

Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Assessment of Phenotypic Methods for Metalobetalactamase Detection in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa

**Armino José Perozo Mena¹,
Maribel Josefina Castellano González²,
Tutaya Chávez Kathyuska³,
Eliana Ling Toledo⁴,
Naillet Arraiz⁵**

¹Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital
Universitario de Maracaibo. Dirección Postal: Edificio Ciencia y Salud,
Planta Baja Laboratorio de Bacteriología. aperozomena@cantv.net;
aperozomena@interlink.net.ve.

²Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
maribelcast@interlink.net.ve; maribeljo@cantv.net.

^{3, 4}Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital
Universitario de Maracaibo.

⁵Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Laboratorio de Biología Molecular. Centro de Investigaciones
Endocrino Metabólicas Dr. Feliz Gómez.

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es considerado uno de los patógenos nosocomiales más importantes, siendo común su aislamiento en pacientes de unidades de cuidados intensivos, en quienes además suele presentar multirresistencia, esto limita enormemente las opciones terapéuticas para el tratamiento del paciente, lo que constituye un problema ya que no se disponen de drogas efectivas para el tratamiento. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar cuatro métodos fenotípicos para la detección de metalo-beta-lactamasas (método de sinergia del doble disco con EDTA, méto-

Recibido: 07-10-13 / Aceptado: 21-11-13

do del disco combinado de imipenem y meropenem con EDTA, método de E-Test-MBL y el método de Hodge modificado), con un método de referencia (PCR), para determinar el método fenotípico o combinación de estos que sea más válido y seguro para su implementación en los laboratorios de bacteriología de rutina. La sensibilidad y especificidad de los métodos fenotípicos empleados fue buena (más de 90%), de los métodos empleados, el test de Hodge modificado fue el que proporcionó mejores resultados en la detección de aislados de *P. aeruginosa* productores de MBL (menor tasa de falsos positivos y negativos), al analizar los diferentes métodos combinados para determinar cuál es la asociación con mayor sensibilidad y especificidad, el método del doble disco asociado con el test de Hodge modificado reunieron estas características, estos resultados sugieren que estos dos métodos se deben emplear de rutina en un laboratorio de Bacteriología, por ser fáciles de realizar, económicos, sensibles y específicos.

Palabras clave: *P. aeruginosa*, metalo-beta-lactamasas, detección, MBL, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is considered one of the most important nosocomial pathogens. Its isolation is common in intensive care unit patients who also usually have multi-resistance. This greatly limits therapeutic options, since no effective drugs are available for treatment. The study aims to evaluate four phenotypic methods for detecting metallo-beta-lactamases. The double disc synergy with EDTA method, combined imipenem and meropenem disk with EDTA method, the E-Test-MBL method and the modified Hodge method, along with a reference method (PCR), are used to determine the phenotypic method or a combination of these is used that is more valid and safe for implementation in routine bacteriology laboratories. The sensitivity and specificity of the phenotypic methods used was good (over 90%); the modified Hodge test obtained the best results in detecting MBL-producing *P. aeruginosa* isolates (lower rate of false positive and negative). On analyzing the different combined methods for determining the association with greater sensitivity and specificity, the double disc method associated with the modified Hodge test met these characteristics. Results suggest that these two methods should be routinely used in a bacteriology laboratory, since they are easy to perform, sensitive, specific and economical.

Key words: *P. aeruginosa*, metallo-beta-lactamase, detection, MBL, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo que ha sido aislado de múltiples ambientes y superficies, así como de individuos sanos como parte de la microflora normal (1, 2). Es considerado un patógeno primariamente nosocomial, siendo común su aislamiento en pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos, en quienes además presenta una marcada multiresistencia, que incrementa la mortalidad asociada (2-4).

Su papel ecológico como eficaz patógeno oportunista radica en la supervivencia durante largos períodos de tiempo en fómites con escasas fuentes alimenticias como aires acondicionados, ventiladores, soluciones de limpieza, jabones líquidos, agua, antisépticos y equipos médicos como fibrobroncoscopios (5, 6). Estos mínimos requerimientos nutricionales, se complementan con una alta resistencia intrínseca a los agentes antimicrobianos, esta se debe a la baja permeabilidad de su membrana externa, acoplada con me-

canismos de resistencia secundarios como bombas de eflujo activo de antibióticos y cefalosporinas inducibles, los cuales toman ventaja de esta baja permeabilidad, por lo que, pequeños cambios en la susceptibilidad a un antibiótico pueden resultar en un incremento de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la droga a un nivel superior al alcanzado de manera terapéutica, lo que resulta en la resistencia del microorganismo a ese antibiótico (7).

