
Resistencia a carbapenemes asociada a integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa*

María Fernanda Yauri¹, Iliana Alcocer¹, Jeannete Zurita² & Mercedes Rodríguez-Riglos¹

¹Laboratorio de Microbiología, Escuela de Ciencias Biológicas, PUCE,
Quito, Ecuador. iralcocer@puce.edu.ec

²Departamento de Microbiología, Zurita&Zurita Laboratorios, Quito, Ecuador

Recibido: 2010-05-27, aprobado: 2010-08-31.

RESUMEN: *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo, oportunista de humanos, comúnmente aislado de infecciones nosocomiales. Es difícil de tratar por su inherente resistencia a varios antibióticos y por su rápida adquisición de genes de resistencia. En los últimos años han sido reportados aislados multiresistentes de *P. aeruginosa* con genes que codifican enzimas que confieren resistencia a los carbapenemes: las metalo- β -lactamasas (MBLs). Estos genes, comúnmente, se encuentran localizados en integrones. El objetivo del estudio fue identificar genes que codifican metalo- β -lactamasas (MBLs) y su ubicación en integrones clase 1 en aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Se colectaron 129 aislados clínicos en Zurita&Zurita Laboratorios entre enero de 2005 a diciembre de 2008. La detección de genes que codifican MBLs se realizó por PCR, amplificando los genes mayormente diseminados entre bacilos Gram negativos no fermentadores productores de MBLs y encontrados en Latinoamérica: *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y *bla*_{SPM}. La ubicación de estos genes en integrones clase 1 fue determinada por PCR anidado. De los 129 aislados analizados, 46 aislados fueron resistentes a carbapenemes. De los 46 aislados resistentes 34 (73,9%) presentaron genes que codifican MBLs y el 14,7% estuvieron ubicados en integrones clase 1. Fue evidente la alta prevalencia de genes productores de MBLs en la población estudiada.

PALABRAS CLAVE: Carbapenemes, integrones, metalo- β -lactamasas, multiresistencia, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT.- *Pseudomonas aeruginosa* is a microbial agent, human opportunistic and commonly isolated from nosocomial infections. It is a difficult organism to treat because of its inherent resistance to various antibiotics and rapid acquisition of resistance genes. In recent years, it has been reported multiresistant isolates of *P. aeruginosa* with genes that encode enzymes which confer principally resistance

to carbapenems: metallo- β -lactamases (MBLs). These genes are often located in integrons. Its importance lies in the spread of resistance genes between Gram-negative bacteria. The aim of this study was to identify genes that encode metallo- β -lactamases (MBLs) and their location in class 1 integrons in clinical isolates of *P. aeruginosa*. The 129 clinical isolates were collected in Zurita&Zurita Laboratories between 2006 and 2008. The detection of genes that encode MBLs was performed by PCR, amplifying the genes mostly scattered among non-fermenting Gram negative bacilli that produce MBLs: *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM}. The location of these genes in class 1 integrons was determined by nested PCR. Of the 129 isolates analyzed, 46 were resistant to carbapenems. Of the 46 resistant isolates, 34 (73.9%) had genes encoding MBLs. Only 14.7% were located in class 1 integrons. It was evident the high prevalence of MBLs producing genes in the population studied.

KEYWORDS: Carbapenems, integrons, metallo- β -lactamase, multiresistance, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN.- *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria aerobia, Gram negativa, no fermentadora ni formadora de esporas, móvil por la presencia de flagelos lofótricos y miembro de la familia Pseudomonadaceae. Es un patógeno oportunista comúnmente asociado a personas inmunocomprometidas que presentan infecciones en pulmones, oído, válvulas cardíacas, tracto urinario, sistema nervioso central, piel y en heridas quirúrgicas. Adquiere especial importancia en pacientes con fibrosis quística (1). El programa Internacional de Control de las Infecciones Nosocomiales (INICC) describe a las infecciones nosocomiales como uno de los mayores problemas sanitarios, siendo de particular importancia las infecciones causadas por bacterias multiresistentes (2). Además, establece que la mayor pre-

valencia mundial de infecciones intrahospitalaria corresponde a América Latina, donde el 11,4% de los aislados obtenidos son de *P. aeruginosa* (3).

