

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE METALO- β -LACTAMASAS EN
AISLAMIENTOS HOSPITALARIOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Microbiología, Parasitología y Química Clínica para optar al grado de *Magister Scientiae* en
Microbiología

FRANCISCO TOVAL MALDONADO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2008

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de cumplir esta meta.

Muy especialmente a mi esposa Marisol García y a mis hijos Brissa y David, por su sacrificio en este proyecto familiar y a mis padres Francisco y Estela, por haberme dado el maravilloso regalo de la vida.

AGRADECIMIENTOS

Mi especial agradecimiento al Dr. Fernando García por su invaluable apoyo y guía en mis estudios de posgrado y la tutoría de mi tesis.

Al Dr. César Rodríguez por su invaluable amistad y por el tiempo que dedicó para resolver mis dudas y consultas.

Ambos me brindaron un excelente ejemplo de motivación, superación personal y calidad académica.

A la Dra. Teresita Somogyi por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo y por su ejemplo y entusiasmo para estudiar los mecanismos de resistencia en los aislamientos del Hospital México.

A la M.Sc. Evelyn Rodríguez y la M.Sc. María del Mar por la revisión, sugerencias y comentarios constructivos para mejorar esta investigación.

A la M.Sc. Lizeth Taylor por su aporte en reactivos Big Dye, lo que me permitió completar algunas secuencias que estaban pendientes por analizar. De esta forma pudimos ahorrar tiempo valioso para la culminación de este estudio.

A la M.Sc. Rebeca Campos, por su asistencia durante las reacciones de secuenciación de ADN.

A la Dra. Ana C. Gales del Laboratorio Especial de Microbiología Clínica de la Universidad de Sao Paulo, por aportar generosamente las cepas productoras de metalo- β -lactamasas utilizadas como controles positivos en la investigación.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y la confianza que depositaron en mí en todo momento.

A la Fundación CR-USA y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por su apoyo económico para la realización del presente trabajo.

Así mismo, experimento un profundo sentimiento de gratitud hacia Yeimy Ramírez, Jhonnatan Campos y Carlos Vargas por el ambiente y el calor humano que mantuvieron conmigo en el laboratorio.

A mis compañeros de Maestría Estela Barboza, Magaly Segura, Olga Rivas, Alejandro Ulloa, Javier Oviedo y Carlos Quesada por su amistad, sus consejos y sugerencias.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae* en Microbiología".

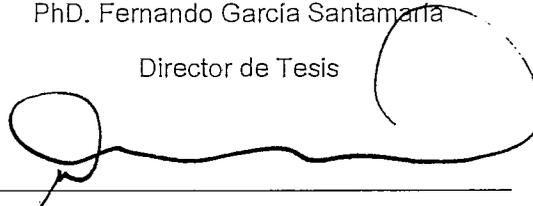


MSe. Evelyn Rodríguez Cavallini

Representante de la Decana del Sistema
de Estudios de Posgrado

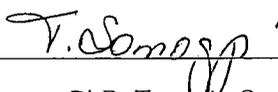


PhD. Fernando García Santamaría
Director de Tesis



PhD. César Rodríguez Sánchez

Asesor



PhD. Teresita Somogyi Pérez

Asesora



MSc. María del Mar Gamboa Coronado

Representante del Director del Programa de Posgrado
en Microbiología, Parasitología y Química Clínica



Francisco Toval Maldonado

Candidato

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 Resistencia a los antibióticos como problema en el manejo clínico de las infecciones.....	3
1.3 Mecanismos de resistencia adquirida.....	5
1.3.1 Disminución en la captación de la droga con énfasis en la resistencia a β -lactámicos en <i>P. aeruginosa</i>	5
1.3.2 Alteración del sitio blanco con énfasis en la resistencia a β -lactámicos en <i>P. aeruginosa</i>	6
1.3.3 Bombas de eflujo con énfasis en la resistencia a β -lactámicos en <i>P. aeruginosa</i>	7
1.3.4 β -lactamasas con énfasis en la resistencia a β -lactámicos en <i>P. aeruginosa</i>	9
1.3.4a β -lactamasa AmpC.....	12
1.3.4b Carbapenemasas clase A de Ambler.....	12
1.3.4c Carbapenemasas clase B de Ambler.....	12
1.3.4c1 Metaloenzimas naturales.....	13
1.3.4c2 Metaloenzimas adquiridas.....	13
1.3.4d Carbapenemasas clase D de Ambler.....	14
1.4 Localización de los genes de metalo- β -lactamasas.....	15
1.5 Integrones clase 1.....	16
1.6 Diseminación de metalo- β -lactamasas.....	18
1.7 Detección fenotípica de metalo- β -lactamasas.....	19
2. JUSTIFICACION.....	21
3. OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS.....	22
3.1 Objetivo general.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	22

5. MATERIALES Y METODOS.....	23
5.1 Descripción de los aislamientos.....	23
5.2 Demostración fenotípica de la actividad metalo-β-lactamasa de los aislamientos.....	24
5.3 Extracción de ADN.....	24
5.4 Determinación de la presencia de los genes codificantes de metalo-β-lactamasas.....	24
5.5 Caracterización filogenética de las <i>P. aeruginosa</i> por la técnica de RAPD.....	25
5.6 Detección de integrones clase 1.....	26
5.7 Clonación de productos de amplificación correspondientes a cassettes génicos.....	27
5.8 Secuenciación de ADN.....	29
5.9 Análisis estadísticos.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1 Porcentaje de resistencia antimicrobiana en los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	30
6.2 E-test MBL para la detección de metalo-β-lactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
6.3 PCR múltiple para investigar la presencia de los genes <i>bla_{IPM1}</i> , <i>bla_{VIM1}</i> , <i>bla_{SPM1}</i> , <i>bla_{GIM}</i> y <i>bla_{SIM}</i>	32
6.4 Frecuencia de <i>P. aeruginosa</i> productores de metalo-β-lactamasas según origen de la muestra.....	33
6.5 Análisis comparativo de la resistencia antimicrobiana en aislamientos productores y no productores de metalo-β-lactamasas.....	34
6.6 Detección de integrones de clase 1 mediante PCR.....	35
6.7 Secuenciación de los cassettes génicos contenidos en los integrones de clase 1.....	40
6.8 Metalo-β-lactamasas e integrones de clase 1.....	42
6.9 Metalo-β-lactamasas y su relación clonal a través de la técnica de RAPD.....	44
7. DISCUSIÓN.....	50
8. CONCLUSIONES.....	58
9. REFERENCIAS.....	59

RESUMEN

Se estudiaron 198 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados del Hospital México entre noviembre 2004 y octubre 2005. Debido a la resistencia mostrada a los carbapenemes, se investigó la presencia de las metalo- β -lactamasas IMP, VIM, SPM-1, GIM-1 y SIM-1 mediante E-test MBL y PCR múltiple. Además, se estudió la posible asociación con integrones de clase 1 mediante PCR y secuenciación de los cassettes génicos y se compararon los aislamientos metalo- β -lactamasas (MBL) positivo con la técnica RAPD empleada por Madriz-Garita.

Los dos hallazgos más relevantes de la presente investigación son la presencia de dos genes diferentes, *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}, en la mayoría de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes, y que ambos genes no están, aparentemente, asociados a integrones de clase 1.

Los resultados de la secuenciación de la región variable de los integrones de clase 1 mostró la presencia de los genes *aacA4*, *aadA2*, *aadA6*, *orfD* y *qacF* distribuidos en 18 aislamientos sensibles a imipenem y meropenem, mientras que, aunque los aislamientos MBL positivo presentaron integrones de clase 1, no se obtuvo amplicones con los primers 5'CS y 3'CS utilizados para determinar la presencia de cassettes génicos.

Un tercer hallazgo significativo es que los aislamientos de *P. aeruginosa* portadores de los genes *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} pertenecen a varios grupos o clones genéticamente diversos, por lo que cabe la posibilidad de plásmidos conjugativos u otros elementos genéticos móviles que efectúen una transferencia horizontal de *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} simultáneamente entre diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las β -lactamasas.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la detección de los genes codificantes de las MBLs.

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para la detección de regiones de integrones clase 1.

Cuadro 4. Porcentaje de resistencia antimicrobiana en 198 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*.

Cuadro 5. *P. aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas según origen de la muestra.

Cuadro 6. Porcentaje de resistencia antimicrobiana según la presencia o ausencia de MBLs.

Cuadro 7. Integrones de clase 1 en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* no productores de MBLs.

Cuadro 8. Cassettes génicos obtenidos con los primers 5'CS y 3'CS.

Cuadro 9. Asociación entre metalo- β -lactamasas e integrones de clase 1.

Cuadro 10. Aislamientos productores de metalo- β -lactamasas según servicio hospitalario.

Cuadro 11. Relación clonal entre las *P. aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de imipenem, meropenem y ertapenem (Tomado de Giske, 2007).

Figura 2. Comparación de las cinco familias de eflujo de drogas (Tomado de Piddock, 2006).

Figura 3. Representación esquemática de la inserción de un cassette génico en la primera posición de un integrón de clase 1 (Tomado de Mendes, 2006).

Figura 4. Test de sinergia de doble disco (Tomado de Lee *et al.*, 2003).

Figura 5. Tira E-test MBL (Tomado de Walsh *et al.*, 2005).

Figura 6. Resultados fenotípicos de la detección de metalo- β -lactamasas con E-test MBL.

Figura 7. PCR múltiple para las metalo- β -lactamasas tipo IMP, tipo VIM, SPM-1, GIM-1 y SIM-1.

Figura 8. PCR IntAB para el gen *Int1*.

Figura 9. PCR *sul1-sul1.rev* para el gen *sul1*.

Figura 10. PCR *orf4-sul1.rev* para el gen *qac Δ E1*.

Figura 11. PCR 5'CS-3'CS para la región variable (cassettes génicos).

Figura 12. PCR Int2F-3'CS para la región variable e integrasa.

Figura 13. PCR 5'CS-3'CS para la región variable de aislamientos de *P. aeruginosa* imipenem-resistentes con cassette vacío.

Figura 14. Porcentaje de correlación entre las distintas cepas de *P. aeruginosa*, su lugar de aislamiento según sexo, servicio, tipo de muestra y grupo al que pertenecen.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAC	Aminoglicósido acetiltransferasa
AAD	Aminoglicósido adeniltransferasa
ABC	Cassette de unión a ATP
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APH	Aminoglicósido fosfotransferasa
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
dNTP	Desoxiribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERIC	Regiones consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias
GIM	Imipenemasa alemana
IMP	Imipenemasa
IC	Intervalo de confianza
In	Integrón
IS	Secuencias de inserción
M	Molar
MATE	Multidroga y extrusión de compuestos tóxicos
MBL	Metalo- β -lactamasas
MFS	Superfamilia de facilitadores mayores
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OR	Odds ratio

ORF	Marcos de lectura abierta
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas de unión a penicilinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación al azar de ADN polimórfico
RND	División nodular de resistencia
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SIM	Seúl imipenemasa
SMR	Familia pequeña de multidroga resistencia
SPM	Sao Pablo imipenemasa
Tn	Transposón
µg	Microgramos
µl	Microlitros
VIM	Verona imipenemasa

1. INTRODUCCION

1.1 CARACTERISTICAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo recto o ligeramente curvo (0.5-1.0 x 1.5-5.0 µm) que se mueve por medio de flagelos polares. Posee un genoma de 6.3 millones de pares de bases (Mbp) con 5570 marcos de lectura abiertos (ORFs). Su complejidad genética es comparable con el eucariota *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo genoma codifica para 6200 proteínas. Se ha asignado una función al 54.2% de sus ORFs descritos; de éstos, 372 codifican para genes de enzimas biosintéticas de lípolisacáridos y factores de virulencia (Stover *et al.*, 2000; Mahon *et al.*, 2007).

P. aeruginosa tiene una capacidad excepcional para colonizar diversos nichos ecológicos aunque existan limitaciones de nutrientes. Su capacidad para sobrevivir por largos períodos en ambientes húmedos le confiere características de ubicuidad (Mahon *et al.*, 2007). Este microorganismo no realiza fermentación y emplea relativamente pocos carbohidratos mediante metabolismo oxidativo. La producción de la enzima citocromo C oxidasa se utiliza para diferenciarlos de las enterobacterias y permite la identificación preliminar de los aislamientos. *P. aeruginosa* crece con rapidez en diferentes medios de cultivo de uso en el laboratorio clínico (agar MacConkey, agar sangre) y produce pigmentación debido a la producción de piocianina, fluoresceína y pioverdina (Murray *et al.*, 1996). Otras características de este microorganismo son la producción de gluconato por oxidación de la glucosa, la capacidad de hidrolizar arginina, crecer en cetrimida a 42°C y la utilización de citrato y acetamida (Mahon *et al.*, 2007).

Las especies de *Pseudomonas* normalmente se encuentran en el suelo, en la materia orgánica en descomposición, en el agua y en la vegetación. No obstante, pueden aislarse de la piel, de la garganta y de las heces de personas sanas. A menudo colonizan el medio ambiente hospitalario en reservorios húmedos, como alimentos, grifos, equipos de terapia respiratoria e incluso desinfectantes (Murray *et al.*, 1996).

En las muestras clínicas, *P. aeruginosa* es la especie de *Pseudomonas* aislada con mayor frecuencia entre los bacilos Gram-negativos no fermentadores. Se considera su implicación en el 5

a 15% de todas las infecciones nosocomiales, especialmente neumonías y bacteremias (Mahon *et al.*, 2007). Además, *P. aeruginosa* ocupa el primer lugar en las infecciones nosocomiales del tracto respiratorio y son un grave problema en los pacientes hospitalizados con cáncer, fibrosis quística y quemaduras, ocupando el 50% de las causas de muerte. La diseminación es de paciente a paciente vía contacto con fomites o por ingestión de alimentos y aguas contaminadas. Otras infecciones menos graves incluyen otitis externa, foliculitis e infecciones del tracto urinario (Mahon *et al.*, 2007).

P. aeruginosa puede producir una variedad de factores de virulencia, tales como lipopolisacáridos (LPS), que son importantes en la bacteremia y el shock séptico, pili y cápsula. Además produce diversas exotoxinas con actividad de proteasa, lecitinasa, elastasa y DNasa. La exotoxina más importante es probablemente la exotoxina A, una exotoxina con funciones similares a la exotoxina diftérica, que bloquea la síntesis de proteínas (Mahon *et al.*, 2007).

En infecciones del tracto respiratorio en pacientes con fibrosis quística, la mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* producen colonias mucoides debido a la sobreproducción de alginato, un polímero de polisacáridos con actividad antifagocítica (Mahon *et al.*, 2007).

En la actualidad, la atención clínica se ha enfocado en el incremento de la frecuencia con que se asocian patógenos Gram-negativos no fermentadores de lactosa con infecciones nosocomiales. En este grupo, *P. aeruginosa* emerge como una de las principales causas de infección en las unidades de cuidados intensivos (Bonomo y Szabo, 2006). Su diseminación es muy difícil de controlar, debido a la presencia de múltiples mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos (Sevillano *et al.*, 2006).

Debido a su eficacia y seguridad, el tratamiento preferido para estas infecciones son los antibióticos β -lactámicos, pero el uso prolongado de generaciones sucesivas de este tipo de antimicrobianos en los últimos 60 años, ha seleccionado también generaciones sucesivas de enzimas β -lactamasas, cada una más potente que la anterior (Livermore y Woodford, 2006).

1.2 RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS COMO PROBLEMA EN EL MANEJO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES POR *P. aeruginosa*.

1.2.1 Generalidades de los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son potentes, de amplio espectro y tienen actividad bactericida con baja toxicidad para las células eucariotas. Actúan mediante interacción con proteínas de unión a penicilinas (PBPs), las cuales están involucradas en la síntesis de pared celular (Georgopapadakou, 1993; Fluit *et al.*, 2001). Estos agentes abarcan una gran cantidad de compuestos, en su mayoría semi-sintéticos que podrían clasificarse como penicilinas (penicilina, aminopenicilinas, ureidopenicilinas, carboxipenicilinas, penicilinas estables a las penicilinasas y amidinopenicilinas), cefalosporinas (cefalosporinas de I a IV generación, cefamicinas, oxacefemes y carbacefemes), el monobactámico monocíclico, denominado aztreonam y penemes (carbapenemes) (Georgopapadakou, 1993; CLSI, 2007).

La susceptibilidad a los β -lactámicos varía entre las especies bacterianas y refleja los efectos combinados de la unión a las PBP, de su estabilidad frente a las β -lactamasas y, en las bacterias Gram-negativas, de la permeabilidad a la membrana externa (Georgopapadakou, 1993; Yano *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2005).

Se calcula que las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactames representan el 60% de todos los antimicrobianos utilizados (Livermore y Woodford, 2006). Entre los antibióticos β -lactámicos, los carbapenemes, tales como el imipenem, panipenem y meropenem, poseen el espectro más amplio de actividad bactericida, por lo que a menudo son utilizados como último recurso para tratar infecciones producidas por bacilos Gram-negativos multirresistentes (Yano *et al.*, 2001). La estructura de los carbapenemes difiere levemente de la estructura de las penicilinas y son mucho más resistentes a la hidrólisis por las β -lactamasas (Moellering *et al.*, 1989). Un ejemplo es el imipenem (Figura 1), el cual tiene una estructura química que difiere del núcleo penam, porque posee un átomo de carbono en vez de azufre en la posición 1 del anillo tiazolidina. Además, presenta un enlace no saturado entre los carbonos 2 y 3 del núcleo (Moellering *et al.*, 1989). La cadena lateral hidroxietílica en configuración *trans* difiere de los radicales acilamino en

configuración *cis* presentes en el resto de las penicilinas y cefalosporinas, y es la que protege el anillo β -lactámico de la hidrólisis enzimática (Moellering *et al.*, 1989). Además, el bajo peso molecular del compuesto y su naturaleza zwitteriónica permiten explicar en parte su elevada capacidad de penetrar a través de la membrana externa de bacilos Gram-negativos (Nikaido, 1989; Iyobe *et al.*, 1999).

Otro carbapenem recientemente aprobado en Estados Unidos es el ertapenem, el cual presenta un espectro de actividad bactericida similar a imipenem y meropenem contra la mayoría de las bacterias de la familia Enterobacteriaceae, especies Gram-positivas y anaerobios, pero es menos activo contra bacterias no-fermentadoras (Livermore *et al.*, 2003). El ertapenem difiere de meropenem únicamente en su sustituyente 2', donde presenta un grupo ácido benzoico *meta*-sustituido. Al igual que el meropenem y a diferencia del imipenem, en el carbono 1 presenta un grupo β -metilo que lo protege de la hidrólisis causada por la dehidropeptidasa renal I (Livermore *et al.*, 2003). Por otro lado, al igual que el imipenem y el meropenem, el ertapenem tiene una cadena hidroxietílica en configuración *trans* en la posición 6, y puesto que es una molécula más grande y cargada negativamente, se estima que podría tener una penetración más lenta en las bacterias Gram-negativas en comparación con meropenem (Livermore *et al.*, 2003).