El tratamiento de las infecciones causadas por este agente suele ser difícil, ya que además de su amplia resistencia natural, *P. aeruginosa* puede adquirir mecanismos de resistencia para prácticamente la totalidad de los antimicrobianos disponibles para su tratamiento (8, 9). En respuesta a esto, es cada vez más frecuente y necesario en las instituciones hospitalarias el empleo de los carbapenemas, lo que ha complicado aún más el panorama, ya que, el uso de estos antimicrobianos trae consigo la selección de resistencia, debido a la producción de enzimas carbapenemasas (10, 11), por lo que en la actualidad ha aumentado el número de cepas de *P. aeruginosa* productoras de estas enzimas, lo que deja prácticamente al paciente sin opciones terapéuticas, ya que la presencia de este mecanismo de resistencia inhabilita el uso de todos los antibióticos del grupo de los betalactámicos.

Las MBL de *P. aeruginosa* representan varios grupos: IMP, VIM, SPM, GIM y SIM; de ellos los de mayor importancia son IMP y VIM (12, 13). Estas MBL son transferibles puesto que su gran mayoría se encuentran en genes cassettes localizados principalmente en integrones tipo 1 y, en algunas ocasiones, se han encontrado en plásmidos o transposones. De esta manera se asocian a otros genes de resistencia ubicados en los mismos genes cassettes lo cual les confiere a las cepas portadoras, resistencia a múltiples antibióticos.

Las MBLs se caracterizan por generar resistencia a los betalactámicos (oximino cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemas), y por presentar sensibilidad variable al aztreonam. Actualmente, Las MBL están ampliamente diseminadas en una gran variedad de especies, aunque se hallan más comúnmente en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, siendo detectadas en los países de los 5 continentes (3, 13, 14).

Para la detección de metalo-betalactamasas (MBL) en cepas de *P. aeruginosa* el método de referencia lo constituye la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta prueba es capaz de detectar los genes responsables de este mecanismo de resistencia, sin embargo, la mayoría de los laboratorios de bacteriología clínica de rutina no poseen la capacidad para realizar estas pruebas moleculares. Existen pocos métodos fenotípicos para la detección de MBL en cepas de *P. aeruginosa* (15), adicionalmente se conoce poco acerca de la sensibilidad y especificidad de estos, por lo que este estudio pretende probar los diferentes métodos fenotípicos disponibles y compararlos con la prueba de referencia (PCR), para determinar cuál de los métodos, o combinación de métodos, pueden utilizarse de manera segura y efectiva en un laboratorio de bacteriología de rutina, permitiendo entonces la detección de este importante mecanismo de resistencia, lo que repercutirá directamente en el beneficio del paciente y la comunidad.

Materiales y Métodos

En este estudio se analizaron 294 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de los cultivos de rutina practicados con fines diagnósticos a los pacientes que asisten al Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (CRB-SAHUM).

Aislamiento e Identificación de cepas de *P. aeruginosa*

El aislamiento e identificación de las cepas de *P. aeruginosa* a partir de las diferentes muestras clínicas fue realizado por el personal del CRB-SAHUM, para ello se utilizaron las técnicas de aislamiento convencionales descritas en el Manual de Microbiología Clínica (16), para la identificación se utilizó el equipo automatizado VITEK 2C (Biomerieux®) y las tarjetas de identificación para Gram negativos GN; estas tarjetas permiten la identificación de la mayor parte de los bacilos Gram negativos de interés clínico en un tiempo máximo de 7 horas.

Detección Fenotípica de la Producción de MBL

En la actualidad, no existe estandarización ni consenso sobre el tipo de técnicas más eficaces para la detección fenotípica de las cepas productoras de MBL, por lo que una vez identificadas las cepas de *P. aeruginosa*, fueron sometidas a cuatro pruebas fenotípicas individuales para determinar la producción de MBL; método del doble disco con EDTA (DD), método del disco combinado con EDTA (DC), método de E-Test MBL (ET) y el test de Hodge modificado (HM).