Pseudomonas aeruginosa es inherentemente resistente a una amplia variedad de antisépticos y antibióticos como cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, clo-ranfenicol, macrólidos, novobiocina; dejando como última alternativa de tratamiento al grupo de los carbapenemes (4). Los carbapenemes son los antimicrobianos β -lactámicos en la terapia contra *P. aeruginosa* mayormente empleados. Sin embargo, durante la última década, la aparición de nuevos factores de resistencia ha elevado el número de aislados resistentes a estos antibióticos (5 y 6).

La resistencia en *P. aeruginosa* a los carbapenemes es generada por múltiples mecanismos, tales como: bombas de flujo, mutación de porinas, producción de enzimas que hidrolizan al antibiótico. Este estudio se centró en este último mecanismo: la producción de metalo- β -lactamasas (MBLs; 7). Las MBLs son enzimas bacterianas con una elevada actividad hidrolítica que inactivan a todos los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes), transformando a estos agentes terapéuticos en compuestos inofensivos para las bacterias (8). Las más comunes y ampliamente reportadas MBLs son las tipo VIM e IMP, las cuales exhiben una amplia distribución a nivel mundial con más de 50 variantes alélicas descritas (9 y 10). Los genes que codifican enzimas tipo MBLs son, generalmente, transferidos por determinantes genéticos móviles como son los plásmidos o transposones, los cuales a su vez pueden contener sistemas de recombinación sitio-específica denominados integrones (11). Esto sumado a su frecuente relación con otros genes que confieren resistencia a diversas familias de antibióticos (como aminoglucósidos), convierten a estos aislados en un importante problema terapéutico a nivel hospitalario (12).

Los primeros aislados resistentes a carbapenemes y productores de MBLs fueron registrados en la década de los 80 en Asia y Europa (8). En Latinoamé-

rica no fueron encontradas sino hasta el 2003, siendo descritas por primera vez en Chile y Venezuela (13).

Las MBLs han sido descritas y clasificadas en cuatro tipos clínicamente relevantes: IMP reportada en Japón (14), VIM detectada originalmente en Italia (15); GIM observada en Alemania (16) y SPM descubierta en Sao Paulo, Brasil (17).

Diversos estudios de genes que codifican MBLs demostraron su ubicación como genes "cassette" en integrones clase 1 (18). Los integrones son sistemas formados de dos segmentos conservados y separados por una región variable capaz de insertar y escindir genes en "cassettes" (19). Los genes en "cassette" son elementos móviles extracromosómicos circularizados que no se expresan hasta que son insertos en un integrón. Los integrones son movilizados por transposición en plásmidos y transposones (19).

En el Ecuador no existen datos que demuestren el estudio de la resistencia en Gram negativos no fermentadores. Así, este trabajo contribuye en el conocimiento de la multiresistencia, la presencia de genes relacionados con la resistencia y su relación con integrones clase 1. El objetivo de este estudio fue identificar los genes relacionados con la resistencia a carbapenemes tipo metalo- β -lactamasas y su ubicación en integrones clase 1 en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes

a imipenem y meropenem. Los objetivos específicos fueron: a) Identificar fenotípica y genotípicamente los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas y moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por amplificación del gen de la proteína de la membrana externa *oprL*. b) Detectar la presencia de genes productores de metalo- β -lactamasas (MBLs) mediante PCR. c) Determinar la localización de los genes que codifican metalo- β -lactamasas a través de la amplificación de la región variable de integrones clase 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

Se analizaron 129 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* recibidas de la colección del Departamento de Microbiología de los laboratorios Zurita & Zurita y tomados de muestras clínicas de pacientes atendidos en diversos centros hospitalarios de Quito. El período de colección de los aislados fue comprendido entre enero de 2005 a diciembre de 2008. La identificación y el perfil de resistencia fueron obtenidos mediante MicroScan (VITEK) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Caracterización fenotípica y genotípica de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa de acuerdo a sus reacciones bioquímicas se

identifica como un bacilo Gram negativo móvil, no fermentador de azúcares, oxidasa positiva, productora de ornitina descarboxilasa, no productora de triptofanasas y sintetizadora de lisina descarboxilasa. Para evidenciar este perfil se realizaron las pruebas bioquímicas estándares: Agar con triple azúcar y hierro (TSI), Motilidad, Indol, Ornitina (MIO), Motilidad, indol, lisina (MILI), óxido fermentación (O-F).

