

Artículo original

Persistencia clonal de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas en un hospital de Ciudad Bolívar, Venezuela

Armando Guevara^{a,b,*}, José Miguel Sahai^a, Rosa Tedesco-Maiullari^a

^aDepartamento de Parasitología y Microbiología. Escuela de Ciencias de la Salud "Dr. Francisco Batisttini". Universidad de Oriente. Núcleo de Bolívar. Ciudad Bolívar. ^bLaboratorio de Resistencia Bacteriana. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Cumaná, Venezuela.

Recibido 7 de junio de 2015; aceptado 6 de octubre de 2015

Resumen: *Pseudomonas aeruginosa* es una de las especies aisladas con mayor frecuencia en las infecciones asociadas a la atención en salud, con un importante rol como patógeno. Se determinó la relación clonal de *P. aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas (MBLs), aisladas de pacientes recluidos en el Complejo Hospitalario Universitario "Ruiz y Páez", Ciudad Bolívar, Venezuela, durante los años 2008 al 2014. Se evaluó una colección de 10 aislados de *P. aeruginosa* productoras de MBLs. La susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó mediante difusión con discos. La producción de MBLs se detectó fenotípicamente a través del método de discos de carbapenemos combinados con ácido etilendiaminotetraacético-mercaptoacético de sodio, y mediante la reacción en cadena de la polimerasa se investigó la presencia de los genes que codifican para las MBLs de las familias IMP, VIM y SPM. Se determinó la relación clonal mediante la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD). Todas las cepas fueron multiresistentes y se comprobó la presencia de MBLs de tipo VIM. Mediante RAPD se logró clasificar las cepas en tres grupos clonales distintos, pero altamente relacionados entre sí, demostrándose su diseminación y persistencia clonal.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, metalo- β -lactamasas, epidemiología molecular, PCR, RAPD.

Clonal persistence of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a hospital in Ciudad Bolivar, Venezuela

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the species most frequently isolated in associated health care infections with an important role as pathogen. The clonal relation of *P. aeruginosa* producing metallo- β -lactamases (MBLs) isolated from patients hospitalized at the Hospital Universitario "Ruiz y Páez" Complex of Ciudad Bolivar, Venezuela, for the years 2008 to 2014, was determined. A set of 10 isolates of *P. aeruginosa* producing MBLs were evaluated. The antimicrobial susceptibility was performed by the disk diffusion test. MBLs production was determined by the method of carbapenem disks combined with ethylene-diamine-tetra-acetic acid-sodium mercapto-acetic. By means of the polymerase chain reaction test the presence of the genes encoding for MBLs of the families: IMP, VIM and SPM were investigated. Clonal spread by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was investigated. All strains were multiresistant and the presence of VIM type MBLs was demonstrated. By the RAPD the different strains were classified into three distinct clonal groups, highly related. In conclusion, all strains of *P. aeruginosa* were multiresistant, producing VIM type MBL and the clonal dissemination and persistence were demonstrated.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo- β -lactamases, molecular epidemiology, PCR, RAPD.

* Correspondencia:
E-mail: agvillefort@yahoo.com

Introducción

P. aeruginosa es una de las especies aisladas con mayor frecuencia en las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), siendo responsable del 10 al 15% de este tipo de patologías a nivel mundial. Aunque se considera que

tiene una baja virulencia, este microorganismo ha cobrado importancia en los últimos años por su rol oportunista en el hombre, produciendo mayoritariamente infecciones respiratorias intrahospitalarias, especialmente en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica, en unidades de cuidados intensivos; asimismo, es un importante productor

de infecciones en individuos cuya barrera mucocutánea ha perdido su continuidad (heridas, quemaduras, intubaciones endotraqueales, cateterismos vesicales, vías venosas, entre otros) y en pacientes inmunodeprimidos (SIDA, cáncer, neutropénicos y diabéticos) en quienes puede actuar como patógeno primario, pudiendo causar una serie de enfermedades que afectan a diferentes órganos y sistemas como: bacteriemias, infecciones del sistema nervioso central, artritis, infecciones gastrointestinales, osteomielitis, queratitis, úlceras corneales, endoftalmítis, infecciones urinarias, infecciones de úlceras por presión, entre otros [1,2].