Detección de MBL por el Método del Doble Disco con EDTA (DD)

Este método fue descrito por Arawaka y cols. (15), y se basa en que las MBL necesitan

como cofactor en la reacción iones metálicos como el Zn^{+2} , el EDTA es un agente quelante que posee la capacidad de atrapar estos iones metálicos y por consiguiente de inhibir la acción de la enzima, por lo que en esta prueba se utiliza el EDTA como inhibidor de MBL. La prueba se realizó utilizando una placa de agar Müeller-Hinton (MH), esta placa es sembrada con un inóculo estandarizado (0,5 McFarland) y se colocaron los discos de antibióticos, en este caso se colocó un disco de papel Whatman N° 6 con un diámetro de 6mm en la placa y se impregnó con 10µl de EDTA (0,5M pH 8,0), para obtener una concentración final en el disco de 750µg/ml de EDTA, luego se colocó a cada lado del disco de EDTA un disco de imipenem y meropenem respectivamente, a una distancia de 15 mm centro-centro, se incubó a 35°C de 18 a 24 horas en aerobiosis, luego de la incubación, se realizó la lectura de la prueba, esta se consideró positiva cuando se observó una ampliación o distorsión (efecto sinérgico) entre los discos de imipenem y meropenem y el disco de EDTA (Figura 1).

Detección de MBL por el Método del Disco Combinado con EDTA (DC)

Este método fue descrito inicialmente por Yong y cols. (17), se basa también en la capacidad del EDTA de inhibir a las MBL, pero a diferencia del método del doble disco, en este se utiliza un disco de antibiótico que adicionalmente posee EDTA (750µg). Para

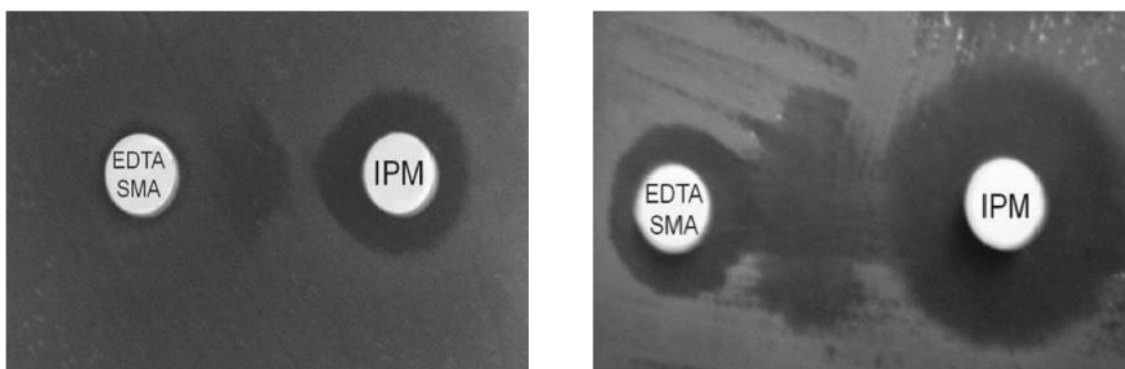


Figura 1. Prueba del doble disco positiva para la detección de MBL.

esta prueba se inoculó una placa de agar MH con una suspensión estandarizada del microorganismo (como se realizó en el método anterior), luego se colocaron dos discos de imipenem (10µg), a uno de los discos se le colocaron 10µl de EDTA, posteriormente se incubó a 35°C de 18 a 24h, para la lectura, se compararon los tamaños de los halos de inhibición entre los discos de imipenem e imipenem/EDTA, si la diferencia de tamaño entre el disco de imipenem y el disco de imipenem/EDTA resultó ≥ 7 mm, se consideró la prueba positiva, es decir, la cepa es productora de MBL (Figura 2).

DetECCIÓN DE MBL POR EL MÉTODO E-test-MBL®

El método E-Test-MBL fue descrito y evaluado por Walsh y cols. (18), también se basa en la capacidad del EDTA como agente inhibidor de MBL. Este método utiliza tiras de material plástico no poroso, impregnadas con dos gradientes predefinidos, de un lado contiene imipenem en concentraciones que van de 4-256µg/ml, mientras que del otro posee una combinación de imipenem en concentraciones que van desde 1-64µg/ml, además de niveles constantes de EDTA. Al igual que en los métodos anteriores se preparó una suspensión bacteriana y se inoculó la superficie de una placa de agar de MH, seguidamen-

te, se colocó la tira de E-test_MBL con ayuda de una pinza estéril, se incubó a 35°C, en aerobiosis, por 18-24h, para la lectura de la prueba, se tomó en cuenta el punto donde la zona de inhibición corta la escala numérica de la tira de E-test, lo que corresponde a la CIM. Para la interpretación de los resultados, se calculó la razón de dividir la CIM de IPM entre la CIM obtenida por IPM/EDTA, si esta razón es ≥ 8 , o si la diferencia de las CIM es ≥ 3 diluciones, la prueba se consideró positiva (Figura 3).