La confirmación molecular de los aislados se realizó mediante la técnica de PCR amplificando el gen que codifica la proteína *oprL* de la membrana externa, empleando los iniciadores y condiciones descritos por Xu *et al.* (20): F 5' ATGGAAATGCTGAAATTCGGC 3' y R 5'CTTCTTCAGCTCGACGCGACG 3'.

El templado fue preparado mediante kit de extracción de ADN genómico (PROMEGA nro. A1120). La reacción se preparó en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 1,25 U de *Taq* polimerasa (PROMEGA nro.M8295) 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 3,5 mM de KCl, 0,1 μ M de cada iniciador y 4 μ l de ADN templado en tampón para PCR 1X. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer). El programa de PCR consistió en 35 ciclos de 96 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por un minuto, seguido de un paso de extensión final de 72 °C por diez minutos.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (Invitrogen) al 1% a 125 V/cm por 60 min en tampón 44,5 mM tris-HCl, 44,5 mM ácido bórico, 1,5 mM EDTA (TBE). Se empleó como marcador molecular ADN de 100 pb (Invitrogen). Los geles fueron teñidos empleando Syber gold 10.000x en DMSO (Invitrogen). Los productos de amplificación se analizaron en Safe Imager (Invitrogen) por examen visual considerando todas las bandas visibles, independientemente de su intensidad.

Detección de genes que codifican MBLs

La detección de genes productores de MBLs se realizó por PCR. Fueron analizados los dos genes más frecuentemente encontrados entre bacilos Gram negativos no fermentadores y un gen reportado únicamente para Latinoamérica (7 y 10).

Los iniciadores empleados para el gen *blavIM* fueron: F 5' GTTTGG TCGCATATCGCAAC 3' y R 5' AATGCGCAGCACCCAGGATAG 3' (21); para el gen *blaIMP* los iniciadores empleados fueron F 5' GAAGGYGTT-TATGTTTCATAC 3' y R 5' GTAMGTTTCAAGAGTGATGC 3' (10); y para el gen *blasPM* se usaron los iniciadores F 5' CTGCTTGGATTC ATGGGCGC 3' y *blasPM* R 5' CCTTTT CCGCGACCTTGATC 3'

(21). Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Pitaut *et al.* (21).

El templado fue preparado mediante kit de extracción de ADN genómico (PROMEGA No. A1120). La reacción se preparó en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 1 U de *Taq* polimerasa (PROMEGA No.M8295), 0,16 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada iniciador y 2 μ l de ADN templado en tampón para PCR 1X (PROMEGA). La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer). El programa de PCR consistió de una incubación inicial de 37 °C por 10 minutos, una denaturación inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 31 minutos y un paso de extensión final de 72 °C por 1,5 minutos.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis con las mismas condiciones empleadas para la identificación molecular de *P. aeruginosa*.

Determinación de la localización de los genes que codifican MBLs

El ADN de los aislados que resultaron positivos para la presencia de genes codificantes de MBLs fue empleado en una segunda PCR para determinar la región variable de integrones de clase 1. Los iniciadores empleados son los detallados por Pitout *et al.* (21). Para la reacción en cadena de la polimerasa se

prepararon reacciones de 25 µl conteniendo: 1 U de *Taq* polimerasa (PRO-MEGA nro. M8295), 0,16 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada iniciador y 2 µl de ADN templado en tampón para PCR 1X.

Los parámetros de amplificación fueron: 95 °C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos, y un período de extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Los productos resultantes de la PCR fueron separados a través de electroforesis horizontal en geles de agarosa (Invitrogen 15510-027) al 1%.