Las IAAS causadas por *P. aeruginosa* se pueden originar de dos fuentes distintas. Una exógena, que está representada por el ambiente hospitalario, donde destacan: las camillas, el aire, las paredes, el suelo, las botellas de fármacos de múltiples dosis, superficies húmedas y algunos alimentos como el tomate y la lechuga que pueden ser reservorios de esta bacteria. La otra fuente de infección es la endógena y es ocasionada por la flora normal del paciente; además, hallazgos epidemiológicos señalan que del 2,6 al 24% de los pacientes ingresados en el hospital portan dicho microorganismo en su intestino, de donde se origina la subsecuente infección, ocasionada por un proceso de colonización secundaria [3].

El frecuente aislamiento de *P. aeruginosa* en el entorno hospitalario se debe a que esta bacteria se adapta fácilmente al medio, con gran afinidad por zonas húmedas y resistencia a la desecación, además de una gran resistencia natural contra los desinfectantes y antibióticos, que para muchos otros microorganismos serían mortales [4].

En los últimos años la prevalencia de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* multirresistente ha mostrado un incremento significativo, dado que posee la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia contra los agentes antimicrobianos, siendo la producción de metalo β -lactamasas (MBLs) una de sus principales armas para la evasión del efecto tóxico causado por los β -lactámicos de amplio espectro (cefalosporinas y carbapenemos) [5,6].

En el año 2004, estudios moleculares permitieron detectar por primera vez en Venezuela, cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs del tipo VIM-2 [7]; posteriormente en el año 2012 se confirmó que existe una diseminación clonal de este microorganismo multirresistente, entre diferentes centros hospitalarios del oriente y sur del país. En el mismo estudio se logró evidenciar la diseminación de *P. aeruginosa* productora de MBLs en los diferentes servicios de Complejo Hospitalario Universitario "Ruiz y Páez", entre los años 2007 y 2009 [8]; sin embargo, se desconoce si este tipo de diseminación continúa actualmente. Por tal razón, en este trabajo se investigó la relación clonal de *P. aeruginosa* productoras de MBLs aisladas de pacientes recluidos en el Complejo Hospitalario Universitario "Ruiz y Páez" de Ciudad Bolívar, Venezuela, durante el periodo de 2008 al 2014, utilizando la técnica de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD).

Materiales y métodos

Cepas bacterianas: En este estudio se evaluó una colección de 10 cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario "Ruiz y Páez", Ciudad Bolívar, Venezuela, obtenidas de pacientes recluidos en distintos servicios del mencionado hospital, recolectadas durante el periodo enero de 2008 a junio de 2014. Para verificar la persistencia de la diseminación clonal, se incluyó en el estudio las cepas 467-O del año 2008 y 64-A del año 2009, caracterizadas en un estudio anterior [8].

Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos: La susceptibilidad antimicrobiana se investigó mediante el método de difusión con discos, siguiendo los lineamientos propuestos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio [9]. Se utilizaron los siguientes antimicrobianos: piperacilina (100 μ g), piperacilina/tazobactam (100/10 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefepima (30 μ g), imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), aztreonam (30 μ g), amikacina (30 μ g), gentamicina (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g) y colistina (10 μ g) (BBL®). Para estos ensayos se utilizó como cepa control *P. aeruginosa* ATCC 25923.

Detección fenotípica de la producción de MBLs: Se confirmó la producción de MBLs fenotípicamente mediante el método de discos de imipenem y meropenem combinados con ácido etilendiaminotetraacético - mercaptoacético de sodio (EDTA-SMA) [10]. La solución de EDTA-SMA fue preparada según las indicaciones de Lee *et al.* [11]. Como control de los discos de carbapenemos combinados con EDTA-SMA y de las pruebas de detección fenotípica de las metalo-enzimas, se utilizó la cepa *P. aeruginosa* 77923 productora de metalo β -lactamasas de tipo VIM, proveniente del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" de Caracas, Venezuela.