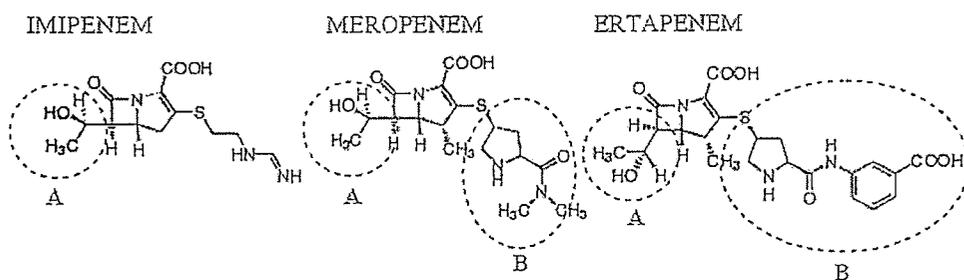


Fig. 1. Estructura química de imipenem, meropenem y ertapenem (Tomado de Giske, 2007).

El círculo A indica la cadena lateral hidroxietílica y el círculo B la cadena lateral heterocíclica.

La resistencia bacteriana a éstos y otros antibióticos puede ser natural (intrínseca) o adquirida (extrínseca). La resistencia intrínseca significa que cada miembro de una especie bacteriana es resistente sin ninguna alteración genética adicional. Por ejemplo, *P. aeruginosa* exhibe una susceptibilidad muy baja a los antibióticos hidrofóbicos, debido a que tienen dificultad para atravesar la membrana externa de estos organismos (Normark y Normark, 2002).

La resistencia adquirida a los antibióticos ocurre por recombinación, por mutaciones (ej. mutaciones puntuales, deleciones, inversiones e inserciones en el genoma bacteriano) o por transferencia horizontal de genes. Para cada clase de antibiótico pueden existir varios mecanismos que causen resistencia. Estos mecanismos pueden diferir según la especie bacteriana y su composición genética (Normark y Normark, 2002).

Los mecanismos bioquímicos para la resistencia antimicrobiana se pueden resumir en tres categorías principales, producción de enzimas que modifican los antibióticos, alteración o adquisición de sitios blanco y modificaciones de la accesibilidad al blanco que incluyen barreras de permeabilidad y bombas de eflujo de antibióticos (Li y Nikaido, 2004).

1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA ADQUIRIDA

1.3.1 Disminución en la captación de la droga con énfasis en la resistencia a β -lactámicos en *P. aeruginosa*

La mayoría de los solutos hidrofílicos cruzan la membrana externa a través de canales porínicos llenos de agua, pero se ha visto que esta ruta en *P. aeruginosa* es 10 a 100 veces menos eficiente que en *E. coli* (Sandeep *et al.*, 2006). Debido a que los canales porínicos son totalmente inespecíficos, es de esperar que agentes hidrofílicos pequeños como los β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglicósidos y el cloranfenicol puedan utilizar esta vía de acceso a la célula (Nikaido, 1989). Sin embargo, los canales porínicos son muy estrechos y pueden actuar como barreras efectivas para el influjo de compuestos grandes o hidrofóbicos (Nikaido, 1989). Es así que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos puede ocurrir por la lenta difusión a través de los

canales, pero este mecanismo es más relevante cuando se combina con otros mecanismos adicionales de resistencia (Hooper, 2005).

Hasta la fecha se han identificado 3 familias de proteínas de membrana externa (OMPs) en *P. aeruginosa*: la familia de porinas Ton-B, la familia OprM y la familia de porinas específicas OprD que forman un canal específico para carbapenemes a través de la membrana externa (Driscoll *et al.*, 2007). Entre los componentes que penetran la membrana por OprD, el imipenem muestra el coeficiente de permeabilidad más alto, seguido por los otros carbapenemes (Trias y Nikaido, 1990). Se ha observado que una β -lactamasa es capaz de conferir mayor resistencia al imipenem cuando se produce la pérdida de esta porina, por mutaciones en el gen que codifica para OprD2 (Sandeep *et al.*, 2006).

1.3.2 Alteración del sitio blanco con énfasis en la resistencia a β -lactámicos en *P. aeruginosa*

La reducción en la afinidad de los blancos enzimáticos ocurre más rápidamente para antibióticos que inactivan un solo blanco y que no son análogos de sustrato. Esto es debido a que numerosas sustituciones de un solo aminoácido pueden producir una gran disminución en la afinidad (Spratt, 1994).

Las penicilinas y otros miembros de la familia de los β -lactámicos matan las bacterias al inactivar un conjunto de transpeptidasas que catalizan la reacción final de entrecruzamiento en la síntesis de peptidoglicanos. Las penicilinas inhiben estas enzimas al actuar como una estructura análoga para formar el complejo irreversible peniciloil-enzima que es similar al complejo acil-enzima que se forma durante la reacción normal de transpeptidación. Las transpeptidasas se detectan y estudian como proteínas de unión a penicilina (PBP) y están presentes en casi todas las bacterias pero varían de especie a especie en número, tamaño, cantidad y afinidad a los antibióticos β -lactámicos (Georgopapadakou, 1993; Spratt, 1994).

La resistencia a los β -lactámicos mediada por PBP alteradas puede surgir por reducciones en la afinidad de las PBP, pérdidas en la cantidad de PBP o adiciones de PBP de baja afinidad (Malouin y Bryan, 1986). La producción PBP con baja afinidad a los antibióticos es más frecuente en especies donde las β -lactamasas están ausentes (Spratt, 1994; Hakenbeck y Coyette, 1998).

En el caso de *P. aeruginosa*, imipenem y panipenem ejercen su acción principalmente al unirse a la PBP-2, mientras que el meropenem tiene mayor afinidad para PBP-3 (Yano *et al.*, 2001). El ertapenem se une más fuertemente a las PBP-2 de *Escherichia coli*, después a la PBP-3 y tiene buena afinidad para las PBP-1a y 1b.

La mayoría de las modificaciones reportadas en PBP de *P. aeruginosa* han sido en PBP-1a, PBP-2, PBP-3, PBP-4, y PBP-5 (Fung-Tomc *et al.*, 1995, Massova y Mobashery, 1998).

1.3.3 Bombas de eflujo con énfasis en la resistencia a β -lactámicos en *P. aeruginosa*

Los sistemas de eflujo bacteriano se han clasificado en cinco familias: la superfamilia de cassette de unión al ATP (ABC), la superfamilia de facilitadores mayores (MFS), la familia de multidroga y extrusión de compuestos tóxicos (MATE), la familia pequeña de multidroga resistencia (SMR) y la familia de división nodular de resistencia (RND) (Li y Nikaido, 2004). Los genes de la familia RND son casi exclusivamente cromosomales y están ampliamente distribuidos en las bacterias Gram-negativas. Este sistema se considera uno de los más importantes en cuanto a exportación de agentes antimicrobianos (Poole, 2004). En *P. aeruginosa*, las bombas de eflujo claves para la extrusión de carbapenemes pertenecen a la familia RND, también conocidos como sistemas tripartitos que consisten de una proteína de bombeo que atraviesa la membrana interna, una proteína de fusión en el periplasma y una proteína de membrana externa que forma el canal (Figura 1) (Li y Nikaido, 2004)

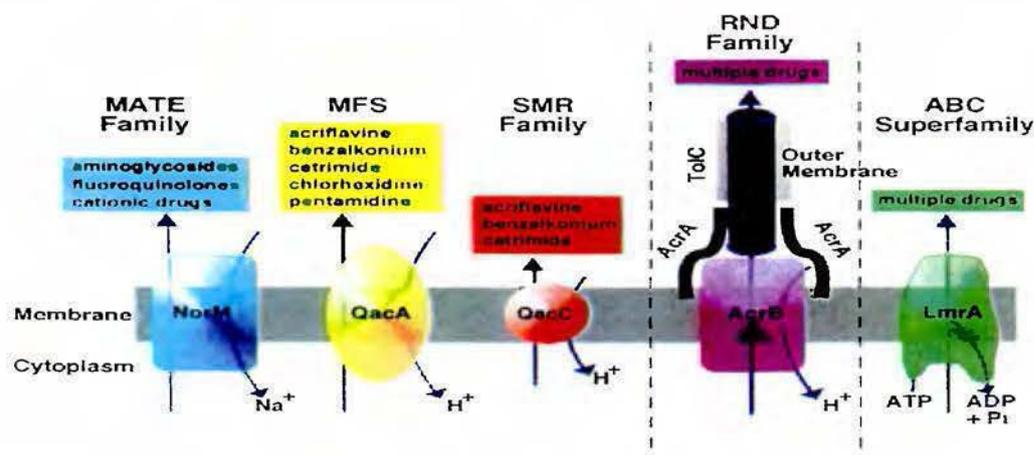


Fig. 2. Comparación de las cinco familias de eflujo de drogas (Tomado de Piddock, 2006).

Se han descrito seis sistemas de eflujo multidroga de tipo RND en *P. aeruginosa*: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY (también llamado MexGH- o AmrAB)-OprM, MexJK-OprM, y MexGHI-OpmD. (Li y Nikaido, 2004).

Las mutantes que sobreexpresan MexAB-OprM exhiben un fenotipo de resistencia a detergentes, solventes orgánicos, desinfectantes y múltiples antibióticos (Srikumar *et al.*, 1997; Middlemiss y Poole, 2004). Nakae y colaboradores encontraron que la sobreexpresión de MexAB-OprM confiere altos niveles de resistencia a β -lactámicos tanto en ausencia de β -lactamasas como en cepas con β -lactamasas inducible (Nakae *et al.*, 1999). Se ha determinado que el sistema MexAB-OprM se expresa constitutivamente y contribuye a la resistencia intrínseca en *P. aeruginosa* (Li y Nikaido, 2004). La sobreproducción de OprM se ha asociado con resistencia cruzada a meropenem, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas en *P. aeruginosa* (Masuda y Ohya, 1992). La delección o sobreexpresión del sistema MexAB-OprM altera la concentración mínima inhibitoria (CMI) de meropenem sin cambiar la de imipenem. Estos hallazgos sugieren que el meropenem se comporta como un sustrato para este sistema de eflujo, debido probablemente a la presencia de su cadena lateral hidrofóbica en la posición 2 (Köhler *et al.*, 1999; Li y Nikaido, 2004).

Por otro lado, el sistema de eflujo MexCD-OprJ aparentemente no se expresa en cepas silvestres de *P. aeruginosa* bajo condiciones normales de laboratorio, por lo que se ha asociado únicamente

a la resistencia adquirida debido a mutaciones (Masuda *et al.*, 1996; Li y Nikaido, 2004). La sobreexpresión de MexCD-OprJ incrementa la resistencia a quinolonas, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol y cefalosporinas de amplio espectro, incluyendo cefalosporinas de cuarta generación, no así carbenicilina y aztreonam (Gotoh *et al.*, 1998; Li y Nikaido, 2004).

El sistema MexEF-OprN, al igual que MexCD-OprJ, no se expresa en las cepas silvestres de *P. aeruginosa* debido a una completa represión mediada por el producto del gen *mexT* que actúa como regulador del operón (Ochs *et al.*, 1999; Li y Nikaido, 2004). La expresión de MexEF-OprN en mutantes *mexT* incrementa la resistencia al cloranfenicol, quinolonas y trimetoprim, mientras que la resistencia a imipenem se asocia más a la regulación negativa de la expresión de OprD (Li y Nikaido, 2004). Por otro lado, las mutantes con sobreexpresión de MexXY y disminución de las porinas OprD son resistentes a múltiples drogas que incluyen imipenem, meropenem, quinolonas, penicilinas antipseudomónicas, aztreonam y cefalosporinas antipseudomónicas (Bonomo y Szabo, 2006). Los sistemas de eflujo MexJK-OprM y MexHI-OpmD no se expresan en las cepas silvestres (Li y Nikaido, 2004).

1.3.4 β -lactamasas con énfasis en la resistencia a β -lactámicos en *P. aeruginosa*

Las β -lactamasas son el mecanismo más común de resistencia a los agentes β -lactámicos particularmente entre las bacterias Gram-negativas (Livermore, 1995; Poole, 2004). Estas enzimas rompen el enlace amida del anillo β -lactámico para formar un complejo acil-enzima. Interesantemente, las β -lactamasas están estructuralmente relacionadas a las PBP y pudieron evolucionar de las enzimas de unión a β -lactámicos involucradas en la biosíntesis de pared celular (Helfand y Bonomo, 2003; Poole, 2004).

Hay dos esquemas para la clasificación de las β -lactamasas: el esquema de clasificación de Ambler y el sistema de clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. El primero organiza las β -lactamasas en cuatro clases distintas. La base de este esquema de clasificación descansa en la identidad o similitud de la secuencia de aminoácidos. En el sistema de clasificación de Ambler,

las clases A, C y D son serinas β -lactamasas. Las enzimas de clase B son metalo- β -lactamasas que requieren zinc para su actividad (Helfand y Bonomo, 2003; Poole, 2004).

El esquema de clasificación Bush-Jacoby-Medeiros (Cuadro 1) agrupa las β -lactamasas de acuerdo con las similitudes funcionales (sustrato β -lactámico y perfil de inhibición) (Helfand y Bonomo, 2003).

Cuadro 1. Clasificación de las β -lactamasas

Grupo Bush-Jacoby-Medeiros ¹	Clase molecular ² Ambler	Enzimas representativas	Sustratos preferidos	Inhibidos por:		Organismos	Localización molecular
				AC ³	EDTA ⁴		
1	C	AmpC	Cefalosporinas	-	-	Bacilos Gram-negativos	Cromosoma (Plásmidos)
2a	A	PC1	Penicilinas	+	-	Cocos y bacilos Gram-positivos	Plásmidos
2b	A	TEM-1, 2 SHV-1	Penicilinas Cefalosporinas	+	-	Bacilos y cocos Gram-negativos	Plásmidos Cromosoma
2be	A	Derivados de TEM Derivados de SHV CTX-M-1-26	Penicilinas Cefalosporinas de bajo y amplio espectro	+	-	Bacilos Gram-negativos	Plásmidos
	D	PER GES-1 OXY-1/2 (K1) OXA-11,14,16,17		\pm - -	- - -	<i>P. aeruginosa</i> <i>K. oxytoca</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>P. aeruginosa</i>	Cromosoma Plásmidos
2br	A	TEM-30-36, TRC-1, SHV-49	Penicilinas	\pm	-	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Plásmidos
2c	A	PSE-1,3 4	Penicilinas, Carbencilinas	+	-	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i>	Variable
		BRO-1-3					
2d	D	OXA-1-10 PSE-2	Penicilinas Cloxacilinas	\pm	-	Enterobacteriaceae <i>P. aeruginosa</i>	Variable
2e	A	CepA FPM-1	Cefalosporinas	+	-	<i>Bacteroides</i> sp. <i>Proteus</i> sp.	Variable
		L2					
2f	A	NMC-A Sme-1-3 Imi-1-3 KPC-1,2 GES-2	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes	+	-	<i>E. cloacae</i> <i>S. marcescens</i>	Cromosoma
	D	OXA-24-26,40, 51,58,72		\pm	-		
3	B	VIM, IMP, SPM, GIM, SIM L1 CcrA	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes	-	+	<i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. Enterobacteriaceae <i>S. maltophilia</i> <i>Bacteroides</i> sp.	Variable

¹Clasificación funcional basada en el perfil de sustrato.²Clasificación estructural basada en la similitud de la secuencia de aminoácidos.³AC, ácido clavulánico (para inhibición de la actividad de β -lactamasa)⁴EDTA, quelante (para la inactivación de las enzimas dependientes de zinc)

1.3.4a. β -lactamasa AmpC en *P. aeruginosa*

La mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* expresan una β -lactamasa AmpC inducible, codificada cromosomalmente, la cual se clasifica en la clase C de Ambler y en el grupo de 1 de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995). Una característica de la β -lactamasa cromosómica AmpC es la resistencia a los inhibidores de β -lactamasa tales como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Livermore, 1995). Los carbapenemes (imipenem, meropenem, etc) son fuertes inductores de la enzima AmpC, pero resisten la hidrólisis enzimática, puesto que permanecen activos independientemente del modo de producción de la β -lactamasa (Livermore, 1992; Livermore, 1995).

1.3.4b. Carbapenemasas clase A de Ambler

Se han descrito enzimas que pertenecen al grupo A de Ambler y 2f de Bush-Jacoby-Medeiros que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Una característica de estas enzimas es que su actividad es inhibida por ácido clavulánico pero no por EDTA (Riley, 2004). Las enzimas representativas de este grupo son NMC-A e IMI-1 de *Enterobacter cloacae*, SME-1, SME-2 y SME-3 de *Serratia marcescens*. También se ha informado la presencia de enzimas KPC-1 en *Klebsiella pneumoniae* y finalmente GES-2 en *P. aeruginosa* (Nordmann y Poirel, 2002; Helfand y Bonomo, 2003). GES-2 se deriva de un β -lactamasa de espectro extendido GES-1 de la cual difiere por un solo aminoácido y, aunque hidroliza el imipenem, es mucho menos activa que las otras enzimas de esta clase (Poole, 2004).

1.3.4c. Carbapenemasas Clase B de Ambler

La mayoría de estas carbapenemasas confieren resistencia no sólo a carbapenemes, sino también a otros β -lactámicos (Bush *et al.*, 1995).

1.3.4c1. Metaloenzimas naturales

Se han descrito metaloenzimas en especies de bacterias Gram-positivas y negativas, tales como *Bacillus cereus* (Lim *et al.*, 1988), *Stenotrophomonas maltophilia* (Walsh *et al.*, 1994), *Flavobacterium* (Woodford *et al.*, 2000), especies de *Chryseobacterium* (Bellais *et al.*, 2000), *Aeromonas hydrophila* (Massidda *et al.*, 1991), *Legionella gormanii* (Boschi *et al.*, 2000) y *Janthinobacterium lividum* (Rossolini *et al.*, 2001). Las enzimas naturales de clase B están codificadas cromosomalmente (Nordmann y Poirel, 2002).

1.3.4c2. Metaloenzimas adquiridas

En general, la resistencia a los carbapenemes atribuida a β -lactamasas en *P. aeruginosa* es debido a la adquisición de metalo- β -lactamasas. Los principales tipos identificados son las metalo- β -lactamasas (MBLs) de tipo imipenemasas (IMP), Veronese imipenemasa (VIM), German imipenemasa (GIM), Sao Pablo metalo- β -lactamasa (SPM) y Seoul imipenemasa (SIM) (Walsh *et al.*, 2005; Bonomo y Szabo, 2006). La producción de estas MBLs en *P. aeruginosa* puede producir resistencia a imipenem, meropenem y a cefalosporinas como ceftazidima y cefepima (Bonomo y Szabo, 2006).

Las carbapenemasas más comunes en *P. aeruginosa* son las metalo- β -lactamasas de clase B de los tipos IMP y VIM (Sevillano *et al.*, 2006), las cuales comparten menos del 40% de identidad en sus aminoácidos, pero exhiben propiedades cinéticas similares al inactivar todos los antibióticos β -lactámicos con excepción de los tipo monobactam (Bonomo y Szabo, 2006).

