

Presencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem

Alfonso Pérez I^{1a}, Patricia García C², Helena Poggi M^{3b}, Stephanie Braun J⁴, Claudia Castillo V^{3c}, Juan Carlos Román^{3c}, Marcela Lagos², Eliana Romeo O^{3c}, Lorena Porte T⁴, Jaime Labarca L⁵, Gerardo González R^{6d}.

*Presence of metallo β -lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa**

Background: Metallo- β -lactamases (MBL) confer high resistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* (Psaе). They are encoded in mobile elements of different genes (VIM, IMP, SMP, GIM), along with other resistance genes. **Aim:** To detect the presence of MBL in imipenem resistant Psaе strains. **Material and methods:** Fifty-nine imipenem resistant Psaе strains isolated from January 2004 to August 2005 in a University Clinical Hospital, were included. The presence of MBL was studied by Etest (phenotypic) and genotypic polymerase chain reaction (PCR) methods. To rule out a nosocomial outbreak, MBL positive strains, were studied by pulse field gel electrophoresis. **Results:** The presence of MBL was detected in eleven strains. All were type VIM and were not clonally related. There was no concordance between phenotypic and genotypic MBL detecting methods. All the strains were also multiresistant. **Conclusions:** The presence of MBL was detected in 19% of imipenem resistant Psaе strains (Rev Méd Chile 2008; 136: 423-32).

(Key words: Beta-Lactamases; Imipenem; *Pseudomonas aeruginosa*)

Recibido el 25 de junio, 2007. Aceptado el 12 de octubre, 2007.

Fuente financiamiento: Proyectos de Investigación Unidad Docente Asociada 2005, PUC

¹Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. ²Departamento de Laboratorios Clínicos. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. ³Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Laboratorios Clínicos. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. ⁴Laboratorio de Microbiología. Hospital Militar. Santiago de Chile. ⁵Departamento de Medicina Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. ⁶Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

^aLicenciado en Medicina

^bBioquímico

^cTecnólogo médico

^dLic. Biología, PhD. Ciencias biológicas

Correspondencia a: Dra. Patricia García. Laboratorio de Microbiología, Centro Médico San Joaquín. Av. Vicuña Mackenna 4686, Macul, Santiago de Chile. Fono: 56-2-354-8576. Fax: 56-2-354-8571. E mail: pgarcia@med.puc.cl

Pseudomonas aeruginosa es uno de los principales agentes aislados de infecciones intrahospitalarias, entre ellas, neumonía asociada a ventilación mecánica, infecciones urinarias, de piel y partes blandas. Según diversos estudios realizados en Latinoamérica bajo el Programa de Vigilancia de Susceptibilidad Antimicrobiana SENTRY¹⁻⁴, corresponde al 5º agente más frecuentemente aislado en bacteriemias.

En los últimos años se ha observado un aumento de la prevalencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, las que a su vez presentan resistencia múltiple a otros antibióticos⁵.

Datos chilenos provenientes de diversos estudios^{1,4,6,7} describen tasas de resistencia a carbapenémicos que varían entre 3% y 25%. En un estudio reciente realizado en Santiago, en 2004, en los hospitales Militar y Clínico de la Universidad Católica de Chile, se encontró 17% de resistencia a imipenem en 338 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*⁸.

En la Red Nacional de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos, entre los años 2004 y 2005, en 11 hospitales de Chile, se vigilaron infecciones invasoras e infecciones respiratorias bajas, correspondiendo *P aeruginosa* a 15% de los aislados intrahospitalarios. En estos aislados, la susceptibilidad a imipenem alcanzó 80% (Red de Resistencia, II Curso de Resistencia Bacteriana, 2005, Santa Cruz, Chile, datos no publicados).

La resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a carbapenémicos puede ser explicada por diversos mecanismos:

1. Producción de metalo β -lactamasas (MBLs).
2. Excreción del antibiótico mediante sobreexpresión de bombas de eflujo (MexAB-OprM) comprometiéndose en este caso, la sensibilidad a meropenem más que imipenem y la de otros antibióticos no carbapenémicos (fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas).
3. Alteraciones de la porina OprD que confiere impermeabilidad a carbapenémicos, generando resistencia a imipenem y susceptibilidad disminuida a meropenem.

