



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL GENERAL “DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA”  
CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”**

**“Detección fenotípica y genotípica de metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente aisladas en el Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza”.**

**Presenta:**

**Alma Estrella Martínez Fernández**

**UMAЕ Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” CMN La Raza.**

**Laboratorio Central. Departamento de Microbiología.**

**Av. Jacarandas y Seris s/n Col. La Raza. Delegación Azcapotzalco.**

**CP: 02990**

**Tel: 57245900 ext 23454**

**e-mail: e\_joskua@hotmail.com**

**Para obtener el grado académico de Médico Especialista en Patología Clínica.**

**Asesor de tesis:**

**QFB. María del Socorro Méndez Tovar.**

**UMAЕ Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” CMN La Raza.**

**Laboratorio Central. Departamento de Microbiología.**

**Av. Jacarandas y Seris s/n Col. La Raza. Delegación Azcapotzalco.**

**CP: 02990**

**Tel: 57245900 ext 23454**

**e-mail: maria.mendezt@imss.gob.mx**

**México DF**

**2012.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud

**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3502  
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, D.F. NORTE

FECHA 03/08/2012

**Q.F.B MARIA DEL SOCORRO MENDEZ TOVAR**

**P R E S E N T E**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**"Detección fenotípica y genotípica de metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) en cepas de Pseudomonas aeruginosa multidrogorresistente aisladas en el Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" del Centro Médico Nacional "La Raza".**

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A\_U\_T\_O\_R\_I\_Z\_A\_D\_O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2012-3502-92

ATENTAMENTE

**DR. JAIME ANTONIO ZALDIVAR CERVERA**  
Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3502

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

**AUTORIZA.**

---

**Dra. Luz Arcelia Campos Navarro.**

**Jefe de la Coordinación de Educación e Investigación en Salud.**

---

**Dra. Ma. Guadalupe Carrillo Montes.**

**Coordinador de la especialidad de Patología Clínica.**

---

**QFB. María del Socorro Méndez Tovar.**

**Titular de tesis.**

## **COASESORES.**

Dra. en C. Rosa María Ribas Jaimes.

Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del  
Instituto Politécnico Nacional.

Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Casco de Santo Tomás.  
Delegación Miguel Hidalgo.

CP: 11340

Tel: 57296000 y 57296300 ext 62384

Fax: 57296207

e-mail: [rribas233@yahoo.com.mx](mailto:rribas233@yahoo.com.mx)

M. en C. Jenny Elizabeth Donis Rocandio.

Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias  
Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n. Col. Casco de Santo Tomás.  
Delegación Miguel Hidalgo.

CP: 11340

Tel: 57296000 y 57296300 ext 62384

Fax: 57296207

e-mail: [jeli\\_do@yahoo.com.mx](mailto:jeli_do@yahoo.com.mx)

## ÍNDICE.

TEMA	Pág.
1. Resumen.	1
2. Marco Teórico.	3
3. Planteamiento del Problema.	13
4. Justificación.	14
5. Objetivos.	
5.1. Objetivo General.	15
5.2. Objetivos Específicos.	15
6. Hipótesis.	15
7. Criterios de Selección.	
7.1. Criterios de Inclusión.	16
7.2. Criterios de Exclusión.	16
7.3. Criterios de Eliminación.	16
8. Variables.	16
9. Material y Métodos.	
9.1. Material.	17
9.2. Métodos.	17
10. Recursos.	24
14. Factibilidad.	25
15. Resultados	25
16. Gráficos y tablas.	25
17. Cronograma de Actividades.	34
18. Anexos.	36
19. Bibliografía.	38

## INDICE DE TABLAS.

Tabla.	Pág.
Tabla 1. Clasificación de $\beta$ -lactamasas.	6
Tabla 2. Variables.	16
Tabla 3. Ejemplos de valores de referencia para detección de metalo- $\beta$ -lactamasas	21
Tabla 4. Secuencia específica de iniciadores y tamaño esperado del amplificado.	23
Tabla 5. Porcentaje de cepas por servicio.	26
Tabla 6. Tipo de aislamientos clínicos de las cepas estudiadas.	27
Tabla 7. Tinción de Gram.	28
Tabla 8. Fermentación.	28
Tabla 9. Producción de pigmento.	29
Tabla 10. Desarrollo a 4°C en CST.	29
Tabla 11. Prueba oxidasa.	30
Tabla 12. Morfología colonial.	30
Tabla 13. Tabla 12. $\beta$ -lactamasas.	31
Tabla 14. Detección fenotípica de metalo- $\beta$ -lactamasas.	31
Tabla 15. Detección genotípica de metalo- $\beta$ -lactamasas.	32
Tabla 16. Relación fenotípica, genotípica y origen.	33

## INDICE DE FIGURAS.

Figura.	Pág.
Figura 1. Modelo tridimensional de MβLs.	.....9
Figura 2. E-test-MBL	.....21
Figura 3. Electroforesis.	.....22
Figura 4. Servicio.	.....27
Figura 5. Aislamientos clínicos.	.....28
Figura 6. Pigmento.	.....29
Figura 7. Desarrollo a 4°C en CST.	.....30
Figura 8. Morfología colonial.	.....30
Figura 9. β-lacamasas.	.....31
Figura 10. Detección fenotípica de MβLs.	.....32
Figura 11. Porcentaje de genes positivos.	.....32
Figura 12. IMP	.....34
Figura 13. VIM	.....34
Figura 14. SPM	.....34
Figura 15. GIM	.....34
Figura 16. SIM	.....34

## RESUMEN.

**Antecedentes.** Durante el 2005 en 6 hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México, se encontró que el 86% de las cepas bacterianas estudiadas, correspondientes a 19 géneros identificados, fueron resistentes por lo menos a un grupo de antibióticos; en primer lugar a cefalosporinas, seguido de  $\beta$ -lactámicos y carbapenémicos, éstos últimos, utilizados como última línea terapéutica en infecciones severas. *Pseudomonas* predominó en el grupo de las bacterias Gram negativas, siendo el 50% panresistente. Otros estudios, afirman que éste género, ocupa la cuarta parte de la totalidad de las cepas bacterianas multidrogosresistentes; Por lo que el adquirir una infección, por dicho microorganismo, implica un aumento de la morbimortalidad, incremento de la estancia intrahospitalaria y la necesidad de antibióticos más agresivos. En el Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico “La Raza” del IMSS, *P. aeruginosa* fue el agente etiológico en 12.8% de las infecciones nosocomiales durante el 2010. Reportándose además, que un total de 917 pacientes con infección nosocomial, representó una sobrestancia del 10,588 días, con un costo de \$ 147,956,245.00; siendo la mayor proporción, por atención en Unidades de Cuidados Intensivos. La disminución de la sensibilidad a antibióticos por parte de *P. aeruginosa*, ha conducido al estudio de sus mecanismos de resistencia, reportándose que la producción de metalo- $\beta$ -lactamasas representa uno de los más importantes por su capacidad de hidrolizar a los carbapenémicos.

**Objetivos:** Identificar y determinar mediante técnicas fenotípicas y genotípicas las metalo- $\beta$ -lactamasas involucradas en la resistencia a antibióticos en cepas de *P. aeruginosa* multidrogosresistente procedentes del Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza” en el periodo 2011-2012.

**Metodología:** Se recabarán y seleccionarán las cepas identificadas como *P. aeruginosa* que presenten multidrogosresistencia a través del antibiograma realizado en el sistema Vitek 2<sup>®</sup>; pruebas convencionales para corroborar género y

especie, test de susceptibilidad a doripenem mediante E-test-Dori® y detección fenotípica de metalo- $\beta$ -lactamasas mediante E-test MBL/EDTA (Biomérieux®). Se realizará extracción de DNA genómico y plasmídico de las cepas de estudio y se investigarán los genes *blaVIM*, *blaIMP*, *blaGIM*, *blaSMP* y *blaSIM*, que codifican para metalo- $\beta$ -lactamasas por medio de iniciadores específicos para su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Factibilidad.** El hospital del cual serán obtenidas las cepas cuenta con el recurso humano capacitado para su manipulación, así como con la infraestructura necesaria de los utensilios y equipos para su desarrollo.

## MARCO TEÓRICO.

### *Pseudomonas aeruginosa.*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, móvil, flagelado, aerobio estricto, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Importante patógeno oportunista. Tiene forma de bastón con un tamaño de 1.5 a 3  $\mu\text{m}$  y produce pigmentos fluorescentes difusibles que incluyen la pioverdina (fluoresceína), un pigmento fenazídico soluble llamado piocianina el cual es producido por más del 50% de los aislamientos clínicos, apareciendo de color verde o azul a pH neutro o alcalino, lo que da origen al nombre de la especie *aeruginosa* (palabra latina que denota el color del óxido de cobre). Otros pigmentos que presenta *P. aeruginosa* con menor frecuencia son la piorrubina (rojo) y la piomelanina (marrón-negro). *P. aeruginosa* es capaz de utilizar un gran número de compuestos orgánicos para su desarrollo, logrando sobrevivir en ambientes muy desfavorables. Su temperatura de crecimiento óptima es de 37°, aunque puede crecer a 42°C, lo que la diferencia de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*. Produce hemolisinas, adhesinas, endotoxinas y exotoxinas hidrolíticas, las cuales son factores de virulencia de este patógeno. Posee resistencia intrínseca a una amplia variedad de agentes antimicrobianos lo que favorece su resistencia en ambientes intrahospitalarios. Se encuentra distribuido en aguas, suelo y plantas, sin embargo, rara vez forma parte de la flora normal del humano (1,2,3).

### Epidemiología.

A pesar de los factores de virulencia mencionados, *P. aeruginosa*, sigue siendo un patógeno oportunista que necesita que las defensas del huésped estén comprometidas para causar infección. En las personas sanas, la infección suele asociarse con situaciones que alteran o superan la protección representada por la epidermis (quemaduras, heridas punzantes, uso de agujas contaminadas en adictos usuarios de drogas intravenosas, traumatismos oculares causados por lentes de contacto, entre otros) con el resultado de infecciones en la piel, los huesos, el corazón o los ojos. En los pacientes con fibrosis quística, este patógeno

tiene predilección por las vías respiratorias, ocasionando compromiso grave y frecuentemente la muerte (3,4). Se calcula que de las infecciones nosocomiales (IN), las infecciones por *P. aeruginosa* constituyen alrededor del 5%, encontrándose de manera predominante en salas de Cuidados Intensivos, donde del 5-10% de los pacientes que ingresan adquieren una IN; quirófanos, áreas de quemados y de inmunocomprometidos (pacientes oncológicos en quimioterapia, SIDA, etc.) (5).