Test de Hodge Modificado para la Detección de MBL

Este método fue descrito inicialmente por Hodge y cols. (19), para detectar la presencia de penicilinasas en cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, este método detecta la presencia de una enzima inactivadora de antibióticos en la cepa estudiada, la especificidad del método para distinguir distintos tipos de betalactamasas está dada por el antibiótico que se utilice. Lee y cols. (20), modificaron el método original cambiando el microorganismo indicador y el antibiótico probado, haciendo que la prueba sea bastante sensible para la detección de MBL.

La prueba se realizó inoculando la superficie de una placa de agar MH, con una suspensión de colonias de un cultivo de joven *Es-*

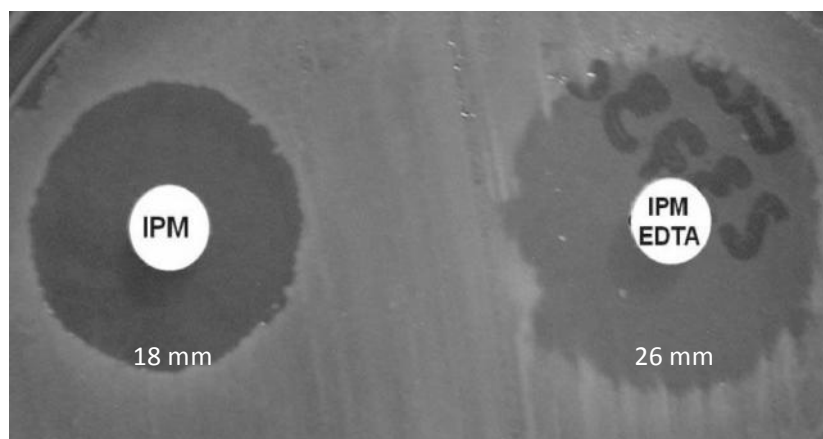


Figura 2. Prueba del disco combinado con EDTA positiva para la detección de MBL.

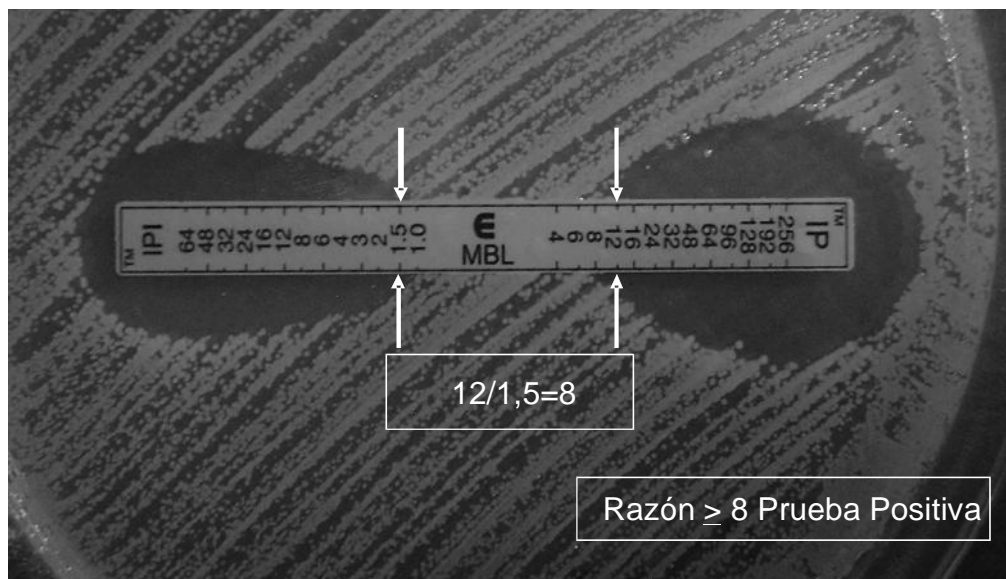


Figura 3. Prueba de E-Test positiva para la detección de MBL.