Caracterización molecular de las cepas de P. aeruginosa:

Extracción del ADN: La extracción del ADN genómico de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas se realizó mediante ebullición en baño de María por 10 minutos, de acuerdo con métodos previamente descritos [12]. Una vez realizada la ebullición, las suspensiones se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos y posteriormente se tomó el sobrenadante que contenía el ADN bacteriano y se transfirió a tubos para microcentrífuga estériles y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Detección de genes que codifican para las MBLs mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La presencia de los genes que codifican para las MBLs de las familias SPM, VIM e IMP, se realizó a través de la PCR utilizando los iniciadores 5'-CCTACAATCAACGGCGACC-3' y 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3' para la detección de *bla*_{SPM} [13]; 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3' y 5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3' para los genes *bla*_{IMP} [14]; 5'AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3' y 5'ATG

AAA GTG CGT GGA GAC-3' para *bla_{VIM}* [15], bajo las condiciones descritas previamente. Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 12,5 µL y la mezcla estuvo compuesta por 1µL de cada iniciador (5 pmol/mL); 3,3 µL agua bidestilada ultrapura; 6,2 µL de GoTaq Master Mix (Promega®) y 1 µL de ADN. Como control positivo de la detección por PCR de los genes que codifican para las MBL se utilizaron las cepas *P. aeruginosa* 77923 productora de MBL de tipo VIM, 77927 productora de MBL de tipo IMP, ambas provenientes del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" de Caracas, Venezuela, y la cepa M7525 productora de MBL de tipo SPM, procedente del Instituto "Carlos Malbran" de Buenos Aires, Argentina.

RAPD: La tipificación molecular se realizó mediante la técnica de RAPD. Se utilizaron los iniciadores 208 (5'ACG-GCC-GAC-C3') y 270 (5'TGC-GCG-CGG-G3') [16]. La mezcla estuvo compuesta por 1 µL de ADN; 2,5 µL de iniciador 208 (5 pmol/µL); 2,5 µL de iniciador 270 (5 pmol/µL); 12,5µL de Máster Mix (Promega®) y 6,5 µL de agua libre de nucleasas (Promega®), para un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación de los oligonucleótidos a 30 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 3 min; finalmente se programó una extensión final de 72 °C por 5 min [16].

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador marca TECHNE TC-412. Los productos obtenidos fueron observados en corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1,5% (Promega®) teñidos con bromuro de etidio (Sigma®), se visualizaron en un transiluminador de luz UV y fueron fotografiados con una cámara digital Power Shot A700 (Canon®).

Para establecer las relaciones entre las cepas estudiadas se construyó un dendograma o árbol de similitud, utilizando el programa para análisis de imágenes Guefast Scan (NEURONIC S.A.®) mediante el uso del Coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). Los patrones que mostraron un coeficiente de Dice superior a 80%, fueron considerados relacionados clonalmente.

Resultados

Al evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos probados se encontró que todas las cepas fueron resistentes a imipenem, meropenem y amikacina, con un porcentaje variable de resistencia a los otros antimicrobianos, que osciló entre el 60 y 80%, excepto para colistina (0%), piperacilina-tazobactam (30%) y aztreonam (40%) (Tabla 1). Sin embargo, al analizar el perfil de susceptibilidad de cada cepa estudiada, se encontró que cada una de ellas presentó un patrón diferente independientemente del año y servicio de aislamiento (Tabla 2).

Al corroborar fenotípicamente la producción de MBLs en las cepas de *P. aeruginosa*, se logró detectar correctamente en el 100% de los aislados la producción de

Tabla 1. Susceptibilidad de *P. aeruginosa* productora de metalo-β-lactamasas. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez". Ciudad Bolívar, Venezuela. 2008-2014.

ANTIBIOTICOS	Resistente		Intermedio		Sensible	
	N°	%	N°	%	N°	%
Piperacilina	6	60	4	40	0	0
Piperacilina/ Tazobactam	3	30	3	30	4	40
Ceftazidima	7	70	1	10	2	20
Cefepime	6	60	1	10	3	30
Imipenem	10	100	0	0	0	0
Meropenem	10	100	0	0	0	0
Aztreonam	4	40	0	0	6	60
Gentamicina	8	80	1	10	1	10
Amikacina	10	100	0	0	0	0
Ciprofloxacina	8	80	0	0	2	20
Colistina	0	0	0	0	10	100

las metaloenzimas. En todas se logró identificar la presencia del gen *bla_{VIM}* mediante la PCR.