Los productos obtenidos de las amplificaciones anteriores fueron usados como templados para la ejecución de la PCR anidada y fueron empleados iniciadores para cada uno de los genes encontrados (*blavIM* y *blaIMP*). Las cantidades y los parámetros de amplificación son los mismos descritos anteriormente.

RESULTADOS

El 100% de los aislados (129) fueron confirmados como *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis molecular del gen que codifica la proteína *oprL* de la membrana externa (Figura 1). La identificación molecular concordó con la identificación fenotípica realizada a través de pruebas bioquímicas.

De los 129 aislados estudiados, 46 mostraron resistencia a carbapenemes. Los datos del origen de los aislados resistentes se encuentran en la Tabla 1.

Los perfiles de resistencia a los carbapenemes evaluados en los 46 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron un alto porcentaje de resistencia a ambos β-lactámicos empleados (imipenem y meropenem), con 34 aislados resistentes (73,9%); nueve aislados (19,6%) fueron resistentes únicamente a imipenem y tres (6,5%) fueron únicamente para meropenem (Figura 2).

De los 46 aislados resistentes, 34 (73,9%) presentaron uno o dos genes que codificaban MBLs. En los doce aislados restantes (26,1%) no fue detectado ningún gen estudiado. De los 34 aislados portadores de genes que codifican MBLs, 24 (70,6%) presentaron el gen *blavIM*, seis (17,6%) registraron el gen *blaIMP* y cuatro aislados (11,8%) presentaban ambos genes *blavIM* /*blaIMP* (Figura 3). Cinco (14,7%) de los 34 aislados codificantes de MBLs fueron ubicados en la región variable de integrones clase 1 y 29 (84,3%) no lo fueron.

De los 24 aislados que presentaron el gen *blavIM*, cinco (20,8%) fueron ubicados en la región variable de integrones clase 1 (Figura 4). De los seis aislados portadores del gen *blaIMP*, tan solo uno (16,7%), pudo ser situado en la región variable de integrones clase 1 (Figura 5). Finalmente, de los cuatro aislados positivos para ambos genes, dos aislados (50%) fueron ubicados en región variable de integrones clase 1.

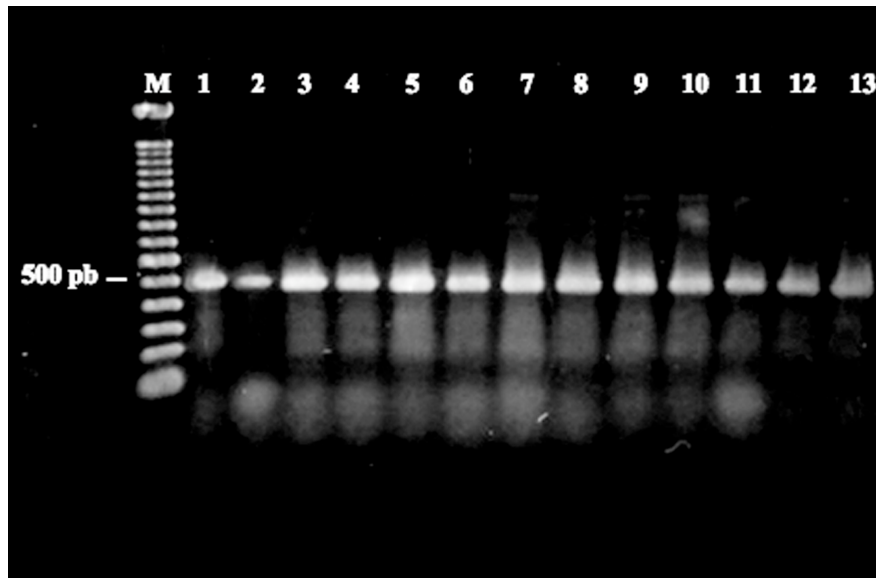


Figura 1. Representación gráfica de la identificación de la proteína de la membrana externa *oprL* para confirmación genotípica de *Pseudomonas aeruginosa*. M, marcador de peso molecular 100pb; canaletas 1-13, aislados de *Pseudomonas aeruginosa* confirmados.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado el incremento de genes productores de MBLs asociados a integrones, los cuales a su vez se relacionan con plásmidos y transposones, facilitando su transferencia vertical a una amplia gama de agentes patógenos (11).