En Japón se ha reportado la presencia de metalo- β -lactamasas tipo IMP en más de 15 especies diferentes de bacterias, y es el país cuyos aislamientos son considerados como el mayor reservorio para las IMP-1, IMP-2, IMP-3, IMP-6, IMP-10 e IMP-11 que se han diseminado a un número de cepas de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. y Enterobacteriaceae (Walsh, 2005).

El segundo grupo dominante de las metalo- β -lactamasas adquiridas son las enzimas tipo VIM (Walsh *et al.*, 2005). Similar a los genes *bla_{IMP}*, los genes *bla_{VIM-1}* se encontraron integrados como cassettes génicos en integrones de clase 1, y estos a su vez estaban localizados en el cromosoma

bacteriano (Lauretti *et al.*, 1999). SPM-1 se considera como una metalo- β -lactamasa distinta de IMP y VIM que hidroliza principalmente cefalosporinas, aunque su perfil hidrolítico es más similar al de IMP-1 (Toleman *et al.*, 2002; Bonomo y Szabo, 2006).

Los estudios cinéticos de la enzima indican que SPM-1 puede hidrolizar todas las clases de antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, el factor común entre SPM-1, IMP-1, VIM-1 es su incapacidad de hidrolizar aztreonam (Murphy *et al.*, 2003).

GIM-1 fue descrita en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* de Dusseldorf, Alemania. La secuencia de aminoácidos de GIM-1 mostró mayor identidad con las variantes IMP-6, IMP-1 e IMP-4 en un rango de 43.5, 43.1 y 43.1%, respectivamente, seguido por las variantes VIM con un 31.2% para VIM-7, y 28% para VIM-1, VIM-4 y VIM-5, y únicamente un 28% de similaridad para SPM-1. Al igual que la mayoría de los genes de metalo- β -lactamasas, los genes *bla*_{GIM-1} se encontraron en un integrón de clase 1 (Castanheira *et al.*, 2004).

SIM-1 es un nuevo miembro de la subclase B1 descrita en *Acinetobacter baumannii*. SIM-1 mostró un punto isoeléctrico de 7.28 y una masa molecular de 25 439 Da, su relación más estrecha fue con las metalo- β -lactamasas de tipo IMP con un 68% de identidad de secuencia de aminoácidos con IMP-12 y un 64% de identidad con IMP-9. El gen *bla*_{SIM-1} se encontró en un cassette génico inserto en un integrón de clase 1, el cual incluía tres cassettes adicionales (*arr-3*, *catB3*, y *aadA1*).

— Similar a las demás metalo- β -lactamasas, SIM-1 mostró mayor actividad contra los β -lactámicos incluyendo penicilinas, cefalosporinas de corto y amplio espectro y carbapenemes. No mostró actividad contra aztreonam ni piperacilina (Lee *et al.*, 2005).

1.3.4d. Carbapenemasas Clase D de Ambler

Las oxacilinasas (OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-54, OXA-58, y OXA-72) están en su mayoría, codificadas cromosomalmente y confieren cierto grado de resistencia a los carbapenemes. El perfil de hidrólisis es muy similar entre ellas. Hidrolizan débilmente al imipenem y meropenem pero no hidrolizan cefalosporinas de amplio

espectro ni aztreonam. Su actividad hidrolítica es inhibida por el ácido clavulánico con excepción de OXA-23 (Nordmann y Poirel, 2002; Helfand y Bonomo, 2003; Poole, 2004).

1.4 LOCALIZACIÓN DE LOS GENES DE METALO- β -LACTAMASAS

Como todas las β -lactamasas, las MBL pueden ser codificadas cromosomalmente o en elementos genéticos transferibles. Las MBL que son codificadas cromosomalmente se encuentran en organismos cuyo hábitat es principalmente ambiental tales como *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus*, *Aeromonas* spp, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Walsh, 2005; Walsh *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2006). Estos microorganismos rara vez causan infecciones serias, con la discutible excepción de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Bacillus anthracis* (Walsh *et al.*, 2005).

La mayoría de los genes móviles que codifican para MBL están insertos en elementos genéticos que ayudan a su transferencia de un aparato genético a otro y se han descrito en patógenos clínicamente importantes como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. y miembros de la familia Enterobacteriaceae (Walsh, 2005; Mendes *et al.*, 2006).

Por lo general, las MBLs adquiridas son codificadas por cassetes génicos localizados en cromosomas o en plásmidos bacterianos. Sin embargo, con excepción de la enzima SPM-1 que es codificada por un gen asociado con elementos de región común (ISCR4), las demás MBL adquiridas son codificadas por genes localizados en integrones de clase 1 (Poirel *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2006).

Los genes que codifican para MBLs tipo IMP también se han encontrado en integrones de clase 3 (Walsh *et al.*, 2005). Aunque los integrones por sí mismos no son móviles, se han encontrado varios integrones de clase 1 en plásmidos, transposones Tn21 y relacionados al Tn21 en bacilos Gram-negativos, lo que hace posible su movilización (Toleman *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006).

Gran parte de los genes que codifican para MBL se han encontrado en plásmidos conjugativos o movilizables de entre 120 y 180 kb, sin embargo algunos como el *bla*_{VIM-7}, reportado en Estados

Unidos forman parte de un plásmido conjugativo de 24 kb (Walsh *et al.*, 2005).

El contexto genético de *bla*_{SPM-1} ha mostrado ser único, con genes estrechamente relacionados a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y sin estar asociado con integrones ni transposones. Interesantemente *bla*_{SPM-1} y sus genes circundantes son parte de una isla de patogenicidad y se encuentran en un plásmido de aproximadamente 180 kb (Walsh, 2005; Walsh *et al.*, 2005).

1.5 INTEGRONES DE CLASE 1

Los integrones tienen la información genética necesaria para expresar una proteína implicada en la captura y liberación de cassettes génicos entre los que se incluyen algunos genes de resistencia a antibióticos. Los integrones están constituidos por dos regiones de ADN muy conservadas situadas en sus extremos que se denominan 5'CS y 3'CS, y una región variable (Walsh *et al.*, 2005). Entre las regiones conservadas 5' y 3' se pueden insertar uno o más genes de resistencia a antibióticos (Figura 3) (Liu *et al.*, 2006).

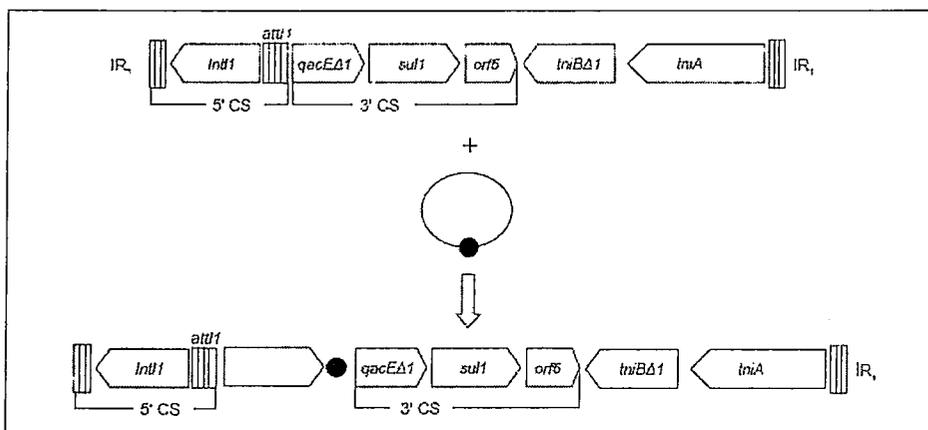


Figura 3. Representación esquemática de la inserción de un cassette génico en la primera posición de un integrón de clase 1 (Tomado de Mendes, 2006).

La región 5'CS contiene un gen que codifica para una integrasa (*int*) y una secuencia para un sitio de recombinación adyacente (*attI*) (Hall *et al.*, 1991; Fluit y Schmitz, 1999).

La expresión del integrón cuenta con un promotor común para todos los cassettes génicos en la región variable, mientras que la región 3'CS usualmente consiste de un gen parcialmente truncado (*qacEΔ1*) que codifica para resistencia a sales cuaternarias de amonio, así como determinados antisépticos y desinfectantes, además de otro gen de resistencia a sulfonamidas (*sulf*). Corriente abajo se inserta un marco de lectura abierta (*orf5*) cuya función se desconoce (Hall *et al.*, 1991; Fluit y Schmitz, 1999).

Los integrones contienen dos promotores, denominados P1 y P2. La distancia entre el promotor y los cassettes génicos respectivos influenciarán el impacto del promotor en la transcripción de los genes (Fluit y Schmitz, 1999). De esta forma, mediante la acción del segundo promotor se puede incrementar la transcripción de los genes en el integrón (Stokes y Hall, 1989; Collis y Hall, 1995; Recchia y Hall, 1997).

Los cassettes génicos tienen un tamaño aproximado de 1 kb que contienen un gen de resistencia a un antimicrobiano. En el extremo final 3' tienen una secuencia llamada elemento de 59 pares de bases (59 pb) (Recchia y Hall, 1997; Fluit y Schmitz, 1999). Se cree que las secuencias de 59 pb implicadas en las inserciones de los genes en los integrones son las que dotan a la inserción de una direccionalidad. De esta forma varios de estos cassettes insertados, uno detrás de otro pueden ser leídos a partir de los promotores comunes. En este sentido, y dado que pueden estar insertos más de un gen de resistencia, los genes situados en una zona más distal de los promotores tienen una expresión más baja que los situados al principio. Es así, entonces, que los genes localizados en las primeras posiciones presentan mayores tasas de transcripción (Collis y Hall, 1992; Fluit y Schmitz, 1999; Mendes *et al.*, 2006). El gen que se inserta de último, ocupará la posición más cercana a los promotores y sería, por lo tanto, el más eficientemente transcrito (Collis *et al.*, 1993; Fluit y Schmitz, 1999).

Estas características de los cassettes génicos hacen posible que algunos de los genes que se encuentren lejanos al promotor puedan cambiar de posición, pasando a posiciones más activas.

Se ha comprobado que existen integrones con más de una copia de genes de resistencia, lo que aumenta el producto de la expresión de estos genes y por tanto el grado de resistencia de las

bacterias que los poseen (Collis y Hall, 1992; Fluit y Schmitz, 1999).

Aún cuando los cassettes génicos que portan genes de resistencia a aminoglicósidos y β -lactámicos pueden moverse libremente de un integrón a otro, ellos no pueden moverse de un organismo a otro y requieren la asistencia de otros elementos genéticos como plásmidos y transposones (Walsh *et al.*, 2005).

El gran número de posibilidades de recombinación e intercambio que poseen los integrones y los genes de resistencia proporciona a las bacterias que los incluyen en su estructura, una gran capacidad de adaptación para hacer frente a los antibióticos, puesto que las bacterias pueden cambiar la posición y la expresión de sus genes en función de la presión ambiental provocada por los antimicrobianos (Jones *et al.*, 1997).

1.6 DISEMINACION DE METALO- β -LACTAMASAS

De los genes de resistencia que las bacterias adquieren y expresan, algunos genotipos parecen dominar mientras que otros solo hacen una aparición fugaz. Las posibles razones son muchas, pero lo más probable es que involucre los elementos genéticos en los cuales son transportados los genes, así como la promiscuidad y el subsiguiente "fitness" de la bacteria receptora, sin obviar la contribución a la diseminación de la resistencia por medio de los viajes humanos de una región a otra (Walsh, 2005).

A pesar de las estrictas políticas de control de infecciones, los genes que codifican para las MBL ya se han establecido en muchos países, entre ellos Japón que es el principal reservorio de aislamientos con MBL tipo IMP, Brasil con las MBL tipo SPM-1 y los países europeos con las variantes VIM (Murphy *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2004; Toleman *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2006).

Otro dato importante es la aparición inicial y coincidente de las MBL tipo IMP, VIM, SPM y GIM en *Pseudomonas aeruginosa* antes de su detección en *Acinetobacter* spp. y Enterobacteriaceae, que aunque no está claro se especula podría involucrar la presencia de plásmidos de amplio rango de hospederos y de ahí su diseminación a otras bacterias Gram-negativas (Walsh, 2005).

1.7 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASAS

Debido a la gran cantidad de bacterias productoras de MBL en diferentes regiones del mundo, existe la necesidad de realizar pruebas simples, prácticas y de bajo costo que faciliten su búsqueda en los laboratorios de microbiología para ayudar en el control de infecciones y en la prevención de su diseminación (Yong *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2006). Sin embargo, aunque están disponibles diversos métodos para la detección de bacterias productoras de MBL, aún no están lo suficientemente estandarizados (Mendes *et al.*, 2006).

Todos los métodos de detección se basan en la capacidad de los quelantes, como el EDTA, y los componentes basados en tiol para inhibir la actividad de las MBL. Estas pruebas incluyen sinergia con doble disco utilizando EDTA con imipenem (IPM) o ceftazidima (CAZ) (Lee *et al.*, 2003; Franklin *et al.*, 2006) (Figura 4), comparación de zonas de inhibición IPM versus IPM+EDTA (Yong *et al.*, 2002), ácido 2-mercaptopropiónico (MPA) con CAZ o IPM (Arakawa *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003), ácido mercaptoacético con CAZ o IPM (Arakawa *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2003), la prueba de Hodge (Lee *et al.*, 2003), el E-test MBL (Franklin *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2002) (Figura 5), y un método de microdilución utilizando EDTA y 1,10 fenantrolina con IPM (Pitout *et al.*, 2007), entre otros.

Arakawa y colaboradores también ensayaron la detección fenotípica con el uso de metales pesados como el CuCl_2 , FeCl_2 y HgCl_2 , no obstante los resultados no fueron satisfactorios y aunque el HgCl_2 mostró mayor actividad bactericida, no se recomienda su uso desde el punto de vista de salud humana y conservación ambiental. En este mismo estudio, los autores encontraron muy buenos resultados con ácido 2-mercaptopropiónico con un 100% de sensibilidad en la detección de MBL cuando se utiliza ceftazidima como sustrato (Arakawa *et al.*, 2000).

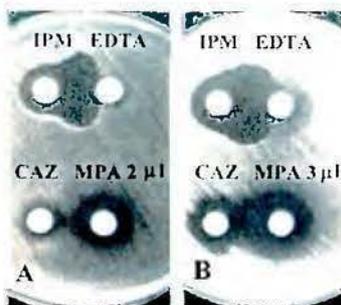


Figura 4. Test de sinergia de doble disco (Tomado de Lee *et al.*, 2003).



Figura 5. Tiras de E-test MBL (Tomado de Walsh *et al.*, 2005).

Las tiras comerciales E-test MBL (AB Biodisk, Solna, Sweden) incluyen imipenem en un extremo e imipenem+EDTA en el otro extremo. Se considera un microorganismo productor de MBL aquel que presente una CMI a IPM+EDTA con tres diluciones por debajo de la mostrada frente a IPM sin EDTA. El inconveniente de esta prueba es que aunque es simple de realizar, es una prueba costosa y altamente insensible para detectar organismos portadores de MBL sensibles a los carbapenemes (CMI ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$) (Lee *et al.*, 2003; Franklin *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2006). La mayoría de los métodos descritos, en especial la prueba de sinergia de doble disco y la prueba de Hodge, a menudo son difíciles de realizar y subjetivas de interpretar, además de que pueden demandar mucho tiempo. El ácido 2-mercaptopropiónico y el 1,10 fenantrolina son tóxicos para manipularlos rutinariamente y se deben tener precauciones especiales para trabajar con esos componentes, por lo que son inadecuados para el uso de rutina en los laboratorios clínicos (Pitout *et al.*, 2007). Por consiguiente, no hay una perfecta combinación inhibidor- β -lactámico para detectar todas las MBL móviles (Walsh *et al.*, 2005).

Para incrementar la sensibilidad de las pruebas se requieren varios sustratos (imipenem, meropenem, ceftazidima, cefepime) preferiblemente con más de un inhibidor. Los aislamientos positivos deben remitirse a un laboratorio de referencia donde las técnicas moleculares puedan verificar los fenotipos observados. Sin embargo, la realización de técnicas como PCR detectan la presencia del gen en el aislamiento clínico pero no indican el tipo de variante que está presente, por lo que se requiere realizar secuenciación (Walsh *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICACION:

Los carbapenemes se han utilizado clínicamente para contrarrestar los patógenos productores de β -lactamasas. Actualmente se les considera como los agentes más potentes para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* multirresistentes. No obstante, un número creciente de aislamientos clínicos muestran susceptibilidad disminuida o resistencia a estos antimicrobianos. En muchos hospitales la presencia de *P. aeruginosa* con enzimas que hidrolizan los carbapenemes se ha vuelto endémica, representando así un desafío terapéutico.

Una preocupación particular es que los genes que codifican para las metalo- β -lactamasas están localizados en integrones que eventualmente favorecen su diseminación hospitalaria y en la comunidad. Además, existe el riesgo de la transferencia horizontal de genes con otros organismos patógenos del hospital. Por otro lado, se ha determinado la presencia de genes que no se expresan y por lo tanto se produce una correlación imperfecta con la resistencia a los carbapenemes.

Tomando en cuenta que la mayoría de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM1}, *bla*_{GIM-1}, y *bla*_{SIM-1} se han reportado en integrones de clase 1, este trabajo pretende a través de las técnicas de PCR múltiple y secuenciación de ADN, determinar la presencia de genes de resistencia a los carbapenemes y su asociación con integrones de clase 1 en 198 aislamientos de *P. aeruginosa* del Hospital México.

La caracterización molecular de las cepas contribuirá a una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la resistencia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Determinar fenotípica y molecularmente la presencia de metalo- β -lactamasas en 198 aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital México y su asociación con integrones de clase 1.

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar pruebas fenotípicas con E-test MBL para la detección de metalo- β -lactamasas en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico aisladas en el Hospital México.
- Investigar la presencia de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM} y *bla*_{SIM} en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a través de PCR múltiple.
- Investigar la presencia de integrones de clase 1 en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas a través de la técnica PCR.
- Establecer la asociación de genes de metalo- β -lactamasas con los integrones de clase 1 por medio de secuenciación de los cassettes génicos.

4. HIPOTESIS DE TRABAJO

Hipótesis nula: La resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa* se debe a genes que codifican para metalo- β -lactamasas asociadas a integrones de clase 1.

Hipótesis alternativa: La resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa* se debe a mecanismos de resistencia diferentes a las enzimas metalo- β -lactamasas.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Descripción de los aislamientos

Se analizaron 198 aislamientos de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas del Hospital México entre noviembre del 2004 y octubre 2005.

Las cepas en estudio provienen de secreciones (n=48), orina (n=59), tracto respiratorio (n=62) y otros (n=29). La clasificación "otros" se debe a que muchos tipos de muestras no tenían aislamientos suficientes para realizar un análisis estadístico como un grupo aparte. En esta última categoría se incluyeron puntas de catéter, sangre, líquido abdominal, líquido peritoneal, tubo corrugado, drenaje, colgajo, piel, tibia y uñas (Madriz-Garita, 2007).