Las MBLs tienen un amplio espectro hidrolítico, inactivando a todos los beta-lactámicos, incluso, los carbapenémicos y exceptuando el aztreonam. Son muy eficientes sobre imipenem, aumentando las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) a más de 32 ug/ml. Sin embargo, su acción hidrolítica es

dependiente de zinc (Zn^{+2}), por lo que quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) las inhiben, disminuyendo las CIM⁹⁻¹¹.

Se han descrito cuatro tipos de MBLs clínicamente relevantes: IMP, SMP, GIM y VIM. La mayoría de ellas han sido reportadas en Europa y Asia, encontrándose también algunas subclases de VIM en Estados Unidos de Norteamérica¹¹⁻¹³. En Latinoamérica no habían sido descritas hasta 2003, fecha en que se identificó el gen *bla*_{VIM-2} codificante para la MBL VIM-2, en 1 cepa de *Pseudomonas fluorescens* de Chile y 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de Venezuela resistentes a imipenem¹⁴.

La resistencia de *P aeruginosa* a carbapenémicos por este mecanismo ha ido en aumento, llegando a ser responsable de hasta 40%, con una amplia diseminación a nivel mundial. Desde el punto de vista clínico esto es importante, ya que muchas de estas son multiresistentes con limitadas alternativas terapéuticas (como polimixina B y colistin) y desde el punto de vista epidemiológico pueden manifestarse como brotes nosocomiales^{11,15,16}.

Dado que no se tenía información sobre MBLs en Chile desde su descripción en 2003, los objetivos de este estudio fueron detectar la presencia y la frecuencia de MBLs en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a imipenem en un hospital universitario, así como también determinar si los perfiles de resistencia en cepas portadoras de MBLs difieren del que presentan las cepas resistentes por otros mecanismos (no MBL).

MATERIAL Y MÉTODO

Selección de cepas. Entre enero de 2004 y agosto de 2005 se aislaron en forma sucesiva 834 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de muestras clínicas procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile en Santiago. Se encontró que de las 834 cepas de *P aeruginosa*, 128 (15,3%) fueron resistentes a imipenem por método de dilución en agar. En todas las cepas se confirmó la resistencia por un método alternativo (Etest®). Las cepas fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis. De las 128, sólo 65 estuvieron disponibles para estudio. De éstas, se analizaron 59 cepas, por ser consideradas eventos infecciosos independien-

tes (muestras provenientes de distinto sitio de aislamiento, con un intervalo mayor a una semana) correspondientes a 51 pacientes.

Detección de MBLs. a) Método genotípico: reacción en cadena de la polimerasa (RPC). En las 59 cepas seleccionadas se estudió la presencia de MBLs por RPC con dos parejas de partidores comunes para los distintos tipos del gen *bla*_{VIM} (Pareja A: VIM S: 5'-CCGATGGTGTGGTTCGCAT- 3' y VIM AS: 5'-GAATGCGCAGCACCAGGAT-3', amplificando un fragmento de 391 pb; Pareja B: VIM-F: 5'-AAAGTTATGCCGCACTCACC-3' y VIM-R 5'-TGCAACTTCATGTTATGCCG-3', fragmento amplificado de 864 pb) y una pareja de partidores, común para los distintos tipos del gen *bla*_{IMP} (IMP S: AAAGTACTGAAAAGTTAGT e IMP AS: TCYCCAAYTTCACRTGACT, tamaño del fragmento amplificado: 446 pb)^{14,17}. Se usaron como controles positivos las cepas *Pseudomonas fluorescens* 43-14926 y *Serratia marcescens* AK9373 portadoras de VIM e IMP, respectivamente^{14,18}.

b) Método fenotípico: Se buscó la presencia de MBLs por Etest MBL de AB-Biodisk® (test de sinergia imipenem-EDTA). Se consideró el test positivo cuando la relación entre CIM de imipenem/imipenem + EDTA fue mayor o igual a 8 (según recomendación del fabricante).

Análisis de clonalidad. En las cepas con resultados positivos para MBLs se evaluó clonalidad por electroforesis en gel de campo pulsado según lo descrito por Maslow y Lutsky¹⁹ interpretada según los criterios de Tenover et al²⁰. Además, fueron estudiadas por RAPD (sigla en inglés para *Randomly amplified polymorphic DNA*) con el partidor ERIC 2 (5': AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG)²¹.

Resistencia a antibióticos. Se evaluó la resistencia por el método de dilución en agar²² para 5 antibióticos: una cefalosporina con actividad anti-pseudomónica (ceftazidima), una fluoroquinolona (ciprofloxacino), un aminoglicósido (amikacina), un betalactámico asociado a un inhibidor de betalactamasas (cefoperazona/sulbactam) y otro carbenémico (meropenem).