En el Hospital General CMN La Raza, durante el 2010 se encontró que *P. aeruginosa* fue el agente etiológico en 12.8% (96 casos), de las infecciones nosocomiales (IN) (4); 7.8% mayor que lo reportado en el Hospital de Infectología del mismo centro durante el 2006 (5), localizándose en ambos hospitales en los servicios críticos como las unidades de cuidados intensivos, cirugía, transplantes (4,6); además de presentarse en infecciones diversas de pacientes inmunocomprometidos, así como los no hospitalizados, los cuales han tenido contacto con medicamentos como fluoroquinolonas (7).

#### Factores de Riesgo.

Dentro de los factores de riesgo reportados para la adquisición de una infección por *P. aeruginosa* potencialmente mortal se encuentran: tratamiento inicial empírico inadecuado o tratamientos prolongados, pacientes inmunocomprometidos con una cuenta de neutrófilos totales menor de 200/ml, comorbilidades como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el antecedente de ventilación mecánica, hemodiálisis, fibrobroncoscopia, fracturas de fémur con prótesis articular, enfermedades de gravedad como sepsis y neumonía, así como aumento en la puntuación de gravedad APACHE II (7,8,9,10,11).

## Mecanismos de Resistencia a Antibióticos.

Sumado a las características intrínsecas de *P. aeruginosa* hacia diferentes antibióticos, ésta tiene la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia hacia nuevos fármacos a los que previamente tenía susceptibilidad, mediante mutaciones o adquisición de nuevos genes. Dentro de los que se encuentran: escasa permeabilidad de la membrana externa por pérdida de porinas OprD transmembranales; presencia de bombas de expulsión, sobre todo MexAB-OprM, con capacidad de expulsar antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetoprim, así como resistencia a imipenem y escaso efecto de meropenem; modificación del sitio de unión al antibiótico, modificación de rutas metabólicas internas; producción de  $\beta$ -lactamasas cromosomales del tipo AmpC con la consecuente disminución de la susceptibilidad a penicilinas y cefalosporinas. Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), son otro tipo de enzimas que también hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico, sin embargo su codificación radica principalmente en genes transferidos por plásmidos, siendo las más frecuentes la PSE-1 (que confiere franca resistencia a ceftazidima pero que pierde su poder al adicionar clavulanato) y PSE-4. Otras BLEE como TEM, SHV y OXA generan resistencia a monobactámicos, penicilinas y cefalosporinas, pero no a los carbapenémicos; y enzimas que hidrolizan los carbapenémicos como imipenem y meropenem, sin afectar el aztreonam, llamadas carbapenemasas, las cuales son motivo del presente estudio. Aunque es difícil encontrar todos los mecanismos presentes en una sola cepa, no es imposible, ya que se han observado combinaciones de éstos en cepas de *P. aeruginosa* multidrogorresistentes (PAMDR), (12,13,14,15,16,17,18,19).

## Betalactamasas tipo carbapenemasas.

Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan todos los antibióticos betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas y a los carbapenémicos. Para ser activadas necesitan de un ión metálico o de un grupo serina (20).

Según la clasificación de Ambler, se pueden estructurar en tres grupos: clase A (grupo 2f de Bush-Jacoby-Medeiros –BJM–), dependientes de serina e inhibidas parcialmente por ácido clavulánico, inducibles, no transferibles; clase B (grupo 3 de BJM), dependientes de zinc, inhibidas por EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) llamadas metalo- $\beta$ -lactamasas, esencialmente las enzimas del grupo 3a de BJM poseen un amplio espectro de actividad, el grupo 3b tiene afección preferencial por los carbapenemes y el grupo 3c tiene actividad pobre ante los carbapenemicos, todas inducibles o asociadas a plásmidos conjugativos; y clase C, oxacilinasas, las cuales han sido caracterizadas principalmente en *Acinetobacter baumannii* (Tabla 1), (20, 21, 22).

Tabla 1. Clasificación de  $\beta$ -lactamasas.

Clasificación de BUSH-JACOBY-MEDEYROS, 1995		Clasificación de AMBLER, 1989.	de	Características funcionales.
Grupo funcional.	Subgrupos.	Clase Molecular		
1.		C.		Las enzimas cromosómicas y plasmidales confieren resistencia a los $\beta$ -lactámicos, excepto a los carbapenémicos. Ellas no son inhibidas por ácido clavulánico.
2.		A,D.		La gran mayoría de las enzimas son inhibidas por ácido clavulánico.
	2 a.	A.		Penicilinasas producidas por <i>Staphylococcus</i> spp. y <i>Enterococcus</i> spp. confieren un alto nivel de resistencia a la penicilina.
	2 b.	A.		$\beta$ -lactamasas de espectro reducido en bacterias Gram-negativas. Incluye TEM-1 y SHV-1.
	2 be.	A.		$\beta$ -lactamasas de espectro extendido, confieren resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y monobactamas.
	2 br.	A.		$\beta$ -lactamasas derivados de la enzima TEM resistente a los inhibidores de $\beta$ -lactamasas (IRT)
	2 c.	A.		Enzimas que hidrolizan carbencilina.
	2 d.	D.		Enzimas que hidrolizan la cloxacilina (oxacilina), poco inhibidas por ácido clavulánico.
	2 e.	A.		Cefalosporinasas inhibidas por ácido clavulánico.
3	3 a, 3 b, 3 c.	B.		Metallo- $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a los carbapenémicos y todos los demás $\beta$ -lactámicos, con la excepción de los monobactamas. Ellas no son inhibidas por ácido clavulánico.
4		ND.		Enzimas no secuenciadas y que no son incluidas en otros grupos.

Metalo- $\beta$ -lactamasas (M- $\beta$ LS).

La primera metalo- $\beta$ -lactamasa fue aislada en Japón en 1991 y se encontró que estaba codificada por un gen presente en un plásmido de *P. aeruginosa* y para 1996 estaba diseminada por todo ese país. Posteriormente, aparecieron en el Continente Europeo, siendo de los primeros países donde se identificó Italia y España; en Latinoamérica se han detectado en Brasil, Argentina, Venezuela, Uruguay, Costa Rica y México (22, 23, 24).

La detección de metalo- $\beta$ -lactamasas por los diferentes métodos tanto fenotípicos como genotípicos a nivel mundial ha ido en aumento, su búsqueda ha sido motivada por el incremento de las resistencias mostradas a través de las distintas técnicas de sensibilidad y en la respuesta clínica de los pacientes.

Así, desde el descubrimiento de estas enzimas, diferentes ensayos se han realizado en varios países para su detección, identificándose una tendencia cronológica de presentación a la alza. En un estudio en Noruega y Suecia que abarcó desde el año 1999 al 2007, se detectaron solo 13 aislamientos de *P. aeruginosa* con producción de metalo- $\beta$ -lactamasas en un periodo de 8 años.(28) En España en el 2004 se obtuvieron 133 cepas procedentes de aislamientos clínicos, de las cuales 4 fueron productores de metalo- $\beta$ -lactamasas, detectándose genes tipo VIM (21). En este mismo país, a finales del 2007, de 236 aislamientos, solo uno fue productor de la enzima, identificándose el gen *blaVIM-2* en plásmidos. (30) En Colombia 2007 se ha detectado que aproximadamente el 11.5% de las *Pseudomonas* son resistentes a carbapenémicos (32). Hacia el 2008, en Venezuela, de 9 cepas de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* MDR, se demostró que el 100% eran productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas, siendo la totalidad de la familia VIM. (24) Esta incidencia se ha incrementado a lo largo de los años, incluyendo nuevas variantes de los genes ya conocidos, así, en Grecia en el 2009 de 29 aislamientos, 14 fueron productores de metalo- $\beta$ -lactamasas, de los cuales 13 se asociaron con una variante del gen *blaVIM-2* llamado *blaVIM-17* y sólo 1 a *blaVIM-2*. (27) Mientras que hay territorios en los que el aislamiento de cepas productoras de M $\beta$ L es todavía algo excepcional, en otros es ya un problema endémico de proporciones enormes. Entre estos últimos, atendiendo a

los datos disponibles, quizá sea Brasil uno de los ejemplos más extremos. Según muestran los datos del estudio SENTRY, cerca de la mitad de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de los hospitales brasileños son resistentes al imipenem, siendo casi la mitad de ellas productoras de M $\beta$ L, hecho alarmante considerando la migración de sudamericanos y centroamericanos a los Estados Unidos y su paso inminente por nuestro país. (23) Cifras preocupantes son las de algunos estudios, donde afirman que aproximadamente el 30% del total de *P. aeruginosa* son productoras de M $\beta$ L (20).

En México, la detección de M $\beta$ L es algo inusual, sin embargo se ha reportado resistencia de 58 y 60% de los aislamientos a imipenem y meropenem respectivamente, por lo que la presencia de estas enzimas podría justificar dicha resistencia y la búsqueda intencionada de las mismas otorgaría una herramienta pronóstica y terapéutica al clínico en el momento del hallazgo, así como posteriormente, la elaboración de programas que permitan prevenir brotes hospitalarios causados por estas clonas y la transmisión de este peligroso mecanismo de resistencia. (15)

Las metalo- $\beta$ -lactamasas, incluidas en el grupo B de Ambler y 3a de BJM, son transferibles, puesto que su gran mayoría se encuentran en genes o casetes localizados principalmente en integrones tipo 1 y, en algunas ocasiones, se encuentran en plásmidos o transposones. Habitualmente, estas enzimas están asociadas con otros genes de resistencia ubicados en los mismos elementos genéticos, lo cual les permite ser resistentes a varios antibióticos (22).