cherichia coli ATCC 25922, ajustada al estándar 0,5 de la escala de McFarland, luego se colocó un disco de imipenem (10ug) en el centro de la placa, posteriormente, se realizó una estría desde el borde del disco hacia la periferia de la placa para cada cepa de *P. aeruginosa* sospechosa de la producción de carbapenemasas, se colocó un máximo de cuatro aislados en placas de petri de 90mm. Las placas se incubaron en atmósfera aerobia por 18-24h a 35°C. La presencia de una zona de distorsión del halo de inhibición alrededor de la estría del microorganismo probado fue interpretada como positiva para la producción de MBL por el método de Hodge modificado (Figura 4). Para el control de calidad de los cuatro métodos fenotípicos, se utilizó una cepa de *P. aeruginosa* productora de MBL como control positivo (*P. aeruginosa* CRB 3256-08) y una no productora de MBL como control negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853).

Detección Genotípica de la Producción de MBL

La técnica que se utilizó como estándar de referencia para comparar la sensibilidad y especificidad de los métodos fenotípicos fue

la PCR. Esta prueba es altamente sensible y específica, detecta de manera directa la presencia de los genes productores de MBL y no su expresión como lo hacen los métodos fenotípicos. De los diferentes genes que codifican la producción de MBL, solo se investigaron *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*, ya que estos son los que codifican la mayor parte de las MBL reportadas en la literatura (3,10, 21-30).

La extracción del ADN del microorganismo se realizó utilizando un método de lisis alcalina de extracción rápida (31), para la amplificación de los genes *bla_{VIM}* Y *bla_{IMP}*, se utilizaron los primers oligonucleótidos descritos por Woodford y cols. (32). Se prepararon 50µl de mezcla de reacción, conteniendo 1µM de cada primer, 200 µm de cada deoxinucleotido trifosfato, Buffer de reacción 1X, 1,5mM de Mg₂Cl, 2,5U de Go-Taq polimerasa (Promega), y 25 ng del ADN molde. La amplificación se realizó en un termociclador MJ-Research PTC-100, se realizó una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, luego 30 ciclos de amplificación de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, anillamiento a 55°C por 1 minuto y extensión

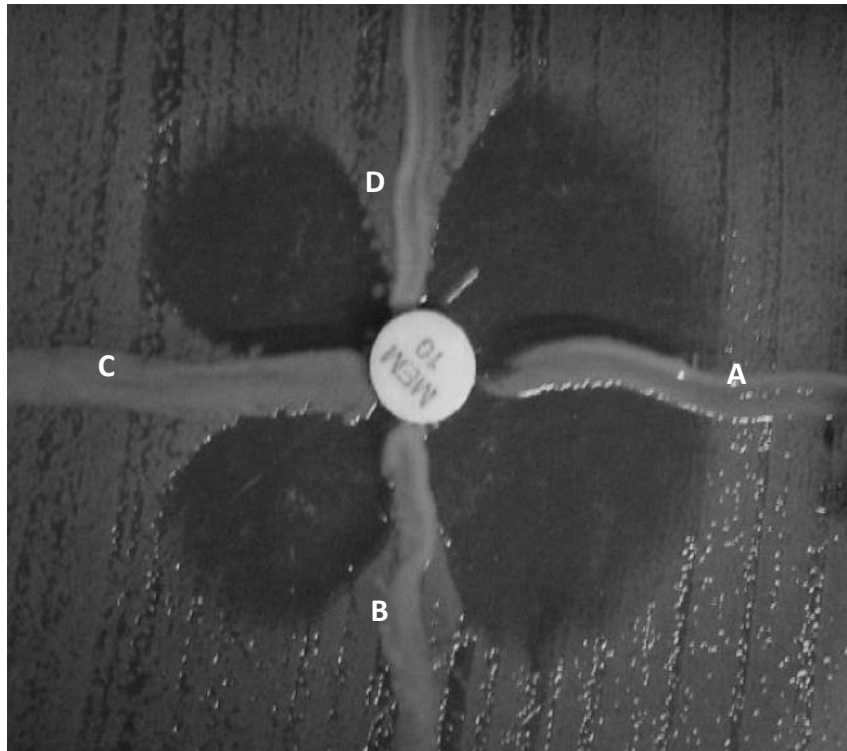


Figura 4. Test de Hodge modificado.

