enterobacter spp. es un patógeno oportunista y nosocomial principalmente asociado a infecciones en unidades de cuidados intensivos (UCI). Las instituciones sanitarias globales indican que en el caso de infecciones intrahospitalarias *E. cloacae* representan el 5% de sepsis, 5% de neumonías, 4% de las infecciones del tracto urinario y el 10% de los casos de peritonitis postquirúrgica (Lina *et al.*, 2012).

En América Latina la incidencia de sepsis neonatal es de 3.5 a 8.9 casos por cada 1,000 nacidos vivos. En un estudio realizado en Tamaulipas, México se reportó que las causas de fallecimiento en las primeras semanas de vida fue por sepsis bacteriana, con un índice de mortalidad del 44%, posicionando en tercer lugar de muerte básica en neonatos en las primeras semanas de vida a *E. cloacae* (Guerrero, 2013; López *et al.*, 2017)

2.4.4. Género *Citrobacter*

En pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos el índice de mortalidad por infecciones asociadas a *Citrobacter* es del 6.8%, pero aumenta en casos de bacteriemia, dando una tasa del 17.8 – 56% de mortalidad (Li *et al.*, 2018). En una unidad de cuidados intensivos neonatales en el Hospital Universitario de Seúl, cuatro recién nacidos murieron a causa de emulsiones lipídicas intravenosas contaminadas con *Citrobacter* spp. resistente a carbapenémicos (Ji *et al.*, 2018). En China, en el 2015 se reportaron cepas altamente multifarmacorresistente de *C. freundii* en aguas residuales del Hospital Wets, provenientes de orina de pacientes internados en este hospital.(Ullauri y Freire, 2019)

2.4.5 Género *Morganella*

M. morganii se ha clasificado como un patógeno importante por la frecuencia y alta tasa de mortalidad de las infecciones con las que se asocia. Esto se debe principalmente a la resistencia intrínseca y adquirida que ha desarrollado. De acuerdo a una estudio realizado en Queensland, Australia se identificaron 709 infecciones en torrente sanguíneo asociadas a *M. morganii*, principalmente en adultos mayores y observaron una resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y carbapenémicos, principalmente en muestras de pacientes hospitalizados. Además, la tasa de mortalidad en este estudio fue de 21.1% a partir de los 30 días de infección (Laupland *et al.*,2022) .

En Taiwan en un estudio realizado en el *Tri-Service General Hospital*, un centro médico terciario, desde enero 2003 hasta diciembre 2012 se recolectaron hemocultivos positivos con *M. morganii* con cuadros de bacteriemia principalmente adquirida en la comunidad (75.3%). En un hospital Universitario en Israel entre 1997 y 2014, encontraron 136 casos de *M. morganii* provocando bacteriemia en adultos, donde hubo una tasas de mortalidad del 52%, dado que la mayoría de los pacientes estaban debilitados o altamente comorbidos (Erlanger *et al.*,2017)

2.4.6 Género *Providencia*

En un estudio transversal en el hospital universitario de Wonju, Corea del Sur recolectaron muestras de hemocultivos positivos con *P. rettgeri* en un periodo de 2001 al 2013. El número total de reportes positivos en hemocultivos con *P. rettgeri* fue de 14 en esos 13 años de estudio, donde las pruebas de susceptibilidad indicaron una resistencia a aminoglucósidos, trimetoprim- sulfametoxal y cefalotina. La tasa de mortalidad global en el hospital fue de 28.6%, donde en otros estudios fue del 33% y 24%.

2.5. Diseminación de enterobacteriales resistentes a carbapenémicos

Durante la última década, ha habido un aumento en los informes de enterobacteriales que muestran resistencia a los carbapenémicos. Este aumento se ha atribuido principalmente a la movilidad creciente de personas entre diferentes continentes y a la propagación de plásmidos en entornos hospitalarios y comunitarios que portan el gen que confiere resistencia a los carbapenémicos. En la figura 5 se muestra la distribución mundial de las

principales carbapenemasas en enterobacteriales que confieren la resistencia a carbapenémicos.

KPC es la carbapenemasa encontrada con mayor frecuencia en enterobacteriales a nivel mundial, esta propagación se ha asociado principalmente a *K. pneumoniae* del complejo clonal 258. Grecia es el país donde se observa la mayor incidencia de aislamientos de enterobacteriales productores de KPC. En el 2008 se realizó un estudio de 18 hospitales en Salónica, Creta y Atenas, donde se presentó que el 96% de los aislamientos portaban el gen KPC-2; las cepas portadoras de KPC presentaron una alta resistencia a carbapenémicos en base a su relación con el número de copias presentes del gen KPC-2 o la pérdida de una o dos porinas de membrana externa (OmpK35 y/o OmpK36) (Giakoupi *et al.*, 2009). En México en el 2016 se encontraron dos aislamientos resistentes a carbapenémicos por KPC, uno de *K. pneumoniae* y el otro *Raoultella ornithinolytica*; el gen KPC-3 fue la única variante encontrada. Además, asociaron la resistencia a carbapenémicos de estos dos aislamientos a la pérdida de una o ambas porinas (OmpK35 y/o OmpK36), disminuyendo así la susceptibilidad a los antibióticos (Kazmierczak *et al.*, 2016).

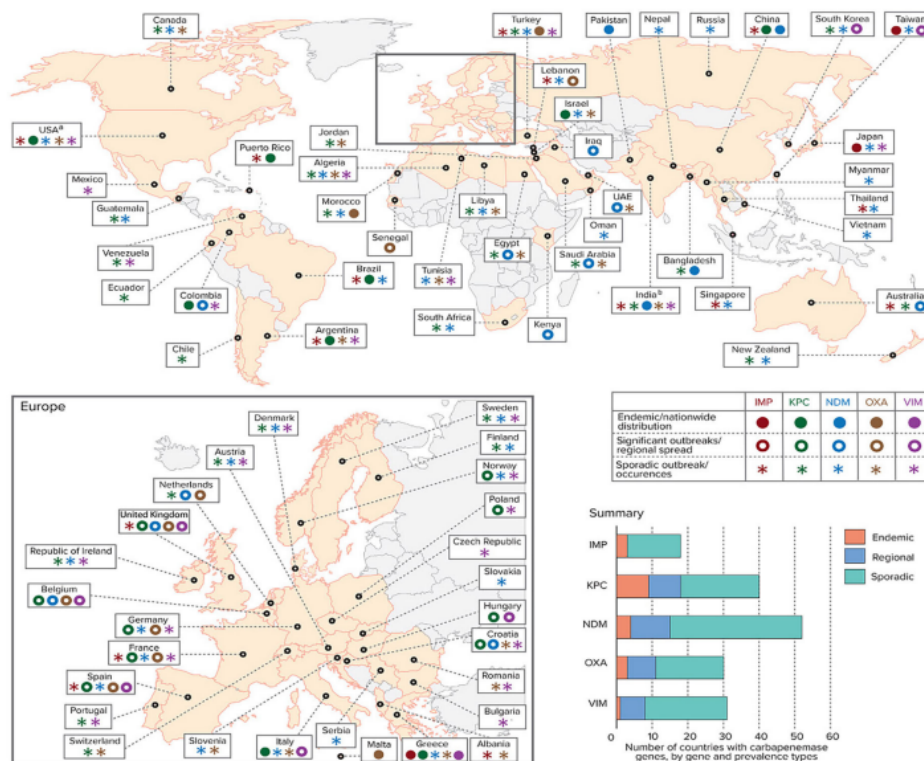


Figura 5. Distribución global de Enterobacteriales productores de carbapenemasas (HANSEN, 2021).

En México la descripción de la metalo β -lactamasas del tipo VIM-2 se detectó en *E. cloacae* y *K. oxytoca* en un hospital de Guadalajara (Morfin *et al.*, 2009). Este gen que confiere la resistencia por medio de la expresión de la enzima VIM está distribuido ampliamente como se ha reportado en Argentina, Colombia, Venezuela, India, Japón, Turquía, Jordán, entre otros (Hansen, 2021).

En *S. marcescens* se ha detectado que SME-1 y SME-2 son el principal mecanismo enzimático de resistencia a carbapenémicos, estos casos se encuentran esporádicamente en Estados Unidos (Queenan *et al.*, 2000).

En México se han reportado IMP-15 e IMP-18 en aislamientos de *K. oxytoca* desde el 2008 (Morfin *et al.*, 2009). En cambio las variantes de IMP-1 e IMP-2 cuentan con una persistencia en Japón, China, Italia, Turquía, Taiwán y Estados Unidos. Las especies de enterobacteriales en las que se han encontrado estos genes son: *E. cloacae*, *C. freundii* y *E. coli* (Luzzaro *et al.*, 2004).

Las carbapenemasas tipo NDM están distribuidas a nivel mundial debido a la rápida diseminación del gen en especies de enterobacteriales como: *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *K. oxytoca* y *E. coli* (Dortet *et al.*, 2014). A partir del 2011-2012 con la aparición de NDM-1 en un brote nosocomial de *K. pneumoniae* en Guatemala, su presencia en México fue detectada. Desde el 2013 se han reportado aislamientos de NDM-1 en enterobacteriales en todas las regiones geográficas de México, principalmente en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *E. coli* (Alcántar *et al.*, 2019).

Las carbapenemas de la familia OXA-48 se han asociado principalmente a *K. pneumoniae* ST11 y raramente en *E. coli* y *E. cloacae*. Los lugares donde podemos encontrar aislamientos con esta clase de carbapenemasa son: India, Turquía, Arabia Saudita, Italia, Alemania, Francia, España y Reino Unido (Logan y Weinstein, 2017). El único hallazgo reportado en México de OXA-232, una variante de la familia de OXA-48, fue obtenido de pacientes con sospecha de cepas portadoras de carbapenemasas, donde se detectó en tres aislamientos de *K. pneumoniae* y 13 de *E. coli* (Aquino *et al.*, 2015).

En Monterrey, Nuevo León en enero del 2012 se reportó la primera cepa de *P. rettgeri* con el gen NDM-1 y como efecto domino fueron reportándose casos en Brasil, Argentina, Ecuador y Colombia (Barrios *et al.*, 2013).