Las M- $\beta$ Ls químicamente son hidrolasas, formadas por subdominios, cada uno separado por una  $\alpha$  hoja y un par de hélices que caen hacia el exterior de cada una de ellas. Cada subdominio está dividido en dos sectores, el primer subdominio está formado por los sectores 1 y 2, el primer sector es muy conservado y está tipificado por una  $\alpha$  hoja que contiene un aspartato terminal. Este aspartato participa en la estabilización de las cargas positivas entre los dos sectores. El segundo sector es el más característico de la familia de las metaloenzimas, con actividad glioxilasa alfa-lactamasa: este sector tiene una estructura HxHxDH,

donde la primera H corresponde a un aspartato que se mantiene invariable entre todos los miembros activos de esta familia; la segunda H es remplazada por residuos ácidos en varios miembros de las flavoproteínas; mientras que la tercera H es remplazada por la arginina en las  $\alpha$ -lactamasas típicas, en este segundo sector se encuentra el sitio activo en el cual se produce la reacción de hidrólisis, formado por el zinc, estabilizado por dos histidinas y fuertemente protegidas por una estructura muy conservada de aspartato. El segundo subdominio está formado por los sectores 3 y 4, el sector 3 se caracteriza por la presencia de una histidina, la cual actúa como ligando coordinador del zinc, sosteniéndolo en el sitio activo. El sector 4 es muy parecido al sector 3, presenta una histidina unida, asociada a un nitrógeno terminal, la histidina protege al sitio activo, con actividad  $\alpha$ -lactamasa, además de interactuar con cargas negativas del sustrato (Figura 1).

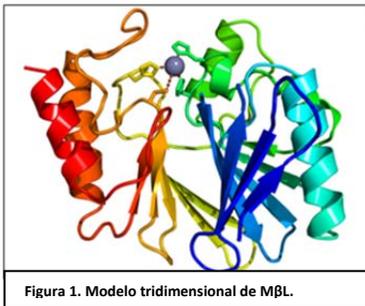


Figura 1. Modelo tridimensional de MβL.

Además de metalo- $\beta$ -lactamasas que escinden el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico, la superfamilia de metalo- $\beta$ -lactamasa incluye enzimas que hidrolizan tior-éster, fosfodiéster y enlaces éster sulfúrico, así como oxidoreductasas. La mayoría de

los 6.000 miembros de esta superfamilia de los cinco motivos conservados. Todos ellos presentan una  $\alpha\beta\beta\alpha$  a veces, similar a la encontrada en la estructura de zinc  $\beta$ -lactamasas. Muchos miembros de esta superfamilia están involucrados en la maduración del ARNm y la reparación del ADN. Este hecho sugiere la hipótesis de que metalo- $\beta$ -lactamasas pueden ser el resultado de la evolución divergente a partir de una proteína ancestral que no tenía una actividad  $\beta$ -lactamasa. (25)

Con base a la secuencia de aminoácidos, las M- $\beta$ Ls se clasifican en cuatro familias: IMP, VIM, SPM y GIM. La familia IMP fue encontrada por primera vez en Japón, en un aislamiento de *S. maltophila* y hasta la fecha se han descrito 18 variantes. Habitualmente son reportadas en *P. aeruginosa* y *Serratia* sp. Las M- $\beta$ Ls pertenecientes a la familia IMP se distinguen por presentar altos niveles de

resistencia a imipenem y la hidrólisis de meropenem es mayor en presencia de IMP. (26)

La M-βLs tipo VIM fue descrita por primera vez en 1999 en Europa, esta familia se ha detectado en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* sp.; posteriormente la variante VIM-2 fue descrita en Corea en aislamientos de *Serratia marcescens* y *Acinetobacter* sp., a partir de esto se han descrito cinco variantes más: VIM-3 que se describe por primera vez en Taiwan en aislamientos de *P. putida* y *P. stutzeri*, VIM-4 en *P. aeruginosa*, VIM-5 identificada en Grecia en *K. pneumoniae*; y recientemente , VIM-6 encontrada en *E.coli* y VIM-7 encontrada en *P. aeruginosa* en Estados Unidos. Hasta el momento se han descrito 34 variantes VIM. La diseminación de esta familia en Latinoamérica fue posterior a los hallazgos encontrados en Europa y Este de Asia. (26,27)

El grupo SPM demuestra un perfil de hidrólisis único, ya que mantiene una cinética constante ante la presencia de betalactámicos, e inhibidores de betalactamasas. Hasta el momento se describen dos variantes: SPM-1 y SPM-2, éstas difieren del grupo IMP y VIM por presentar un intervalo de hidrólisis mayor, ante la presencia de penicilina y ampicilina, además de exhibir una catálisis disminuida para carbencilinas; así mismo, el grupo SPM es capaz de hidrolizar ticarcilina. (26)

Por su parte GIM-1, fue encontrada en un brote intrahospitalario causado por *P. aeruginosa* en un hospital de Alemania. Esta familia presenta una relación estrecha con la variante IMP-1, mostrando un 40% de identidad con la secuencia de aminoácidos de IMP-1. GIM-1 al igual que IMP-1, hidroliza preferentemente ampicilina y penicilina, comparado con carbencilinas y ticarcilina; sin embargo a diferencia de IMP-1, GIM-1 presenta una actividad enzimática mayor en presencia de cefoxitina y cefalotina, además de mostrar una elevada afinidad catalítica para imipenem y meropenem. (26)

La presencia de M-βLs es diferente en cada región del mundo, asociándose en gran medida al uso indiscriminado de antibióticos o tratamientos iniciales inadecuados; sin embargo en países donde el uso farmacológico de antibióticos de amplio espectro es racional, como Noruega y Suecia, se ha visto un aumento de la detección de M-βLs, atribuyéndose esto, en parte a su importación clonal

internacional, sin dejar de lado la responsabilidad del equipo de salud en cuanto a medidas de higiene. (28,29) Siendo causante de brotes en España. (30) En algunas poblaciones susceptibles, como en grupos con Fibrosis Quística y quemados, se han publicado brotes de una sola clona en Inglaterra y Estados Unidos. (31) En Latinoamérica su detección ha sido menor probablemente al coste de los estudios de tamizaje y biología molecular; sin embargo, actualmente se han reportado brotes en Centro y Sudamérica, lo que ha causado gran interés en la detección de estas enzimas en pacientes con factores de riesgo. (32)

#### Detección de M-βLs.

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), no tiene al momento ningún procedimiento estandarizado para detección de M-βLs, sin embargo algunos autores han descrito técnicas que pueden facilitar la detección de estas enzimas por laboratorio:

#### E-test para la detección de M-βLs.

Utilizando una tira de E-Test impregnada en un extremo con imipenem en el otro extremo con imipenem-EDTA. Se sigue el mismo procedimiento estandarizado por CLSI para la técnica de difusión en disco. Esta prueba tiene algunas limitaciones porque no detecta MBLs de todos los miembros de la familia de las Enterobacteriaceae y puede dar falsos positivos en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Una reducción de la CIM  $\geq 3$  diluciones en presencia de EDTA es interpretado como sugestivo de producción de MBLs. La presencia de una zona fantasma entre los dos gradientes ó deformación en la elipse de imipenem es también considerado indicativo de presencia de MBLs. Este método ha sido ampliamente utilizado, sin embargo se han reportado incongruencias del fenotipo con el genotipo, lo que deja a decisión del clínico utilizar este método como único, por lo que se recomienda su caracterización mediante técnicas de biología molecular. (33, 34, 35, 36)

### Prueba de Sinergismo.

Teniendo en cuenta la capacidad de los quelantes para interactuar con el Zn del sitio activo, muchos ensayos fenotípicos han sido empleados en la detección de MBLs; sin embargo ningún método ha sido lo suficientemente estandarizado.

Esta técnica se basa en el método de difusión en disco, se realiza una suspensión de la bacteria sobre el Agar Mueller Hinton, se colocan dos discos de imipenem y dos de meropenem de 10µg, se adiciona EDTA sobre uno de los disco de imipenem y de meropenem. La presencia de una zona sinérgica de inhibición o agrandamiento de diámetro en el halo de inhibición del disco del antibiótico hacia el disco con inhibidores es considerada positiva. Las pruebas que involucran varios agentes quelantes como EDTA y MPA han tenido una buena sensibilidad debido a que los quelantes son inhibidores específicos de MβLs; no siempre un solo agente quelante puede no inhibir todas las MβLs en ciertos patógenos, haciendo necesario el uso de una mezcla de quelantes para una confiable detección. Esta técnica ha sido validada con *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp*, mientras que es más limitada para Enterobacterias y bacterias Gram negativas. (33, 34, 37)

### Detección Molecular de MBLs.

Las pruebas fenotípicas nos permiten determinar la presencia de carbapenemasas tipo metaloenzimas, para establecer que familia de carbapenemasas clase B que posee el aislamiento es necesario utilizar PCR. Actualmente existen ensayos de PCR multiplex que nos permiten la detección de *blaVIM* y *blaIMP* que son las familias mas frecuentemente encontradas, sin embargo se pueden evaluar las otras familias a través de PCR simple. Se utilizan iniciadores de amplificación para los genes codificantes de MβLs como IMP, VIM, SPM, GIM y SIM.(38)

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

*P. aeruginosa* se ha colocado como uno de los principales patógenos multidrogosresistentes dentro de las IN, oportunistas y pacientes multitratados en los hospitales de tercer nivel. En el hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Medico Nacional La Raza, en donde un 90% de la población derechohabiente es pediátrica, y que cuenta con especialidades como: Hematología, Oncología, Neumología, Unidades de Cuidados Intensivos así como unidad de Trasplantes y Cirugía Cardiotorácica; en las diversas muestras enviadas al laboratorio de microbiología, provenientes de estos pacientes, se han detectado *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multidrogosresistente. Esto debido a la gran variedad de mecanismos de resistencia a antibióticos; relacionados al uso indiscriminado de antibióticos, motivo por el cual en mayo del 2010, en México, posterior a la epidemia de influenza A (AH1N1), de conformidad con lo dispuesto en los artículos 31 y 32 del Reglamento de Insumos para la Salud, se estableció que la dispensación de antibióticos debe llevarse a cabo única y exclusivamente con la exhibición de receta médica extendida por los profesionales de la salud autorizados. Así mismo, la presión selectiva ambiental, realizada por antisépticos y desinfectantes, ha generado una supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de algunos agentes; lo que ha provocado una disminución de la sensibilidad a gran cantidad de antibióticos, incluidos los carbapenémicos, los cuales son usados como anti-pseudomonales de última línea para infecciones severas. La producción de las metalo- $\beta$ -lactamasas se ha relacionado de manera directa con dicha resistencia, sin embargo, éste mecanismo aún no es reportado por los métodos convencionales de identificación automatizados, por lo que el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), desarrolló una técnica manual para evidenciarlas de manera fenotípica mediante sensidiscos. Además, estudios a nivel mundial consideran la PCR como el método de elección para demostrar la presencia de los genes responsables de la codificación de éstas enzimas.