Test de Hodge modificado (A) negativo; B, c y D positivo.

del ADN a 72°C por 1,5 minutos, después del último ciclo los productos fueron conservados a 4°C. La detección de amplificadores se realizó mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% en TBE 0,5x. Se corrió la electroforesis con 80 voltios por 1 hora o hasta que el frente de avance de las muestras llegó al final del gel, luego se tiñó el gel con bromuro de etidio (1µg/mL) durante 30 minutos. Una vez teñido, para la detección de amplificadores se visualizó sobre un transiluminador ultravioleta. La reacción de amplificación para *bla_{IMP}* se consideró positiva al observar una banda única de 587pb. La reacción de amplificación para *bla_{VIM}* se considera positiva al observar una banda única de 261pb. La sensibilidad y especificidad de los primers fue evaluada con cepas controles que poseen el mecanismo de resistencia plenamente identificado, *P. aeruginosa* ATCC 27853 como control negativo no productor de MBL,

P. aeruginosa CRB-55642-09 cepa productora de *bla_{VIM}* y *P. aeruginosa* CRB-25698-09 cepa productora de *bla_{IMP}*.

Análisis Estadístico

Para la validación de los métodos fenotípicos en comparación al PCR se calculó la Sensibilidad y Especificidad de cada método y de los métodos combinados (33,34). Se utilizó un intervalo de confianza del 95% para el cálculo.

Resultados

Se analizó un total de 294 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Del total de cepas analizadas 104 fueron positivas mediante PCR para el gen *bla_{IMP}*, ninguno de los aislados amplificó con el gen *bla_{VIM}*.

La Tabla 1 muestra los resultados de los métodos fenotípicos empleados con respecto

a la prueba de PCR. La Tabla 2 muestra la sensibilidad y especificidad de cada método fenotípico al compararse con el PCR; mientras que la Tabla 3 muestra la sensibilidad y especificidad de los diferentes métodos fenotípicos combinados, al compararse con la técnica de referencia.

Discusión

Al comparar los resultados de los métodos utilizados se puede concluir que hubo una alta concordancia entre los métodos fenotípicos empleados, ya que todos caracterizaron de manera similar a los aislados de *P. aeruginosa* como productores o no de MBL, cuando se compara con el método de Referencia (PCR).

El 96,15% de los aislados de *P. aeruginosa* confirmados como productores de MBL por PCR fue detectado por el método del DD, DC y ET, mientras que el 3,85% de las cepas productoras de MBL fueron negativas por estos métodos, por lo que se consideraron resultados falso negativos. El HM detectó el

98,08% de las cepas productoras de MBL y solo aportó 1,92% de resultados falsos negativos (aislados PCR positivo HM negativo), por lo que fue la prueba que obtuvo los mejores resultados en la detección del mecanismo de resistencia.

Por otra parte, 5,26% de los aislados negativos por PCR dieron positivos para los métodos del DD y DC, mientras que solo 3,15% resultaron positivos por los métodos de ET y HM, por lo que estos resultados se consideran falsos positivos. El desempeño del ET y el HM fue superior y generó una menor proporción de resultados falsos positivos.

Galani y col. (35) reportan un 99% de sensibilidad y un 91,9% para la detección de MBL utilizando el método del DC, por lo que lo recomiendan como método de rutina para la detección de cepas productoras de MBL. Por otra parte Guevara y col. (36), en Venezuela también reportan una buena sensibilidad y especificidad (superior al 95%), utilizando discos de IPM con Ácido Etilendiamíntetracético y Tioglicolato de Sodio (EDTA/SMA). Mientras que Lee y col. (37),

Tabla 1. Resultados de los métodos fenotípicos comparado con el PCR

Resultado del Método Fenotípico	Métodos Fenotípicos				PCR
	DD	DC	ET	HM	
Positivo	100	100	100	102	Positivo
Negativo	4	4	4	2	
Positivo	10	10	6	6	Negativo
Negativo	180	180	184	184	

Tabla 2. Sensibilidad y Especificidad de cada método fenotípico comparado con el PCR.

	Métodos Fenotípicos			
	DD (95%IC)	DC(95%IC)	ET(95%IC)	HM(95%IC)
Sensibilidad	96,15% (89,88%-98,76%)	96,15% (89,88%-98,76%)	96,15% (89,88%-98,76%)	98,08% (92,55%-99,67%)
Especificidad	94,74% (90,26%-97,30%)	94,74% (90,26%-97,30%)	96,84% (92,94%-98,71%)	96,84% (92,94%-98,71%)

reportan una sensibilidad y especificidad del 100% para el método del doble disco con IPM/EDTA.