En Nepal, Asia del sur en el 2019 encontraron en aislamientos clínicos de *M. morganii* los genes NDM-1/NMD-5 y ArmA, brindando una alta tasa de mortalidad (Karlowsky *et al.*,2021).

En un estudio de revisión en Europa, entre el 2015 y 2017, identificaron cepas de enterobacteriales resistentes a carbapenémicos en un total de 34 países. Se encontró que el 68% de las cepas resistentes a carbapenémicos no producían carbapenemasas, lo que suponen la presencia de otro mecanismo de resistencia. De las cepas aisladas, el 57.1% mostró resistencia por la sobreexpresión de BLEE y AmpC, mientras que el 27.5% tenía resistencia por mecanismos no enzimáticos, como la sobreexpresión de bombas de eflujo y disminución de la permeabilidad de la membrana (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018)

3. JUSTIFICACIÓN

Los Enterobacterales son bacterias gram negativas de las cuales algunas especies forman parte de la microbiota intestinal de humanos y animales. Estos microorganismos pueden estar presentes en el ambiente hospitalario y se asocian a distintas infecciones intrahospitalarias.

En los últimos años, la resistencia de bacterias hacia los antibióticos se ha convertido en una amenaza a nivel mundial, debido a que provoca altas tasas de morbi-mortalidad por las limitadas opciones terapéuticas para su tratamiento. En las infecciones por enterobacterales, los carbapenémicos son de las últimas opciones terapéuticas, debido a su amplio espectro de actividad bactericida. Sin embargo, en la década pasada se ha observado un incremento de resistencia a este grupo de antibióticos mediante mecanismos enzimáticos por producción de carbapenemasas o por mecanismo no enzimáticos como la sobreexpresión de bombas de expulsión o alteración o pérdida de porinas, lo que impide la llegada de los carbapenémicos a su sitio de acción, impidiendo la erradicación de la bacteria.

4. HIPÓTESIS

La resistencia de enterobacterales a los carbapenémicos en el ambiente hospitalario está asociada a la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos, un mecanismo que favorece la persistencia como la diseminación de estas cepas en el ambiente hospitalario.

5. OBJETIVOS DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Determinar los mecanismos relacionados a la resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos de enterobacteriales recuperados en un Hospital de Tercer Nivel de México.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar aislamientos clínicos de enterobacteriales resistentes a carbapenémicos.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad a diversos antibióticos de importancia clínica.
3. Detectar mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Estrategia general



Figura 6. Estrategia general

6.2. Aislamientos clínicos

Los especímenes clínicos fueron obtenidos e identificados en el Laboratorio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de Monterrey, Nuevo León. El período de colección fue de enero de 2020 a diciembre de 2024 e incluyó

especímenes de relevancia clínica y únicamente se incluyó un aislamiento por paciente, a excepción de aquellos que presentaron dos perfiles de susceptibilidad diferentes. Los aislamientos que se identificaron como enterobacteriales resistentes a carbapenémicos fueron enviados al Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su inclusión en este estudio. Cada aislamiento se conservó en caldo glicerol a -80°C hasta su posterior análisis.

6.2.1. Selección de aislamientos resistentes a carbapenémicos

Los microorganismos recuperados de especímenes clínicos fueron identificados en el Laboratorio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. Jose Eleuterio González” de Monterrey, Nuevo León, utilizando espectrofotometría de masas MALDI-TOF de Bruker Biotyper; y la susceptibilidad a antimicrobianos fue determinada mediante el sistema automatizado VITEK® 2 COMPACT.

6.2.2. MALDI-TOF MS

La identificación se realizó mediante la técnica de extracción directa, tomando una cepa de interés de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación previa. Con un palillo estéril, se aplicó una fina capa de una colonia aislada del cultivo puro sobre el objetivo de la tarjeta metálica del equipo (tarjeta de 96 pocillos de acero inoxidable), dejándola reposar para su secado a temperatura ambiente. Después del tiempo de secado, se adicionó 1 µL de ácido fórmico al 70% y nuevamente se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 1 µL de matriz HCCA (solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, ácido trifluoroacético y acetronitrilo) (Lévesque *et al.*, 2015). La tarjeta metálica se colocó en el espectrofotómetro y se programó la sesión de lectura. Cuando el proceso finalizó, se comparó el espectro obtenido de la muestra introducida con los espectros de la base de datos del software. Se realizó un análisis sobre los picos obtenidos del espectrofotómetro para obtener un *score* logarítmico sobre el grado de similitud, lo que permitió definir el género y la especie de la muestra problema (García *et al.*, 2012; Lévesque, 2015).

6.3. Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos

En los aislamientos recibidos en el Laboratorio de Microbiología General se confirmó la resistencia a carbapenémicos mediante difusión en disco, y los aislamientos resistentes a al menos un carbapenémico fueron seleccionados para el resto del estudio, obteniéndose su perfil de susceptibilidad completo mediante microdilución en caldo. Los antibióticos, así como las concentraciones y puntos de corte, fueron seleccionados de acuerdo con lo establecido por el CLSI en el documento M100-S35 y se siguió el protocolo descrito en el manual M02 13.^a edición del 2018 y M07 11.^a edición del 2018 (CLSI, 2025).

6.3.1. Preparación del inóculo

Los aislamientos fueron colocados en placas de agar Müller-Hinton y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, se prepararon los inóculos resuspendiendo las colonias en 5 mL de solución salina estéril para alcanzar una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. Esto se logró ajustando la absorbancia entre 0.080 – 0.130 a una longitud de onda de 625 nm en el espectrofotómetro. Luego se realizó una dilución 1:150 en 10 mL de caldo Müller-Hinton. La concentración final quedó en 5×10^5 UFC/mL y se utilizó dentro de los primeros 15 minutos posteriores a su preparación.

6.3.2. Difusión en disco

En cada aislamiento se confirmó la resistencia a carbapenémicos mediante la técnica de difusión en disco. A partir del inóculo previamente preparado, se inoculó en una placa de agar Müller-Hinton utilizando un hisopo estéril. Posteriormente, se colocaron los sensidiscos de ertapenem, imipenem y meropenem a una distancia de 24 mm entre discos. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 16-18 horas. La interpretación se realizó siguiendo los criterios de interpretación del documento M100-S35 del CLSI, y como cepas de control de calidad se utilizaron la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922.

6.3.3. Preparación de la placa para Microdilución en caldo

Para cada muestra, se preparó una placa con 96 pocillos dispuestos en un formato de 12 filas por 8 columnas con diluciones seriadas de los antibióticos bajo evaluación. Se añadieron 200 μ L de antibiótico en el primer pocillo de la primera columna, siendo esta la concentración más alta de antimicrobiano. Luego, utilizando una pipeta multicanal se añadieron 100 μ L de caldo Müller-Hinton a todos los pocillos restantes, excepto a los pocillos previamente llenados con las concentraciones más altas de antimicrobianos. Las diluciones seriadas se realizaron transfiriendo consecutivamente 100 μ L de una celda a la siguiente utilizando una micropipeta, aumentando así progresivamente la dilución (por ejemplo, de la celda 2 a la 3, de la 3 a la 4, etc.).

En el último pocillo de cada uno de los antibióticos se desecharon 100 μ L para que todas las diluciones tuvieran el mismo volumen final de 100 μ L. El primer pocillo de la placa se utilizó como control positivo de crecimiento (sin antibiótico), mientras que dos pocillos en la última fila se dejaron como controles negativos (sin inóculo). Las concentraciones y disposición de los antibióticos en cada placa se presenta en la figura 7.

AMK 64	AMK 32	AMK 16	AMK 8	AMK 4	AMK 2	DOX 64	DOX 32	DOX 16	DOX 8	DOX 4	DOX 2
AZT 64	AZT 32	AZT 16	AZT 8	AZT 4	AZT 2	CPM 64	CPM 32	CPM 16	CPM 8	CPM 4	CPM 2
FOX 128	FOX 64	FOX 32	FOX 16	FOX 8	FOX 4	CAZ 64	CAZ 32	CAZ 16	CAZ 8	CAZ 4	CAZ 2
CZA 64/4	CZA 32/4	CZA 16/4	CZA 8/4	CZA 4/4	CZA 2/4	LVX 8	LVX 4	LVX 2	LVX 1	LVX 0.5	LVX 0.25
AZA 64/4	AZA 32/4	AZA 16/4	AZA 8/4	AZA 4/4	AZA 2/4	T/S 64/1216	T/S 32/608	T/S 16/304	T/S 8/152	T/S 4/76	T/S 2/38
ERT 128	ERT 64	ERT 32	ERT 16	ERT 8	ERT 4	ERT 2	ERT 1	ERT 0.5	ERT 0.25		T/S 1/19
IMP 128	IMP 64	IMP 32	IMP 16	IMP 8	IMP 4	IMP 2	IMP 1	IMP 0.5			
MEM 128	MEM 64	MEM 32	MEM 16	MEM 8	MEM 4	MEM 2	MEM 1	MEM 0.5	POS	NEG	NEG

COL 32	COL 16	COL 8	COL 4	COL 2							
-----------	-----------	----------	----------	----------	--	--	--	--	--	--	--

CTR 128	CTR 64	CTR 32	CTR 16	CTR 8	CTR 4	CTR 2	CTR 1	CTR 0.5			
------------	-----------	-----------	-----------	----------	----------	----------	----------	------------	--	--	--

Figura 7 . Distribución de los antibióticos y las concentraciones (µg/mL) utilizadas en la placa de microdilución en caldo. AMK: amikacina, DOX: doxiciclina, AZT: aztreonam, CPM: cefepime, FOX: cefoxitina, CAZ: ceftazidima, CZA: ceftazidima-avibactam, LVX: levofloxacina, AZA: aztreonam-avibactam, T/S: trimetoprim/sulfametoxazol, ERT: ertapenem, IMP: imipenem, MEM: meropenem, COL: colistina, CTR: ceftriaxona.