Las pruebas de identificación y susceptibilidad se realizaron utilizando las tarjetas GNI Vitek y las tarjetas AST-GN651 (bioMérieux Vitek Inc., USA) para bacterias Gram-negativas. Los aislamientos se almacenaron a -80°C en caldo de infusión cerebro corazón con 20% de glicerol (vol/vol). Las CMI obtenidas fueron interpretadas de acuerdo a las normas CLSI 2007 (Clinical and Laboratory Standards Institute), y los antimicrobianos utilizados fueron amikacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, aztreonam, cefazolina, cefepime, cefotetan, ceftazidime, ceftriaxone, cefuroxime, cefuroxime/axetil, ciprofloxacina, gatifloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, nitrofurantoina, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulánico, tobramicina y trimetoprim sulfametoxazol. Para el control de calidad en la determinación de las CMI, se utilizaron las cepas de referencia ATCC (American Type Culture Collection) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* ATCC 35218. Para análisis estadísticos, los aislamientos que mostraron susceptibilidad intermedia a los antimicrobianos analizados fueron clasificados como no-susceptibles o resistentes.

5.2 Demostración fenotípica de la actividad metalo- β -lactamasa de los aislamientos

Para la detección fenotípica de las metalo- β -lactamasas se emplearon las tiras E-test MBL (AB BioDisk Company, Sweden) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las cepas de referencia utilizadas para los ensayos de metalo- β -lactamasas fueron, como control negativo, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y, como controles positivos, *P. aeruginosa* A5386 (*bla*_{IMP-1}), *P. aeruginosa* 115-10639A (*bla*_{IMP-5}), *P. aeruginosa* 86-14571 (*bla*_{IMP-13}), *P. aeruginosa* 101-4704 (*bla*_{IMP-16}), *P. aeruginosa* A3486 (*bla*_{IMP-18}), *P. aeruginosa* 75-3636C (*bla*_{VIM-1}), *P. aeruginosa* 81-11963A (*bla*_{VIM-2}), *P. aeruginosa* 7-406 (*bla*_{VIM-7}), *P. aeruginosa* 48-1997A (*bla*_{SPM-1}), *P. aeruginosa* 73-5671 (*bla*_{GIM-1}) y *A. baumannii* 03-9-T104 (*bla*_{SIM-1}). Los controles positivos fueron proporcionados amablemente por la Dra. Ana C. Gales (Laboratorio Especial de Microbiología Clínica, Brasil).

5.3 Extracción de ADN

Se trabajó con una colección de ADNs aportados por Vivian Madriz-Garita (Madriz-Garita, 2007) extraídos con un método descrito anteriormente (Speijer *et al.*, 1999). Para ello se crecieron las bacterias en agar sangre por aproximadamente 24 horas y luego hizo una suspensión con una asada de la bacteria en 20 μ l de una solución de NaOH 50 mM y 0.25% de SDS. La amplificabilidad de algunos extractos de ADN genómico se verificó mediante un PCR con iniciadores específicos para el ARNr 16S.

5.4 Determinación de la presencia de los genes codificantes de las metalo- β -lactamasas

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con una mezcla comercial lista para usar (Fermentas, USA) que contiene una *Taq* ADN polimerasa (recombinante), buffer PCR, 2 mM de MgCl₂ y 0.2 mM de cada dNTPs.

La detección de los genes que codifican para MBL se realizó por PCR múltiple siguiendo el protocolo descrito por Mendes y colaboradores para *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM} y *bla*_{SIM} (Mendes *et al.*, 2007). Los iniciadores se presentan en el cuadro 3. Los parámetros de amplificación fueron una

desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 20 s a 94°C, 45 s a 53°C y 30 s a 72°C y finalmente una extensión de 5 min a 72°C. La visualización de los amplicones se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% preparados en buffer 0.5X TBE que fueron corridos a 90 V por 45 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Se cargaron 5 µl de muestra en cada pozo y se utilizó como marcador de tamaño el Mass Ruler DNA de la casa comercial Fermentas. El tamaño de los productos de amplificación esperados se muestra en el cuadro 2. Como cepas control se utilizaron las mismas cepas descritas para la detección fenotípica de MBLs.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la detección de los genes codificantes de las MBLs

Iniciador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Gen por amplificar	Tamaño esperado (pb)
IMPgen-F1 IMPgen-R1	GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC	tipo <i>bla</i> _{IMP}	188
VIMgen-F2 VIMgen-R2	GTTTGGTTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	tipo <i>bla</i> _{VIM}	382
GIM-F1 GIM-R1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC CGGAACGACCATTTGAATGG	<i>bla</i> _{GIM-1}	72
SIM-F1 SIM-R1	GTACAAGGGATTTCGGCATCG TGGCCTGTTCCCATGTGAG	<i>bla</i> _{SIM-1}	569
SPM-F1 SPM-R1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG CCTTTTCCGCGACCTTGATC	<i>bla</i> _{SPM-1}	798

5.5 Caracterización filogenética de las *P. aeruginosa* por la técnica de RAPD

Las reacciones por la técnica RAPD (random amplification of polymorphic DNA) fueron realizadas por Madriz-Garita (Madriz-Garita, 2007), según se describió anteriormente (Speijer *et al.*, 1999). La amplificación se realizó en una mezcla de 25 µl que contenía 12.5 µl de 2X PCR Master Mix (Fermentas, USA), 1 µl de primers ERIC2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3'), 9 µl de H₂O y 2.5 µl del ADN molde (dilución 1:10); para una concentración del primer de 20 µM en cada pocillo.

Se realizó una fase de pre-PCR a 94°C por 4 min, 35 ciclos de PCR compuestos por 94°C por 1 min, 25°C por 1 min y 72°C por 2 min; y posteriormente se realizó un post-PCR a 72°C por 10 min. Para cada corrida de PCR se realizó un control negativo con agua para PCR y un control positivo con la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. Finalmente, los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio al 2%, fotografiados con luz UV y analizados con el software GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) con un cut-off $\geq 80\%$.

5.6 Detección de integrones clase 1

Todos los aislamientos fueron analizados con los primers IntA e IntB para determinar la presencia del gen *intI* (codifica la integrasa de clase 1). Posteriormente, los primers *sul1* y *sul1.rev*, y los primers *orf4* y *sul1.rev*, fueron utilizados para caracterizar los genes *sul1* (codifica resistencia a sulfonamida) y *qacE Δ 1* (codifica resistencia a compuestos amino-cuaternario) correspondientes a la región 3'CS según un protocolo descrito anteriormente (Rosser y Young, 1999). Una vez reconocido el integrón de clase 1 se procedió a amplificar la región variable (cassettes génicos) con los primers 5'CS y 3'CS (Levesque *et al.*, 1995; Martínez-Freijo, 1999). Además, se utilizaron los primers Int2F y 3'CS para amplificar un segmento variable que comprende un fragmento del gen de la integrasa y el cassette inserto (Levesque *et al.*, 1995; Martínez-Freijo, 1999). La amplificación se llevó a cabo con una mezcla comercial lista para usar (Fermentas, USA), 1 μ l de primers forward y reverse (concentración stock de 25 μ M), 10.5 μ l de H₂O, y 1 μ l de ADN molde. Los primers que se utilizaron para determinar los genes estructurales y las diferentes regiones de un integrón clase 1 se indican en el cuadro 3.

La visualización de los amplicones resultantes se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados en buffer 0.5X TBE, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) y se corrieron a 90 V por 45 min. Se cargaron 5 μ l de muestra en cada pozo y se utilizó como marcador de tamaño el Mass Ruler DNA de la casa comercial Fermentas.

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para la detección de regiones de integrones clase 1

Iniciador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Blanco a amplificar	Tamaño esperado (pb)
IntA IntB	ATCATCGTCGTAGAACGTCGG GTCAAGGTTCTGGACCAGT	Integrasa	892
sul1 sul1.rev	GTATTGCGCCGCTCTTAGAC CCGACTTCAGCTTTTGAAGG	<i>sul1</i>	408
orf4 sul1.rev	TAGCGAGGGCTTTACTAAGCTTGCC CCGACTTCAGCTTTTGAAGG	<i>qacΔE1</i>	872
5'CS 3'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	cassettes génicos	variable
Int2F 3'CS	TCTCGGGTAACATCAAGG AAGCAGACTTGACCTGA	Integrasa y cassettes génicos	variable

5.7 Clonación de productos de amplificación correspondientes a cassettes génicos

Los productos de amplificación (región variable amplificada por iniciadores 5'CS-3'CS) se purificaron con el Wizard SV Gel and PCR Clean-up System siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). Los productos purificados se ligaron dentro de un vector de selección positiva (pJET; Fermentas, USA) utilizando el GeneJET PCR Cloning Kit, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El vector pJET (3128 pb) contiene un gen que codifica para una endonucleasa de restricción que es letal para la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en clonación. La ligación de un fragmento de un ADN en el sitio múltiple de clonación, corre el marco de lectura del gen letal y, como resultado, únicamente las células con el plásmido recombinante podrán crecer.

Los plásmidos recombinantes resultantes se propagaron en las cepas *E. coli* DH5α [Φ 80d*lacZ*ΔM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*) U169, *phoA*] y *E. coli* JM107 [F' , *traD36*, *proA⁺B⁺*, *lacI^q*, Δ(*lacZ*)M15 / e14' (McrA⁻), Δ(*lac-pro*) *endA1*, *gyrA96* (Nal^r), *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *glnV44*, *relA1*]. Estas células se hicieron competentes con el método de CaCl₂. Para esto, se inocularon en 5 ml de caldo Luria Bertani (LB)

y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación constante. Al día siguiente, se tomaron 1.5 ml del cultivo ya crecido para inocularlas en un erlenmeyer con 100 ml de caldo LB. Los cultivos se incubaron por 3 h a 37°C con agitación. Luego, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 10 min a 4°C en tubos plásticos estériles y fríos de 50 ml. Posteriormente, las células se mezclaron rápidamente con un agitador tipo vortex en 20 ml de CaCl₂ 100 mM, estéril y frío; y se incubaron sobre hielo durante 3 h a 4°C. Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron suavemente en 2 ml de CaCl₂ 100 mM con glicerol al 15% estéril y frío y se incubaron sobre hielo por 12 h. Finalmente, se alicuotaron las células competentes en 10 tubos estériles (200 µl/tubo) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

La transformación se realizó mediante choque térmico. Para este paso, se tomaron 50 µl de las células competentes de *E. coli* DH5α y/o *E. coli* JM107, previamente descongeladas sobre hielo; y se les añadió 5 µl del producto de ligación. Esta mezcla se incubó en hielo por 20-30 min y posteriormente, se colocaron los tubos en un baño de agua a 42°C por 2 min. Después se le añadió 1 ml de caldo LB a cada tubo y se incubaron a 37°C por 30 min – 1 h. Finalmente, puesto que el vector pJET contiene un gen de β-lactamasa en la posición 2068-2928 pb que confiere resistencia a ampicilina, la selección de los transformantes se hizo al inocular 100 µl del cultivo sobre placas de agar LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

La extracción del ADN plasmídico para los análisis de restricción y secuenciación se realizó con el método de lisis por ebullición a pequeña escala (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente, se utilizaron las enzimas de restricción XhoI y BglII para linearizar el plásmido y verificar la presencia del inserto según las instrucciones del fabricante (Fermentas, USA). Los fragmentos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

5.8 Secuenciación de ADN

El ADN de los productos de clonación seleccionados se cuantificó mediante espectrometría (absorbancia a 260 nm). Posteriormente fueron secuenciados en ambas direcciones con primers específicos (pJET forward: 5'GCCTGAACACCATATCCATCC-3' y pJET reverse: 5'-GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC-3'). Cuando fue necesario se diseñaron primers adicionales (primer walking) con el software Primer3 (Rozen y Skaletsky, 1998), para completar la secuencia de la región variable. La secuenciación de nucleótidos se llevó a cabo con el método de terminación de cadena dideoxi en un secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA). Una vez determinadas, las secuencias se editaron con el software Sequence Scanner 1.0 (Applied Biosystems, 2005) y se ensamblaron con el software DNA-Man 5.2.9 (Lynnon Biosoft, 2001). Finalmente, se realizó un BLASTN con las secuencias depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.9 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron con el software SPSS 15.0 (Chicago, IL, 2006). Mediante este programa se llevaron a cabo análisis de frecuencias para perfiles de resistencia, pruebas de concordancia o relación entre las pruebas fenotípicas y genotípicas para la detección de metalo- β -lactamasas (McNemar), pruebas de independencia de χ^2 , y finalmente, se determinó la razón de grados de probabilidad (OR), con el fin de medir el riesgo de desarrollar resistencia a imipenem entre los aislamientos que presentan genes codificantes de metalo- β -lactamasas. Para este último análisis se tomó en cuenta el intervalo de confianza y el valor de χ^2 . Resultados con $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Porcentaje de resistencia antimicrobiana en los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*

Un total de 198 aislamientos de *P. aeruginosa* fueron incluidos en este estudio. Los porcentajes de resistencia a los diferentes aminoglicósidos, fluoroquinolonas y β -lactámicos se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Porcentaje de resistencia antimicrobiana en 198 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*

Antibiótico	n	%	Antibiótico	n	%
Gentamicina	142	71.7	Imipenem	116	58.6
Tobramicina	134	67.7	Meropenem	112	56.6
Amikacina	121	61.1	Ceftazidima	135	68.2
Gatifloxacina	139	70.2	Cefepime	125	63.1
Ciprofloxacina	135	68.2	Ticarcilina/ácido clavulánico	142	71.7
Aztreonam	148	74.7	Piperacilina/tazobactam	47	23.7

De los 116 aislamientos de *P. aeruginosa* no-susceptibles a imipenem, 79 (68.1%) presentaron CMI a imipenem superiores a 256 $\mu\text{g/ml}$, 27 (23.3%) con CMI entre ≥ 16 y 128 $\mu\text{g/ml}$ y 10 (8.6%) entre 8 y < 16 $\mu\text{g/ml}$.

6.2 E-test MBL para la detección de metalo- β -lactamasas en *P. aeruginosa* de origen clínico

Entre los 198 aislamientos de *P. aeruginosa*, 102 (51.5%) dieron resultados positivos para metalo- β -lactamasas por E-test MBL. De éstos 102 aislamientos, 102 (100%) fueron resistentes a imipenem, ceftazidima y cefepime, 100 (98%) fueron resistentes a amikacina, ciprofloxacina y gatifloxacina y 89 (87.3%) fueron resistentes a meropenem.

Las figuras 6A a 6D permiten comparar los resultados observados ante la presencia o ausencia de la enzima metalo- β -lactamasa con la prueba de E-test MBL.



6A. *P. aeruginosa* 75-3636C (*bla*_{VIM-1}). CMI IPI = 2 μ g/ml, CMI IP \geq 256 μ g/ml.



6B. *Pae*-75. CMI IPI = 4 μ g/ml, CMI IP \geq 256 μ g/ml.



6C. *Pae*-109. CMI IPI = 4 μ g/ml, CMI IP \geq 128 μ g/ml.



6D. *Pae*-145. CMI IPI = 1 μ g/ml, CMI IP \leq 4 μ g/ml.

Figura 6. Resultados fenotípicos de la detección de metalo- β -lactamasas con E-test MBL. La figura 6A corresponde a la cepa *P. aeruginosa* 75-3636C (*bla*_{VIM-1}) utilizada como control positivo. Las figuras B y C corresponden a resultados MBL positivos (*Pae*-75 y *Pae*-109 respectivamente). La figura D corresponde a MBL negativo (*Pae*-145).

6.3 PCR múltiple para investigar la presencia de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM} y *bla*_{SIM}

Noventa y seis (94.1%) de los 102 aislamientos positivos con E-test MBL también fueron positivos para los genes *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} (Figura 7), 5 (4.9%) fueron positivos únicamente para *bla*_{IMP}, mientras que uno (0.98%) presentó resultados negativos. Este último aislamiento mostró resistencia a imipenem (CMI ≥ 64 µg/ml) y a meropenem (CMI ≥ 16 µg/ml). De los 96 aislamientos restantes negativos por E-test, 2 (2.08%) dieron positivo para los genes *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}. Ambos aislamientos fueron resistentes a meropenem (CMI ≥ 16 µg/ml), pero mostraron CMI a imipenem por debajo del punto de corte para resistencia, uno mostró una CMI ≥ 12 µg/ml, mientras que el otro presentó una CMI ≤ 4 µg/ml.

No hubo evidencia molecular de la presencia de los genes *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM} y *bla*_{SIM} con los primers utilizados en este estudio.

Con los datos recopilados se utilizó la prueba de McNemar para analizar la relación o concordancia entre las pruebas fenotípicas y genotípicas y se concluyó que no existen diferencias estadísticamente significativa entre ambos métodos diagnósticos ($\text{Chi}^2 = 186.19$ y $p = 1.00$).

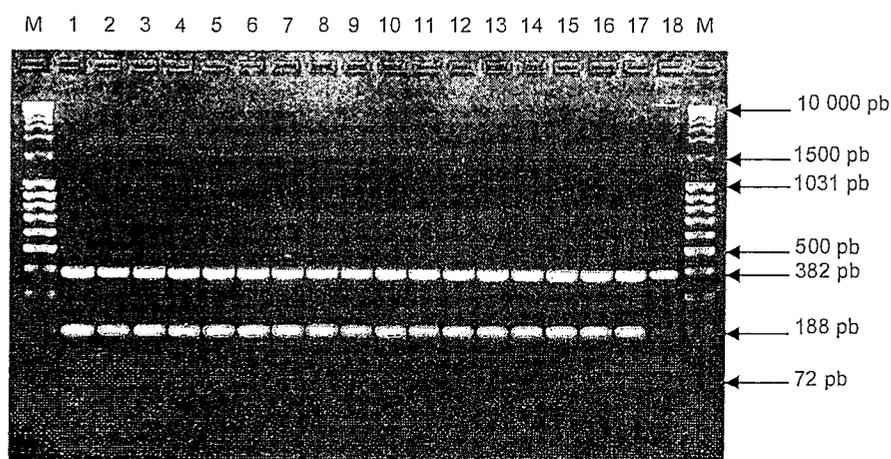


Figura 7. PCR múltiple para las metalo-β-lactamasas IMP, VIM, SPM-1, GIM-1 y SIM-1. En los extremos se muestra el marcador de tamaño molecular (M). De izquierda a derecha (1-17) se muestran los productos de las cepas *Pae*-1, *Pae*-7, *Pae*-8, *Pae*-11, *Pae*-12, *Pae*-16, *Pae*-17, *Pae*-20, *Pae*-21, *Pae*-23, *Pae*-27, *Pae*-30, *Pae*-31, *Pae*-32, *Pae*-33, *Pae*-34 y *Pae*-36. En el carril 18 se

observan las bandas correspondientes a las cepas control GIM-1 (72 pb), IMP-1 (188 pb) y VIM-1 (382 pb).