Debido a que es un grave problema cuando el paciente tiene *P. aeruginosa* implicada en su patología, es de suma importancia la orientación del laboratorio de Microbiología con respecto a los mecanismos de resistencia presentes en este tipo de cepas multidrogoresistentes, siendo uno de los más importantes la producción de metalo- $\beta$ -lactamasas por lo que se requiere investigar si estas clonas de *Pseudomonas* tienen dicho mecanismo, aportando con esto la orientación terapéutica oportuna para el médico tratante, lo cual se verá reflejado en una disminución en los días de tratamiento, así como en la estancia intrahospitalaria; evitando la aparición de brotes causados por estos microorganismos.

## **JUSTIFICACIÓN.**

En la mayoría de los hospitales, uno de los microorganismos más comunes es *P. aeruginosa*, que presenta un marcado incremento en la resistencia a los antimicrobianos, convirtiéndose en un problema grave de salud por su relación con las infecciones nosocomiales. En los servicios de UCI, oncohematología, por mencionar algunos, donde los pacientes permanecen internados durante largos periodos de tiempo, sujetándose a maniobras invasivas, tratamientos inmunosupresores, antineoplásicos, con múltiples esquemas antimicrobianos y que desarrollan una infección causada por *P. aeruginosa*, se ha observado una baja respuesta a los tratamientos con antipseudomonales, incluso a carbapenémicos, los cuales se utilizan como último recurso en las infecciones severas. Para explicar la causa del difícil manejo de este microorganismo, se han estudiado los posibles mecanismos que hacen más complejo su tratamiento, encontrando una relación con la producción de la enzima metalo- $\beta$ -lactamasa.

En el Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional la Raza, durante el año 2010 *Pseudomonas aeruginosa* se encontró como agente etiológico de 96 casos de infecciones nosocomiales, siendo responsable del 17% de las muertes; dando como resultado una alta tasa de morbimortalidad y costos excesivos. Es de vital importancia identificar la presencia de este mecanismo de resistencia en las muestras provenientes de aislamientos

clínicos de pacientes de este hospital, recibidas en el laboratorio de microbiología; para evitar el uso indiscriminado de los antibióticos, establecer medidas que disminuyan su diseminación, así como otorgar una terapéutica oportuna y eficaz; lo cual se verá reflejado en una disminución en los costos y mejor calidad de la atención.

### **OBJETIVO GENERAL.**

Identificar y determinar mediante técnicas fenotípicas y genotípicas las metalo- $\beta$ -lactamasas involucradas en la resistencia a antibióticos en cepas de *P. aeruginosa* multidrogoresistentes aisladas en el Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza” durante el periodo 2011-2012.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Obtener y seleccionar aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* multidrogoresistentes.
2. Determinar fenotípicamente en qué aislamientos clínicos la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos está mediada por metalo- $\beta$ -lactamasas.
3. Identificar la presencia de los genes *blaVIM*, *blaIMP*, *blaGIM*, *blaSMP* que codifican para las metalo- $\beta$ -lactamasas.

### **HIPÓTESIS.**

La multidrogoresistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas de los aislamientos clínicos del Hospital General “Dr Gaudencio González Garza” del CMN La Raza podría ser debida a la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN.

- a) **INCLUSIÓN.** Cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras biológicas con resistencia o sensibilidad intermedia a carbapenémicos, incluyendo imipenem, ertapenem, meropenem o doripenem.
- b) **EXCLUSIÓN.** Cepas de *P. aeruginosa* con antibiograma incompleto.
- c) **ELIMINACIÓN.** Muerte de la cepa. Pérdida de las características de resistencia posterior a conservación. Contaminación por otros agentes.

**Tabla 2. VARIABLES.**

Variable	Interrelación.	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala de Medición	Indicador	Unidad de Medición
<i>P. aeruginosa</i> multidrogorresistente.	Independiente.	Cepa que es capaz de multiplicarse en presencia de concentraciones mayores que las alcanzadas con dosis terapéuticas para más de 3 grupos de antibióticos.	Susceptibilidad menor a lo estipulado por el CLSI para cada uno de los agentes antimicrobianos contenidos en el antibiograma descrito en el inserto de manufactura del equipo Vitek 2 (Biomérieux)	Cualitativa Ordinal.	Intermedio. Resistente.	Sensible. Intermedio. Resistente.
Genes codificantes de metalo-β-lactamasas.  <i>blaVIM</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaGIM</i> , <i>blaSMP</i>	Dependiente.	Secuencia de nucleótidos de DNA que codifican para la enzima metal-β-lactamasa.  <i>blaVIM</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaGIM</i> , <i>blaSMP</i>	Amplificación de los genes en estudio y regiones conservadas mediante PCR.	Cualitativa dicotómica.	<i>blaVIM</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaGIM</i> , <i>blaSMP</i>	Presente o ausente.
<i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenemes.	Dependiente.	Cepa que precise más de 4 µg/ml de imipenem, meropenem, ertapenem o doripenem para inhibir su crecimiento.	Susceptibilidad menor a lo estipulado por el CLSI para imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem descritos en el inserto de manufactura del equipo Vitek 2 (Biomérieux) y según inserto de E-test Doripenem (Biomérieux)	Cualitativa ordinal.	CMI µg/ml R >16 I 8 S < 4	Sensible. Intermedio. Resistente.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Estudio transversal, descriptivo, analítico.

**Material.** Bibliografía impresa y electrónica. Cepas procedentes de aislamientos clínicos de pacientes hospitalizados en el Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza”. Sistema de identificación bacteriana y antibiograma Vitek-2 (BioMérieux®), Medios de cultivo: Agar Mueller-Hinton, Soya Trypticaseína, MacConkey, Cetrimida, Luria, *Pseudomonas*, caldo Soya Trypticasina, Luria, LB-Glicerol. Kits con los que se realizó pruebas de Oxidasa y Tinción de Gram (Becton Dickinson ®). Tiras E-test-Doripenem y MBL/EDTA (BioMérieux®). Disco de detección de enzimas  $\beta$ -lactamasas (BioRad®), Kits de extracción de ADN (ZymoResearch™). Iniciadores específicos de los genes *blaIMP*, *blaVIM*, *blaSPM*, *blaGIM* y *blaSIM*. Sistema de electroforesis y fotodocumentador con transiluminador de luz UV. Lap-top.

### Métodos.

1. Obtención de cepas. Se recuperaron cepas procedentes de aislamientos clínicos (ej: urocultivo, expectoración, lavado bronquial, hemocultivo, punta de catéter, biopsias, entre otros) las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología del Hospital General CMN “La Raza”, que durante su análisis se identificaron por medio del equipo Vitek 2 (Biomeieux®) como *P. aeruginosa* y el antibiograma mostró resistencia a carbapenémicos y a dos grupos más de antibióticos.
2. Aplicación de E-test Doripenem (Biomerieux®). Se realizó una suspensión de la colonia en agua destilada, ajustando la turbidez al estándar 0.5 McFarland y utilizando agar Muller Hilton (Biomerieux®), se sembró de manera homogénea con un hisopo estéril en toda la superficie del agar y se dejó secar. Posteriormente se colocó la tira o “epsilómetro” en

el medio del agar y se incubó en una estufa a 37°C durante 18 h. Se leyó la CIM, donde la elipse del crecimiento microbiano interceptó la escala de concentración de la tira.

3. Siembra en Caldo de Soya Trypticaseína (CST). Se colocó el inóculo tomado directamente del agar inicial de recuperación en un tubo con 4 ml de CST formulado según los criterios del fabricante (AMRESCO®), en agitación a 37°C durante 24 h y se observó desarrollo en base a la turbidez del medio.
4. Conservación en LB-Glicerol. Se colocó el contenido del tubo con CST en tubos ependorff de 1.5 ml previamente rotulados y se centrifugó a 13,000 rpm durante 6 minutos, decantándose el sobrenadante; el proceso se repitió hasta agotar la totalidad del medio contenido en el tubo de CST inicial. Se colocó 1 ml de LB-Glicerol (ver preparación en anexo 1), el botón o *pellet* se desprendió del fondo del tubo mediante golpecillos gentiles para posteriormente homogeneizarlo y colocarlo a -70°C.
5. Pruebas de identificación y vitalidad post-congelación. Se extrajeron los viales y se descongelaron lentamente en hielo, homogeneizándolos suavemente para sembrar las cepas en:
  - a) Agar Luria. Preparado previamente de acuerdo a indicaciones del fabricante (Invitrogen®) y cumpliendo con los criterios del CLSI. Se tomó con un asa calibrada de 10 µl el inóculo del vial y se sembró mediante estría cruzada. Se incubó a 37°C durante 24 h, posterior esto, se realizó lectura del desarrollo obtenido y descripción de morfología colonial.
  - b) Agar Cetrimida. Se realizó medio de cultivo según fabricante (BioRad®). Posterior al crecimiento en agar Luria se procedió a tomar una colonia de este con un asa calibrada a 10 µl y se sembró

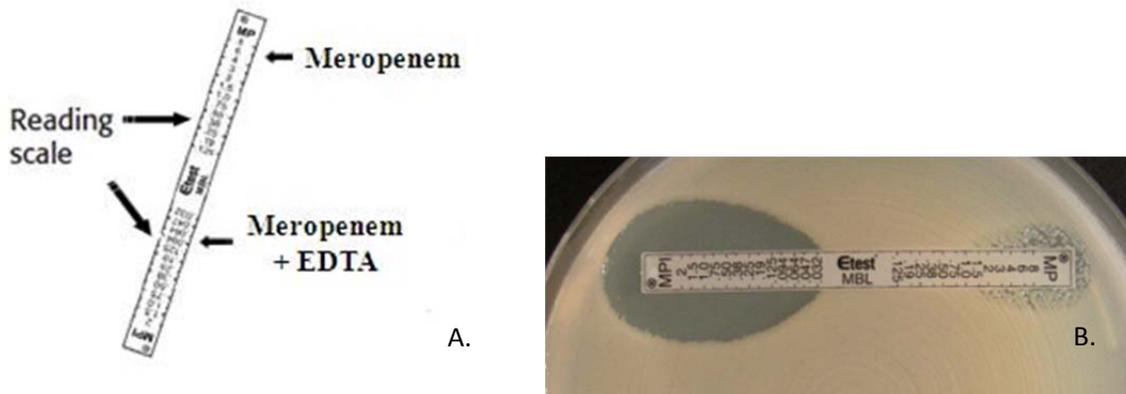
en agar cetrimida mediante estría cruzada. Se incubó a 37°C durante 24 h, posterior estas se realizó lectura del desarrollo obtenido, descripción de morfología colonial y evidencia de producción de pioscianina observando el color verde característico.