La interpretación de los resultados se realizó considerando el crecimiento observado en el pocillo utilizado como control positivo. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), que representó la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo. Los aislamientos se clasificaron como resistentes, intermedios o susceptibles mediante los puntos de corte de los antibióticos a analizar (tabla 1). Para asegurar el control de calidad en el estudio, se incluyeron cepas de control de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 1. Puntos de corte descritos por el CLSI para los antibióticos utilizados

Agente antimicrobiano	Clase	CMI (µg/mL)		
		Susceptible	Intermedio	Resistente
Amikacina (AMK)	Aminoglucósido	≤ 4	8	≥16
Ertapenem (ERT)	Carbapenémico	≤0.5	1	≥2
Imipenem (IMP)		≤1	2	≥4
Meropenem (MEM)		≤1	2	≥4
Aztreonam (AZT)	Monobactámico	≤ 4	8	≥16
Cefepime (CPM)	Cefalosporinas	≤ 2	-	≥16
Cefoxitina (FOX)		≤ 8	16	≥32
Ceftazidima (CAZ)		≤ 4	8	≥16
Ceftriaxona (CTR)		≤1	2	≥4
Levofloxacina (LVX)	Fluoroquinolona	≤0.5	1	≥2
Colistina (COL)	Polimixina	-	≤ 2	≥4
Doxiciclina (DOX)	Tetraciclina	≤ 4	8	≥16
Aztreonam-avibactam (AZA)	β-lactámico combinación con inhibidor de β-lactamasas	≤ 4/4	-	≥16/4
Ceftazidima- avibactam (CZA)		≤ 4/4	-	≥16/4

Trimetoprima/Sulfametoxazol (T/S)	Inhibidores de vía de folato	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$
--------------------------------------	---------------------------------	-------------	---	-------------

6.4. Determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos

6.4.1. Determinación de la producción de carbapenemasas

La determinación de la producción de carbapenemasas se llevó a cabo en todos los aislamientos en los que se confirmó la resistencia a carbapenémicos mediante la prueba de carbaNP e inactivación de carbapenémicos siguiendo el protocolo M100-S35 del CLSI.

6.4.1.1. Prueba de CarbaNP

Se comenzó con un cultivo joven y puro en un medio no selectivo o placas que no contenían antibióticos, como agar sangre, y se preparó un inóculo al tomar biomasa de la cepa problema utilizando un asa de 1μL y resuspendiendo en 200μL de solución de lisis (Tris-HCl) en un tubo Eppendorf nuevo. Después de homogeneizar el inóculo mediante agitación en vórtex por cinco segundos, se transfirieron 100μL de la suspensión a un tubo nuevo etiquetado como “a” y se etiquetó un nuevo tubo como “b”. Al tubo identificado como “a” se le añadieron 100μL de rojo de fenol con sulfato de zinc (solución de trabajo), mientras que al tubo “b” se le agregaron 100μL de la solución de trabajo con 6mg/mL de imipenem (antibiótico). Las suspensiones se homogeneizaron en vórtex por un minuto y, al finalizar el tiempo, ambos tubos se incubaron a 37°C. Los resultados se midieron cada media hora durante un periodo de dos horas de incubación, observando cualquier cambio de color en los tubos. La interpretación de los resultados se realizó conforme a la tabla 2.

Tabla 2 Interpretación de la prueba CarbaNP

Interpretación	Tubo a (solución de trabajo)	Tubo b (solución de trabajo con antibiótico)
Producción de carbapenemasas	Rojo	Amarillo o naranja claro
Sin producción de carbapenemasas	Rojo	Rojo

Invalido (no interpretable)	Amarillo o naranja rojizo	Amarillo o naranja claro o rojizo
-----------------------------	---------------------------	-----------------------------------

6.4.1.2. Método modificado de inactivación de carbapenémicos

Se inició con un cultivo puro y joven en un medio no selectivo o sin presencia de antibióticos, como el agar sangre, y se resuspendió 1 µL de biomasa de la cepa problema en 2 mL de caldo soya tripticaseína (TSB). Después de homogeneizar en vórtex por 10 – 15 segundos, se añadió un disco de meropenem de 10 µg con una pinza estéril y se incubó a 37°C por 4 horas. Transcurridas las 4 horas de incubación, se preparó una suspensión en solución salina con *E. coli* ATCC 25922 en una escala de 0.5 McFarland que se inoculó en una placa de Müller-Hinton (MHA) y, una vez transcurrido el tiempo de secado (3-10 minutos), se removieron los discos de meropenem de los tubos con TSB y se colocaron en la placa de MHA. La placa lista se incubó a 37°C por 18-24 horas. Después de la incubación, se midieron los halos de inhibición del disco en la placa de MHA. Los resultados se interpretaron en base a la tabla 3.

Tabla 3 Interpretación de la prueba mCIM

Interpretación	mCIM resultados	Halo (mm)
Carbapenemasa no detectada	Negativo	≥19 sin presencia de colonias dentro del halo de inhibición
Carbapenemasa detectada	Positivo	6-15 o presencia de colonias pequeñas dentro del halo de inhibición en una zona de 16-18
No interpretable	Indeterminado	• Zona de diámetro de 16-18 • Zona de diámetro ≥ 19 con presencia de colonias dentro del halo

6.4.2. Identificación de genes asociados a resistencia a β-lactámicos

6.4.2.1. Obtención de ADN por lisis térmica

Para obtener el material genético de los aislamientos, se cultivaron las cepas en agar sangre y se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas. Posteriormente, se preparó una suspensión bacteriana en un tubo Eppendorf estéril, donde se añadieron 100µL de agua destilada estéril y de tres a cuatro colonias del cultivo previamente realizado, posteriormente se homogeneizó mediante agitación en vórtex. Después de este proceso, se pasó a la placa de calentamiento por 10 minutos a 96°C por 12 minutos, posteriormente se centrifugó la suspensión a 12,000g durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril. El ADN obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.4.2.2. Detección de β -lactamasas de clase A

La metodología y los oligonucleótidos que se utilizaron fueron descritos por Weifeng *et al.* (Weifeng *et al.*, 2013). Los pares de cebadores se encuentran en la tabla 5. El ensayo se llevó a cabo en 20 µL de mezcla de reacción: 10mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 0.5µM de cebador, 200µM de dNTPs, 10mM de Tris-HCl (pH 9.0), 1 U de Taq ADN polimerasa y 8mM de (NH₄)₂SO₄. Todas las reacciones de amplificación se realizaron con una desnaturalización inicial a 93°C durante tres minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 93°C durante un minuto, hibridación a 55°C durante un minuto y elongación a 72°C durante un minuto. La elongación final se realizó a 72°C durante siete minutos. Se tomó 5µL de cada muestra para someterla a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 5. Cebadores utilizados en la detección de β -lactamasas de clase A y C

Gen	Secuencia de cebadores (5'-3')	Tamaño (pb)
SHV	F: TGC GCAAGCTGCTGACCAGC R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCGA	305
Grupo CTX-M1	F: ATGGTTAAAAAATCACTGCGC R: TCCCGACGGCTTTCCGCCTT	833

6.4.2.3. Detección de genes que confieren resistencia a carbapenémicos

Para la determinación de los genes que confieren resistencia a carbapenémicos en los enterobacteriales (KPC, GES, VIM, NDM, IMP y OXA-48), se realizaron PCRs de punto final con el ADN obtenido de la lisis térmica y con los iniciadores reportados por Swayne *et al.* (Swayne *et al.*, 2011) para la amplificación de KPC; los reportados por Nordmann *et al.* (Nordmann *et al.*, 2002) para VIM; los descritos por Ellington *et al.* (Ellington *et al.*, 2007) para IMP; los descritos por Baroud *et al.* (Baroud *et al.*, 2013) para NDM; los reportados por Wachino *et al.* (Wachino *et al.*, 2004) para GES y los reportados por Potron y colaboradores para OXA-48 (Potron *et al.*, 2011). Para todas las PCR se utilizaron 25 µL de una mezcla compuesta por: Taq polimerasa, MgCl₂, dNTPs, buffer, iniciador correspondiente y DNA.

Las condiciones de amplificación para VIM fueron las siguientes: un ciclo de cinco minutos a 94°C para el inicio de la desnaturalización; posteriormente, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 25 segundos, el alineamiento fue a 60°C por 40 segundos, una elongación a 72°C por 50 segundos y para la elongación final un ciclo de 72°C por seis minutos. Para IMP, un ciclo de cinco minutos a 94°C para el inicio de la desnaturalización; luego 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 52°C durante 40 segundos, elongación a 72°C por 50 segundos y para la elongación final a 72°C por cinco minutos. Para KPC se necesitó un ciclo de cinco minutos para la desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un alineamiento a 60°C por 30 segundos, elongación a 72°C durante 30 segundos y un último ciclo de 72°C durante cinco minutos para la elongación final. Para NDM, se necesitó un ciclo de cinco minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, después 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos, elongación a 72°C por 45 segundos y un ciclo a 72°C por cinco minutos para la elongación final. Para GES se necesitó un ciclo de 15 minutos a 95°C para una desnaturalización inicial, 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C durante 90 segundos para el alineamiento, para la elongación un ciclo a 72°C por 90 segundos y para la elongación final un ciclo de 72°C durante 10 minutos. Para OXA-48 se necesitó un ciclo

de cinco minutos para la desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un alineamiento a 56°C por 30 segundos, elongación a 72°C durante 50 segundos y un último ciclo de 72°C durante cinco minutos para la elongación final. Las secuencias de los cebadores utilizados en estas PCR se encuentran en la tabla 6.

Para revisar la presencia del ADN del producto, se realizó una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Después se aplicó una corriente de 100 V durante 50 minutos, utilizando un marcador de peso molecular de 100-1,000 pb. Finalmente, el gen se expuso a la luz UV a 254 nm en un transiluminador, registrando las imágenes de forma digital.