Una mayor proporción de cepas de *P. aeruginosa* dieron positivo el HM, es decir, este método detectó mayor cantidad de cepas que el resto de los métodos empleados, esto puede deberse principalmente a que el HM detecta la presencia de cualquier mecanismo enzimático de resistencia, mientras que el resto de los métodos empleados solo detectan la presencia de MBL. En el HM, la especificidad del método está dada por el antibiótico utilizado como sustrato en la prueba, en este caso IPM, por lo que el método detecta la presencia de enzimas que hidrolizan a los carbapenemas, es decir, carbapenemasas; en nuestro medio, la resistencia a carbapenemas en *Pseudomonas* spp. se debe principalmente a la producción de MBL (38), sin embargo existen otras carbapenemasas no MBL que pueden conferir resistencia a los carbapenemas como por ejemplo KPC, SME y NDM-1 entre otras, estos mecanismos enzimáticos de resistencia pueden ser detectados por el HM pero no por el resto de los métodos, lo que explicaría la posible diferencia existente entre los métodos utilizados. Sin embargo, es importante destacar que la frecuencia de carbapenemasas diferentes a MBL en aislados de *Pseudomonas* es baja, por lo que no se ve comprometida la especificidad del método.

Al analizar los resultados de la combinación de métodos fenotípicos buscando elevar la sensibilidad y especificidad, se observa que la combinación de los métodos DD+DC; DD+ET; DC+ET obtuvo una sensibilidad del 96,15% y una especificidad del 94,74%, mientras que las combinaciones DD-HM; DC+HM; ET+HM; DD+DC+ET; DD+DC+HM; DC+ET+HM; DD+DC+ET+HM tienen una sensibilidad del 98,08% y una especificidad del 94,74% (Tabla 3).

Tabla 3. Sensibilidad y Especificidad de los diferentes métodos fenotípicos combinados al compararse con el PCR.

	DD+DC (95%IC)	DD+ET (95%IC)	DD-HM (95%IC)	DC+ET (95%IC)	DC+HM (95%IC)	ET+HM (95%IC)	DD+DC+ET (95%IC)	DD+DC+H M (95%IC)	DC+ET+H M (95%IC)	DD+DC+ ET+HM (95%IC)
Sensibilidad	96,15% (89,88%- 98,76%)	96,15% (89,88%- 98,76%)	98,08% (92,55%- 99,67%)	96,15% (89,88%- 98,76%)	98,08% (92,55%- 99,67%)	98,08% (92,55%- 99,67%)	98,08% (92,55%- 99,67%)	98,08% (92,55%- 99,67%)	98,08% (92,55%- 99,67%)	98,08% (92,55%- 99,67%)
Especificidad	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)	94,74% (90,26%- 97,30%)

Diferentes autores recomiendan el DD y el HM para la detección de MBL en aislados de *Pseudomonas* spp. (20, 36, 37, 39), este estudio demuestra que estos métodos son una buena recomendación para laboratorios de rutina donde los métodos moleculares no están disponibles (39, 40). La utilización de ambos métodos permite detectar de manera adecuada la producción de MBL en aislados de *Pseudomonas* spp., incluso permite la detección de carbapenemasas no MBL en estas cepas, lo que resulta útil en el laboratorio para dirigir de manera óptima la terapéutica aplicada a los pacientes, así como, la activación rápida de los programas de control de infecciones nosocomiales, para de esta manera evitar la diseminación de la resistencia.

Referencias Bibliográficas

- (1) Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 15;32(Suppl 2):S146-S155.
- (2) Corona-Nakamura AL, Miranda-Navales MG, Leños-Miranda B, Portillo-Gómez L, Hernández-Chávez A, Anthon-Rendón J, et al. Epidemiologic Study of *Pseudomonas aeruginosa* in Critical Patients and Reservoirs. *Arch Med Res* 2001; 32(3):238-42.
- (3) Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo- β -Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004; 42(11): 5094-101.
- (4) Martínez P, Espinal P, Attar S. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Beta-lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Infectio* 2007; 11(1):6-15.
- (5) Gamboa M, Rodríguez E, Rojas M. Bacterias de importancia clínica en respiradores y aires acondicionados de hospitales de San José, Costa Rica. *Revista Biomedica* 2003; 14:143-51.
- (6) Vilar-Compte D, Jacquemin B, Díaz-González A, Velasquez C, Wolkow P. Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizadas. *Salud Pública de México* 2003; 45(5):371-8.
- (7) Hancock REW. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Non-fermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 27(Supplement 1):S93-S99.
- (8) Pagniez G, Radice M. Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología* 2006; 38(33):37.
- (9) Sociedad Argentina de Bacteriología (SADEBAC). Consenso sobre criterio de ensayo, interpretación e Informe de las pruebas de sensibilidad en los BGNNF de importancia clínica. Disponible en: www.aam.org.ar
- (10) Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rosso-Lini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis*. 2000; 31 (5): 1119 -25.
- (11) Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1 Carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3):1290-2.
- (12) Suarez CJ, Kattan JN, Guzmán AM, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio* 2006; 10:85-93.
- (13) Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(11):4485-91.