- c) Agar MacConkey. Se preparó medio de cultivo según disposiciones del fabricante (DIBICO®). De la misma forma que el anterior, posterior al crecimiento en agar Luria se procedió a tomar una colonia de este con un asa calibrada a 10 µl y se sembró en el agar mediante estría cruzada. Se incubó a 37°C durante 24 h, posteriormente se realizó lectura del desarrollo obtenido, descripción de morfología colonial y la conservación de las características físicas del medio que otorga el señalamiento de un microorganismo no fermentador.
- d) Caldo de Soya Trypticaseína (CST) 4°C. Con un asa calibrada a 10 µl se tomó una colonia del desarrollo obtenido de agar luria y se introdujo en los 3 ml de CST contenidos en el tubo, colocándolo inmediatamente de su siembra en hielo para su posterior refrigeración a 4°C durante 24 h; su crecimiento posterior, se evaluó según la turbidez del medio; su desarrollo a esta temperatura fué indicador de *P. aeruginosa*.
- e) Tinción de Gram. Se realizó según inserto del Kit de Bio-Rad®. Posteriormente se observará al microscopio electrónico con el objetivo 100x determinado la característica de Bacilo Gram Negativo.
- f) Prueba de Oxidasa. Se realizó prueba según inserto de la casa comercial Becton Dickinson®. Se determinó la producción de oxidasa característico de la especie, tomando como positivo la aparición de un tinte azul marino a púrpura en el papel filtro impregnado del reactivo en combinación con la cepa.

Para todos los medios de cultivos mencionados, se colocó un control negativo.

6. Siembra en Caldo de Soya Tripticaseína (CST). Se colocó el inóculo tomado directamente del agar ceftrimida en un tubo con 10 ml de CST formulado según los criterios del fabricante, en agitación a 37°C durante 24 h. y se observó desarrollo en base a la turbidez del medio.
7. Conservación en LB-Glicerol. Se colocó el contenido del tubo con CST en tubos ependorff de 1.5 ml previamente rotulados y se centrifugará a 13,000 rpm durante 6 minutos y se decantó el sobrenadante; el proceso se repitió hasta agotar la totalidad del medio contenido en el tubo. Se colocó 1 ml de LB-Glicerol preparado según casa comercial, el botón o *pellet* se desprendió del fondo del tubo mediante golpecillos gentiles para posteriormente homogeneizar y colocar a -70°C.
8. Detección de  $\beta$ -lactamasas (Discos Cefinase Becton Dickinson®). Utilizando un dispensador para un solo disco, se tomaron el número necesario de discos a utilizar y se colocaron en una caja de Petri estéril. Posteriormente se humedecieron los discos con solución inyectable estéril. Con el asa estéril, se colocó una o varias colonias en el disco. Se observó cambio de color. Se interpretó como positivo un cambio de color de amarillo a rojo en el área donde se aplicó el cultivo.
9. Detección de metalo- $\beta$ -lactamasas mediante E-test. Se emulsionaron varias colonias bien aisladas procedentes de un cultivo fresco (AST) en solución salina estéril. Utilizada dicha suspensión antes de los 15 minutos de su preparación. Se realizó prueba de turbidez según escala de McFarland con nefelómetro. Posteriormente se sumergió un hisopo de algodón estéril y se presionó contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido. Se sembró completa y uniformemente la superficie en el agar Mueller Hinton (Biomérieux®) en tres direcciones. Las tiras se aplicaron sobre el agar con

la CMI hacia arriba y las siglas del antibiótico hacia el borde externo de la placa, utilizando pinzas Kelly sin dientes estériles. Comprobando que toda la tira esté en contacto con el agar. Se incubaron en posición invertida a 37°C en condiciones de aerobiosis durante 18 horas. Para la interpretación, se redondearon los valores intermedios proporcionados por el E-test a la dilución doble seriada inmediatamente superior. Un cociente entre las CMI de la misma tira mayor o igual a 8, un halo “fantasma” o una deformación de la elipse indica posible producción de metalo-β-lactamasas.



**Imagen 2. E-test-MBL (Biomerieux®). A. Epsilometro. B. Halo de inhibición, indicativo de presencia de metalo-β-lactamasas.**

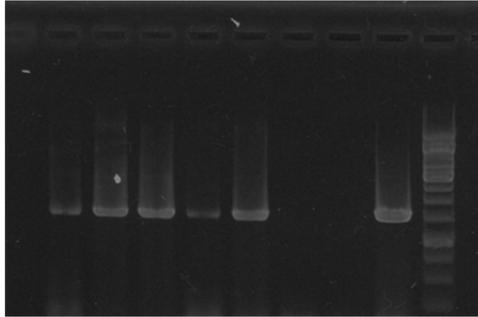
**Tabla 3. Ejemplos de valores de referencia para detección de metalo-β-lactamasas.**

Imipenem. CMI	Imipenem + EDTA. CMI	Cociente (IP/IPI)	Interpretación.
4	0.25	16	MBL Positivo.
>8	0.032	>250	MBL Positivo.
2	0.032	63	MBL Positivo.
2	>2	<1	MBL Negativo.
<0.125	<0.032	3.9	MBL Negativo.
>8	>2	>/= 4	MBL Indeterminada.

10.Extracción de DNA. Mediante el kit de extracción Zimo Research™ y sus especificaciones, las cuales fueron modificadas debido a las características

particulares de las cepas (ver anexo 1). Se realizó la extracción de DNA total y plasmídico, para su posterior almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

11. Se corroboró integridad del DNA mediante PCR convencional, utilizando iniciadores A y B 16S y realizando electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.



**Imagen 3. Electroforesis. Evaluación de la integridad del DNA.**

12. Concentración y pureza de DNA. Se realizó mediante el aparato Synergy II BioTeck Gene 5™, herramienta take 3, siguiendo las disposiciones del fabricante.

13. PCR. Para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa, se tomaron de estudios previos la secuencia de oligonucleótidos específicos, así como los programas y temperaturas para su amplificación.

La mezcla maestra realizada para una muestra fue la siguiente:

Reactivo.	Cantidad.
Agua tipo I.	..... 17 $\mu\text{L}$
Regulador 10x	..... 2.5 $\mu\text{L}$
dNTPs 2mM	..... 2.5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	.....0.75 $\mu\text{L}$
Iniciador A 30 pmol/ $\mu\text{L}$	.....0.5 $\mu\text{L}$
Iniciador B 30 pmol/ $\mu\text{L}$	.....0.5 $\mu\text{L}$
Taq	.....0.25 $\mu\text{L}$
DNA	.....1.0 $\mu\text{L}$
Volumen Total.	.....25 $\mu\text{L}$

Tabla 4. Secuencia específica de iniciadores y tamaño esperado del amplificado.

Iniciadores.	Secuencia A.	Secuencia B.	Tamaño del amplificado
<i>blaIMP</i> Pifout D.D y cols	5'-GAAGGYGTTTATGTTTCATAC-3'	5'-GTAMGTTTCAAGAGTGATGC-3'	586 pb.
<i>blaVIM</i> Pifout D.D y cols	5'-GTTTGGTGCATATCGCAAC-3'	5'-AATGCGCAGCACCAGGATAB-3'	381 pb.
<i>blaSPM</i> Castanheira y cols.	5'-CCTACAATCTAACGCGCACC-3'	5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'	648 pb.
<i>blaGIM</i> Castanheira y cols.	5'-AGAACCTTGACCGAACGCAG-3'	5'-ACTCATGACTCCTCACGAGG-3'	748 pb
<i>blaSIM</i> Lee K. y cols.	5'-TACAAGGGATTTCGGCATCG-3'	5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG	570 pb.

### Programas:

#### *blaIMP.*

37°C      10 minutos.  
 94°C      5 minutos.      }  
 94°C      1 minutos.      }      30 ciclos.  
 54°C      1 minutos.      }  
 72°C      90 segundos  
 4°C      ∞

#### *blaVIM*

37°C      10 minutos.  
 94°C      5 minutos.      }  
 94°C      1 minuto.      }      30 ciclos.  
 55°C      1 minuto.      }  
 72°C      90 segundos  
 4°C      ∞

#### *blaSPM.*

95°C      5 minutos.  
 95°C      1 minutos.      }  
 40°C      1 minutos.      }      30 ciclos.  
 68°C      1 minuto.      }  
 68°C      1 minuto.  
 4°C      ∞

95°C      5 minutos.  
 95°C      1 minuto.      }  
 40°C      1 minuto.      }      30 ciclos.  
 68°C      1 minuto.      }  
 68°C      5 minutos.  
 4°C      ∞

#### *blaGIM.*

*bla*SIM

95°C	5 minutos.	
95°C	1 minuto.	} 30 ciclos.
40°C	1 minuto.	
68°C	1 minuto.	
68°C	1 minuto.	
4°C	∞	

Posterior a amplificación, se colocaron los productos de la PCR a 4°C en hielo y para su conservación a -20°C.

14. Electroforesis. Se preparó gel de agarosa al 1.5% (1.5 g de agarosa/100ml de amortiguador TBE 0.5%). Se tomó 3 µL de densificante y se homogeneizó con 3 µL de la muestra, colocando toda la mezcla en cada uno de los pocillos del gel. Aplicando un voltaje de 100mV durante 20 minutos. Se utilizó marcador de peso molecular marca Roche® de 19 a 1114 pares de bases, colocando 2µL y añadiéndole 2 µL de densificante, así como marcador de 1Kb marca Fermentas™, 4µL.

15. Revelado. Se sumergió el gel en TBE/Bromuro de etidio durante 15 minutos y se procedió a su visualización en transiluminador de luz UV.