Tabla 6. Cebadores para la amplificación y secuenciación de genes codificadores de carbapenemasas

Gen	Secuencia de cebadores(5' - 3')	Tamaño (Pb)
KPC	F: GCAGCGGCAGCAGTTTGTGATT R: GTAGACGGCCAACACAATAGGTGC	184
GES	F: CTTCAATCACGCACTATTAC R: TAACTTGACCGACAGAGG	827
VIM	F: ATGGTGTTTGGTCGCATATC R: TGGGCCATTGAGCCAGATC	510
IMP	F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC R: CCAAACYACTASGTTATCT	188
Pre-NDM	F: CACCTCATGTTTGAATTGCGC R: CTCTGTCACATCGAAATCGC	984
OXA-48	F: GCTTGGAATCGTGACCATG R: CACACAAATACGCGCTAACC	513

6.4.3 Caracterización e identificación del plásmido portador de resistencia a carbapenémicos

En los aislamientos donde se detectó la presencia de al menos uno de los genes que codifican para carbapenemasas, se analizó la presencia de algún plásmido portador de este gen mediante electroforesis y, posteriormente, se analizó su capacidad de transferencia mediante ensayos de conjugación.

6.4.3.1. Identificación del patrón electroforético de plásmidos

Se llevó a cabo la extracción de plásmidos utilizando la técnica de hidrólisis alcalina, descrita por Kieser (1984). Inicialmente, las cepas se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron durante 12 horas a 37°C con agitación constante. Transcurrido el tiempo, se tomaron 1.5 mL de caldo y se transfirieron a un tubo Eppendorf, luego se centrifugaron a 14,000 rpm durante 3 minutos, repitiendo los pasos previos hasta obtener un sedimento de aproximadamente 10 mm de alto. El sedimento se suspendió vigorosamente en 500 µL de una solución de lisis compuesta por sacarosa, EDTA y Tris-HCl. Se agregaron 200 µL de solución de neutralización (NaOH y SDS) y se incubó nuevamente a 55°C durante 30 minutos.

Después de la incubación, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se les añadieron 250 µL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, seguido de una agitación vigorosa hasta la formación de una emulsión blanca. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se transfirieron 500 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y se almacenó a -20°C. Para la obtención del patrón electroforético, se preparó un gel de agarosa al 0.7% utilizando TBE (Tri base, ácido bórico y EDTA) al 0.5X como disolvente. Se tomaron 20 µL del sobrenadante obteniendo en la extracción de plásmidos y se mezclaron con 8 µL de buffer de carga, luego se colocó la mezcla en el gel de agarosa. En los extremos del gel se colocaron marcadores de peso molecular de *E. coli* 50192 que contenían plásmidos de peso conocido (150, 68, 36 y 7 Kb). La electroforesis se realizó con TBE 0.5X como buffer de corrida a 80V a temperatura ambiente durante 5-6 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de la electroforesis, el gel se tiñó con GelRed durante 30 minutos y se procedió a lavar con agua destilada. Finalmente, se visualizó en un transiluminador con luz UV a 254 nm utilizando un Foto documentador UVP Biolmaging Systems. Se procedió a determinar el tamaño molecular del plásmido o plásmidos detectados comparando su movilidad electroforética en el gel de agarosa con los plásmidos de tamaño molecular conocidos de la cepa *E. coli* 50192. En este proceso, se registraron las distancias de migración de los fragmentos de ADN en milímetros a partir de la imagen del gel de agarosa teñido. Luego, se elaboró una curva de calibración donde

se graficaron las distancias migratorias de los controles en función de sus pesos moleculares conocidos en KB.

6.4.3.2. Conjugación bacteriana

Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Miller (1972). La cepa donadora de interés, así como la cepa receptora identificada como *E. coli* J53-3, se cultivaron en agar LB a 37°C durante 16-18 horas. Luego, se preparó un inóculo de la cepa receptora en 5 mL de caldo LB y otro inóculo del aislamiento de interés en 1 mL de caldo LB, los cuales se incubaron con agitación durante 3 horas. Después de este período, se transfirieron 800 µL de la cepa receptora y 200 µL del aislamiento de interés a un tubo nuevo y estéril de Eppendorf, el cual se incubó durante 3 horas sin agitación a 30°C. Al finalizar las 3 horas de incubación, se sembraron 100 µL de la mezcla en placas de LB con rifampicina (100 µg/mL) e imipenem (2 µg/mL) utilizando un asa Drigalski de vidrio. Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 37°C, mientras que los tubos se mantuvieron en incubación sin agitación durante 16-18 horas a 30°C. Al día siguiente, si no había crecimiento, se realizaron nuevamente las siembras con el mismo proceso antes mencionado.

Una vez que se logró el crecimiento de colonias bacterianas aisladas, se procedió a resembrarlas para confirmar su identificación mediante MALDI-TOF MS, donde se esperó que el microorganismo detectado fuera la cepa *E. coli* transconjugante (cepa con el plásmido de interés). Posteriormente, se llevó a cabo la confirmación del éxito de la conjugación del plásmido mediante la prueba de CarbaNP, una vez que el resultado fue positivo, se realizó el perfil de plásmidos por hidrólisis alcalina. Si la conjugación no fue exitosa, se realizó nuevamente la metodología anterior, pero en esta ocasión, las placas donde se incubaron las muestras contenían azida de sodio (100 µg/mL) e imipenem (2 µg/mL) en lugar de rifampicina e imipenem. El resto del procedimiento se mantuvo igual: se sembraron 100 µL de la mezcla en las nuevas placas y se incubaron a 37°C durante 16-18 horas, se identificaron en MALDI-TOF MS, se realizó la prueba de CarbaNP y los aislamientos positivos a la prueba CarbaNP se obtuvo su perfil plásmidico.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación y origen de los aislamientos clínicos

Durante el período de colección, de enero de 2020 a diciembre de 2024, en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, se recuperaron 1,120 aislamientos de enterobacteriales, de los cuales 67 se preseleccionaron debido a su resistencia a al menos un carbapenémico. Los aislamientos preseleccionados se enviaron al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Para confirmar la susceptibilidad a carbapenémicos, se realizó la prueba de difusión en disco. Los resultados mostraron que el ertapenem presentó mayor resistencia, con un 89.1% (n=49), seguido por el meropenem con un 67.3% (n=37) e imipenem con un 60% (n=33). A partir de estos resultados se descartaron 12 aislamientos al no presentar resistencia a carbapenémicos.

En total, se estudiaron 55 aislamientos clínicos obtenidos de 53 pacientes diferentes, esto debido a que dos pacientes presentaron dos especies bacterianas con resistencia a carbapenémicos (*M. morganii* y *E. coli*; *C. freundii* y *K. pneumoniae*).

De los 55 aislamientos seleccionados, se identificaron siete especies diferentes: *E. cloacae* (n=18), *E. coli* (n=15), *K. pneumoniae* (n=9), *P. rettgeri* (n=7), *C. freundii* (n=3), *Klebsiella variicola* (n=2), y *M. morganii* (n=1).

Los aislamientos se obtuvieron principalmente de hisopados rectales con un 30.9% (n=17), infecciones de tejidos blandos un 18.2% (n=10), infecciones del tracto urinario un 14.5% (n=8), infecciones intraabdominales un 12.7% (n=7), infecciones del tracto respiratorio inferior un 9.1% (n=5), infecciones osteoarticulares y un 7.3% de especímenes diversos (n=4), respectivamente. Los aislamientos se obtuvieron de nueve salas del hospital como se muestra en la figura 8.

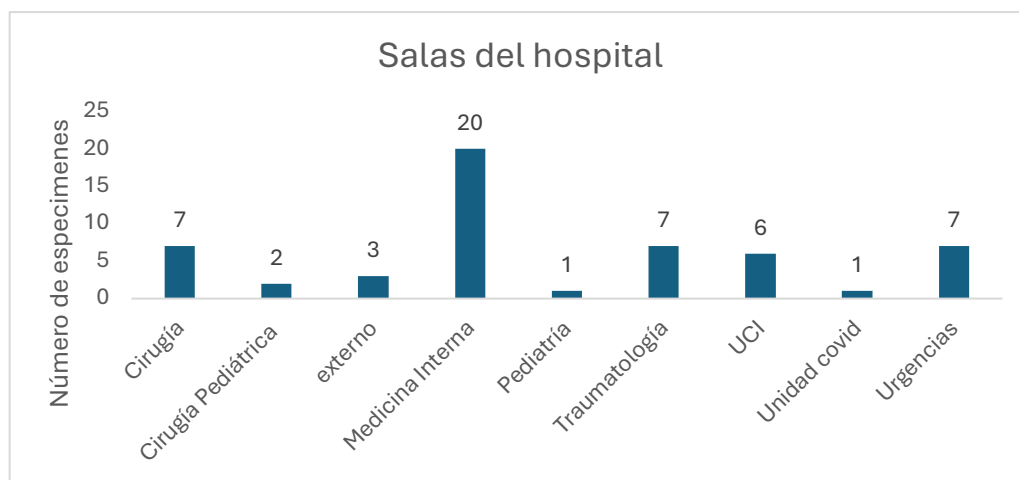


Figura 8. Áreas hospitalarias de donde se obtuvieron los aislamientos.

7.2 Detección de producción de carbapenemasas

En los 55 aislamientos seleccionados, que presentaron resistencia a uno o más carbapenémicos, se realizó la prueba de CarbaNP o inactivación de carbapenémicos para identificar la producción de carbapenemasas.

El 54.5% (n=30) de las cepas mediante la prueba de CarbaNP fueron productoras de carbapenemasas, mientras que el 45.5% (n=25) fueron no productoras. En estos aislamientos no productores se realizó la prueba de inactivación de carbapenémicos como prueba confirmatoria de producción. En esta prueba 10 aislamientos dieron positivo a la producción de carbapenemasas y 15 se mantuvieron como no productores.

En conjunto con ambas pruebas, se determinaron 40 aislamientos como productores de carbapenemasas y 15 como no productores. Esta clasificación fue utilizada para la selección de cepas en los siguientes ensayos.

7.3 Detección de genes de BLEE y carbapenemasas

Para la detección de los seis genes relacionados a la resistencia de carbapenémicos se llevó a cabo PCR de punto final. Los resultados obtenidos permitieron la detección de tres genes relacionados con la resistencia a carbapenémicos correspondientes a NDM, OXA-48 y

VIM. En lo que respecta a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), se identificaron dos genes, CTX-M y SHV (figura 9).