6.4 Frecuencia de *P. aeruginosa* productores de metalo- β -lactamasas según origen de la muestra

Los aislamientos de *P. aeruginosa* se obtuvieron principalmente del tracto respiratorio (31.3%), orina (29.8%), secreción (24.2%) y "otros" (14.6%) (Cuadro 5). No obstante, la detección genotípica de MBLs por PCR fue mayor en la categoría "otros" (72.4%) y secreción (60.4%), (Prueba de independencia, $\chi^2 = 9.64$, $p = 0.02$).

Cuadro 5. *P. aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas según origen de la muestra

Tipo de muestra	Aislamientos clínicos	No. de aislamientos IPM-resistentes	E-test MBL positivo	No. de aislamientos positivos por:	
				<i>bla</i> _{IMP-like}	<i>bla</i> _{VIM-like}
Secreción	48 ^a (24.2) ^b	33 (68.7)	28 (58.3)	29 (60.4)	27 (56.2)
Orina	59 (29.8)	28 (47.4)	26 (44.1)	27 (45.8)	26 (44.1)
Tracto resp. ^c	62 (31.3)	32 (51.6)	27 (43.5)	26 (41.9)	25 (40.3)
Otros	29 (14.6)	23 (79.3)	21 (72.4)	21 (72.4)	20 (69.0)
Total	198 (100)	116 (100)	102 (100)	103 (100)	98 (100)

^a Número de aislamientos.

^b Porcentaje de aislamientos.

^c Tracto respiratorio.

No se obtuvo amplicones con los primers para *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} y *bla*_{SIM-1}.

6.5 Análisis comparativo de la resistencia antimicrobiana en aislamientos productores y no productores de metalo- β -lactamasas

Una vez determinada la producción de MBLs en las *P. aeruginosa*, se comparó el perfil de resistencia a los diferentes antibióticos con los organismos no productores de MBLs, con el fin de evaluar si existen diferencias significativas entre ambos grupos de microorganismos. En general, los aislamientos productores de MBLs son resistentes a más antibióticos que los aislamientos que no producen la enzima. El 100% de los aislamientos MBLs positivo fueron resistentes a las cefalosporinas y a los aminoglicósidos gentamicina y tobramicina. Se observó además, que aunque las metalo- β -lactamasas hidrolizan a los carbapenemes, el imipenem fue más afectado que el meropenem (Cuadro 6). De los 103 aislamientos positivos para MBLs por PCR, 89 (86.4%) mostraron resistencia a imipenem (CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) y meropenem (CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), 13 (12.6%) fueron resistentes a imipenem (CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) pero sensibles a meropenem (CMI entre 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$) y un único aislamiento (0.97%) fue sensible a imipenem (CMI ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$) pero resistente a meropenem (CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$). Por otro lado, 14 de los 116 aislamientos imipenem resistentes (9 con CMI entre 8 y < 16 $\mu\text{g/ml}$, y 5 con CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) también mostraron resistencia a meropenem (CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), no obstante no se detectó la producción de MBLs por E-test y/o por PCR.

Aunque la resistencia a piperacilina/tazobactam fue menor, existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de aislamientos.

Cuadro 6. Porcentaje de resistencia según la presencia o ausencia de MBLs por PCR

Antibiótico	Aislamientos MBL-positivo n = 103	Aislamientos MBL-negativo n = 95	p
	n (%)	n (%)	
Gentamicina	103 (100.0)	39 (41.1)	<0.001
Tobramicina	103 (100.0)	31 (32.6)	<0.001
Amikacina	101 (98.1)	20 (21.0)	<0.001
Gatifloxacina	101 (98.1)	38 (40.0)	<0.001
Ciprofloxacina	101 (98.1)	34 (35.8)	<0.001
Aztreonam	102 (99.0)	46 (48.4)	<0.001
Imipenem	102 (99.0)	14 (14.7)	<0.001
Meropenem	90 (87.4)	22 (23.2)	<0.001
Ceftazidima	103 (100.0)	32 (33.7)	<0.001
Cefepime	103 (100.0)	22 (23.2)	<0.001
Ticarcilina/ácido clavulánico	103 (100.0)	39 (41.0)	<0.001
Piperacilina/tazobactam	33 (32.0)	14 (14.7)	0.004

6.6 Detección de integrones de clase 1 mediante PCR

Con los primers para el gen *Int1* (Figura 8), se logró determinar la presencia de integrasa en 137 (69.2%) aislamientos, de los cuales 136 (99.3%) y 122 (89.05%) dieron resultados positivos para los genes *su1* (Figura 9) y *qacΔE1* (Figura 10), respectivamente. Una vez reconocido el integrón clase 1 se utilizaron los primers 5'CS y 3'CS (Figura 11) para amplificar la región variable y los primers *Int2F* y 3'CS (Figura 12) para amplificar un segmento variable que comprende un fragmento del gen de la integrasa y el cassette génico. De los 137 aislamientos con integrones clase 1, 19 (13.9%) dieron resultados positivos para cassettes génicos. Interesantemente, todos estos 19 aislamientos fueron imipenem-sensibles y no dieron resultados positivos con el ensayo de

E-test para la detección de metalo- β -lactamasas. El tamaño de los amplicones varió entre 700 y 2500 pb (Cuadro 7).

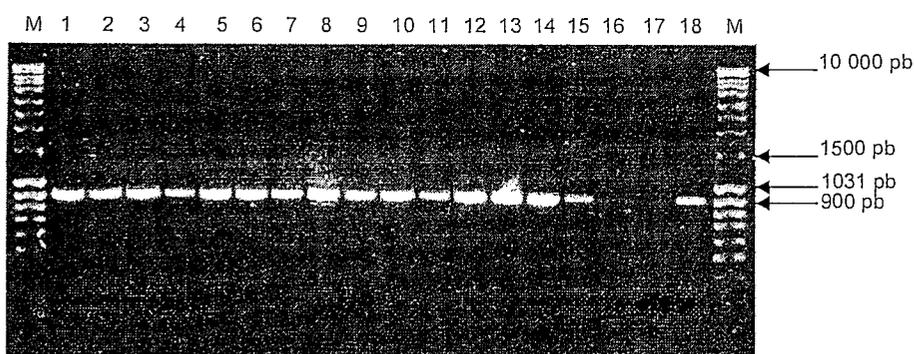


Figura 8. PCR IntAB para el gen *Int1*. En los extremos se muestra el marcador de tamaño molecular (M), mientras que de izquierda a derecha (1-16) se muestran los resultados para las cepas *Pae*-103, *Pae*-104, *Pae*-105, *Pae*-106, *Pae*-107, *Pae*-108, *Pae*-109, *Pae*-110, *Pae*-119, *Pae*-120, *Pae*-121, *Pae*-125, *Pae*-126, *Pae*-130, *Pae*-131 y *Pae*-132. Los carriles 17 y 18 corresponden a los controles negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853) y positivo (*E. coli* UCR-0689).

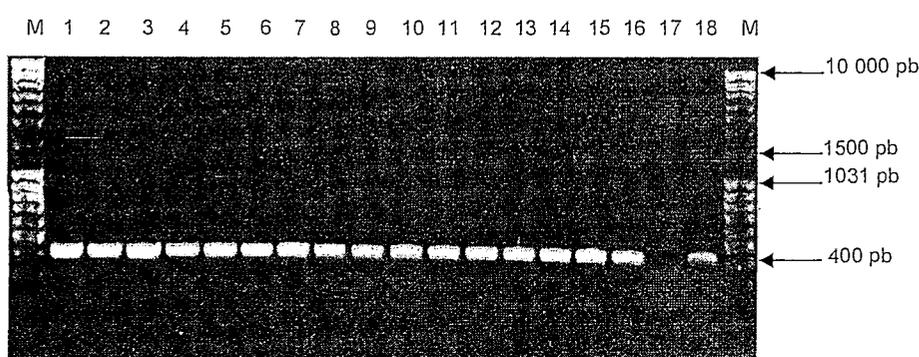


Figura 9. PCR *sul1-sul1.rev* para el gen *sul1*. En los extremos se muestra el marcador de tamaño molecular mientras que de izquierda a derecha se muestran los resultados para las cepas *Pae*-45, *Pae*-61, *Pae*-80, *Pae*-127, *Pae*-138, *Pae*-149, *Pae*-150, *Pae*-164, *Pae*-169, *Pae*-201, *Pae*-13, *Pae*-59, *Pae*-67, *Pae*-68, *Pae*-81 y *Pae*-122. Los últimos dos carriles corresponden a los controles negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853) y positivo (*E. coli* UCR-0689).

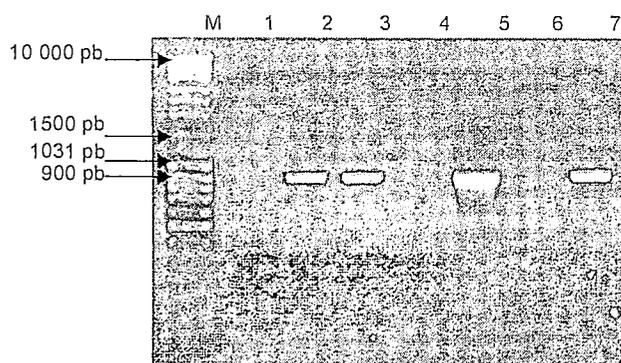


Figura 10. PCR Orf4-sul1.rev para el gen *qacΔE1*. En el primer carril se muestra el marcador de tamaño molecular (M). Los carriles del 1 al 5 corresponden a las cepas *Pae-407*, *Pae-159*, *Pae-221*, *Pae-222* y *Pae-224*, mientras que los últimos dos carriles corresponden a los controles negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853) y positivo (*E. coli* UCR-0689).

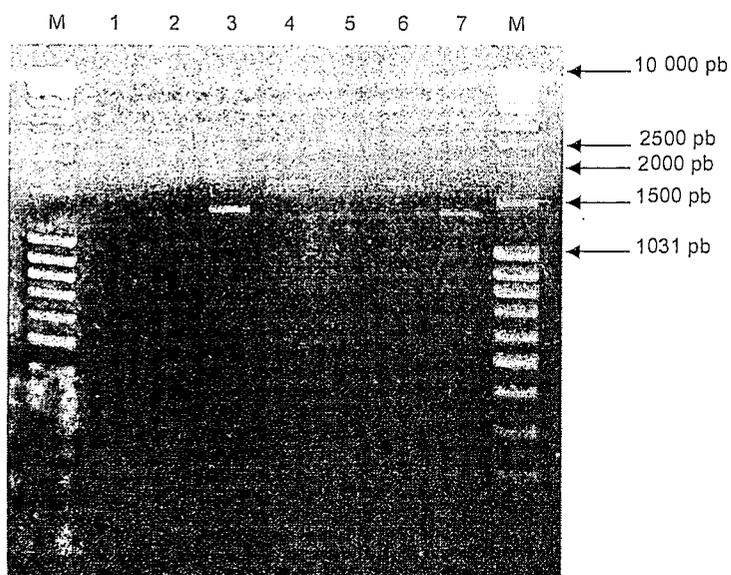


Figura 11. PCR 5'CS-3'CS para la región variable (cassettes génicos). En los extremos se muestra el marcador de tamaño molecular y de izquierda a derecha se muestran los productos purificados de las cepas *Pae-158*, *Pae-164*, *Pae-198*, *Pae-221*, *Pae-224*, *Pae-308* y *Pae-387*.

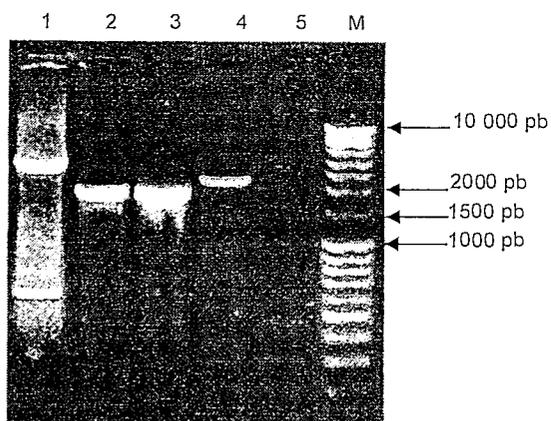


Figura 12. PCR Int2F-3'CS para la región variable e integrasa. De izquierda a derecha (Carriles del 1 al 5) se muestran los resultados para las cepas *Pae-164*, *Pae-134*, *Pae-161*, *Pae-82*, *Pae-221* y *Pae-222*. En el último carril se muestra el marcador de tamaño molecular.

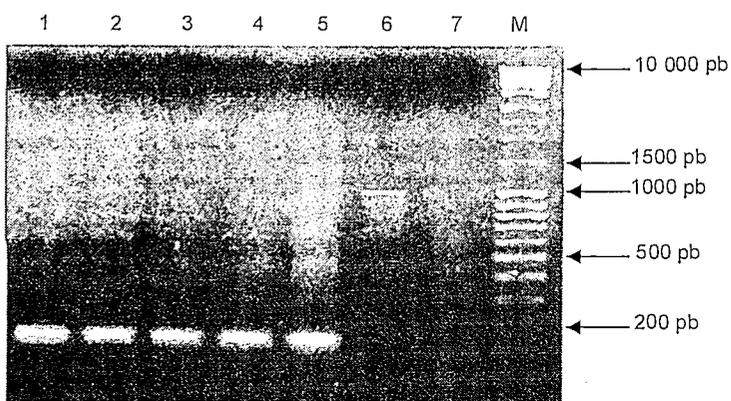


Figura 13. PCR 5'CS-3'CS para la región variable de aislamientos de *P. aeruginosa* imipenem resistentes con cassette vacío. De izquierda a derecha (Carriles del 1 al 5) se muestran los resultados para las cepas *Pae-97*, *Pae-99*, *Pae-103*, *Pae-104*, y *Pae-105*. Los carriles 6 y 7 corresponden al control positivo (*E. coli* UCR-0689) y al control negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853) respectivamente. El último carril muestra el marcador de tamaño molecular.

Cuadro 7. Integrones de clase 1 en aislamientos de *P. aeruginosa*

Aislamientos ^a	<i>Int1</i>	<i>sul1</i>	<i>qacΔE1</i>	cassettes génicos (pb)	Integrasa+cassettes (pb)
<i>Pae-9</i>	+	+	+	800	1500
<i>Pae-47</i>	+	+	+	1400	2000
<i>Pae-82</i>	+	+	-	800	1500
<i>Pae-87</i>	+	+	-	800	1500
<i>Pae-100</i> ^b	+	+	+	700, 800	1300
<i>Pae-134</i>	+	+	+	1400	2000
<i>Pae-157</i>	+	+	+	800	1400
<i>Pae-158</i>	+	+	+	800	1500
<i>Pae-159</i>	+	+	+	800	1400
<i>Pae-161</i>	+	+	+	1400	2000
<i>Pae-164</i>	+	+	+	2500	3000
<i>Pae-186</i>	+	+	+	1600	2200
<i>Pae-198</i>	+	+	+	1400	2000
<i>Pae-209</i>	+	+	+	1400	2000
<i>Pae-221</i>	+	+	+	1600	2200
<i>Pae-224</i>	+	+	+	2500	3100
<i>Pae-232</i>	+	+	+	1400	2000
<i>Pae-308</i>	+	+	+	1600	2200
<i>Pae-387</i>	+	+	-	1400	2000

^a Todos los aislamientos con cassettes génicos fueron sensibles a imipenem y meropenem y no se detectó la presencia de metalo- β -lactamasas por E-test MBL.

^b Dos integrones de clase 1.

6.7 Secuenciación de los cassettes génicos contenidos en los integrones de clase 1

La secuencia de nucleótidos de la región variable de los integrones permitió identificar los genes de resistencia (Cuadro 8). El fenotipo de resistencia no siempre correlacionó con el genotipo encontrado, como es el caso del aislamiento *Pae-47*, donde a pesar de la presencia del gen *aadA6* no se observó resistencia a ninguno de los aminoglicósidos ensayados.

Un aislamiento (*Pae-100*) reveló la presencia de dos integrones de clase 1, uno con un cassette de 700 pb y otro con un cassette de 800 pb. El primero reveló la presencia del gen *qacF* que confiere resistencia a compuestos cuaternarios de amonio (Tennstedt *et al.*, 2003), mientras que el segundo presentó un cassette con el gen *aacA4* que codifica una aminoglicósido acetiltransferasas AAC(6')-II para resistencia a gentamicina y kanamicina pero no para amikacina (Stokes *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 2006). Seis aislamientos adicionales portaban un integrón con un único cassette *aacA4* y otros tres aislamientos portaban integrones con 2 cassettes génicos: el gen *aacA4* y el gen *aadA2*. Este último gen codifica para una aminoglicósido-3'-adenililtransferasa que confiere resistencia a estreptomina y espectinomina (Stokes *et al.*, 1993). En otros siete aislamientos se detectó la presencia de integrones con dos cassettes génicos. El primero contenía el gen *orfD* de función desconocida (Gu *et al.*, 2007) y el segundo cassette génico detectado fue el *aadA6* que codifica una aminoglicósido adeniltransferasa que confiere resistencia a diversos aminoglicósidos (Naas *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2007). Los restantes 118 (86.1%) integrones no amplificaron con los primers 5'CS y 3'CS.

Cuadro 8. Cassettes génicos obtenidos con los primers 5'CS y 3'CS en aislamientos de *P. aeruginosa*

Aislamientos	Cassettes génicos (5'-3')	Fenotipo de resistencia a aminoglicósidos ^a según el sistema VITEK
<i>Pae</i> -9	<i>aacA4</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -82	<i>aacA4</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), TOB (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -87	<i>aacA4</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), TOB (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -100	<i>aacA4</i> , <i>qacF</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), AMK (CMI = 32 µg/ml)
<i>Pae</i> -157	<i>aacA4</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -158	<i>aacA4</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), TOB (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -159	<i>aacA4</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -186	<i>aacA4+aadA1</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), TOB (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -221	<i>aacA4+aadA1</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -308	<i>aacA4+aadA1</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), TOB (CMI ≥ 16 µg/ml)
<i>Pae</i> -47	<i>orfD+aadA6</i>	GEN (CMI = 4 µg/ml), TOB (CMI ≤ 0.5 µg/ml)
<i>Pae</i> -134	<i>orfD+aadA6</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), TOB (CMI ≥ 16 µg/ml), AMK (CMI ≥ 64 µg/ml)
<i>Pae</i> -161	<i>orfD+aadA6</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), AMK (CMI ≥ 64 µg/ml)
<i>Pae</i> -198	<i>orfD+aadA6</i>	GEN (CMI = 8 µg/ml)
<i>Pae</i> -209	<i>orfD+aadA6</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), TOB (CMI ≥ 16 µg/ml), AMK (CMI ≥ 64 µg/ml)
<i>Pae</i> -232	<i>orfD+aadA6</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), AMK (CMI ≥ 64 µg/ml)
<i>Pae</i> -387	<i>orfD+aadA6</i>	GEN (CMI ≥ 16 µg/ml), AMK (CMI ≥ 64 µg/ml)

^a GEN, Gentamicina; TOB, Tobramicina; AMK, Amikacina

Los cassettes génicos *aacA4*, *aadA1* and *aadA6* se han descrito en *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y Enterobacteriaceae en combinación con genes codificantes de β -lactamasas, incluyendo genes de metalo- β -lactamasas (Fukigai *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2007; Pitout *et al.*, 2007).