Se utilizaron los puntos de corte descritos por CLSI²³ excepto para cefoperazona/sulbactam, en el que se usó el punto de corte descrito por Jones et al²⁴.

Se consideraron multirresistentes a aquellas cepas que además de presentar resistencia a imipenem, mostraron susceptibilidad disminuida a otro de los antimicrobianos probados²⁵.

Se estudió la susceptibilidad a colistin por 2 métodos alternativos: difusión en agar (discos de 10 ug; BBL) y Etest AB-Biodisk®. Se utilizaron los puntos de corte recomendados por el fabricante: sensible ≤ 4 ug/ml, resistente ≥ 8 ug/ml²⁶.

Estadística. El análisis estadístico se realizó con el *software* Medcalc versión 4.16e. La comparación de concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) a imipenem y la relación imipenem/ imipenem - EDTA entre cepas *bla*_{vim} positivas y negativas se realizó por el test de Wilcoxon para muestras independientes. En estos grupos, también se analizó la susceptibilidad a antibióticos por el Test Chi-cuadrado. La multirresistencia fue evaluada por T-test. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

De las 59 cepas estudiadas, 47 (80%) correspondían a pacientes hospitalizados y 12 (20%) a pacientes ambulatorios, de estos últimos, ninguno tenía el antecedente de hospitalizaciones previas en nuestro hospital. El promedio de edad fue de 53 años (rango: 16 días a 95 años) y 40 de los pacientes (67,8%) eran de sexo masculino. El origen clínico de las cepas fue en su mayoría muestras respiratorias: lavado bronquioalveolar: 7, aspirado endotraqueal: 11, expectoración: 17, hemocultivos: 3, cultivo de punta de catéter: 1, urocultivos: 11 y otras: 9.

1. Detección de MBLs

Método genotípico: RPC. Por este método se encontraron 11 cepas portadoras del *bla*_{VIM} (18,6%) (Figura 1). Ambas parejas de partidores (VIM S-AS y VIM F-R) fueron igualmente efectivas en detectar el gen *bla*_{VIM}, en las mismas portadoras. No se encontraron cepas portadoras del gen *bla*_{IMP} (Figura 2).

Las once cepas positivas para el gen *bla*_{VIM} fueron aisladas de 10 pacientes. Dos eran ambulatorios y las nueve restantes de pacientes hospitalizados en siete servicios diferentes. Dos cepas

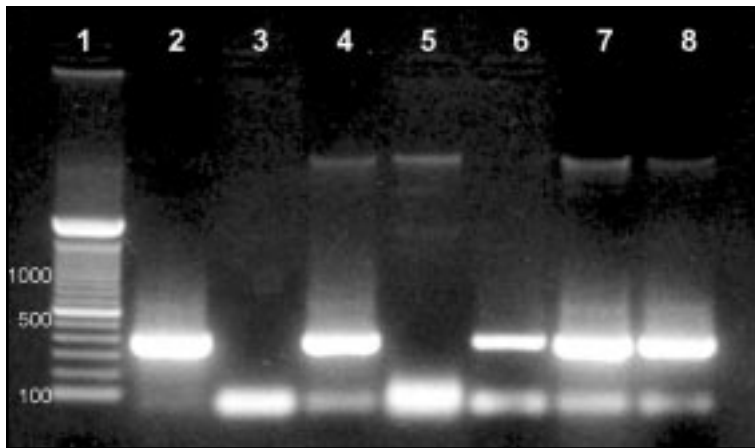


Figura 1. RPC *bla*_{VIM} con pareja de partidores VIM S-AS. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control positivo (*Pseudomonas fluorescens* 43-14926), carril 3: control negativo, carriles 4 a 8: cepas estudiadas. En los carriles 2, 4, 6, 7 y 8 se observa una banda correspondiente al fragmento de 391 pb del gen *bla*_{VIM}.