16. Los resultados obtenidos se ingresaron a sistema SPSS para su recolección y análisis.

## **RECURSOS.**

Personal Humano. Químicos del Laboratorio Central del Departamento de Microbiología del Hospital General CMN La Raza. Residente de Patología Clínica. Investigadores asociados del Departamento del Microbiología de la Escuela

Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, los cuales llevarán a cabo la capacitación en técnicas de biología molecular.

## **FACTIBILIDAD.**

De acuerdo a lo observado, dentro del laboratorio de microbiología, se obtienen con regularidad cepas de *P. aeruginosa* multirresistente, de diferentes especímenes y servicios de procedencia, por lo que el número de muestras a analizar se considera significativo.

El laboratorio de microbiología cuenta con los analizadores automatizados, medios de cultivo, dispositivos para determinación de sensibilidad y equipo de biología molecular, los cuales son financiados por el presupuesto destinado al laboratorio clínico del hospital.

## **RESULTADOS.**

Se recolectaron un total de 63 muestras, de las cuales 12 se encontraron contaminadas con otro germen (*K. neumonie* y *E. coli*), 10 de estas fueron reaisladas obteniendo cultivos puros para su ingreso al estudio. Dos no tuvieron desarrollo en CST por lo que se excluyeron. Cuatro cultivos presentaron doble morfología colonial, siendo identificadas ambas colonias como *P. aeruginosa* multidrogorresistente por medio del sistema Vitek 2 (Biomérieux®), por lo que continuaron en el estudio como cepas independientes.

Se obtuvieron un total de 56 cepas procedentes de los siguientes aislamientos clínicos: urocultivo, herida quirúrgica, secreción bronquial, lavado bronquial, hemocultivo, expectoración, punta de catéter, exudado faríngeo, biopsia y otros. Siendo la mayor proporción secreciones bronquiales con un 44.6%, el servicio con mayor cantidad fue neumología/Terapia respiratoria con 51.8%. El 100% de las cepas fueron bacilos gram negativos, 98.2% no fermentadores, 100% oxidasa positivos, 46.4% pioscianina positivos, 17.9 piomelanina positivos y el re

sto no desarrollo pigmento. Solo el 60.7% presentó desarrollo a 4°C en CST y finalmente 7.1% cultivos desarrollaron doble morfología colonial.

La presencia fenotípica de  $\beta$ -lactamasas se encontró en 96.43% de las cepas.

Fenotípicamente se observó la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en un 7.1%, sin embargo 32.1% tuvo resultado “indeterminado”, ya que el cociente de imipenem/imipenem+EDTA no permitió clasificarlo como negativo, pero tampoco alcanzó el valor para ser positivo, es decir se obtuvo  $\geq$  a 4 pero  $<$ 8.

De manera genotípica, el valor fue mayor, alcanzando hasta un 17.9%, siendo en mayor proporción positivas a *bla*SPM (7.1%) y seguida en igual cantidad a *bla*VIM y *bla*GIM (5.4%).

De las 10 cepas positivas genotípicamente, el 70% el servicio de procedencia fue neumología/Terapia respiratoria, el 40% tuvo expresión fenotípica de la enzima, 20% fue indeterminada y 40% no se expresó. 70% corresponden a muestras procedentes de las vías respiratorias (secreción bronquial, lavado bronquial y expectoración), 20% a biopsias y 10% a urocultivo.

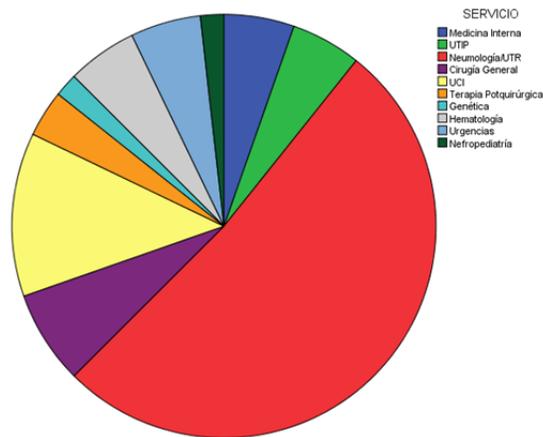
Dos de las cepas positivas, fueron aisladas de un mismo cultivo, sin embargo con morfología colonial diferente (A y B).

## GRAFICOS Y TABLAS.

Tabla 5.

Servicio.	Frecuencia.	Porcentaje.
Medicina interna	3	5.4%
UTIP	3	5.4%
Neumología/UTR	29	51.8%

Cirugía general.	4	7.1
UCI	7	12.5%
Terapia postquirúrgica	2	3.6%
Genética.	1	1.8%
Hematología.	3	5.4%
Urgencias.	3	5.4%
Nefropediatría.	1	1.8%
Total.	56	100%

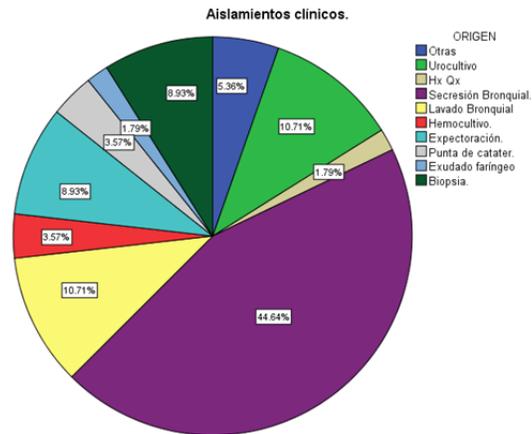


**Figura 4. Porcentaje de cepas por servicio.**

**Tabla 6. Tipo de aislamientos clínicos de las cepas estudiadas.**

Origen.	Frecuencia.	Porcentaje.
Otras.	3	5.4 %
Urocultivo.	6	10.7 %
Herida quirúrgica	1	1.8 %
Secreción Bronquial.	25	44.6 %
Lavado Bronquial.	6	10.7 %
Hemocultivo.	2	3.6 %
Expectoración.	5	8.9 %

Punta de catéter.	2	3.6 %
Exudado faríngeo.	1	1.8 %
Biopsia.	5	8.9 %
Total.	56	100%



**Figura 5. Aislamientos clínicos.**

Pruebas bioquímicas.

Tabla 7. Tinción de Gram.

Gram	Frecuencia.	Porcentaje.
Bacilo Gram negativo.	56	100%
Total	56	100%

Tabla 8. Fermentación.

Fermentación. (MK)	Frecuencia.	Porcentaje.
No fermentador.	55	98.2%
Sin desarrollo.	1	1.8%
Total.	56	100%

\*MK: Agar Mac Conkey.

Tabla 9. Producción de pigmento.

Pigmento. (Agar cetrimida)	Frecuencia.	Porcentaje.
Negativo.	19	33.9%
Pioscianina.	26	46.4%
Piomelanina.	10	17.9%
Sin desarrollo.	1	1.8%
Total.	56	100%

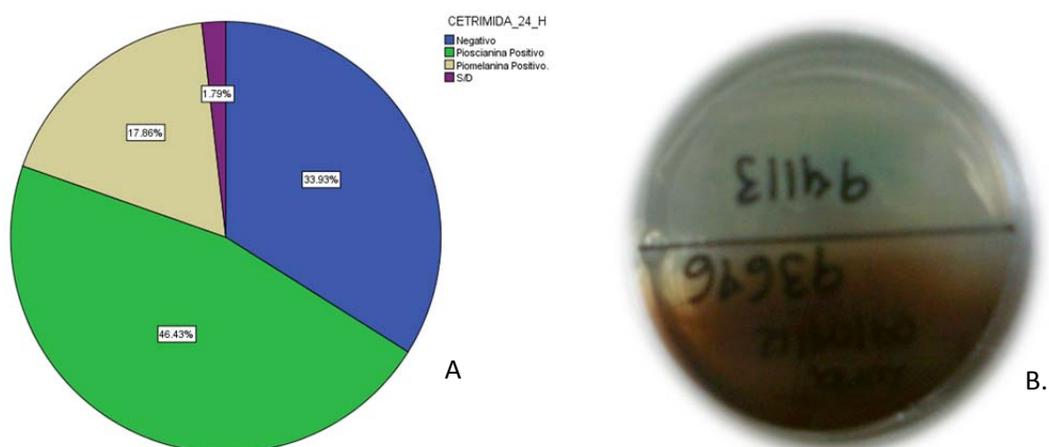
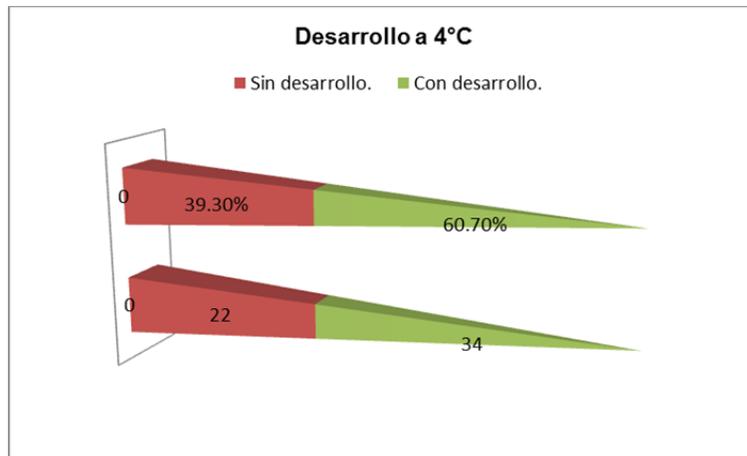


Figura 6. Pigmento. A. Distribución de la producción del pigmento. B. Ejemplo de pioverdina y piomelanina.

Tabla 10. Desarrollo a 4°C en CST.

Desarrollo a 4°C	Frecuencia.	Porcentaje.
Sin desarrollo.	22	39.3%
Con desarrollo.	34	60.7%
Total.	56	100%

\*CST. Caldo Soya Tripticasa.



**Figura 7. Desarrollo a 4°C en CST.**

Tabla 11. Prueba oxidasa.