Al caracterizar las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs mediante RAPD y elaborar el árbol de similitud o dendograma, se logró clasificarlas en tres grupos clonales que fueron denominados como A, B y C, ordenados según el número de cepas que los componen (Figura 1). El grupo A estuvo compuesto por el mayor número de microorganismos (6/10) que genéticamente reflejaron ser 100% idénticos entre sí; a su vez el grupo B estuvo conformado por un número más reducido de cepas (3/10) idénticas entre ellas en el 100% y finalmente el grupo C estuvo integrado por un único aislado (1/10). Los grupos A y B (9/10) se consideraron genéticamente parecidos en un 95% mientras que el grupo C tuvo una similitud de 91% con los grupos A y B.

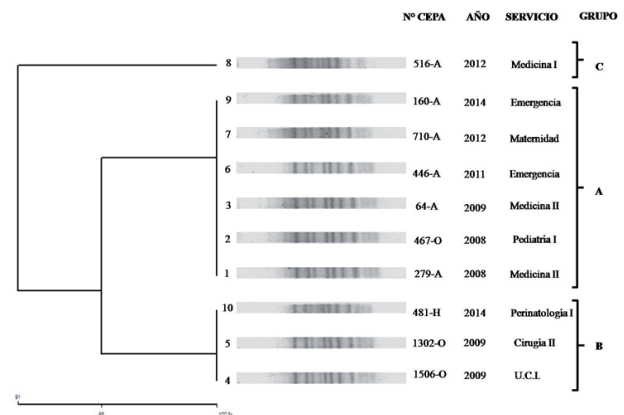


Figura 1. Dendograma de las cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo-β-lactamasas, en base a los patrones de bandas producidos mediante RAPD. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez". Ciudad Bolívar, Venezuela. 2008-2014.

Tabla 2. Características epidemiológicas y microbiológicas de *P. aeruginosa* productora de metalo-β-lactamasas. Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez”. Ciudad Bolívar, Venezuela. 2008-2014.

Cepa	Año	Servicio	Fenotipos de susceptibilidad	Patrón de susceptibilidad	Detección de MBLs	
					MDC	PCR <i>bla</i> _{VIM}
279-A	2008	Medicina II	PIP ^I , TZP ^S , CAZ ^R , FEP ^R , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^S , G ^R , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	I	+	+
467-O	2008	Pediatría I	PIP ^R , TZP ^I , CAZ ^R , FEP ^R , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^S , G ^R , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	II	+	+
64-A	2009	Medicina II	PIP ^R , TZP ^R , CAZ ^R , FEP ^R , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^R , G ^I , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	III	+	+
1302-O	2009	Cirugía II	PIP ^R , TZP ^R , CAZ ^I , FEP ^R , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^R , G ^S , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	IV	+	+
1506-O	2009	U.C.I.	PIP ^R , TZP ^I , CAZ ^R , FEP ^R , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^R , G ^R , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	V	+	+
446-A	2011	Emergencia	PIP ^I , TZP ^S , CAZ ^S , FEP ^S , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^S , G ^R , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	VI	+	+
516-A	2011	Medicina I	PIP ^R , TZP ^S , CAZ ^R , FEP ^S , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^S , G ^R , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	VII	+	+
710-A	2012	Maternidad	PIP ^R , TZP ^R , CAZ ^R , FEP ^I , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^S , G ^R , AK ^R , CIP ^S , CL ^S	VIII	+	+
160-A	2014	Emergencia	PIP ^I , TZP ^I , CAZ ^R , FEP ^R , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^S , G ^R , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	IX	+	+
481-H	2014	Perinatología I	PIP ^I , TZP ^S , CAZ ^S , FEP ^S , IMP ^R , MEM ^R , ATM ^R , G ^R , AK ^R , CIP ^R , CL ^S	X	+	+

PIP: piperacilina; TZP: piperacilina/tazobactam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IMP: imipenem; MEM: meropenem; ATM: aztreonam; G: gentamicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacina; CL: colistina. MDC: método de disco combinado. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. R: resistente; I: intermedio; S: sensible.