- (14) Gomez-Ivarez CA, Leal Castro AL, Perez de Gonzalez MdJ, Navarrete Jimenez ML. Mecanismos de Resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia 2005; 53:27-34.
- (15) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient Test for Screening Metallo-beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. J Clin Microbiol 2000; 38(1):40-3.
- (16) Kiska D, Gillighan P. *Pseudomonas*. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 734-48.
- (17) Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2002; 40(10):3798-801.
- (18) Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Gales A. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. J Clin Microbiol 2002; 40(8):2755-9.
- (19) Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 1978; (1):102-3.
- (20) Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. 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 2003; 41(10):4623-9.
- (21) Bush K. Metallo-B-Lactamases: A Class Apart. Clinical Infectious Diseases 1998; 27(Supplement 1):S48-S53.
- (22) Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging Metallo-B-Lactamase-Mediated Resistances: A Summary Report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Clinical Infectious Diseases 2005; 41(Supplement 4): S276-S278.
- (23) Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw E, et al. Biochemical Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 Metallo-beta-Lactamase IMP-1 Produced by *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(4):902-6.
- (24) Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(7): 1584-90.
- (25) Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, et al. First Isolation of blaVIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(4): 1433-4.
- (26) Oelschlaeger P, Schmid RD, Pleiss J. Insight into the mechanism of the IMP-1 metallo-B-lactamase by molecular dynamics simulations. Protein Engineering 2003; 16(5):341-50.
- (27) Pagani L, Colinon C, Migliavacca R, Labonia M, Docquier JD, Nucleo E, et al. Nosocomial Outbreak Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing IMP-13 Metallo- β -Lactamase. J Clin Microbiol 2005; 43(8):3824-8.
- (28) Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo-beta -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(4):891-7.
- (29) Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR. Genetic characterization of a novel metallo-B-lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2003; 52(4):583-90.

- (30) Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, Suarez CJ, Correa A, Queenan AM, et al. First Detection of Metallo- β -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1):226-9.
- (31) Perozo-Mena A, Castellano-González M, Ginestre-Pérez M, Rincón-Villalobos G. Resistencia a Vancomicina en Cepas de *Enterococcus faecium* Aisladas en un Hospital Universitario. *Kasmera* 2011; 39(1):7-17.
- (32) Woodford N, Tierno PM, Jr., Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12): 4793-9.
- (33) Pita-Fernández S, Pértegas-Díaz S. Pruebas Diagnósticas: Sensibilidad y Especificidad. *Cuadernos de Atención Primaria* 2003;10:120-4.
- (34) Sánchez NA. ¿Son la sensibilidad y la especificidad medidas obsoletas para determinar la bondad de una prueba diagnóstica? *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública* 2002; 20(1): 149-59.
- (35) Galani I, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giamarellou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo- β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(3): 548-53.
- (36) Guevara A, Gamboa A, Machado M, Vera M. Evaluación del ácido etilendiaminotetraacético y del mercaptoacético de sodio en la detección de metalo β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* mediante la técnica del disco combinado. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2010; 30(1): 11-7.
- (37) Lee K, Chong Y, Shin H, Kim Y, Yong D, Yum J. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology & Infection* 2001;7(2):88-91.
- (38) Perozo-Mena A, Castellano-González M, Ling-Toledo E, Arraiz N. Detección fenotípica de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *KASMERIA* 40[2], 113-121. 2012.
- (39) Pitout JDD, Gregson DB, Poirer L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- β -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7):3129-35.
- (40) Valenza G, Joseph B, Elias J, Claus H, Oesterlein A, Engelhardt K, et al. First Survey of Metallo- β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a German University Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(8):3493-7.