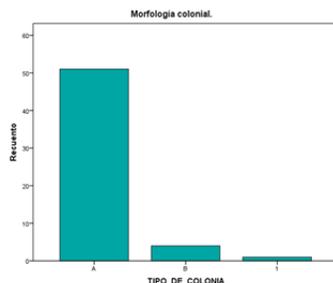
Oxidasa.	Frecuencia.	Porcentaje.
Positiva.	56	100%
Total.	56	100%

Morfología colonial. Se observaron 3 tipos de morfología colonial, desarrolladas en AST posterior a 18 horas de incubación:

- 1) Colonia tipo A. Pequeñas, redondas, planas, húmedas, confluentes y pardas.
- 2) Colonia tipo B. Grandes, redondas, elevadas, blancas, bien delimitadas, brillantes.
- 3) Colonia tipo 1. Pequeñas, secas, planas, confluentes.

Tabla 12. Morfología colonial.

Colonia.	Frecuencia.	Porcentaje.
A	51	91.1%
B	4	7.1%
Uno.	1	1.8%
Total	56	100%

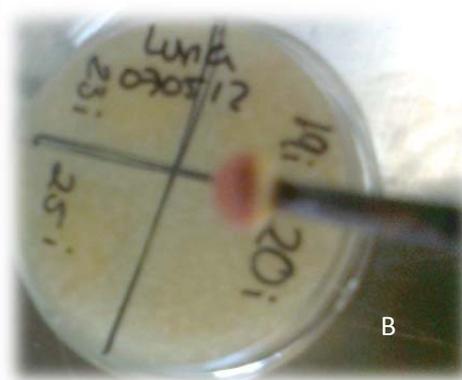
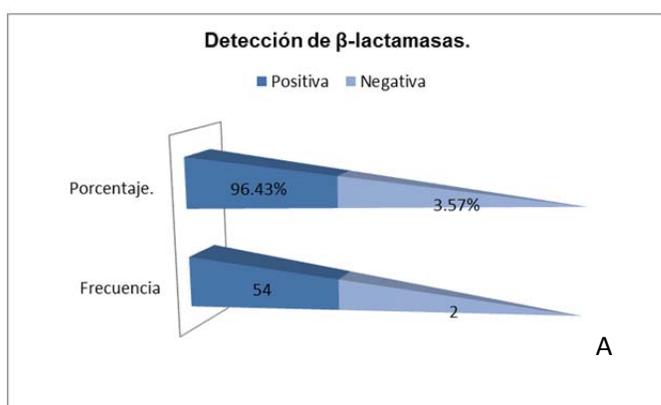


**Figura 8. Morfología colonial.**

Detección de  $\beta$ -lactamasas.

Tabla 13.  $\beta$ -lactamasas.

$\beta$ -lactamasas	Frecuencia	Porcentaje.
Positiva	54	96.43%
Negativa	2	3.57%
Total.	56	100%

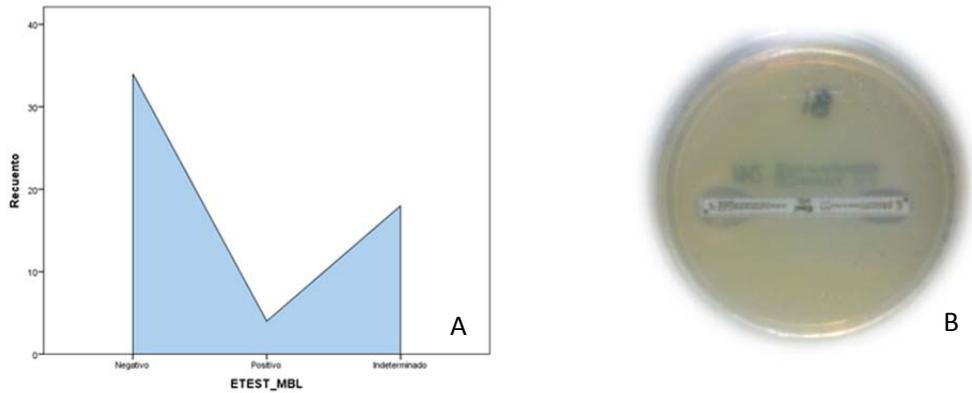


**Figura 9.  $\beta$ -lactamasas. A. Porcentaje y frecuencia de  $\beta$ -lactamasas. B. ejemplo de prueba positiva de  $\beta$ -lactamasa.**

Detección de metalo- $\beta$ -lactamasas, mediante E-test (Biomérieux®)

Tabla 14. Detección fenotípica de metalo- $\beta$ -lactamasas.

Metallo- $\beta$ -lactamasas	Frecuencia.	Porcentaje.
Negativo.	34	60.7%
Positivo.	4	7.1%
Indeterminado.	18	32.1%
Total.	56	100%

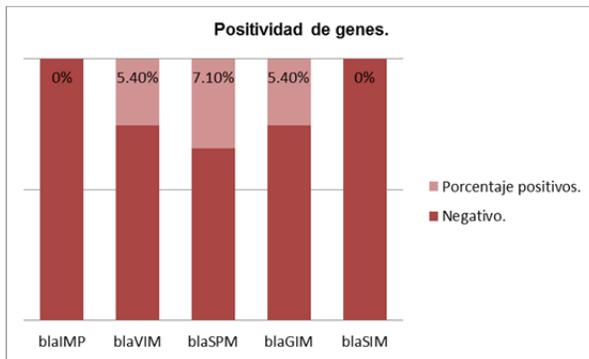


**Figura 10. Detección fenotípica de MβLs. A. Distribución de positivos, negativos e indeterminados. B. Ejemplo de muestra indeterminada.**

Detección genotípica de metalo-β-lactamasas.

Tabla 15. Detección genotípica metalo-β-lactamasas.

Gen	Positivo.	Negativo.	Frecuencia positivos.	Porcentaje positivos.
<i>blaIMP</i>	0	56	0	0%
<i>blaVIM</i>	3	53	3	5.4%
<i>blaSPM</i>	4	52	4	7.1%
<i>blaGIM</i>	3	53	3	5.4%
<i>blaSIM</i>	0	56	0	0%
Total.	8	56	10	17.9%



**Figura 11. Porcentaje de genes positivos.**

Tabla 16. Relación fenotípica, genotípica y origen.

Cepa.	E-test-MBL	Gen Positivo.	Origen.
41i	+	<i>blaVIM</i>	Biopsia.
54i	+	<i>blaSPM</i>	Secreción bronquial.
63i	-	<i>blaGIM</i>	Expectoración.
59070	Indeterminado.	<i>blaGIM</i>	Lavado bronquial.
60155	Indeterminado.	<i>blaGIM</i>	Lavado bronquial.
70658 A	-	<i>blaSPM</i>	Secreción bronquial.
70658 B	-	<i>blaSPM</i>	Secreción bronquial.
70958 A	-	<i>blaSPM</i>	Secreción bronquial.
91784 A	+	<i>blaVIM</i>	Urocultivo.
92024	+	<i>blaVIM</i>	Biopsia.

## DISCUSION.

Durante el 2005, en México se reportó que hasta un 86% de las cepas estudiadas, eran multidrogoresistentes, de las cuales, *Pseudomonas aeruginosa* fue el cuarto lugar, por lo que conocer los mecanismos que otorgan esta resistencia es de vital importancia. La producción de metalo- $\beta$ -lactamasas, capaces de hidrolizar los carbapenémicos, ha tenido una amplia distribución en todo el mundo cobrando cada día más importancia, debido a que los genes codificantes de estas son fácilmente transferibles inter e intraespecie a través de plásmidos, por lo que la capacidad antibiótica de muchos medicamentos se vería comprometida; sin embargo, dichos genes cuentan con una distribución geográfica aun característica que permite evaluar su diseminación mundial y el riesgo que esto confiere. Así, blaIMP es el mayormente identificado en los estudios efectuados hasta ahora; en Europa y sudamérica blaVIM, en Brasil blaSPM y en Europa del Norte y Alemania blaGIM.

Durante este estudio, se encontró que el 17.9% de las cepas incluidas en el estudio cuentan con alguno de los genes implicados en la codificación de metalo- $\beta$ -lactamasas, mayor de lo reportado en países de Sudamérica como Colombia y Argentina, no así en Venezuela donde un estudio reportó el 100% de cepas productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas en 9 muestras e identificándose blaVIM como gen codificante o Brasil con un 55.6% y positivos a blaSPM; Países como Francia y Grecia han reportado la incidencia de esta enzima de un 2 hasta un 45% siendo identificado blaVIM en primer lugar, seguido de blaIMP.

Así México se encuentra en una posición media y muy similar a países asiáticos como Korea, en el cual se reporta hasta un 17%. De forma interesante, en las cepas de nuestro estudio no se encontró blaIMP en ninguna muestra y posicionándose en primer lugar blaSPM (7.1%), seguido de blaGIM con 5.4% (el cual hasta ahora no estaba identificado en latinoamérica) y blaVIM en la misma magnitud. Sin embargo solo 7.1% expresan la enzima de manera franca, por otro lado, existe un 32.1% de las cepas que no pudieron catalogarse como positivos o negativos, de manera fenotípica, ya que el resultado obtenido se encuentra entre los valores intermedios, identificándose entonces como indeterminados; aunado a

esto, este estudio, no incluyó integrones por lo que estas enzimas pudiesen estar subdiagnosticadas fgenotípicamente.

blaGIM tuvo un comportamiento insual al amplificar en 21 cepas (37.5%) productos de diferentes tamaños moleculares, descartándose estos a contaminación, alteraciones en los equipos o al personal, por lo que deberán ser secuenciadas para su correcta interpretación.

Este estudio pretende dar una idea más clara acerca de los mecanismos de resistencia presentes en nuestro hospital, para auxiliar al médico en la elección de un tratamiento eficaz, así como las codiciones para evitar su propagación.

IMP.

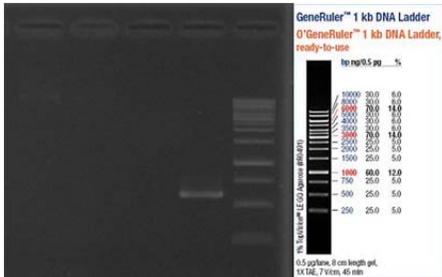


Figura 12. IMP. Se observa marcador de peso molecular 1KB con control positivo (Pa16 586pb). Todas las muestras resultaron negativas.

SIM.

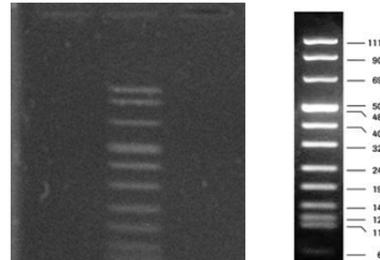


Figura 15. SIM. Se observa marcador molecular de 19-1114 pb, sin presencia de positividad en ninguna de las muestras.