En el dendograma se puede observar que el grupo A está conformado por cepas aisladas de pacientes hospitalizados en la Emergencia, Maternidad, Medicina II y Pediatría I. Del mismo modo, el grupo B estuvo conformado por aislamientos de Perinatología I, Cirugía II y UCI.

Discusión

Los patrones de susceptibilidad antimicrobiana demostraron que todas las cepas de *P. aeruginosa* presentaron un perfil compatible con la producción de MBLs, y en la mayoría (9/10) la resistencia a los β-lactámicos de amplio espectro estuvo asociada a la resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina, lo cual podría deberse a la presencia de otros mecanismos de resistencia como: las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de expulsión, alteraciones de la permeabilidad de la pared celular, entre otros, ya que *P. aeruginosa* presenta una marcada capacidad para adquirir y expresar diferentes mecanismos de resistencia simultáneamente [5,17], generando así diferentes complejos fenotípicos de multirresistencia como los observados en este estudio. Patrones de susceptibilidad similares han sido reportados por otros autores [5,8,18-22].

El aztreonam no se encuentra dentro del perfil de hidrólisis de las MBLs, por lo cual representa una opción terapéutica para el tratamiento de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* productoras de este tipo de enzimas. Sin embargo, en este estudio, sólo 6/10 cepas fueron sensibles al aztreonam, lo cual coincide con estudios realizados en los últimos años en diferentes regiones de Venezuela donde se han venido reportando, cada vez con mayor frecuencia, la presencia de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs con resistencia al aztreonam. Esta resistencia

generalmente se debe a la producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar y causar resistencia a los β-lactámicos incluyendo al aztreonam [5,8,23].

Todas las cepas fueron portadoras de genes de la familia VIM, lo cual ya ha sido reportado en diferentes regiones de Venezuela [5,7,8,22,23].

El análisis mediante RAPD confirmó que, en los distintos servicios de salud del Complejo Hospitalario Universitario “Ruiz y Páez”, circulan cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs de tipo VIM con un origen clonal común, divididas en tres grupos distintos pero altamente relacionados. Estos datos permiten deducir que estas cepas provienen de un único ancestro, que posiblemente adquirió determinantes de resistencia y posteriormente se diseminó a las distintas áreas del hospital; estos resultados concuerdan con lo reportado en Colombia, donde se encontraron cepas de *P. aeruginosa* con diferentes perfiles de resistencia pero con un origen clonal común [24].

En Venezuela se reportó que en el hospital de Cumaná existen tres líneas clonales distintas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs en los diferentes servicios, mientras que en los hospitales de San Tomé, San Félix y Ciudad Bolívar todas las cepas en estudio resultaron indistinguibles entre sí, y conformaron un mismo grupo clonal independientemente del servicio y del hospital de origen [8]. Los resultados de este estudio demuestran que la diseminación clonal de *P. aeruginosa* productora de MBL persiste en este hospital por lo menos desde el año 2007, ya que los aislados 467-O del año 2008 y 64-A del año 2009, utilizados en el estudio de epidemiología molecular realizado previamente [8], presentaron patrones de bandas indistinguibles de aquellos aislados de los años 2008, 2011, 2012 y 2014; esto posiblemente se deba a prácticas

inadecuadas en el control de las IAAS.

Algunos investigadores han reportado la ausencia de diseminación clonal de *P. aeruginosa* productora de MBL. En Chile se demostró, mediante el análisis de 11 cepas portadoras del gen *bla_{VIM2}*, que estas no tenían relación filogenética [25]; así mismo, en el Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo se determinó que el porcentaje de diseminación clonal fue muy bajo (3,3%), demostrando que no hubo relación clonal entre las cepas aisladas de un mismo servicio ni entre los aislamientos de diferentes servicios, dejando en evidencia la diseminación horizontal de mecanismos mediadores de resistencia, los cuales pueden deberse a la transmisión de plásmidos [26].