6.8 Metalo- β -lactamasas e integrones de clase 1

A pesar del hecho que los integrones de clase 1 estaban presentes en todas las *P. aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas, ninguna de ellas mostró evidencia de cassettes génicos con los primers 5'CS-3'CS (Figura 13) y por lo tanto no se logró establecer una asociación entre la producción de MBLs y su presencia como cassettes génicos en integrones de clase 1 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Asociación entre metalo- β -lactamasas e integrones de clase 1

Metalo- β -lactamasas detectadas por PCR	Integrones de clase 1			
	<i>Int1</i> positivo	<i>Int1</i> negativo	Total	cassettes génicos
Metallo- β -lactamasa tipo IMP	103	0	103	0
Metallo- β -lactamasa tipo VIM	98	0	98	0
Ausencia de metalo- β -lactamasas	34	61	95	20
Total de aislamientos ^a	137	61	198	20

^a Todos los aislamientos tipo VIM también poseen el gen que codifica para las IMP-MBLs, por lo que se consideró en la sumatoria total únicamente a los aislamientos productores de IMP-MBLs y los no productores de dicha enzima.

Por otro lado, al analizar la frecuencia de *P. aeruginosa* según servicios hospitalarios, se pudo determinar que la unidad de terapia intensiva (UTI), emergencias quirúrgicas, los pisos 2, 5 y 6 son los servicios con mayor cantidad de aislamientos de *P. aeruginosa*, más del 50% productores de MBLs. Ninguno de los aislamientos correspondientes al servicio de neurocirugía y el piso 1 mostraron resistencia a imipenem y/o fueron productores de MBLs (Cuadro 10).

Cuadro 10. Aislamientos productores de metalo- β -lactamasas según servicio hospitalario

Servicio	Aislamientos clínicos	No. de aislamientos imipenem-resistentes n (%)	No. de aislamientos positivos para:	
			<i>bla</i> _{IMP-like}	<i>bla</i> _{VIM-like}
Terapia intensiva	46	41 ^a (89.1) ^b	39 (84.8)	37 (80.4)
Emergencia quirúrgica	13	11 (84.6)	10 (76.9)	9 (69.2)
Emergencia general	3	2 (66.7)	1 (33.3)	1 (33.3)
Consulta externa	12	3 (25)	2 (16.7)	2 (16.7)
Neurocirugía	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Piso 1	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Piso 2	5	5 (100)	4 (80.0)	4 (80.0)
Piso 3	25	8 (32.0)	6 (24.0)	6 (24.0)
Piso 4	22	4 (18.2)	3 (13.6)	3 (13.6)
Piso 5	30	19 (63.3)	18 (60.0)	17 (56.7)
Piso 6	34	21 (61.8)	18 (52.9)	17 (50)
Piso 7	3	2 (66.7)	2 (66.7)	2 (66.7)
Total	198	116 (58.6)	103 (52.0)	98 (49.5)

^a Número de aislamientos

^b Porcentaje de aislamientos

No se obtuvo amplicones con los primers para *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} y *bla*_{SIM-1}.

6.9 Metalo- β -lactamasas y su relación clonal a través de la técnica de RAPD

Finalmente, con el objetivo de determinar el origen clonal de los 198 aislamientos de *P. aeruginosa*, se compararon nuestros resultados con los datos obtenidos anteriormente por Madriz-Garita a través de la técnica de RAPD (Madriz-Garita, 2007). Dieciocho (9%) de los 198 aislamientos no pudieron ser tipificados con la técnica de RAPD. De los 180 (91%) aislamientos restantes, 132 pudieron ser clasificados en 29 grupos con una similitud igual o superior al 80%. Nueve grupos primarios (I-IX) contienen de 6 a 13 aislamientos, mientras que 45 aislamientos fueron distribuidos en 20 grupos secundarios (i-xx), cada uno con 2 ó 3 aislamientos (Cuadro 11, Figura 14). Interesantemente, de los 87 aislamientos de *P. aeruginosa* representados en los grupos primarios, 71 (81.6%) mostraron evidencia molecular de la presencia de genes de metalo- β -lactamasas mientras que únicamente 14 (31.1%) aislamientos de los grupos secundarios dieron resultados positivos para MBLs. La mayoría de las MBLs estaban distribuidas entre los cluster primarios II, III, V, VI y VII pero no se encontró ningún aislamiento productor de MBLs en el grupo IV.

Cuadro 11. Relación clonal entre las *P. aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas

Clusters (RAPD)	Aislamientos clínicos	No. de aislamientos imipenem-resistentes	E-test MBL	No. de aislamientos positivos para:	
				<i>bla</i> _{IMP-like}	<i>bla</i> _{VIM-like}
I	12	9 ^a (75.0) ^b	9 (75.0)	9 (75.0)	9 (75.0)
II	12	11 (91.7)	10 (83.3)	11 (91.7)	10 (83.3)
III	8	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)
IV	6	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
V	7	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)
VI	8	8 (100)	8 (100)	8 (100)	7 (87.5)
VII	13	9 (69.2)	9 (69.2)	9 (69.2)	9 (69.2)
VIII	12	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
IX	9	8 (88.9)	8 (88.9)	7 (77.8)	7 (77.8)
CS ^c	45	21 (46.7)	14 (31.1)	15 (33.3)	14 (31.1)
CND ^d	48	15 (31.3)	10 (20.8)	10 (20.8)	8 (16.7)
RNO ^e	18	8 (44.4)	7 (38.9)	7 (38.9)	7 (38.9)
Total	198	116 (58.6)	102 (51.5)	103 (52.0)	98 (49.5)

^a No. de aislamientos

^b Porcentaje de aislamientos

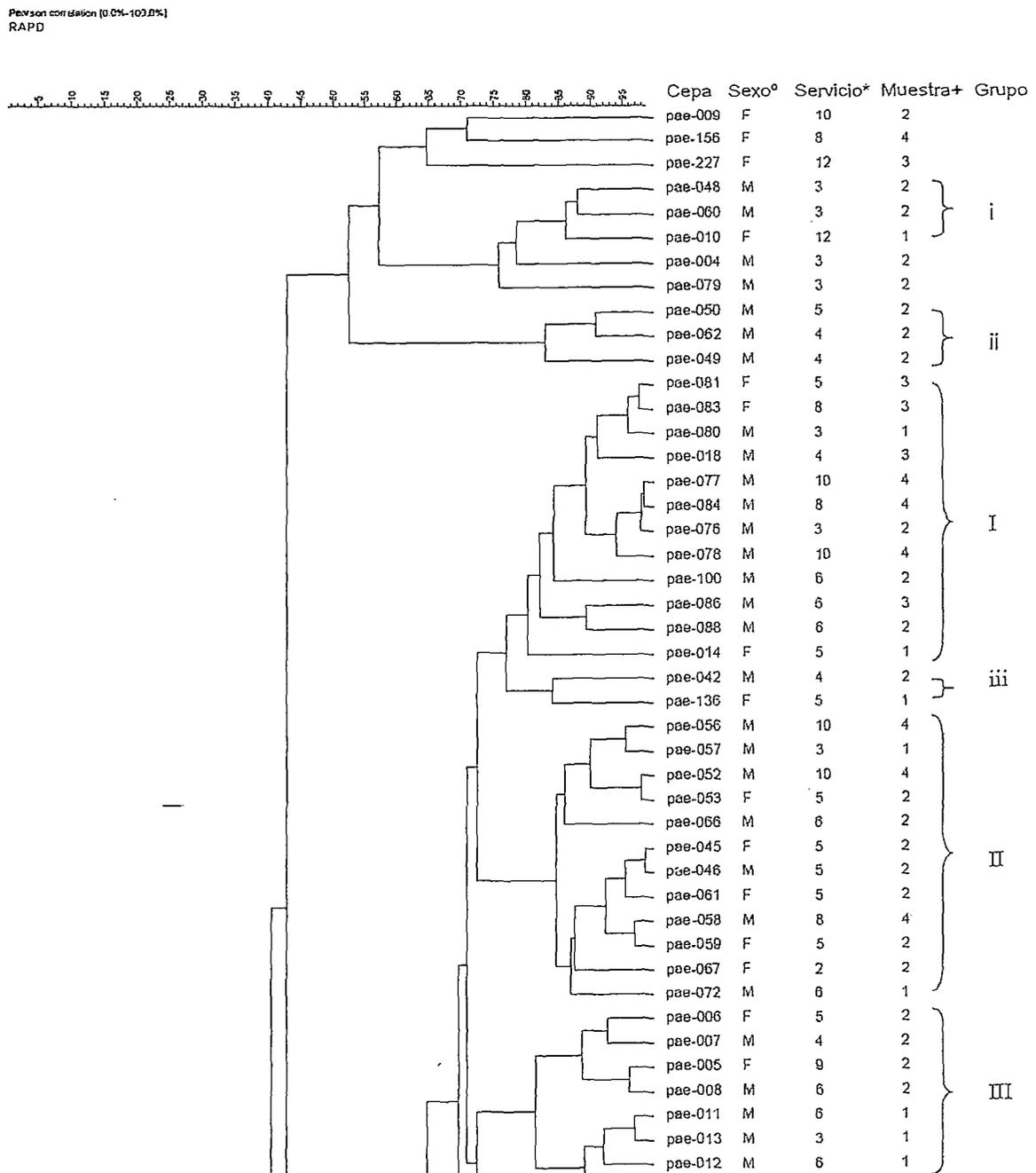
^c CS, clusters secundarios.

^d CND, clonalidad no determinada (cut off ≤ 80)

^e RNO, resultados no obtenidos con primers ERIC2.

No se obtuvo amplicones con los primers para *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} y *bla*_{SIM-1}.

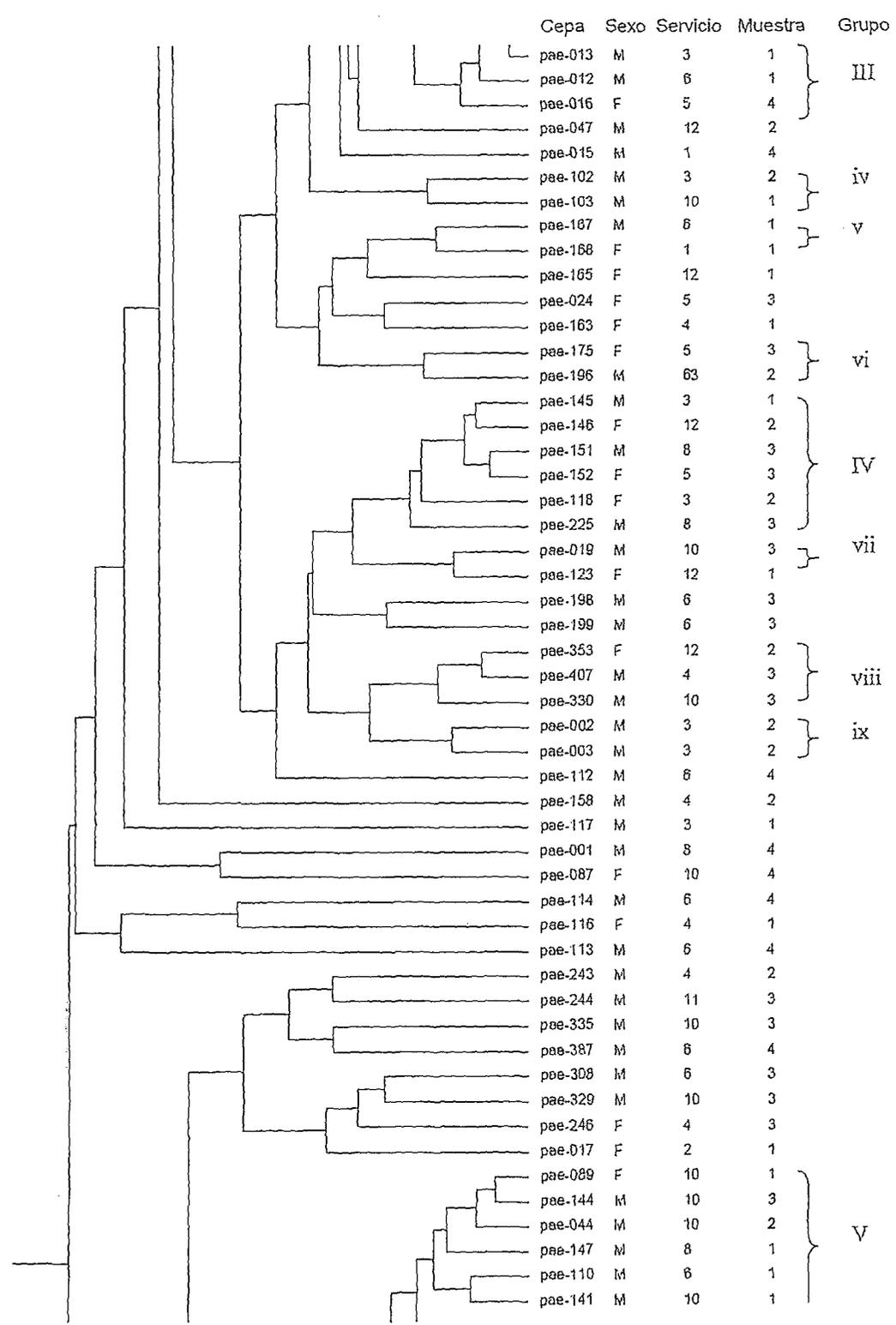
Figura 14. Porcentaje de correlación entre las distintas cepas de *P. aeruginosa*, su lugar de aislamiento según sexo, servicio, tipo de muestra y grupo al que pertenecen.

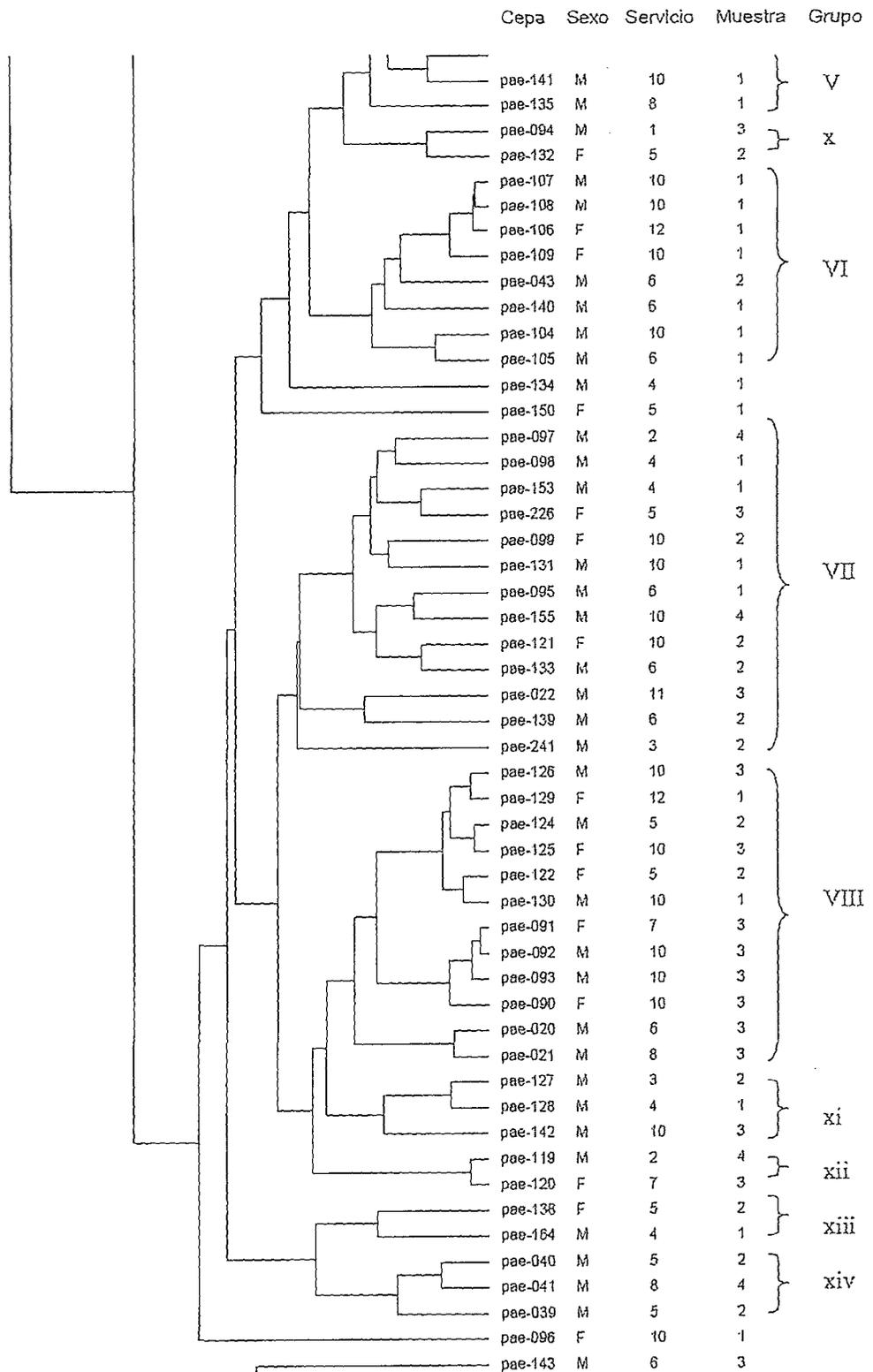


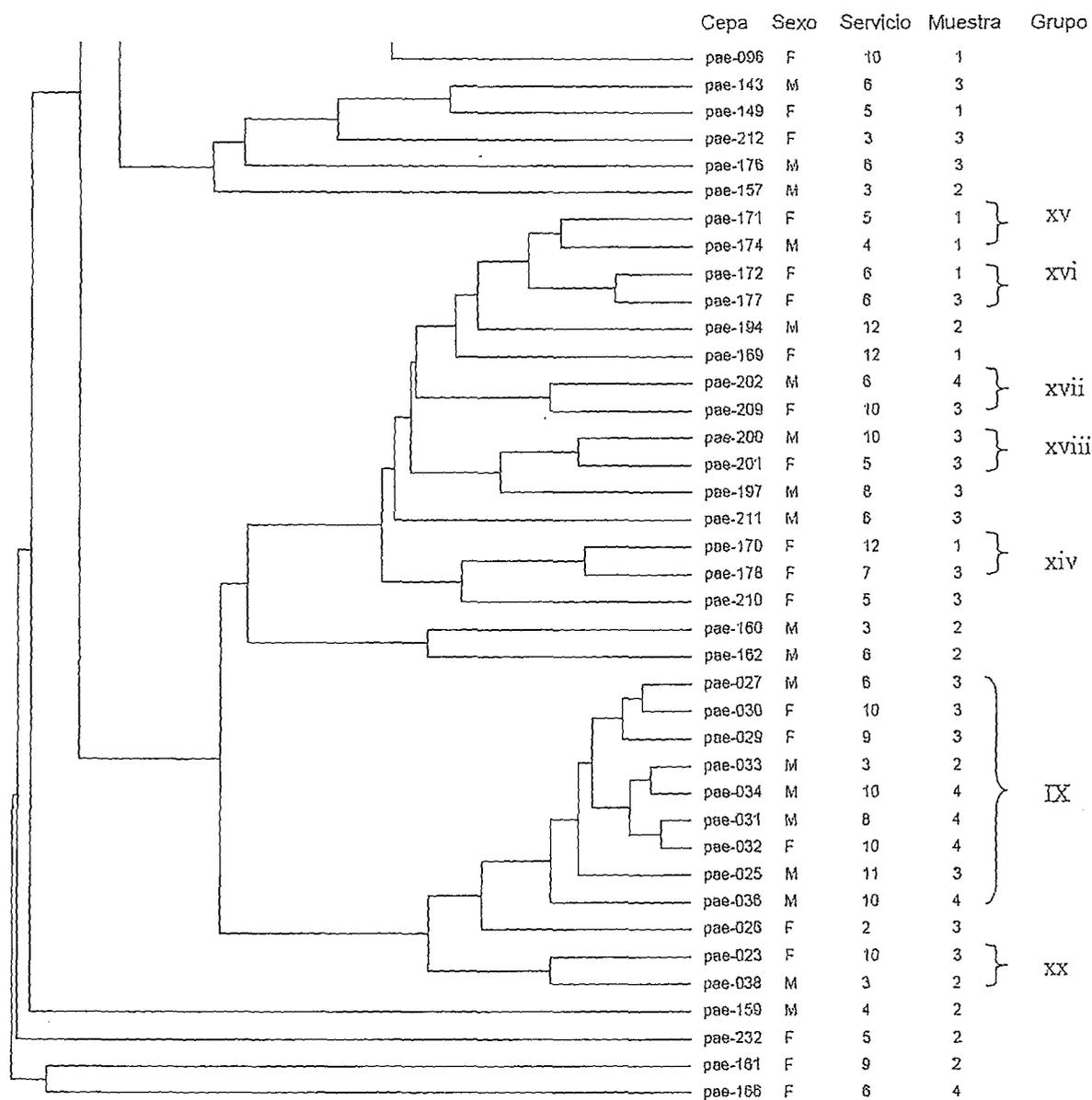
* F = femenino, M = masculino

* 1 = piso 1, 2 = piso 2, 3 = piso 3, 4 = piso 4, 5 = piso 5, 6 = piso 6, 7 = piso 7, 8 = emergencias quirúrgicas, 9 = emergencias, 10 = terapia intensiva, 11 = neurocirugía, 12 = consulta externa.