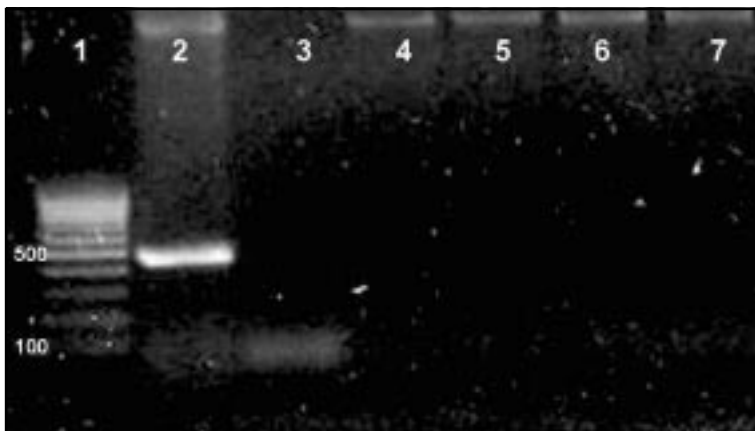


Figura 2. PCR *bla*_{IMP} con pareja de partidores IMP S e IMP AS. En carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control positivo (*Serratia marcescens* AK9373), carril 3: control negativo, carriles 4 a 7: cepas estudiadas. En el carril 2 se observa una banda correspondiente al fragmento de 446 pb del gen *bla*_{IMP}.

correspondieron a un mismo paciente, pero fueron aisladas con un intervalo mayor a un año y en muestras de localizaciones distintas, constituyendo dos eventos independientes.

Método fenotípico: Etest. En 49 de las 59 cepas estudiadas (83,1%), el test fenotípico resultó positivo (relación CIM imipenem/CIM imipenem-EDTA mayor o igual a ocho veces). Todas las cepas positivas para el gen *bla*_{VIM} por RPC lo fueron por Etest. Por otra parte, 38 de 48 (79,2%) de las cepas negativas por RPC resultaron positivas por método fenotípico. De acuerdo con esto,

la concordancia entre ambos métodos fue de 35,6% (21 cepas) (Tabla 1).

No se encontró asociación entre la presencia del gen *bla*_{VIM} y las CIMs a imipenem, pero la relación CIM imipenem/ CIM imipenem-EDTA en cepas portadoras de *bla*_{VIM} fue significativamente superior (Tabla 2).

2. Análisis de clonalidad y patrones de susceptibilidad en cepas portadoras del gen *bla*_{VIM}

Las once cepas positivas para el gen *bla*_{VIM} no mostraron relación clonal entre ellas, tanto en la

Tabla 1. Comparación de método fenotípico (Etest) con método genotípico (RPC)

Test Fenotípico (relación IP / IP-EDTA \geq 8)	Test Genotípico (RPC)	Test +	Test -	Total
Test +		11	38	49
Test -		0	10	10
Total		11	48	59

Etest se considera positivo para MBLs cuando la relación entre CIM de imipenem/imipenem –EDTA (IP/IP-EDTA) es mayor o igual a 8.

Tabla 2. CIM de imipenem y relación imipenem/imipenem-EDTA, según resultado de RPC para el gen *bla_{VIM}*

	<i>bla_{VIM}</i> +	<i>bla_{VIM}</i> -
n	11	48
CIM Imipenem		
Mediana	16	16
(intervalo de confianza 95%)	(12,8-256)	(12-16)
Relación IP/IP-EDTA		
Mediana	16	12
(intervalo de confianza 95%)	(12,8-228,8)*	(8-16)

No se observa diferencia significativa entre la CIM de imipenem y la presencia de *bla_{VIM}*. Sin embargo, la relación imipenem/imipenem-EDTA (IP/IP-EDTA) fue significativamente superior en las cepas *bla_{VIM}* positivas por RPC. * $p=0,0105$ vs *bla_{VIM}* - (test Wilcoxon para muestras independientes).

electroforesis en gel de campo pulsado, como en RAPD (con partidores ERIC2) (Figuras 3 y 4).

La susceptibilidad para amikacina, ceftazidima, ciprofloxacino, y la combinación cefoperazona/sulbactam fue menor en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* positivas para el gen *bla_{VIM}*,

siendo la diferencia significativa sólo para cefoperazona/sulbactam. En el caso de meropenem y aztreonam se observó un mayor porcentaje de cepas susceptibles en aquellas cepas portadoras de *bla_{VIM}*, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 5).