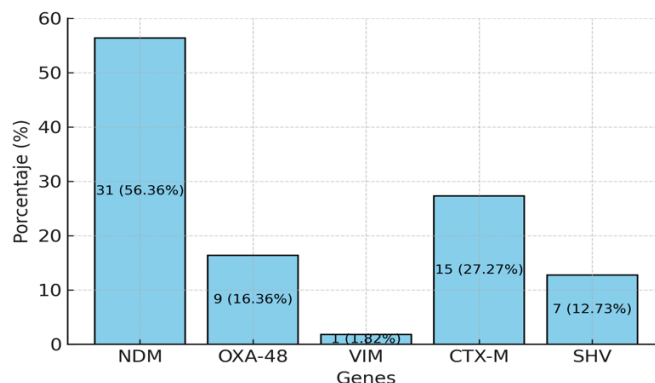


Figura 9. Genes de carbapenemasas y BLEE detectados en CRE.

Respecto a las carbapenemasas, el gen predominante fue NDM con 56.4% (n=31) y fue detectado en *E. coli* (35.5%, n=11), *P. rettgeri* y *E. cloacae* (22.6 %, n=7 cada uno), *K. pneumoniae* (12.9%, n=4), además en *M. morganii* y *C. freundii* (3.2%, n=1 cada uno). El gen OXA-48 se presentó en un 16.4% (n=9) y VIM en un 1.8% (n=1). En el caso de los aislamientos no productores de carbapenemasas no se detectó ninguna carbapenemasa.

La BLEE detectada con mayor frecuencia en todos los aislamientos estudiados fue CTX-M con un 27.3%, así mismo, SHV se presentó en un 12.7% de los aislamientos seleccionados. Las BLEE se identificaron tanto en aislamientos productores como en los no productores de carbapenemasas. En la figura 10 se observa que CTX-M mostró una clara predominancia entre los aislamientos productores de carbapenemasas, mientras que SHV se distribuyó de manera más homogénea entre productores y no productores.

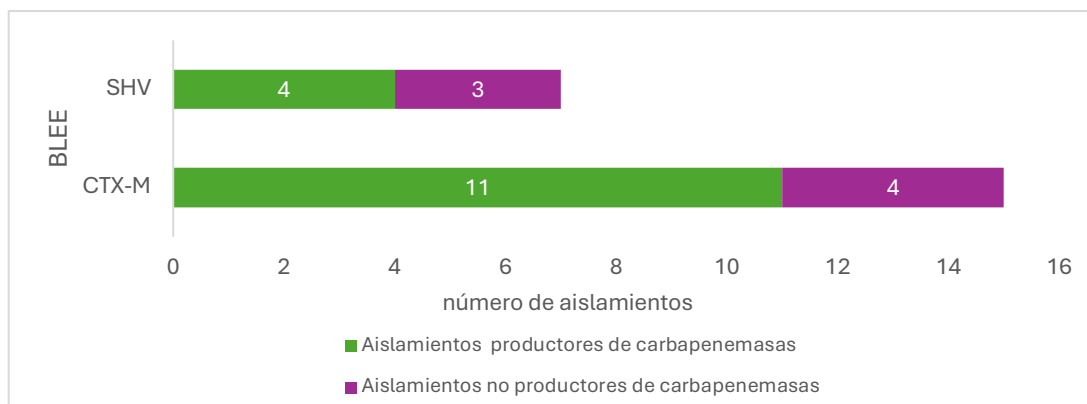


Figura 10. Genes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) detectados por PCR punto final en aislamientos productores y no de carbapenemasas.

7.3 Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos

Los datos de susceptibilidad de los 55 enterobacteriales resistentes a carbapenémicos se presentan en la tabla 7, en la cual se muestran los valores de CMI, el porcentaje de aislamientos resistentes, intermedios y susceptibles a los distintos antibióticos analizados. La tasa de resistencia fue superior al 60% en la mayoría de los antibióticos a excepción de ceftazidima-avibactam y doxiciclina. La mayoría de los aislamientos fue susceptible para amikacina, aztreonam-avibactam y colistina.

Tabla 7. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de enterobacteriales resistentes a carbapenémicos

Antibiótico	CMI (µg/mL)			Aislamientos n (%)		
	Rango	50%	90%	S	I	R
AZT	≤2 - >64	>64	>64	5 (9.1)	0 (0.0)	50 (90.9)
CPM	≤2 - >64	>64	>64	3 (5.5)	7 (12.7)	45 (81.1)
FOX	8 - >128	>128	>128	1 (3.0)	0 (0.0)	32 (97.0)
CAZ	≤2 - >64	>64	>64	4 (7.3)	0 (0.0)	51 (92.7)
CTR	1 - >128	>128	>128	1 (1.8)	0 (0.0)	54 (98.2)
ERT	1 - >128	32	>128	0 (0.0)	6 (10.9)	49 (89.1)
IMP	≤0.5 - >128	4	>128	15 (27.3)	6 (10.9)	34 (61.8)
MEM	≤0.5 - >128	16	>128	17 (30.9)	1 (1.8)	38 (69.1)
CZA	≤2/4- >64/4	>64/4	>64/4	21 (38.2)	2 (3.6)	32 (58.2)
AZA	≤2/4- >64/4	<2/4	>64/4	42 (76.4)	2 (3.6)	11 (20.0)
AMK	≤2 - >64	≤2	>64	34 (61.8)	1 (1.8)	20 (36.4)
LVX	≤0.25 - >8	>8	>8	14 (25.5)	2 (3.6)	39 (70.9)
DOX	≤2 - >64	16	>64	18 (37.5)	7 (14.6)	23 (47.9)
T/S	≤1/19- >64/1216	>64/ 1216	>64/ 1216	14 (25.5)	0 (0.0)	41(74.5)
COL	≤1 - ≤1	≤1	≤1	0 (0.0)	47 (100.0)	0 (0.0)

Antibióticos AZT: aztreonam; CPM: cefepime; FOX: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CTR: ceftriaxona; ERT: ertapenem; IMP: imipenem; MEM: meropenem; CZA: ceftazidima-avibactam; AZA: aztreonam-avibactam; AMK: amikacina; LVX: levofloxacin; DOX: doxicilina; T/S: trimetoprim- sulfametoxazol; Col: colistina.

En la figura 11 se muestra la susceptibilidad de los aislamientos (n=55) agrupada en tres categorías según su mecanismo de resistencia: productoras de carbapenemasas, no productoras de carbapenemasas y portadoras del gen NDM. En términos generales, se puede observar una resistencia más alta en los grupos portadores del gen NDM y productores de carbapenemasas, en comparación con las no productoras. Los portadores del gen NDM tuvieron una resistencia global mayor, alcanzando porcentajes iguales o superiores al 90% frente a la mayoría de los antibióticos a excepción de amikacina, aztreonam-avibactam y colistina.

Los aislamientos productores de carbapenemasas mostraron un comportamiento similar, aunque en varios antibióticos los niveles fueron ligeramente inferiores a los observados en los portadores de NDM. Por su parte, los no productores de carbapenemasas evidenciaron porcentajes de resistencia inferiores, con diferencias especialmente notables en amikacina, imipenem, meropenem, ceftazidima-avibactam, levofloxacin, doxicilina y trimetoprima-sulfametoxazol, en comparación con los otros dos grupos.

Los antibióticos que tiene porcentajes similares entre los tres grupos son aztreonam-avibactam y ceftriaxona.

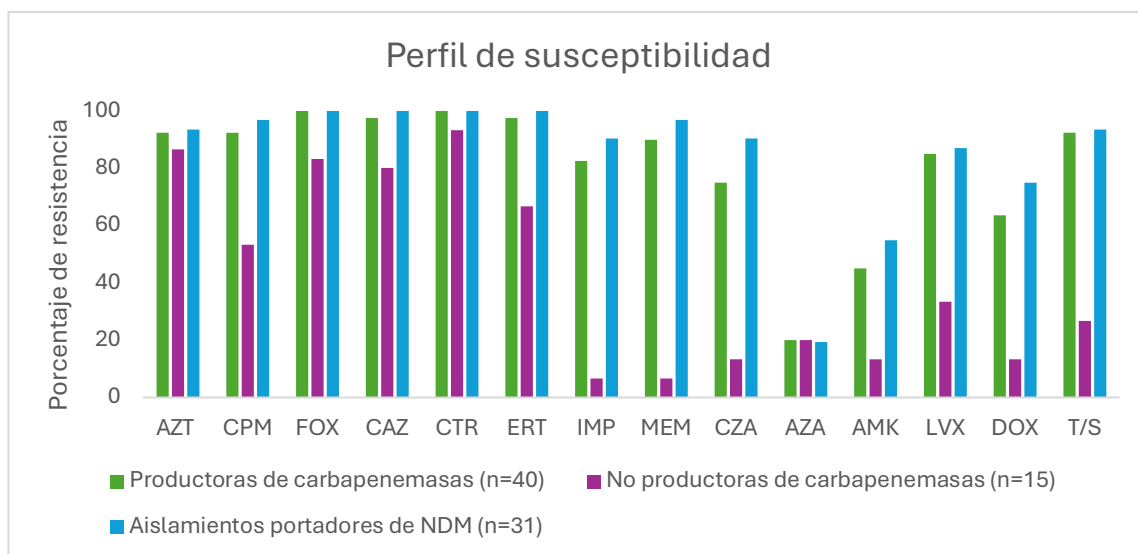


Figura 11 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana clasificada en tres grupos, dependiendo a su mecanismo de resistencia. Antibióticos AZT: aztreonam; CPM: cefepime; FOX: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CTR: ceftriaxona; ERT: ertapenem; IMP: imipenem; MEM: meropenem; CZA: ceftazidima-avibactam; AZA: aztreonam-avibactam; AMK: amikacina; LVX: levofloxacina; DOX: doxicilina; T/S: trimetoprim-sulfametoxazol.

7.4 Perfil de plásmidos

Mediante el método de hidrólisis alcalina descrito por Kaiser, seguido de una migración electroforética en gel de agarosa al 0.7% , se llevó a cabo la caracterización de los perfiles plásmidicos en los aislamientos clínicos portadores de los genes NDM, OXA-48 y VIM. Esta metodología permitió visualizar y estimar el número y tamaño de los plásmidos presentes en cada aislamiento.

La comparación de bandas se realizó utilizando como marcador de peso molecular la cepa de referencia *E. coli* 50190, lo que permitió estimar un rango de tamaño de los plásmidos que osciló entre 105 y 170 Kb. La cantidad de plásmidos por aislamiento varió entre una y cinco bandas.