+ 1 = secreción, 2 = orina, 3 = respiratorio, 4 = otros







Tomado de Madriz-Garita, 2007

7. DISCUSIÓN

La caracterización de las metalo- β -lactamasas se realizó por métodos fenotípicos y genotípicos. Los resultados muestran una alta correlación entre ambos procedimientos ($p = 1.0$). Una excepción fue un único aislamiento que resultó positivo con las tiras E-test MBL pero negativo por PCR. Los resultados falsos positivos con E-test se han asociado en parte con el efecto del zinc sobre las porinas OprD (Conejo *et al.*, 2003). No obstante, dicho aislamiento positivo por E-test MBL también mostró resistencia a imipenem, meropenem y ceftazidima, lo que no descarta la posibilidad de otro tipo de MBL que no es detectable con los primers utilizados en la PCR, o bien, una combinación de diferentes mecanismos como las bombas de eflujo y otros tipos de β -lactamasas. Otros 2 aislamientos dieron resultados negativos por E-test MBL pero mostraron evidencia molecular de IMP y VIM metalo- β -lactamasas. Esta discrepancia podría ser explicada por la baja sensibilidad de los E-test MBL cuando las CMI a imipenem son inferiores a 4 $\mu\text{g/ml}$ (Yan *et al.*, 2004; Galani *et al.*, 2008). Además, se ha observado que existe una correlación imperfecta entre bacterias portadoras de genes que codifican para MBLs y la expresión de resistencia a los carbapenemes (Yan *et al.*, 2001, Livermore *et al.*, 2003), por lo que se ha sugerido que aún las más potentes carbapenemasas de clase B pueden proteger a los organismos Gram-negativos solo si actúan en conjunto con impermeabilidad de la membrana (Livermore *et al.*, 2003; Behera *et al.*, 2008). Esta hipótesis podría explicar la mayor resistencia encontrada para el antibiótico imipenem y en menor grado al meropenem entre los aislamientos productores de metalo- β -lactamasas. De esta forma, los 13 aislamientos MBL positivo que presentaron resistencia a imipenem y sensibilidad al meropenem podrían ser el resultado de la presencia de MBLs en combinación con impermeabilidad por las porinas OprD, mientras que el aislamiento que mostró sensibilidad a imipenem y resistencia a meropenem podría explicarse por la combinación de la MBL y otro mecanismo de resistencia como las bombas de eflujo MexAB-OprM que afectan al meropenem pero no a imipenem (Li y Nikaido, 2004).

En general, la resistencia de los aislamientos de *P. aeruginosa* a carbapenemes atribuida a β -lactamasas se debe a la producción de metalo- β -lactamasas (Bonomo y Szabo, 2006). En este

estudio con aislamientos del Hospital México, la resistencia a imipenem y meropenem está asociada en gran parte a la producción de las enzimas IMP y VIM metalo- β -lactamasas (prueba de independencia, $p \leq 0.001$). Para determinar la asociación entre los genes bla_{IMP} , bla_{VIM} , y la resistencia a imipenem, se calculó además, la razón de grados de probabilidad (OR), el intervalo de confianza al 95% (IC), y χ^2 . En el caso del gen bla_{IMP} , existe una probabilidad 590.1 veces mayor de desarrollar resistencia a imipenem (OR = 590.1, IC al 95% = 208.6 – 1668.6, y $\chi^2 = 144.7$), y para el gen bla_{VIM} existe una probabilidad de 413.5 veces mayor (OR = 413.5, IC al 95% = 147.1 – 1162.6, y $\chi^2 = 130.5$) que cuando los genes están ausentes.

La prevalencia global de MBLs en los 198 aislamientos fue del 52.0% ($n = 103$) y del 49.5% ($n = 98$) para las metalo- β -lactamasas IMP y VIM, respectivamente. Sin embargo, cuando se toman en cuenta únicamente los 116 aislamientos imipenem-resistentes la prevalencia aumenta hasta el 88.8% (103/116) para las MBLs tipo IMP y hasta el 84.5% (98/116) para las MBLs tipo VIM, dato que supera la prevalencia publicada para aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en América Latina (Sader *et al.*, 2004). Catorce de los 116 aislamientos imipenem-resistentes (12.1%), también fueron resistentes a meropenem pero a diferencias de los demás aislamientos, no mostraron resultados positivos para MBLs por E-test y/o PCR. Este dato sugiere que la resistencia a ambos carbapenemes podría ser el resultado de la combinación de diversos mecanismos tales como impermeabilidad de membrana, sobreexpresión de bombas de eflujo u otras β -lactamasas como las carbapenemasas de clase A o clase D.

Por otro lado, se pudo estimar que la cantidad de aislamientos del tracto respiratorio ($n = 62$), orina ($n = 59$) y secreción ($n = 48$) fue bastante similar, lo que sugiere que estos son los sitios de mayor infección o colonización por *P. aeruginosa*. Sin embargo cuando se compararon todos los tipos de muestra con la presencia de MBLs, se pudo determinar que la mayor proporción de MBLs se encuentra en la categoría "otros" (72.4%) y la categoría "secreción" (60.4%) (prueba de independencia, $\chi^2 = 9.6$, $p = 0.02$). Los aislamientos del grupo "otros" tiene porcentajes de resistencias mayores a muchos antibióticos (aminoglicósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas) que

los aislamientos de los otros tipos de muestras y en su mayoría proceden del servicio de terapia intensiva.

Los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* productores de MBLs tienden a ser más resistentes a otras clases de agentes antimicrobianos (Walsh *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2007). El análisis de los perfiles de resistencia antimicrobiana que se obtuvo al comparar los aislamientos de *P. aeruginosa* productores y no productores de metalo- β -lactamasas, concuerda con lo descrito anteriormente puesto que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la resistencia mostrada por ambos grupos de microorganismos. En este estudio se encontró que los aislamientos de *P. aeruginosa* MBL positivo presentan resistencia a cefalosporinas, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, carbapenemes, ticarcilina/ácido clavulánico y la monobactama aztreonam ($p \leq 0.001$). Para este último antibiótico los aislamientos MBL positivos mostraron un 99 % de resistencia, no obstante el aztreonam no sufre hidrólisis enzimática mediada por MBLs y su resistencia podría estar asociada a otros mecanismos de resistencia tales como bombas de eflujo o hiperproducción de cefalosporinasas (Quale *et al.*, 2006).

Por otro lado, la resistencia a amikacina, gentamicina, tobramicina, ceftazidima y cefepime entre los aislamientos productores de MBLs sugiere que, muy probablemente, los genes de resistencia a aminoglicósidos, cefalosporinas y carbapenemes se encuentran juntos ("genetic linkage") en elementos genéticos móviles. Una opción podría ser que formen parte de cassettes génicos en integrones de clase 1 ó clase 3 como fue reportado anteriormente (Jones *et al.*, 2005). Por tal razón y tomando en cuenta que los genes codificantes de las enzimas IMP, VIM, GIM-1 y SIM-1 se han encontrado como cassettes génicos insertos en integrones de clase 1 (Watanabe *et al.*, 1991; Lauretti *et al.*, 1999; Castanheira *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), el siguiente paso fue investigar su presencia en los 198 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*.

En el caso de las quinolonas, la resistencia puede atribuirse a mutaciones en los genes reguladores para el sistema de eflujo o a mutaciones en los genes de las topoisomerasas II y IV (codificadas por los genes *gyrA-gyrB* y *parC-parE* respectivamente) (Fluit *et al.*, 2001). Sin embargo, las mutaciones en los genes reguladores del sistema de eflujo se asocian a altos niveles

de resistencia únicamente cuando hay mutaciones en *gyrA* o *parC* (Bonomo y Szabo. 2006). De la misma forma, se ha determinado que la transferencia horizontal podría facilitar la rápida diseminación de los genes de resistencia a quinolonas, puesto que también se han descrito elementos móviles que portan el gen *qnr* (Ruiz, 2003).

A diferencia de lo observado con la mayoría de los antibióticos, los aislamientos productores de MBLs mostraron mayor susceptibilidad para piperacilina/tazobactam, lo que se atribuye a su alto coeficiente de permeabilidad y a que este antibiótico es poco afectado por las bombas de eflujo (Yan *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2007). Resultados similares han sido reportados en diversos estudios. En un brote nosocomial por *P. aeruginosa* en Canadá, por ejemplo, encontraron altos niveles de resistencia a carbapenemes y ceftazidima pero no a piperacilina. (Gibb *et al.*, 2002).

De los 103 aislamientos de *P. aeruginosa* positivos por PCR para MBLs, 33 (32%) fueron resistentes a piperacilina/tazobactam con CMI ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, 56 (54.4%) fueron sensibles con CMI ≤ 64 $\mu\text{g/ml}$ y 14 (13.6%) con CMI ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, estos resultados deben analizarse con cautela debido a que se ha observado que los sistemas automatizados (incluyendo Vitek y Vitek 2), tienden a reportar CMI para piperacilina/tazobactam con valores más bajos a los reportados con los métodos de referencia en los aislamientos productores de MBLs (Juretschko *et al.*, 2007; Mazzariol *et al.*, 2008). Estos errores se han asociado a que el punto de corte para resistencia a piperacilina/tazobactam se encuentra a solo una dilución del corte para sensibilidad (Sader *et al.*, 2006). La falsa sensibilidad (errores mayores) para piperacilina/tazobactam podría explicar, en parte, las fallas de tratamiento en pacientes con aislamientos de *P. aeruginosa* MBLs positivo, por lo que para este antibiótico en particular se recomienda el uso de los métodos de referencia, como dilución en agar, microdilución en caldo o método de difusión en disco (Karlowsky *et al.*, 2003; Sader *et al.*, 2006).

Contrario a lo esperado, no se obtuvo amplicones con los primers 5'CS-3'CS para los aislamientos productores de metalo- β -lactamasas y, por lo tanto, no se logró establecer asociación con los integrones de clase 1. Una razón podría ser que la integrasa esté llevando a cabo eventos de escisión de los cassettes génicos del integrón, o bien que los genes codificantes de las IMP y VIM

metalo- β -lactamasas se encuentran en integrones de clase 3 (Arakawa *et al.*, 1995) o en estructuras inusuales de integrones de clase 1 (Machado *et al.*, 2005) que no pueden amplificarse con los primers utilizados en el estudio. Hasta la fecha, solo pocas cepas con determinantes genéticos de IMP-MBLs se han encontrado en integrones de clase 3 (Shibata *et al.*, 2003). Otra posibilidad es la presencia de genes codificantes de MBLs descritos en regiones comunes tipo IS91 (ISCR), los cuales poseen una duplicación parcial de la región 3'CS de los integrones de clase 1, entre la cual se localiza una región común (CR) y genes de resistencia a antibióticos (Toleman *et al.*, 2006b). Para determinar con certeza la localización de los genes *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}, se requieren estudios adicionales con otros primers para amplificar la región variable de los integrones clase 1, primers para otros tipos de integrones y/o realizar una librería genómica para luego clonar y secuenciar los genes codificantes de metalo- β -lactamasas y poder determinar su localización física en el genoma de los aislamientos estudiados.

De los 19 aislamientos de *P. aeruginosa* que amplificaron con los primers 5'CS y 3'CS, un aislamiento (*Pae*-100) presentó dos amplicones, cada uno correspondiente a un integrón. El análisis de secuencia de los 18 amplicones restantes reveló un predominio de tres cassettes génicos (*aacA4*, *aadA2* y *aadA6*) que confieren resistencia a aminoglicósidos. En dos de los 18 amplicones no se obtuvieron resultados adecuados con los ensayos de clonación y transformación, quizás debido al hecho que los dos amplicones eran demasiado grandes (2500 pb) para el vector que se utilizó (pJET, 3128 pb), o bien por problemas de purificación del producto de amplificación de la región variable. Otras razones podrían ser que el producto codificado para ese amplicón es tóxico para las bacterias vector, o bien que el vector con el inserto forman una molécula muy inestable. Es de interés notable que la mayoría de los cassettes génicos de resistencia a aminoglicósidos también se han reportado en asociación con genes codificantes de MBLs (Riccio *et al.*, 2001; Yano *et al.*, 2001; Bonomo y Szabo, 2006). Un ejemplo es la descripción de un integrón con los cassettes génicos *bla*_{IMP-2}, *aacA4* y *aadA1* en *Acinetobacter baumannii* (Shibata *et al.*, 2003). Otro cassette génico, el *bla*_{IMP-4}, se encontró en un integrón junto con otros genes de resistencia (*qacG2*, *aacA4* y *catB3*) en un plásmido (Houang *et al.*, 2003). Estos cassettes génicos

podrían ser el resultado de la presión selectiva ejercida por el uso de diversos antibióticos β -lactámicos y aminoglicósidos utilizados a nivel hospitalario, favoreciendo así la incorporación y mantenimiento de los cassettes en la región variable de los integrones clase 1. El gen *qacF* encontrado en nuestro estudio comparte un 67.8% de identidad de secuencia con el gen *qacE*, el cual codifica para una proteína exportadora que media resistencia a agentes intercalantes y a compuestos cuaternarios de amonio (Ploy *et al.*, 1998). Por su parte, el cassette génico *orfD* codifica para un producto desconocido, no obstante se ha sugerido que *orfD* podría estar involucrado en la regulación de la captación de glucosa en *P. aeruginosa* (Hosseini *et al.*, 2006).

Se ha comprobado que las áreas hospitalarias con prevalencias de resistencia más altas, también tienen las tasas más altas en la utilización de antibióticos (Weber *et al.*, 1999). Al comparar los diferentes servicios del hospital para determinar la frecuencia de aislamientos productores de MBLs se pudo comprobar que el 84.8% y el 80.4% de todos los aislamientos de la unidad de terapia intensiva eran portadores de los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*, respectivamente, seguido por el servicio de emergencia quirúrgica con 76.9% de frecuencia para *bla_{IMP}* y 69.2% para el gen *bla_{VIM}*. De los 103 aislamientos portadores del gen *bla_{IMP}*, el 37.9% (n=39) provienen de la unidad de terapia intensiva. Se ha reconocido que los pacientes hospitalizados en la UTI poseen un riesgo de 5 a 10 veces de adquirir una infección nosocomial que aquellos de otros servicios del hospital (Weber *et al.*, 1999). Este riesgo puede explicarse por varios factores. Los pacientes que se encuentran en este servicio por lo general presentan enfermedades de fondo, malnutrición, extremos de edad e inmunosupresión que favorecen la infección por diversos microorganismos. Otro factor es el uso de procedimientos invasivos y el uso de dispositivos tales como, tubos endotraqueales, catéteres intravasculares y catéteres del tracto urinario (Weber *et al.*, 1999; Dzidic y Bedeković, 2003). La estadía prolongada en este servicio con tantos factores predisponentes podría incrementar el riesgo de infecciones nosocomiales, y unido al uso intensivo de antimicrobianos en esta unidad, el resultado será la selección de organismos multi-resistentes como lo son los aislamientos productores de metalo- β -lactamasas.

Finalmente, se caracterizaron los 198 aislamientos mediante la técnica de RAPD (Madriz-Garita, 2007) para poder establecer relación clonal principalmente en aquellos microorganismos con los determinantes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*. Puesto que todos los miembros de un clon descienden de un único individuo, se espera que los miembros de esa cepa compartan más características entre sí que con otras cepas. Si ocurre transferencia horizontal de genes, las especies dejarán de ser clonales y las características de un miembro ya no predecirán las características de los otros (Dale y Park, 2004). Al realizar el análisis genético con el software GelCompar II, se logró identificar grupos de cepas que comparten el 80% o más de similitud genética, lo que sugiere su característica clonal. A pesar de la variabilidad entre los clones de *P. aeruginosa* (9 grupos primarios y 20 grupos secundarios), cuando estos datos se comparan con la presencia metalo-β-lactamasas se logra apreciar situaciones muy interesantes. Setenta y uno (81.6%) de los 87 aislamientos distribuidos en los grupos primarios portan los genes codificantes de MBLs. En el grupo I (9/12), grupo II (11/12), grupo III (8/8), grupo V (7/7), grupo VI (8/8), grupo VII (9/13), grupo VIII (12/12) y en el grupo IX (8/9) aislamientos son productores de MBLs. El grupo IV refleja un clon completamente diferente a los otros. En este caso se puede apreciar que contrario a los demás grupos, todos los aislamientos de este grupo son susceptibles al imipenem y no muestran evidencia fenotípica y/o genotípica de la presencia de MBLs.