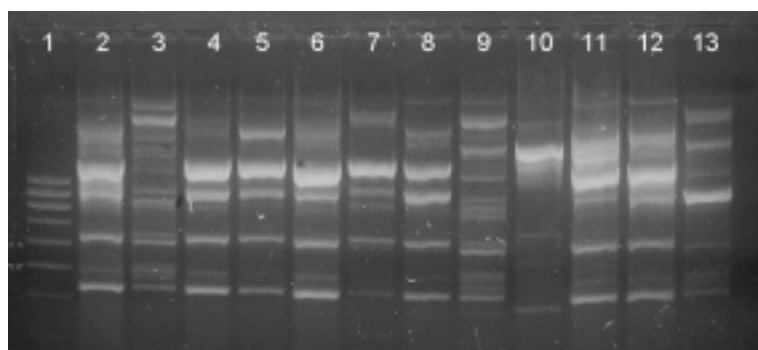


Figura 3. RAPD (partidor ERIC-2) en cepas *bla_{VIM}* positivas. Carril 1 marcador de peso molecular, carriles 2-10, 12, 13: cepas de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras del gen *bla_{VIM}*. No se observaron cepas relacionadas. Carril nº 6 cepa MR-4, proveniente del Hospital Militar de Santiago y carril nº 11 corresponde a *Pseudomonas putida* OA 6820015 no incluidas en el análisis.

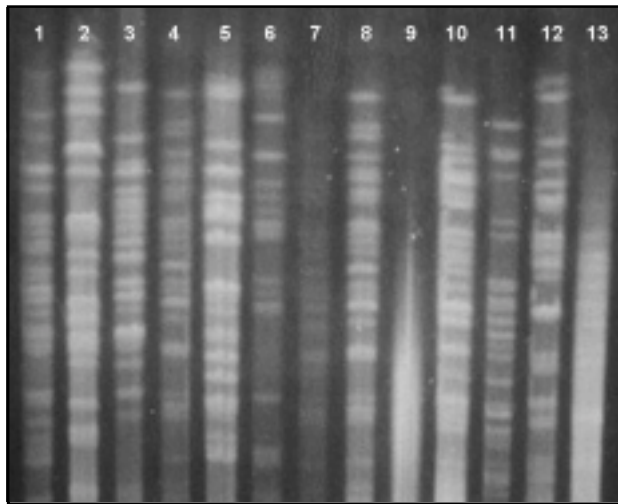


Figura 4: Electroforesis en gel de campo pulsado en cepas *bla*_{VIM} positivas. Carriles 1-10,12: cepas portadoras del gen *bla*_{VIM}, 13 cepa ATCC. Carril 11 *Pseudomonas putida* OA 6820015 y carril 12 cepa MR-4, proveniente del Hospital Militar de Santiago no incluidas en el análisis. No se observan cepas relacionadas.

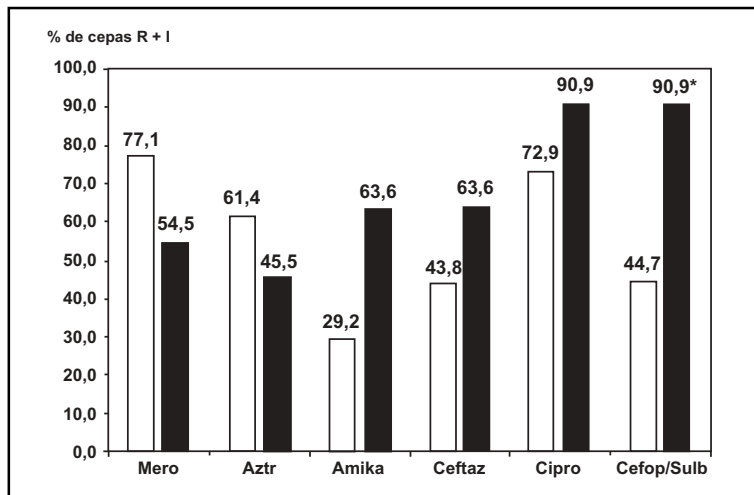


Figura 5: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem: susceptibilidad disminuida a otros antibióticos en cepas *bla*_{VIM} negativas y positivas. Porcentaje de cepas con susceptibilidad disminuida (resistentes (R) y con resistencia intermedia (I)) a meropenem (Mero), aztreonam (Aztr), amikacina (Amika), ceftazidima (Ceftaz), ciprofloxacino (Cipro) y cefoperazona/sulbactam (Cefop/Sulb) ■: cepas *bla*_{VIM} +, □: cepas *bla*_{VIM} -. * p =0,0150 vs *bla*_{VIM} - (Test Chi-cuadrado).

Frente a colistin se analizaron cepas *bla*_{VIM} positivas y negativas en conjunto, siendo todas las estudiadas susceptibles por el método de difusión²⁶ y por Etest²⁹.