VIM.

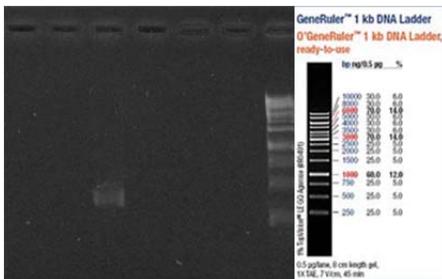


Figura 13. VIM. Presencia de banda representativa de positividad blaVIM (381pb) y marcador de peso molecular 1kb.

GIM.



Figura 16. GIM. Se observan amplificadas de diferentes pesos moleculares para blaGIM. Tres muestras con bandas representativas de positividad de aproximadamente 748pb y marcador molecular de 19-1114pb.

SPM.

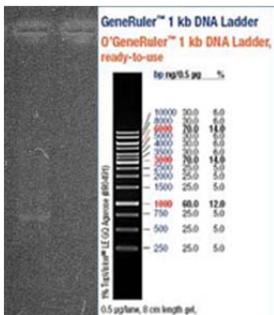


Figura 14. SPM. Se observa vanda representativa de positividad blaSPM (648pb) y marcador molecular de 1kb.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

ACTIVIDAD	Feb. 2012	Mar. 2012	Abr. 2012	May. 2012	Jun. 2012	Jul. 2012	Ago. 2012	Sep. 2012	Oct. 2012	Nov. 2012
Elaboración de protocolo.		x	x	X						
Revisión de Protocolo.					x	x	x			
Recabar cepas.						x	x	X		
Conservación de cepas.						X	x	X		
Inscripción a Programa de Titulación Oportuna UNAM						X				
Realización de pruebas de vitalidad y bioquímicas.							X	X		
Extracción de DNA							X	X		
Realización de PCR							X	X		
Análisis estadístico.								X	x	
Presentación de resultados preliminares.								x		
Presentación de examen de titulación.										x

## ANEXOS.

### 1) Preparación de LB-Glicerol.

Fórmula:

60% de caldo Luria.

40% de glicerol estéril.

Caldo Luria (1 litro):

Triptona.	-----10g
Extracto de levadura.	-----5g
NaCl.	-----10g
Agua destilada.	-----1000ml.

2) Técnica de extracción de DNA modificada del Kit Zimo Research™.

Posterior a desarrollo en 3 ml de CST se procede:

1. Centrifugar a 13,000 rpm por 6 minutos hasta agotar la totalidad del medio.
2. Decantar y conservar únicamente el botón o *pellet*.
3. Agregar 4 volúmenes de amortiguador de Lysis (ej. 400ml:100ml)
4. Mezclar en vórtex hasta que la suspensión se vea totalmente transparente.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
6. Colocar las columnas dentro de los tubos colectores sin tocar las paredes.
7. Pasar toda la mezcla (muestra/amortiguador) a la columna.
8. Centrifugar durante 1 minuto a 10,000 rpm.
9. Desechar el tubo colector y pasar la columna a un nuevo tubo colector.
10. Agregar 200  $\mu$ l de la solución de prelavado.
11. Centrifugar 1 min 10,000 rpm.
12. Adicionar 500  $\mu$ l de la solución de lavado de DNA.
13. Centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm.
14. Colocar la columna en tubos ependorff previamente rotulados.
15. Colocar 50  $\mu$ L o más de diluyente o agua tipo I en la columna.
16. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
17. Centrifugar a pulsos cortos a 13,000 rpm durante 30 seg.
18. Desechar la columna.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Geo FB, Janet SB, Stephen AM. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. *Pseudomonas, Acinetobacters* y gram negativos poco comunes. 18ª ed. México: El Manual Moderno; 2005. p. 285-291.
2. Henry JB, Davey FR, Herman CJ, McPherson RA, Tenenbaum GA. Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Bacteriology. 20th ed. Spain: Marbán; 2007. p. 1107.
3. Forbes BA, Sahm D, Weissfeld A. Diagnóstico Microbiológico. 12ª Ed. Argentina: Ed. Médica Panamericana S.A; 2009. p. 341- 349
4. Hoffman LR, Richardson AR, Houston LS, Kulasekara HD, Martens-Habbena W, et al. Nutrient Availability as a Mechanism for Selection of Antibiotic Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF Airway. *PLoS Pathog.* 2010 6(1):
5. Lebeque PY, Morris QH, Calás VN. Infecciones nosocomiales: incidencia de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Cub Med.* 2006 ene.mar; 45(1):76-80
6. Vazquez L. Reporte de infecciones nosocomiales registradas de enero a septiembre de 2010 en el Hospital General de "La Raza". *Cenca Cualli.* 2010 junio-julio; (5): 18-19.
7. Montero M, Rui M, Belvis J, y cols. Factores de riesgo relacionados con la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente (PAMR). XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2009
8. Lora-Tamayo L, Euba G, Murillo O, y cols. Impacto clínico de la infección de prótesis articular (IPA) por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente (PAMDR). XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2009
9. Morales-Aguirre J, Andrade-Velasquez J. Factores asociados a mortalidad y patrones de susceptibilidad antibiótica en bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa*. *Medigraphic.* 2006 sep-oct (63): 291-300.

10. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2006 Jan; 50(1):43-48.
11. Paramythiotou E, Lucet JC, Timsit J. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis*. 2009; 38(5): 670-677.
12. Bush K, Jacoby G, Medeiros A, et al. A functional classification scheme for  $\beta$ -Lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*. 1995 June; 39(6): 1211-1233.
13. Livemore D. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 35(5):634-640.
14. Zhang S, Chen Y, Potvin E, Sanschagrín F, Levesque RC, McCormak FX, et al. Comparative signature-tagged mutagenesis identifies *Pseudomonas* factors conferring resistance to the pulmonary collectin SP-A. *PLoS Pathogens*. 2005 Nov; 1(3):259-258.
15. Jane-Castillo V, Ribas-Aparicio R, Osorio-Carranza Lourdes y cols. *Medigraphic*. 2006 abril-junio; 31(2):41-48.
16. Zhang S, Chen Y, Potvin E, Sanschagrín F, Levesque RC, McCormak FX, et al. Comparative signature-tagged mutagenesis identifies *Pseudomonas* factors conferring resistance to the pulmonary collectin SP-A. *PLoS Pathogens*. 2005 Nov; 1(3):259-258.
17. Hernández PW, Ramos GA, Nodarse HR, Padrón SA, De Armas ME. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). *Rev Cub Med Int Emerg*. 2006; 5(1): 256-264.
18. Mattar S, Martínez P. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto y epidemiología. *Infect*. 2007; 11(1): 23-35

19. Santella G, Pollini S, Docquier JD, Almuzara M, Gutking G, Rossoloni GM y cols. Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomona aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. Rev Panam Salud Pública. 2011; 30(6): 545-548.
20. Walsh T, Toleman M, Poirel L, et al. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? Clinical Microbiology Reviews. 2005;18(2):306-325.
21. Sánchez A, Salso S, Culebras E y cols. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomona aeruginosa*. Rev Esp Quimioterap. 2004 Dic; 17 (4):336-340.
22. Suarez J, Kattán J, Guzmán A, y cols. Mecanismos de resistencia a carbapenemes en *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Infectio. 2006; 10(2):85-93
23. Oliver A. Impacto de la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente productora de metalo- $\beta$ .lactamasas en los hospitales: presente y futuro. Enf Infec y Microbiol Clín. 2007;27 (5): 255-256.
24. Sánchez G. Damaris, Marcano Daniel, Spadola Enza. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales en Venezuela. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 2008;39 (2):17-22.
25. Bebrone C. Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. Bioc pharm. 2007 Dec; 74 (12): 1686-1701.
26. Andrade V. Emergencia de la resistencia a carbapenemes en *Pseudomona aeruginosa* productora de metalo- $\beta$ -lactamasas. Medigraphic. 2005; 30(5): 53-58.
27. Siarkou V, Vitti D, Protonotariou E, et al. Molecular epidemiology of outbreak-Related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo- $\beta$ -Lactamase gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009 apr; 53(4): 1325-1330.
28. Samuelsen O, Toleman M, Sundsfjord A, et al. Molecular Epidemiology of Metallo- $\beta$ -lactamase-Producing *Pseudomona aeruginosa* isolates from Norway and Sweden Shows Import of International Clones and Local Clonal

- Expansion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010 jan; 54(1): 346-352.
29. Iversen B, Hofman B, Aavitsland P. Questions of causality and responsibility arising from outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in Norway. *Emerging Themes in Epidemiology*. 2008 oct; 5(22): 1-12.
  30. Gutiérrez O, Cercenado J, Navarro F, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007 oct; 15(12): 4329-4335.
  31. Speert D. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Bioscience*. 2002 oct; 7: 354-361.
  32. Martínez P, Espinal P, Mattar 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.
  33. Kim SY, Hong SG, Moland ES, Thomson KS. Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo-beta-lactamases in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):2798-2801.
  34. Orecchini L, López T, Littvik A. Resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* en un periodo de 10 años en el Hospital Rawson. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*. 2010;67(4):135-140.
  35. Lowak M, Bas A, Loaiza N, y cols. Brote de *Pseudomonas aeruginosa* Bla-VIM-2 en Barcelona, Eficacia de IMI/IMI-EDTA en disco placa para su detección. XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2009
  36. Detección de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en la clínica Universidad de Navarra (2004-2008). XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2009
  37. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Canton R, Cauda R, Docquier JD, et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-

- negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 April; 29(4):380-388.
38. Jimeno A, Alcalde M, Blázquez A. Epidemic outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant producing metallo-beta-lactamase. *Revista Clínica Española*. 2011 April;211(4): 187-191.
39. Pitout J, Gregson D, Poirel L, McClure J, Le P, Church L. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamases in a large centralized laboratory. *J. Clin. Microbiol*. 2005 July; 43(7):3129-3135
40. Castanheira M, Toleman M, Jones R. Molecular characterization of  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob agents chemother*. 2004; 48(12): 4654-4651.
41. Lee K, Yum JH, Young D, Lee HM, Kim DH et al. Novel Acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob agents chemother*. 2005 nov; 49(11):4485-4491.