Los grupos secundarios estaban representados por 45 aislamientos de los cuales 14 (31.1%) presentaron MBLs. Otros aislamientos productores de metalo-β-lactamasas no pudieron ser tipificados por RAPD o bien no mostraron relación clonal (cut-off ≤80%). Este aspecto, unido al hecho de que algunos aislamientos solo presentan un determinante de resistencia (*bla_{IMP}*), podría sugerir que los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* son el resultado del intercambio genético entre diferentes clones. Una hipótesis para explicar esto podría ser que ambos genes se encontraban en clones diferentes dentro del mismo hospital, o bien un clon pudo provenir de otro centro hospitalario y con la presión selectiva ejercida por los carbapenemes se seleccionó por aquellos miembros que por transferencia horizontal de genes adquirieron los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*. Puesto que la mayoría de los genes codificantes de metalo-β-lactamasas se localizan frecuentemente en integrones de clase

1 asociados a plásmidos, esto pudo haber facilitado la transferencia horizontal por conjugación. Esta transferencia no solo resultó en la resistencia al β -lactámico, sino que también puede producir multi-resistencia si el plásmido presenta múltiples genes de resistencia. No obstante, se podría especular que los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* están localizados en integrones inusuales como los así llamados, integrones de clase 1 complejos (elementos ISCR) (Toleman *et al.*, 2006a). Los elementos ISCR son responsables de la movilidad y diseminación de muchos genes de resistencia a antibióticos, incluyendo genes codificantes de MBLs. En Brasil, Italia, Alemania y Grecia ya se han descrito aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* con los genes *bla_{IMP}* o *bla_{VIM}* contenidos en elementos ISCR (Toleman *et al.*, 2006a), razón tal que hace pensar que puesto que no se encontraron dichos genes en los integrones de clase 1, su localización podría ser en elementos ISCR. La diseminación de plásmidos con estos elementos podría explicar la amplia distribución de los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* en los aislamientos imipenem-resistentes, sin embargo, otros estudios son requeridos para confirmar esta hipótesis.

8. CONCLUSIONES

La resistencia a carbapenemes en los aislamientos de *P. aeruginosa* analizados en este trabajo se debe principalmente a genes que codifican para metalo- β -lactamasas. La combinación con otros mecanismos como las bombas de eflujo, impermeabilidad de membrana y β -lactamasas podría influir en el fenotipo de resistencia.

Uno de los hallazgos más relevantes de la presente investigación fue la presencia de dos genes diferentes, *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*, en la mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes y que ambos genes no están, aparentemente, asociados a integrones de clase 1.

La detección de dichas MBLs fue mayor en los aislamientos multirresistentes, en especial en aquellos con resistencia a imipenem, meropenem, ceftazidima, amikacina, gentamicina y fluoroquinolonas. La alta correlación observada entre los aislamientos productores de metalo- β -lactamasas y la resistencia a imipenem y ceftazidima sugiere monitorear por MBLs solo a los aislamientos de *P. aeruginosa* que presenten resistencia a ambos antibióticos.

Debido a las inconsistencias en las pruebas de susceptibilidad para piperacilina/tazobactam, este antibiótico debería utilizarse únicamente cuando las CMI's sean lo suficientemente bajas con el fin de prevenir fallas terapéuticas por falsa sensibilidad.

Se propone evaluar el uso de colistina en estudios posteriores, puesto que según nuestros resultados ninguno de los antimicrobianos ensayados podría utilizarse empíricamente para tratar infecciones por este tipo de microorganismos.

Con estos datos y los obtenidos por la técnica de RAPD aplicada por Madriz-Garita (2007), se puso en evidencia el probable origen de los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* en los aislamientos analizados.

Finalmente, tomando en cuenta que los genes de MBLs no se encontraron en integrones de clase 1, este trabajo abre un espacio para que otras investigaciones diluciden la localización de los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*, y la(s) variante(s) circulantes en el Hospital México.

9. REFERENCIAS

- 1) Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., Goto, M. (2000) Convenient test for screening metallo- β -lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38:40-43.
- 2) Bellais, S., Poirel, L., Leotard, S., Naas, T., Nordmann, P. (2000) Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- β -Lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3028-3034
- 3) Bonomo, R.A., Szabo, D. (2006) Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 43:S49-56.
- 4) Boschi, L., Mercuri, P.S., Riccio, M.L., Amicosante, G., Galleni, M., Frère, J.M., Rossolini, G.M. (2000) The *Legionella (Fluoribacter) gormanii* metallo- β -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1538-1543.
- 5) Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. (1995) A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211-1233.
- 6) Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt F.J., Walsh, T.R. (2004) Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4654-4661.
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2007) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, PA:USA.
- 8) Collis, C.M., Hall, R.M. (1992) Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* 174:1574-1585.
- 9) Collis, C.M., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H.W., Hall, R.M. (1993) Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol. Microbiol.* 9:41-52.

- 10) Collis, C.M., Hall, R.M. (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:155-162.
- 11) Conejo, M.C., García, I., Martínez-Martínez, L., Picabea, L., Pascual, A. (2003) Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2313-2315.
- 12) Dale, J.W., Park, S.F. (2004) Molecular genetics of bacteria, 4th edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- 13) Driscoll, J.A., Brody, S.L., Kollef, M.H. (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 67:351-368.
- 14) Dzidic, S., Bedeković, V. (2003) Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin.* 24:519-526.
- 15) Fluit, A.C., Schmitz, F.J. (1999) Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18:761-770.
- 16) Fluit, A.C., Visser, M.R., Schmitz, F.-J. (2001) Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:836-871.
- 17) Franklin, C., Liolios, L., Peleg, A.Y. (2006) Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 49:3139-3144.
- 18) Fukigai, S., Alba, J., Kimura, S., Iida, T., Nishikura, N., Ishii, Y., Yamaguchi, K. (2007) Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29:306-310.
- 19) Fung-Tomc, J., Huczko, E., Banville, J., Menard, M., Kolek, B., Gradelski, E., Kessler, R.E., Bonner, D. (1995) Structure activity relationships of carbapenems that determine their dependence on porin protein D2 for activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:394-399.
- 20) Galani, I., Rekatsina, P.D., Hatzaki, D., Plachouras, D., Souli, M., Giamarellou, H. (2008) Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo- β -lactamase production in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:548-553.

- 21) Georgopapadakou, N.H. (1993) Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2045-2053.
- 22) Gibb, A.P., Tribuddharat, C., Moore, R.A., Louie, T.J., Krulicki, W., Livermore, D., Palepou, M., Woodford, N. 2002. Nosocomial outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:255-258.
- 23) Giske, C.G. (2007) Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. (Tesis) Karolinska Institutet.
- 24) Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M., Nishino, T. (1998) Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in Δ *mexA-mexB-oprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1938-1943.
- 25) Gu, B., Tong, M., Zaho, W., Liu, G., Ning, M., Pan, S., Zhao, W. (2007) Prevalence and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *J. Clin. Microbiol.* 45:241-243.
- 26) Hakenbeck, R., Coyette, J. (1998) Resistant penicillin-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:332-340.
- 27) Hall, R.M., Brookes, D.E., Stokes, H.W. (1991) Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* 5:1941-1959.
- 28) Helfand, M.S., Bonomo, R.A. (2003) β -lactamases: a survey of protein diversity. *Curr. Drugs Targets. Infect. Disord.* 3:9-23.
- 29) Hooper, D.C. (2005) Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologist. *Clin. Infect. Dis.* 40:1811-1817.
- 30) Hosseini-Jazani, N., Abdi-ali, A. (2006) Role of *orfD* *Pseudomonas aeruginosa* H103 gen in glucose uptake. *J. Kerman University Med. Sci.* 13:230-239.

- 31) Houang, E.T., Chu, Y.W., Lo, W.S., Chu, K.Y., Cheng, A.F. (2003) Epidemiology of rifampicin ADP- ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo- β -lactamases (*bla_{IMP-4}*) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strain isolated from blood culture in 1997 to 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1382-1390.
- 32) Huang, Y.T., Chang, S.C., Lauderdale, T.L., Yang, A.J., Wang, J.T. (2007) Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo- β -lactamase genes in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.009.
- 33) Iyobe, S., Watanabe, M., Mitsunashi, S., Inoue, M. (1999) Estimation of the outer membrane permeability of carbapenem antibiotics to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infection and Chemother.* 5:168-170.
- 34) Jones, M.E., Peters, E., Weersink, A., Fluit, A., Verhoef, J. (1997) Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet.* 349:1742-1743.
- 35) Jones, R.N., Biedenbach, D.J., Sader, H.S., Fritsche, T.R., Toleman, R.W. (2005) Emerging epidemic of metallo- β -lactamase-mediated resistances. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51:77-84.
- 36) Juretschko, S., LaBombardi, V.J., Lerner, S.A., Schreckenberger, P.C., *Pseudomonas* AST study group. (2007) Accuracies of β -lactam susceptibility test results with *Pseudomonas aeruginosa* with four automated systems (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek, and Vitek 2). *J. Clin. Microbiol.* 45:1339-1342.
- 37) Karlowsky, J.A., Weaver, M.K., Thornsberry, C., Dowzicky, M.J., Jones, M.E., Sahm, D.F. (2003) Comparison of four antimicrobial susceptibility testing methods to determine the in vitro activities of piperacillin and piperacillin-tazobactam against clinical isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 41:3339-3343.
- 38) Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Epp, S.F., Pechere, J-D. (1999) Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contribution of OprD and efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:424-427.

- 39) Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G.M. (1999) Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1584-1590.
- 40) Lee, K., Lim, Y.S., Yong, D., Yum, J.H., Chong, Y. (2003) Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin Microbiol.* 41:4623-4629.
- 41) Lee, K., Yum, J.H., Yong, D., Lee, H.M., Kim, H.D., Docquier, J.D., Rossolini, G.M., Chong, Y. (2005) Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4485-4491.
- 42) Levesque, C., Piche, L., Larose, C., Roy, P.H. (1995) PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185-191.
- 43) Li, X-Z., Nikaido, H. (2004) Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 64:159-204.
- 44) Liu, S.Y., Lin, J.Y., Chu, C., Su, L.H., Lin, T.Y., Chiu, C.H. (2006) Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27:81-84.
- 45) Lim, H.M., Pène, J.J., Shaw, R.W. (1988) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. *J. Bacteriol.* 170:2873-2878.
- 46) Livermore, D. (1992) Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2046-2048.
- 47) Livermore, D. (1995) β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557-584.
- 48) Livermore, D., Sefton, A.M., Scott, G.M. (2003) Properties and potential of ertapenem. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:331-344.
- 49) Livermore, D., Woodford, N. (2006) The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 14:412-419.

- 50) Madriz-Garita, V. (2007) Caracterización molecular de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas a partir de pacientes del Hospital México. Trabajo Final de Graduación, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- 51) Mahon, C., Lehman, D., Manuselis, G. (2007) Diagnostic microbiology, 3rd edition. USA: W.B. Saunders Company.
- 52) Malouin, F., Bryan, L.E. (1986) Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:1-5.
- 53) Martínez-Freijo, P., Fluit, A., Schmitz, F., Verhoef, J., Jones, M. (1999) Many class 1 integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:686-689.
- 54) Massidda, O., Rossolini, G.M., Satta, G. (1991) The *Aeromonas hydrophila cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J. Bacteriol.* 173:4611-4617.
- 55) Massova, I., Mobashery, S. (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding-protein and β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1-17.
- 56) Masuda, N., Ohya, S. (1992) Cross-resistance to meropenem, cephems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1847-1851.
- 57) Masuda, N., Gotoh, N., Ohya, S., Nishino, T. (1996) Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:909-913.
- 58) Mazzariol, A., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Lo Cascio, G., Koncan, R., Fontana, R. (2008) Performance of Vitek 2 in antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with different mechanisms of β -lactam resistance. *J. Clin. Microbiol.* 46:2095-2098.
- 59) Mendes, R.E., Toleman, M.A., Ribeiro, J., Sader, H.S., Jones, R.N., Walsh, T.R. (2004) Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, and a fused from a aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4693-4702.

- 60) Mendes, R., Castanheira, M., Campos, A.C., Gales, A.C. (2006) Metallo- β -lactamases. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42:103-113.
- 61) Mendes, R., Kiyota, K., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S., Gales, A., Pignatari, A., Tufik, S. (2007) Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45:544-547.
- 62) Middlemiss, J.K., Poole, K. (2004) Differential impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 186:1258-1269.
- 63) Moellering, R.C., Eliopoulos, C., Sentochnik, D.E. (1989) The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 24:1-7.
- 64) Murphy, T.A., Simm, A.M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Walsh, T.R. (2003) Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:582-587.
- 65) Murray, P., Kobayashi, G., Pfaller, M., Rosenthal, K. (1999) *Microbiología médica*. 2ª edición: pp. 253-259.
- 66) Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P. (1999) Molecular characterization of In51, a class 1 integron containing a novel aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette, *aadA6*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1489:445-451.
- 67) Nakae, T., Nakajima, A., Ono, T., Saito, K., Yoneyama, H. (1999) Resistance to β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1301-1303.
- 68) Nikaido, H. (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1831-1836.
- 69) Nordmann, P., Poirel, L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8:321-331.
- 70) Normark, B.H., Normark, S. (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252:91-106.

- 71) Ochs, M.M., McCusker, M.P., Bains, M., Hancock, R.E. (1999) Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1085-1090.
- 72) Piddock, L. (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:382-402.
- 73) Pitout, J.D., Chow, B.L., Gregson, D.B., Laupland, K.B., Elsayed, S., Church, D.L. (2007) Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary health region: emergence of VIM-2 producing isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45:294-298.
- 74) Ploy, M.C., Courvalin, P., Lambert, T. (1998) Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2557-2563.
- 75) Poirel, L., Nordmann, P. (2005) Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Med. Chem. Rev.* 2:183-195.
- 76) Poole, K. (2004) Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:2200-2223.
- 77) Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., Landman, D. (2006) Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1633-1641.
- 78) Recchia, G.D., Hall, R.M. (1997) Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* 5:389-394.
- 79) Riccio, M.L., Palecchi, L., Fontana, R., Rossolini, G.M. (2001) In70 of plasmid pAX22, a *bla*_{VIM-1} containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1249-1253.
- 80) Riley, L.W. (2004) Molecular epidemiology of infectious diseases: principles and practices. ASM Press, Washington.
- 81) Rosser, S., Young, H. (1999) Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:11-18.

- 82) Rossolini, G. M., Condemni, M.A., Pantanella, F., Docquier, J.D., Amicosante, G., Thaller, M.C. (2001) Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:837-844.
- 83) Rozen, S., Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132:365-386.
- 84) Ruiz, J. (2003) Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:1109-1117.
- 85) Sader, H.S., Fritsche, T.R., Jones, R.N. (2006) Accuracy of three automated systems (MicroScan WalkAway, VITEK, and VITEK2) for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five broad-spectrum beta-lactam agents. *J. Clin. Microbiol.* 44:1101-1104.
- 86) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 87) Sandeep, T., Ochs, M.M., Hancock, R.E. (2006) Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188:45-54.
- 88) Sevillano, E., Valderrey, C., Canduela, M.J., Umanan, A., Calvo, F. (2006) Resistance to antibiotics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathol. Biol.* 54:493-497.
- 89) Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., Arakawa, Y. (2003) PCR typing of genetics determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 41:5407-5413.
- 90) Speijer, H., Savelkoul, P., Bonten, M. (1999) Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 37:3654-3661.
- 91) Spratt, B.G. (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science.* 264:388-393.
- 92) Srikumar, R., Li, X-Z., Poole, K. (1997) Inner membrane efflux components are responsible for β -lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179:7875-7881.

- 93) Stokes, H.W., Hall, R.M. (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3:1669-1683.
- 94) Stokes, H.W., Tomaras, C., Parsons, Y., Hall, R.M. (1993) The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO1 have a common origin. *Plasmid.* 30:39-50.
- 95) Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrener, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalik, D., Lagrou, M., Garber, R., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L., Coulter, S., Folger, K., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G., Wu, Z., Paulsen, I., Reizer, J., Saier, M., Hancock, R., Lory, S., Olson, M. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 406:959-964.
- 96) Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Puehler, A., Schlueter, A. (2003) Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:239-252.
- 97) Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R.N., Walsh, T.R. (2002) Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:673-679.
- 98) Toleman, M.A., Biedenbach, D., Bennett, D., Jones, R.N., Walsh, T.R. (2003) Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-13} harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report for the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:583-590.
- 99) Toleman, M.A., Biedenbach, D., Bennet, D.M., Jones, R.N., Walsh, T.R. (2004) Italian metallo- β -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* DOI: 10.1093/jac/dkh512.
- 100) Toleman, M.A., Bennett, M.P., Walsh, T.R. (2006a) ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:296-316.

- 101) Toleman, M.A., Bennett, M.P., Walsh, T.R. (2006b) Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:1-6.
- 102) Trias, J., Nikaido, H. (1990) Outer membrane protein D2 catalyzes facilitates diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:52-57.
- 103) Walsh, T.R., Hall, L., Assinder, S.J., Nichols, W.W., Cartwright, S.J., MacGowan, A.P., Bennett, P.M. (1994) Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta.* 1218:199-201.
- 104) Walsh, T.R., Bolmström, A., Qwörnström, A., Gales, A. (2002) Evaluation of a new E-test for detecting metallo-β-lactamases in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol.* 40:2755-2759.
- 105) Walsh, T.R. (2005) The emergence and implications of metallo-β-lactamases in gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:2-9.
- 106) Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P. (2005) Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18:306-325.
- 107) Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsunashi, S. (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:147-151.
- 108) Weber, D., Raasch, R., Rutala, W. (1999) Nosocomial infections in the ICU. The growing importance of antibiotic-resistant pathogens. *Chest.* 115:34-41.
- 109) Woodford, N., Palepou, M.F., Babini, G.S., Holmes, B., Livermore, D.M. (2000) Carbapenemases of *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*: distribution of *bla_B* and characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla_{B3}*, in the type strain, NCTC 10016. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1448-1452.
- 110) Yan, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Wu, H.M., Wu, J.J. (2001) Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla_{IMP-8}* in a university medical center in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 39:4433-4439.

- 111) Yan, J.J., Wu, J.J., Tsai, S.H., Chuang, C.L. (2004) Comparison of the double-disk, combined-disk, and E-test method for detecting metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Diagn. Microbiol. Inf. Dis.* 49:5-11
- 112) Yan, J.J., Hsueh, P.R., Lu, J.J., Chang, F.Y., Ko, W.C., Wu, J.J. (2006) Characterization of acquired beta-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:530-536.
- 113) Yano, H., Kuga, A., Okamoto, R., Kitasato, H., Kobayashi, T., Inoue, M. (2001) Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5:1343-1348.
- 114) Yong, D., Lee, K., Yum, J.H., Shin, H.B., Rossolini, G.M., Chong, Y. (2002) Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 40:3798-3801
- 115) Yu, Y.S., Qu, T.T., Zhou, J.Y., Wang, J., Li, H.Y., Walsh, T.R. (2006) Integrons containing the VIM-2 metallo- β -lactamase gene among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain from different Chinese hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 44:4242-4245.