El análisis de la multiresistencia mostró que las cepas portadoras del gen *bla*_{VIM} fueron en promedio, resistentes a un mayor número de antibióticos que las cepas no portadoras, diferencias estadísticamente significativas (Figura 6).

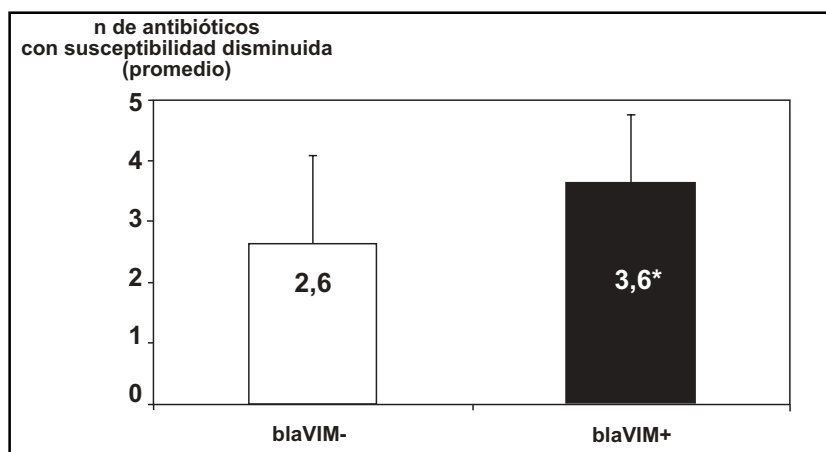


Figura 6: Multirresistencia en *Pseudomonas aeruginosa* bla_{VIM} negativas y positivas: número de antibióticos con susceptibilidad disminuida (promedio). Se estudió la multirresistencia según el número de antibióticos con susceptibilidad disminuida (resistentes o con resistencia intermedia) considerando meropenem, amikacina, ceftazidima, ciprofloxacino y la combinación cefoperazona/sulbactam. Promedio y desviación estándar (barras). * $p=0,0365$ vs bla_{VIM} - (t - Test).

DISCUSIÓN

Si bien las MBLs ya habían sido descritas en *Pseudomonas aeruginosa* en otros países de América Latina^{12,27,28} éste es el primer estudio que demuestra su presencia en Chile. En este estudio, el porcentaje de cepas de *P aeruginosa* resistente a imipenem alcanzó 15,3%; de éstas, 18,6% es mediado por MBLs, siendo todas del tipo VIM. Si bien se estudió solamente la presencia de MBLs tipo VIM e IMP, es poco probable que GIM y SPM sean responsables de la resistencia a imipenem en las cepas bla_{VIM} negativas, ya que sólo han sido descritas en forma endémica en Alemania y Brasil, respectivamente^{12,13}. Si se extrapola el 15,3% de resistencia a imipenem por MBL encontrado en nuestro estudio, al total de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas, 3% de *P aeruginosa* sería resistente a imipenem por este mecanismo.

La resistencia a imipenem en aquellas cepas no portadoras de VIM podría ser explicada por mutaciones de la porina Opr-D, la desrepresión del gen de la B-lactamasa AmpC, o la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexAB¹⁰, mecanismos de resistencia no considerados en este trabajo.

En nuestro estudio, el método fenotípico (Etest MBL) fue muy sensible para detectar MBLs, pero

la concordancia entre ambos métodos fue de 35,6%, ya que se observó un alto porcentaje de cepas con test fenotípico positivo y RPC negativo para los genes bla_{VIM} e bla_{IMP} (38 de 48 cepas, 79,2% de falsos positivos). Generalmente, se describe al Etest MBL como un método altamente sensible y específico, con valores para *Pseudomonas aeruginosa* con rangos que van de 87-99% y 91-97,3%, respectivamente²⁹⁻³². Los distintos valores de sensibilidad y especificidad encontrados en este estudio podrían ser explicados por los siguientes fenómenos: se ha observado que el zinc tiene un efecto directo sobre imipenem, favoreciendo su hidrólisis, por lo que quelantes de cationes divalentes como EDTA pueden crear un ambiente favorable para el imipenem y así tener un mayor efecto sobre *P aeruginosa* disminuyendo su CIM, sin ser esta reducción de la CIM producto de la inhibición de una metalo-beta-lactamasa³³. Además, un ambiente rico en zinc tendría un efecto negativo en la porina OprD, disminuyendo su expresión y también la entrada de carbapenémicos desde el espacio extracelular, afectando también la CIM a imipenem³⁴. Por esto, en aquellas cepas fenotípicamente productoras de MBLs por el test de sinergia imipenem-EDTA es recomendable realizar estudios confirmatorios

más específicos como la reacción en cadena de polimerasa.