En los 31 aislamientos portadores de NDM, se logró obtener perfiles plasmídicos en 20 aislamientos, distribuidos en las siguientes especies: *E. coli* (n=7), *E. cloacae* (n=6), *P.*

rettgeri (n=4), *K. pneumoniae* (n=2) y *M. morganii* (n=1). En los 11 aislamientos restantes, pese a múltiples extracciones plasmídicas, no se detectó ningún plásmido. Para analizar si OXA-48 tenía un perfil de plásmidos diferente, se tomaron dos aislamientos (*E. coli* y *E. cloacae*) con el gen portador, obteniendo un plásmido de tamaño de 166 Kb. En el aislamiento portador de VIM (*E. cloacae*), se presentó un plásmido de 142 Kb. En total se obtuvieron 23 perfiles plasmídicos.

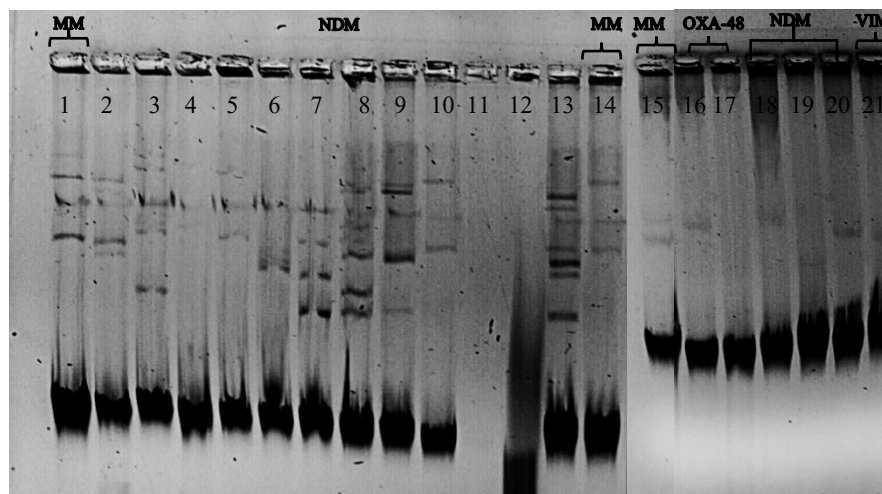


Figura 12. Perfil de plásmidos de los aislamientos portadores de NDM, OXA-48 y VIM, obtenido por electroforesis en gel de agarosa 0.7%. Se observa la ausencia de bandas plasmídicas en los carriles 4,11, 12, 17 y 19 correspondiente a los aislamientos con genes NDM y OXA-48. Marcado de peso molecular (MM).

7.5 Transferencia horizontal de genes de resistencia a carbapenémicos

Con el propósito de evaluar la capacidad de transferencia horizontal de genes de resistencia antimicrobiana, se realizaron ensayos de conjugación bacteriana empleando los 23 aislamientos previamente caracterizados plasméricamente. Se utilizó como cepa receptora a *E. coli* J53-3 resistente a rifampicina pero susceptible a β -lactámicos, con el objetivo de seleccionar únicamente aquellas bacterias receptoras que hubieran adquirido plásmidos portadores de carbapenemasas. En la primera fase, los 23 aislamientos fueron sometidos a el ensayo de conjugación con medio LB con rifampicina (100 μ g/mL) e imipenem (2 μ g/mL). El 56.5% (n=13) de los aislamientos presentaron crecimiento en el medio selectivo, indicando una posible transferencia exitosa de plásmidos.

En los 10 aislamientos que no mostraron transferencia bajo las condiciones antes mencionadas, se repitieron los ensayos de conjugación, pero esta vez utilizando como medio selectivo azida de sodio (100 µg/mL) e imipenem (2 µg/mL). El 30% (n=3) lograron la conjugación.

De los 16 aislamientos que presentaron conjugación exitosa: el 87.5% (n=14) portaban el gen NDM. La distribución por especie fue: *E. coli* (35.7%, n=5), *E. cloacae* (28.6%, n=4), *P. rettgeri* (21.4%, n=3) y *K. pneumoniae* (14.3%, n=2). También se observó transferencia exitosa de los genes OXA-48 y VIM a partir de un aislamiento de *E. coli* y un aislamiento de *E. cloacae*, respectivamente.

8. DISCUSIÓN

La familia Enterobacteriaceae forma parte de la microbiota intestinal de humanos y animales. Sin embargo, algunas especies de esta familia son patógenos oportunistas causantes de infecciones asociadas a la atención en la salud (IAAS), especialmente en pacientes inmunocomprometidos o con estancias hospitalarias prolongadas. La resistencia a los antibióticos, constituye una amenaza creciente en el ámbito de la salud pública a nivel global, ya que aumenta la tasa de morbi-mortalidad y los costos de atención médica. Este fenómeno se agrava cuando las bacterias desarrollan resistencia a antibióticos de última línea terapéutica, como los carbapenémicos, reduciendo de manera significativa las opciones de tratamiento efectivas y dificultando el manejo clínico en entornos hospitalarios. A nivel mundial, se han identificado hasta la fecha al menos once tipos distintos de carbapenemasas codificadas por Enterobacterales, agrupadas en clases moleculares A, B y D según la clasificación de Ambler. En latino América se han reportado únicamente nueve tipo de carbapenemasas. Hasta el 2019, México ha reportado seis de ellas: KPC, GES, NDM, VIM, IMP y OXA-48 (García *et al.*, 2020). Es por eso que en este estudio se llevó acabo la caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos en cepas de Enterobacterales aisladas de un hospital de tercer nivel en México.

En la actualidad, la diseminación de carbapenemasas es el problema de resistencia más importante en bacterias Gram-negativas de importancia clínica, debido a su complejo perfil de susceptibilidad a antibióticos, a la fácil y rápida diseminación interespecie o intraespecie a través de elementos móviles transmisibles.

En este estudio se obtuvieron 55 aislamientos clínicos, identificando siete diferentes especies siendo *E. cloacae* (n=18), *E. coli* (n=15) y *K. pneumoniae* (n=9) los aislamientos predominantes. Estos resultados coinciden con Jalalvand *et al.* y Gualan y Matamoros (Jalalvand *et al.*, 2020;Gualan y Aatamoros, 2024) donde demostraron que *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae* son los bacilos Gram-negativos predominantes en hospitales.

El ertapenem fue el carbapenémico con el mayor porcentaje de resistencia en los aislamientos analizados, alcanzando un 89.1% según la prueba de difusión en disco. En general, la resistencia a esta clase de antibióticos en nuestro estudio fue del 72.1%. En comparación, una investigación realizada en la provincia de Sindh de Pakistán informó una tasa del 59% de resistencia (Pascual *et al.*, 2022). Por otro lado, un ensayo del 2023 en Pakistán, indicó la tasa del 20-30% (Mustafai *et al.*, 2023), lo que representa una diferencia significativa en relación con nuestros hallazgos y el estudio previo.

La identificación de producción de carbapenemasas por el método de CarbaNP detectó 54.5% (n=30) de aislamientos productores. Sin embargo, para una identificación más precisa en los aislamientos no productores de carbapenemasas (n=25) se realizó el método de inactivación de carbapenémicos modificado (mCIM) y se observó que 10 de las cepas evaluadas fueron positivas para producción de carbapenemasas. Estos hallazgos respaldan la utilidad de emplear ambas técnicas de forma complementaria, ya que cada una ofrece ventajas particulares. El mCIM ha demostrado una sensibilidad entre el 98 a 100%, mientras que CarbaNP ofrece un 73 a 100%. Esta complementariedad ha sido documentada previamente por Schaffarczyk *et al.* (2024) reportando una sensibilidad de 83.1% para mCIM y 76.3% para CarbaNP. De igual forma, Lutgring y Limbago (2016) señalaron que la prueba de CarbaNP presenta una sensibilidad baja para detectar carbapenemasas como OXA-48, algo que también se evidenció en el estudio de Papagiannitsis *et al.* (2015), donde se detectó que solo uno de 17 aislamientos fueron productores de OXA-48. Estos resultados indican que para mejores resultados es conveniente realizar ambas técnicas en este tipo de cepas. Estos hallazgos podrían explicar el cambio en el porcentaje detectable en los aislamientos de nuestro estudio.

La detección precisa y temprana de carbapenemasas es fundamental, especialmente en países como México, donde la propagación de bacterias productoras de carbapenemasas ha ido en aumento en los últimos años. El primer reporte documentado corresponde al año 2009, con la identificación de VIM en aislamientos clínicos del Hospital Civil de Guadalajara (Morfin-Otero *et al.*, 2009). Posteriormente, en 2012, se notificó la presencia de NDM en el mismo hospital donde se llevó a cabo el presente estudio (Barrios *et al.*, 2013). En 2013, se detectó por primera vez KPC en *K. pneumoniae* en un Hospital de la

Ciudad de México (Rodríguez-Zulueta *et al.*, 2013). Finalmente, en 2015, se reportó la presencia de OXA-48 *like* en un Hospital de atención terciaria, también ubicado en la Ciudad de México (Torres-Gonzalez *et al.*, 2010). En el presente estudio se detectaron tres carbapenemas diferentes (NDM, OXA-48 y VIM) en un período de dos años.

La carbapenemasa detectada con mayor frecuencia en este estudio fue NDM en el 77.5% de los aislamientos productores de carbapenemasas, en la actualidad este gen y sus variantes han sido reportados a nivel mundial en distintas especies (Kumarasamy *et al.*, 2010). En nuestro estudio se identificó a *E. coli*, *P. rettgeri*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *M. morganii* y *C. freundii* como portadores de NDM. Un estudio en el Hospital Civil “Fray Antonio Alcade” en Guadalajara reportó que el 92.3% de sus aislamientos portaban el gen NDM, donde incluían como aislamientos principalmente a *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* y *P. rettgeri* (Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2017). De acuerdo con informes de Estados Unidos, el gen predominante en Enterobacterales en las IAAS es KPC, principalmente debido a la colonización entre los residentes de centros de atención a largo plazo (Jean *et al.*, 2015). Sin embargo, en México actualmente NDM es la carbapenemasa más prevalente (Garza-González *et al.*, 2021).