En conclusión, se encontró que todas las cepas eran productoras de MBLs de tipo VIM, con una marcada diferencia en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos probados, encontrándose patrones característicos para cada una, independientemente del servicio de hospitalización de dónde provenía el aislado. Asimismo, se demostró la diseminación clonal de *P. aeruginosa* productoras de MBLs en los diferentes servicios de hospitalización del Complejo Hospitalario Universitario "Ruiz y Páez", situación que persiste desde el año 2007.

Fuente de financiamiento

Esta investigación fue parcialmente financiada con recursos provenientes del proyecto CI-5-040605-1622-09 del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Venezuela.

Referencias

- Callicó A, Cedré B, Sifontes S, Torres V, Pino Y, Callis A *et al.* Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccimonitor*. 2004; 13:1-9.
- 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.
- Jáuregui L, Jáuregui A. Patógenos hospitalarios y su control. En: Trigo C, Damiani E, Espinoza F, Jáuregui L, editores. *Vigilancia, prevención y control de infecciones asociadas a servicios de salud*. La Paz, Bolivia: Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA), Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia; 2011. p. 771-818.
- Rosales D, Arévalo M. *Pseudomonas aeruginosa*: un problema hospitalario. *Rev Med Ext Portug*. 2008; 2:128-37.
- Salazar P, Araque M, Mosqueda N. Análisis fenotípico y detección del gen *bla_{VIM}* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas aisladas en Mérida, Venezuela. *Rev Fac Farm*. 2010; 52:12-7.
- Sierra C, Guevara E, Guevara A. Actividad *in vitro* de piperacilina-tazobactam en combinación con aminoglucósidos y fluoroquinolonas en *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2011; 31:13-9.
- Mendes R, Costanheira M, García P, Guzmán M, Toleman M, Walsh T *et al.* First isolation of *bla_{VIM-2}* in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1433-4.
- Guevara A, Sierra C, Waard J. Caracterización molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos provenientes de cuatro hospitales de Venezuela. *Rev Chil Infectol*. 2012; 29:614-21.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- 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. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2010; 30:11-7.
- Lee K, Lim Y, Yong D, Yum J, 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; 41:4623-9.
- Pacheco A, Guth B, Soares K, Nishimura L, De Almeida D, Ferreira L. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol*. 2007; 35:1521-5.
- Gales A, Menezes L, Silbert S, Sader H. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52:699-702.
- Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S *et al.* RCP detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2909-13.
- 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; 38:1290-2.
- Iglesias N, Marengo J, Frentería F, Gatti B, Segal E, Semorile L. Tipificación molecular de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Rev Arg Microbiol*. 2008; 40:3-8.
- Cejas D, Almuzara M, Santella G, Tuduri A, Palombarani S, Figueroa S *et al.* Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Rev Arg Microbiol*. 2008; 40:238-45.

18. Sánchez A, Salso S, Culebras E, Picazo J. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Esp Quimioter. 2004; 17:336-40.
19. Gamero M, García A, Rodríguez F, Ibarra A, Casal M. Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. Rev Esp Quimioter. 2007; 20:230-3.
20. Pitout J, Revathi G, Chow B, Kabera B, Kariuki S, Nordmann P *et al.* Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a large tertiary centre in Kenya. Clin Microbiol Infect. 2008; 14:755-9.
21. Ochoa S, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Davila L, López-Martínez B *et al.* Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos asociadas con la formación de biopelículas. Bol Med Hosp Infant Mex. 2013; 70:138-50.
22. Guevara A, Waard J, Araque M. Detección del gen *bla*_{VIM-2} en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas aisladas en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela. Rev Chil Infect. 2009; 26:336-41.
23. Sánchez D, Marcano D, Spandola E, León L, Payares D, Ugarte C *et al.* Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales en Venezuela. Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel". 2008. 39:17-22.
24. Martínez P, Espinal P, Mattar S. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. Infectio. 2007; 11:6-15.
25. Pérez A, García P, Poggi H, Braun S, Castillo C, Roman J *et al.* Presencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem. Rev Med Chile. 2008; 136:423-32.
26. Núñez A. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas. Trabajo de grado para obtener el título de Magister Scientiarum en Diagnostico Bacteriológico. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela; 2009. Disponible en: http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/156/TDE-2011-11-11T10:08:51Z-2219/Publico/nunez_linaires_ana_graciela.pdf. Acceso 18 de enero 2015.