Es conocido que las MBLs son codificadas en cassettes génicos en integrones de clase 1 (sistemas de recombinación génica en bacterias, en que se ensamblan varios genes detrás de un mismo promotor) en que la resistencia a un antibiótico depende de la posición del cassette con respecto al promotor común del integrón. Así los cassettes ubicados más cerca del promotor tendrán una mayor expresión y por lo tanto mayores niveles de resistencia^{11,35}. Esto podría explicar el amplio rango de CIMs a imipenem encontrado en las cepas productoras de VIM, desde 8 a ≥ 256 ug/ml, hecho previamente descrito por otros autores^{11,36,37}. Otra explicación a esto sería la presencia de distintos subtipos de VIM ya que VIM-1 y VIM-2 muestran distintas velocidades de hidrólisis para imipenem y meropenem¹¹.

Aunque no se encontraron diferencias significativas, se observó un mayor porcentaje de cepas con susceptibilidad disminuida a amikacina en las cepas *bla*_{VIM} positivas. Esto puede deberse a que el cassette génico de VIM puede ir asociado en el integrón a otro cassette portador de aminopeptidasas, generando resistencia a aminoglicósidos¹⁰.

El menor porcentaje de cepas susceptibles a cefoperazona/sulbactam mostrado por las cepas *bla*_{VIM} positivas, concuerda con lo descrito en la literatura, ya que las MBLs no resultan inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam)¹⁰.

Los distintos patrones génicos obtenidos por RADP (ERIC 2) y PFGE encontrados en las cepas positivas para el gen *bla*_{VIM} sugieren que no existió diseminación clonal. La transferencia del

gen *bla*_{VIM} podría efectuarse por medio de elementos móviles de recombinación génica entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no relacionadas. Si bien la presencia del cassette portador del gen *bla*_{VIM} en un integrón no confiere movilidad por sí solo, los integrones sí pueden estar insertos en elementos móviles como plasmidios o transposones¹¹. Se ha descrito que el gen *bla*_{VIM} puede ser transferido a *P aeruginosa*, desde otras especies del género *Pseudomonas*, *Serratia marcescens* o incluso bacterias ambientales no patógenas para el hombre^{10,37}. En 2003 se describió por primera vez en Chile un aislado clínico de *Pseudomonas fluorescens* portadora de VIM-2¹⁴, desde entonces, el gen pudo ser transferido directamente a *Pseudomonas aeruginosa* o a través de otras bacterias ambientales no necesariamente patógenas para el hombre.

Este trabajo describe por primera vez en Chile la presencia de MBLs del tipo VIM en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un centro hospitalario universitario, correspondiendo su frecuencia a 18,6% de las cepas resistentes a imipenem.

Es importante destacar que 2 cepas positivas para el gen *bla*_{VIM} fueron aisladas de pacientes ambulatorios, sin historia de hospitalizaciones previas en nuestro hospital en 5 años. Es de suponer que estos pacientes adquirieron la bacteria portadora del gen en otro centro hospitalario.

La presencia de estas enzimas en otros centros hospitalarios de nuestro país, la determinación de los subtipos, así como la demostración de su incorporación en cassettes génicos dentro de integrones debiera ser objetivo de futuras investigaciones.

REFERENCIAS

- GALES A, SADER H, JONES R. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 301-11.
- GALES A, SADER H, JONES R. SENTRY Participants Group (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 289-99.
- SADER H, JONES R, SILVA J. SENTRY Participants Group (Latin America). Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 281-8.
- SADER H, JONES R, ANDRADE-BAIOCCHI S, BIEDENBACH D. SENTRY Participants Group (Latin America). Four-year evaluation of frequency of occurrence