La segunda carbapenemasa detectada en este estudio fue OXA-48 con el 16.4%, identificado en *E. coli* (n=3), *E. cloacae* (n=2), *K. pneumoniae* (n=2), *C. freundii* (n=1) y *K. variicola* (n=1). En un informe de la globalización de OXA-48 en el 2019, se indicó que *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* y *Enterobacter* spp. tienden a ser portadores de OXA-48 en infecciones intrahospitalarias, a excepción de *E. coli* que es de cepas adquiridas en la comunidad (Zurfluh *et al.*, 2015).

Alguno de los aislamientos de OXA-48 portan a la par NDM (n=3). En Inglaterra, en el Programa Inglés de Vigilancia para la Utilización y Resistencia Antimicrobiana (ESPAUR, por sus siglas en inglés), en su informe 2018 – 2019, indicaron que la combinación de OXA-48 y NDM es la más común (Van y Doi, 2017). Esto se debe a la propagación de OXA-48 a través de plásmidos es 50 veces más frecuente que el de NDM, incluso puede ser en presencia de otro gen codificante para carbapenemasa (Pitout *et al.*, 2019). En el hospital real de Muscat, Sultano de Oman se identificó un aislamiento de *K.*

pneumoniae portadora de OXA-48 y NDM por medio de secuenciación y se confirmó que esta clona había sido previamente descrita en la India. El estudio de Onyeji *et al.* (2024) también concuerda con la coexpresión de OXA-48 y NDM en *K. pneumoniae*, identificando cuatro aislamientos provenientes de un hospital terciario privado en el suroeste de Nigeria.

Comprender la distribución de otros factores, como la producción de betalactamasas de espectro extendido, es necesario debido a que confiere resistencia a cefalosporinas y puede provocar resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos que presenten algún mecanismo no enzimático de resistencia. Se ha demostrado una estrecha relación entre las BLEE (SHV y CTX-M) y la producción de enzimas OXA-48 (Ain *et al.*, 2018). En este estudio el 20% de los aislamientos portadores de CTX-M y el 28.6% de los aislamientos portadores de SHV tenían el gen OXA-48, corroborando lo antes mencionado.

No obstante, OXA-48 no es la única carbapenemasa asociada con BLEE. En un estudio global del programa de Vigilancia en un período de 2012 a 2017, NDM mostró la mayor correlación con las BLEE en comparación con otras MBL, particularmente en *K. pneumoniae* (Kazmierczak *et al.*, 2021). En este estudio se presentó el gen NDM a la par con CTX-M en un 90.9% (10/11) y SHV en un 20% (1/5) de los aislamientos.

Adicionalmente, se realizaron pruebas genotípicas a los aislamientos clasificados fenotípicamente como no productoras de carbapenemasas, considerando que ninguna de las metodologías fenotípicas brindan un 100% de sensibilidad a todas las carbapenemasas, como se ha descrito anteriormente. Este análisis reveló que no hubo presencia de los genes KPC, GES, NDM, VIM e IMP, pero si se identificaron nueve aislamientos portadores de OXA-48, lo que destaca la importancia de complementar los métodos fenotípicos con pruebas moleculares para una detección más precisa. En un estudio de control epidemiológico de resistencia a carbapenémicos en Bélgica, se detectaron 19 cepas con OXA-48 en pacientes hospitalizados, sin tener alguna relación con países endémicos, donde estas cepas no habían sido identificadas correctamente debido a su perfil de resistencia a carbapenémicos, lo que hizo difícil su identificación temprana (Glupeczynski *et al.*, 2012).

La resistencia a antibióticos global en los aislamientos analizados superó el 60% en la mayoría de los antimicrobianos evaluados, con excepción de amikacina, aztreonam-avibactam y colistina, que mostraron mayores porcentajes de susceptibilidad. Estos resultados son similares con lo reportado por Medugu *et al.* (2023), quienes en un estudio, caracterizaron fenotípica y genotípica enterobacteriales en seis hospitales en el norte de Nigeria, observando niveles de resistencia superiores al 60% a la mayoría de los antibióticos, salvo a amikacina, ceftazidima-avibactam y colistina. En dicho estudio, el grupo con mayor porcentajes de resistencia fue el de las cefalosporinas (85.5%), seguido por carbapenémicos (65.3%).

Respecto a los inhibidores de betalactamasas en combinación con betalactámicos se destaca el contraste entre ceftazidima-avibactam y aztreonam-avibactam. Mientras ceftazidima-avibactam mostró una resistencia del 58.2%, aztreonam-avibactam logró una susceptibilidad mayor, con un 76.4% de aislamientos susceptibles.

La diferencia observada entre ceftazidima-avibactam y aztreonam-avibactam puede atribuirse a las características del avibactam y al antibiótico con el que se combina. Aunque avibactam es eficaz frente a betalactamasas de clase A, C y algunas de clase D, no inhibe a las metalo- β -lactamasas (MBL) como NDM, VIM e IMP (Rodríguez *et al.*, 2022). Por ello, ceftazidima-avibactam pierde efectividad frente a aislamientos productores de MBL, como se evidenció en este estudio. Por otro lado, aztreonam es resistente a la hidrólisis por MBL, y su combinación con avibactam permite una cobertura ampliada contra diversas β -lactamasas, incluidas las clases A y C. Esto explica la susceptibilidad observada frente a aztreonam-avibactam (Pasteran *et al.*, 2022). En concordancia con estos resultados, un estudio realizado en un hospital de enseñanza en China reportó que aztreonam-avibactam representa una de las pocas alternativas terapéuticas eficaces frente a enterobacteriales resistentes a carbapenémicos productores de MBL (Wang *et al.*, 2014).

Estos hallazgos se ven respaldados también por estudios más recientes. En una investigación multicéntrica en Argentina post COVID-19 reportaron que aztreonam-avibactam tiene altos porcentajes de susceptibilidad en enterobacteriales portadores de

MBL. En este estudio reportan un 5.0% de resistencia a esta combinación de antibióticos. En el caso de ceftazidima-avibactam tuvieron un porcentaje de 50.7% de resistencia por la alta recuperación de MBL (Echegorry *et al.*, 2024), coincidiendo con nuestros resultados.

La clara diferencia entre los perfiles de susceptibilidad de los grupos evaluados: productores y no productores de carbapenemasas así como portadores del gen NDM, pone en evidencia el impacto que tienen estos mecanismos frente a sus opciones terapéuticas. El grupo portador de NDM se representa como el más problemático desde el punto de vista epidemiológico, ya que no solo se ven afectadas las cefalosporinas, penicilinas y carbapenémicos, sino que tampoco son inhibidas por los inhibidores clásicos como el avibactam. En este estudio el porcentaje de resistencia en los aislamientos portadores de NDM en la mayoría de los antibióticos fue mayor al 90%, lo que coincide con Jeong *et al.*, 2020, quienes observaron que los aislamientos portadores de NDM tuvieron una tasa de resistencia del 95.8% a la mayoría de los antibióticos, con excepción de algunos aminoglucósidos y polimixinas. En contraste, los productores de carbapenemasas mostraron un perfil de susceptibilidad similar pero con cierta variabilidad, probablemente relacionado a la heterogeneidad en los genes identificados. Esta diferencia sugiere que aunque el fenotipo es similar, el tipo específico de carbapenemasa impacta de forma diferente en la susceptibilidad. Por ejemplo, NDM tiene una mayor capacidad hidrolítica frente a las cefalosporinas y carbapenémicos, lo que puede explicar la variabilidad observada en la resistencia (Poirel *et al.*, 2012). Los aislamientos no productores, aunque clasificados como enterobacteriales resistentes a carbapenémicos, evidencian un perfil de susceptibilidad más favorable. Esto sugiere que podrían estar involucrados otros mecanismos de resistencia como pérdida de porinas, sobreexpresión de bombas de eflujo o hiperexpresión de BLEE, en ausencia de carbapenemasas (Tamma *et al.*, 2021).

En el presente estudio, se determinó la presencia de plásmidos en los aislamientos portadores de NDM, OXA-48 y VIM. Mediante el ensayo de hidrólisis alcalina descrita por Kaiser, se logró identificar de uno a cinco plásmidos por aislamiento con un tamaño que oscilaba entre 105 a 170 Kb. Para el gen NDM se identificaron 20 perfiles de distintos aislamientos, donde el número de plásmidos por aislamiento y el tamaño son similares a

lo reportado por Bocanegra-Ibarias en 2017 en 15 perfiles distintos en aislamientos de enterobacteriales portadores de NDM-1.

En el caso de OXA-48 y VIM se detectaron plásmidos de 166 Kb y 142 Kb, respectivamente. En un brote de *K. pneumoniae* portador de OXA-48 en China por medio de S1-PFGE reportaron que el tamaño del plásmido fue de 69 Kb (Guo *et al.*, 2016), siendo el reportado en el presente estudio de un tamaño mayor.

Para revisar la capacidad de transferencia de genes se realizó el ensayo de conjugación bacteriana descrito por Miller, a los aislamientos que mostraron un perfil de plásmidos. La conjugación fue efectiva en 16 aislamientos en cuatro diferentes especies: *E. coli* (n=5), *E. cloacae* (n=4), *P. rettgeri* (n=3) y *K. pneumoniae* (n=2). Wang y colaboradores (2022) reconocieron a *E. coli*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae* como especies altamente competentes para la conjugación bacteriana, donde *E. coli* ha sido ampliamente utilizada por su capacidad para transferir plásmidos con frecuencia de hasta 10^{-1} . *K. pneumoniae* también cuenta con una alta tasa de conjugación bacteriana que puede alcanzar valores cercanos a 1, donde favorece la diseminación de genes como KPC y OXA-48. Por su parte *E. cloacae* ha demostrado frecuencias de transferencia de plásmidos de NDM de hasta 1.68×10^{-3} (Yang *et al.*, 2020).