- and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 273-80.
5. PARAMYTHIOTOU E, LUCET J, TIMSIT J, VANJAK D, PAUGAM-BURTZ C, TROUILLET J ET AL. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 670-7.
 6. TRUCCO O, PRADO V, DURÁN C, GRUPO PRONARES. *Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES: Informe primer semestre 2001*. *Rev Chil Infect* 2002; 19 Suppl 2: S140-8.
 7. ZAMBRANO A, HERRERA N. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. *Rev Chil Infect* 2004; 21: 117-24.
 8. GARCÍA P, CASTILLO C, VILLAGRA N, MELLA G, SALINAS AM, CANALES M, ET AL. Presencia de Metallo β Lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos. CO-44, página 63 Libro de Resúmenes del XXI Congreso Chileno de Infectología. Octubre de 2004. Viña del Mar, Chile.
 9. OKAMOTO K, GOTOH N, NISHINO T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1964-71.
 10. LIVERMORE D. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634-40.
 11. WALSH T, TOLEMAN M, POIREL L, NORDMANN P. Metallo-B-Lactamasas: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.
 12. TOLEMAN M, SIMM A, MURPHY T, GALES A, BIEDENBACH D, JONES R ET AL. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673-9.
 13. CASTANHEIRA M, TOLEMAN M, JONES R, SCHMIDT F, WALSH T. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654-61.
 14. MENDES R, GARCÍA P, GUZMÁN M, TOLEMAN M, WALSH T, JONES R. First Isolation of blaVIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1433-4.
 15. LINDEN P, KUSNE S, COLEY K, FONTES P, KRAMER D, PATERSON D. Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2003; 37: e154-60. Epub 2003 Oct 29.
 16. FRITSCHE T, SADER H, TOLEMAN M, WALSH T, JONES R. Emerging Metallo-B-Lactamase-Mediated Resistance, A Summary Report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 4: S276-8.
 17. YATSUYANAGI J, SAITO S, HARATA S, SUZUKI N, ITO Y, OHTA K, ENOMOTO K. Class 1 Integron Containing Metallo-B-Lactamase Gene bla_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 626-8.
 18. ITO H, ARAKAWA Y, OHSUKA S, WACHAROTAYANKUN R, KATO N, OHTA M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 824-9.
 19. MASLOW J, SLUTSKY A, ARBEIT R. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington, DC: *American Society for Microbiology* 1993: 563-72.
 20. TENOVER F, ARBEIT R, GOERING R, MICKELSEN P, MURRAY B, PERSING D, SWAMINATHAN B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
 21. SPEIJER H, SVELKOUK P, BONTEN M, STOBBERINGH E, TJHIE J. Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3654-61.
 22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility de test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. M7A6, Vol 23 (2): 12.
 23. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. Approved Standards M100-S15, Vol 25 (1).
 24. JONES R, BARRY A, PACKER R, GREGORY W, THORNSBERRY C. *In vitro* antimicrobial spectrum, occurrence

- of synergy, and recommendations for dilution susceptibility testing concentrations of the ceftazidime-sulbactam combination. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1725-9.
25. PATERSON D. The Epidemiological Profile of Infections with Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. *Clin Infect Dis* 2006; 43 Suppl 2: S43-48.
26. FALAGAS M, KASIAKOU S. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1333-41.
27. PASTERAN F, FACCONI D, PETRONI A, RAPOPORT M, GALAS M, VÁZQUEZ M ET AL. Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- β -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 474-5.
28. VILLEGAS M, LOLANS K, OLIVERA M, SUÁREZ J, CORREA A, QUEENAN A ET AL. First Detection of Metallo- β -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654-61.
29. LEE K, YONG D, YUM J, LIM Y, BOLMSTRÖM A, QWÄRNSTRÖM A ET AL. Evaluation of Etest MBL for Detection of bla_{IMP-1} and bla_{VIM-2} Allele-Positive Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 942-4.
30. WALSH T, BOLMSTRÖM A, QWÄRNSTRÖM A, GALES A. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2755-9.
31. PITOUT, J, GREGSON D, POIREL L, McCLURE J, LE P, CHURCH D. Detection *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- β -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3129-35.
32. YAN J, WU J, TSAI S, CHUANG C. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 5-11.
33. BAXTER I, LAMBERT P. The effect of zinc on imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 39: 838-9.
34. CONEJO MC, GARCÍA I, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, PICABEA L, PASCUAL A. Zinc Eluted from Siliconized Latex Urinary Catheters Decreases OprD Expression, Causing Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2313-5.
35. COLLIS C, HALL R. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 155-62.
36. DOCQUIER J, LAMOTTE-BRASSEUR J, GALLEN M, AMICOSANTE G, FRERE J, ROSSOLINI G. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 257-66.
37. NORDMANN P, POIREL L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 321-31.