9. CONCLUSIÓN

- En aislamientos de *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *M. morganii*, *P. rettgeri* y *C. freundii* se detectó la resistencia a carbapenémicos.
- En gran parte de los aislamientos obtenidos la resistencia a carbapenémicos se relacionó con los genes NDM, VIM y OXA-48.
- Las BLEE identificadas fueron CTX-M y SHV.
- Los aislamientos presentaron una elevada resistencia a la mayoría de los antibióticos analizados.
- El perfil de plásmidos indicó la presencia de entre uno a cinco plásmidos con tamaño de 105 a 170 KB en los aislamientos portadores de NDM, OXA-48 y VIM.
- La conjugación bacteriana fue exitosa en 16 aislamientos portadores de NDM, VIM y OXA-48.

10. Perspectivas

- Realizar la identificación y caracterización de mecanismos no enzimáticos de resistencia a carbapenémicos
- Revisar la diversidad clonal de cada una de las especies bacterias por PFGE y MLST.
- Confirmar el plásmido de portador de NDM, OXA-48 y VIM por medio de ensayos de hibridación.
- Realizar un patrón de restricción de los diferentes plásmidos obtenidos para realizar una comparación entre ellos.

11. Bibliografía

- Ahlam Alsaadi , A. A. (marzo de 2024). *Epidemiología y características clínicas de las infecciones por Morganella morganii : un estudio retrospectivo multicéntrico*. Recuperado el 7 de marzo de 2025, de ELSERVIER: https://www-sciencedirect-com.translate.goog/science/article/pii/S1876034123004550?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=wa
- Ain Noor, A. I. (2018). High frequency and molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in a tertiary care hospital in Lahore, Pakistan. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 128.
- Arana D, O. A. (2017). isolated in Spain from 2013 to 2015 produced a variety of carbapenemases including VIM-1, OXA-48, KPC-2, NDM-1 and VIM-2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 3283–3287.
- Barrios H, G.-R. U.-F.-P.-M.-G.-D.-O.-L.-S. (2013). Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico. *J Antimicrob Chemother*, 1934-6.

- BM, L. J. (2016). The Problem of Carbapenemase Producing Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae Detection. *J Clin Microbiol*, 529-34.
- Bocanegra-Ibarias P, G.-G. E.-O.-T.-N.-R. (2017). Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico. *PLoS ONE*.
- Branka Bedenić, S. S.-B.-G.-Z. (2016). Molecular characterization of class b carbapenemases in advanced stage of dissemination and emergence of class d carbapenemases in Enterobacteriaceae from Croatia . *Infection, Genetics and Evolution*, 1567-1348.
- Echegorry, M. M.-A. (2024). Estudio Multicéntrico Nacional sobre la Prevalencia de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasa en la era post-COVID-19 en Argentina: El estudio RECAPT-AR. *Antibióticos*, 1139.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2018). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2017. *Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*, 20-25.
- Glupczynski Y, H. T. (2012). Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents*, 168-72.
- García-Betancur JC, A. T.-H.-M.-V. (2020). Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert review of Anti-infective Therapy*, 17-24.
- Garza-González E, B.-I. P.-D.-V.-d.-L.-G.-K.-S.-R.-C.-J.-C.-C.-T.-O.-L. (2021). Drug resistance phenotypes and genotypes in Mexico in representative gram-negative species: Results from the infivar network. *PLoS One*.
- Gualan, C. S. (2024). identificación de enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Universitario Católico de Cuenca. *Vive Revista de Salud*, 359-370.
- Guo L, A. J. (2016). Brote nosocomial de Klebsiella pneumoniae productora de OXA-48 en un hospital chino: transmisión clonal de ST147 y ST383. *PLOS ONE* , 11 (8).
- Hansen, G. T. (2021). Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther*, 75-92. doi:<https://doi.org/10.1007/s40121-020-00395-2>
- Hui Liu, J. Z. (Septiembre de 2016). *Morganella morganii* , un patógeno oportunista no negligente. Recuperado el 7 de marzo de 2025, de ELSERVIER: https://www-sciencedirect-com.translate.google/science/article/pii/S1201971216311134?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=wa
- Jalalvand, K. ,. (2020). Evaluation of Phenotypic and Genotypic Characteristics of Carbapenemases-producing Enterobacteriaceae and Its Prevalence in a Referral Hospital in Tehran City. *Iranian Journal Pathology*, 86-95. Obtenido de Iranian Journal of Pathology: https://ijp.iranpath.org/article_38304.html
- Jacoby, G. (2009). AmpC β -Lactamasas. *Clin Microbiol Rev*. doi:10.1128/CMR.00036-08
- James A. Karlowsky, M. A. (2021). In vitro activity of ceftaroline against bacterial pathogens isolated from patients with skin and soft tissue and respiratory tract infections in the Middle East and Africa: AWARE global surveillance programme 2015–2018. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 249-256.

- Jean, S. S. (2015). Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria: Current Epidemics, Antimicrobial Susceptibility and Treatment Options. *Future Microbiology*, 407–425.
- Juárez, P. C. (2013). Importancia de la bacteremia primaria por *Escherichia coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido en pacientes con neoplasias hematológicas que cursan con neutropenia grave. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 248-252. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/473/47328902014.pdf>
- Kazmierczak, K. J. (2021). Epidemiology of Carbapenem Resistance Determinants Identified in Meropenem-nonsusceptible Enterobacterales collected as part of a Global Surveillance Program, 2012-2017. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65.
- Kumarasamy KK, T. M. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 597–602.
- Kus, J. (2014). Infections due to *Citrobacter* and *Enterobacter*. *Biomedical sciences*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05089-3>.
- Morfin-Otero R, R.-N. E. (2009). Dissemination of a bla(VIM-2)-carrying integron among Enterobacteriaceae species in Mexico: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Microb Drug Resist*, 33-5.
- Moya Tatiana, H. M. (2001). *Morganella morganii* Estudio sobre el aislamiento de 192 cepas en el Hospital Nacional de Niños, entre 1995 y 2000. Recuperado el 7 de marzo de 2025, de SciELO: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100008
- Mustafai, M. M. (2023). Prevalencia de la carbapenemasa y la β -lactamasa de espectro extendido que producen enterobacteriaceae: un estudio transversal. *Antibióticos*, 12(1), 148.
- Onyeji, C. E. (2024). Molecular detection of OXA-48 and NDM-1 carbapenemase genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* recovered from patients attending a private tertiary hospital in Southwestern Nigeria. *BMC Infect Dis* 24.
- Organización Mundial de la Salud. (27 de Febrero de 2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed#:~:text=Entre%20tales%20bacterias%20se%20incluyen,la%20corriente%20sangu%C3%ADnea%20y%20neumon%C3%ADas.>
- Palzkill, T. (2013). Estructura y función de la metalo- β -lactamasa. *Ann N Y Acad Sci*. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06796.
- Papagiannitsis CC, S. V. (2015). Ensayo de hidrólisis de meropenem de desorción láser de tiempo de vuelo y ionización de desorción láser asistida por matriz con NH_4HCO_3 , una herramienta confiable para la detección directa de la actividad de la carbapenemasa. *J Clin Microbiol*, 1731–1735.
- Pascual A. Apanga Jamil Ahmed Curtidor de viento, K. S. (2022). Enterobacteriaceae resistentes al carbapenem en los desagües de los sumideros de 40 centros de atención médica en Sindh, Pakistán: Un estudio transversal. *PLOS ONE*, 17(2).

- Pasteran Fernando, C. M. (2022). AZTREONAM-AVIBACTAM (ATM-AVI) Y AZTREONAM-RELEBACTAM (ATM-RELE): SON EQUIVALENTES FRENTE A ENTEROBACTERIALES PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS (CPE). *ASEI*, 25-36.
- Pitout JDD, P. G. (2019). The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*, 102-19.
- Poirel, L. P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1597–1606.
- Rodríguez A, M. G.-L. (2022). Antibiotics in development for multiresistant gram-negative bacilli. *Med Intensiva (Engl Ed)*, 630-640.
- Rodríguez-Zulueta P, S.-S. J.-M.-P.-E.-C.-S.-E.-L.-C.-R. (2013). First outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates in a Mexican Medical Center. *ntimicrob Agents Chemother*, 4086-8.
- Schaffarczyk L, N. J. (2024). Detection of rare carbapenemases in Enterobacterales—comparison of two colorimetric and three CIM-based carbapenemase assays. . *Microbiol Spectr* , 15-23.
- Sandra Yamile Saavedra Rojas, C. D. (julio de 2017). *Emergencia de Providencia rettgeri NDM-1 en dos departamentos de Colombia, 2012-2013*. (E. I. Clínica, Ed.) Recuperado el marzo de 2025, de ELSERVIER: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-emergencia-providencia-rettgeri-ndm-1-dos-S0213005X15001986>
- Segarra, C. G. (2021). *Caracterización clínica, epidemiológica y factores de riesgo para la infección/colonización por Enterobacterales productores de carbapenemasa*. Obtenido de Universidad de Granada: <https://digibug.ugr.es/handle/10481/71419>
- Tamma, P. D. (2021). Infectious Diseases Society of America guidance on the treatment of AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales, carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases*, e169–e183.
- Torres-Gonzalez P, C.-H. M.-O.-V.-H.-G.-F.-G.-D.-O.-d.-L. (2010). Factors Associated to Prevalence and Incidence of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Fecal Carriage: A Cohort Study in a Mexican Tertiary Care Hospital. *PLoS One*, 10-13.
- UK Standards for Microbiology Investigations. (2013). Identification of Enterobacteriaceae. *Health England*, 32. Obtenido de https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5a81b172ed915d74e6233a45/ID_16dp_UC.pdf
- Van Duin D, D. Y. (2017). La epidemiología global de las Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasa. *Virulencia*, 460-469.
- Wang, Q. L. (2022). Capsule production and transfer efficiency of carbapenem-resistant plasmids in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 1575–1584.
- Yang L, C. Q. (2020). Characterization of a New Transposon, Tn6696, on a blaNDM-1-Carrying Plasmid From Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* ssp. *dissolvens* in China. *Front. Microbiol.*, 11.
- Zurfluh K, N.-I. M. (2015). Aparición de *Escherichia coli* produciendo OXA-48 beta-lactamasa en la comunidad de Suiza. *Control de infección de resistencia antimicrobiana*, 4-9.