El estudio de la presencia de genes que codifican MBLs reveló un alto porcentaje de genes *blaVIM* (70,6%), en los aislados analizados resistentes a carbapenemes. Datos que concuerdan con estudios previos, donde el gen *blaVIM*, especialmente la variante alélica *blaVIM-2*, ha sido identificada de manera predominante en Latinoamérica y varios países alrededor del mundo (7, 9, 12 y 22).

El gen *blaIMP* fue registrado en un menor porcentaje (17,6 %). Anteriormente se ha descrito porcentajes similares de presencia para genes *blaIMP* en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes (8, 21 y 24).

Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes arrojaron un 0,0% de presencia de genes productores de MBLs tipo SPM, resultado que contribuye a su localización endémica al norte de Brasil (17).

Mecanismos como la baja permeabilidad para el ingreso del antibiótico por pérdida de porinas o expulsión del mismo a través de bombas de flujo podrían explicar la resistencia observada en los aislados que no pro-

Tabla 1 Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en este estudio (Continuación)

Bacteria		Paciente			
Código de Congelación	Código Hospital	Fecha de Aislamiento (años)	Sexo muestra	Edad	Origen de la muestra
13 Ps aer	10	01/07/2005	M	2	Herida
16 Ps aer	4	01/07/2005	M	5	Biopsia
17 Ps aer	7	08/07/2005	F	7	Herida
23 Ps aer	274	09/08/2005	F	16	Herida
28 Ps aer	60	09/09/2005	M	59	Herida
29 Ps aer	237	22/09/2005	F	19	Espujo
40 Ps aer	189	01/10/2005	D	ND	Absceso
45 Ps aer	773	01/10/2005	D	ND	Absceso
48 Ps aer	835	24/10/2005	M	8	Biopsia
57 Ps aer	430	13/12/2005	M	30	Herida quirúrgica
95 Ps aer	714	22/03/2006	F	79	Herida
97 Ps aer	483	15/03/2006	M	6	Hemocultivo
104 Ps aer	1042	31/03/2006	F	34	Secreción traqueal
130 Ps aer	597	19/05/2006	F	40	Secreción traqueal
140 Ps aer	638	22/06/2006	F	31	Secreción traqueal
142 Ps aer	632	22/06/2006	M	56	Líquido peritoneal
150 Ps aer	899	30/06/2006	M	26	Secreción traqueal
167 Ps aer	3532	22/08/2006	F	48	Herida quirúrgica
191 Ps aer	4149	03/10/2006	M	ND	Absceso
228 Ps aer	26	01/12/2006	M	36	Secreción traqueal
235 Ps aer	565	20/06/2007	F	2 meses	Hemocultivo
236 Ps aer	945	28/12/2006	M	27	Secreción traqueal
237 Ps aer	942	28/12/2006	M	72	Secreción traqueal
310 Ps aer	4831	15/11/2007	M	ND	Espujo
319 Ps aer	924	28/11/2007	M	60	Secreción traqueal
326 Ps aer	256	08/12/2007	F	77	Secreción traqueal
330 Ps aer	528	16/12/2007	M	21	Secreción traqueal
332 Ps aer	742	22/12/2007	M	86	Líquido pleural
333 Ps aer	768	23/12/2007	F	80	Secreción traqueal
335 Ps aer	800	24/12/2007	F	61	Herida quirúrgica
345 Ps aer	963	29/12/2007	F	61	Secreción traqueal
346 Ps aer	975	30/12/2007	M	61	Espujo
355 Ps aer	183	06/03/2008	M	ND	Urocultivo
362 Ps aer	595	26/09/2008	F	22	Secreción traqueal
365 Ps aer	466	26/09/2008	F	ND	Espujo
377 Ps aer	332	26/09/2008	M	ND	Secreción traqueal
381 Ps aer	334	30/09/2008	F	ND	Herida
385 Ps aer	467	30/09/2008	M	46	Secreción traqueal
387 Ps aer	531	30/09/2008	M	8	Herida quirúrgica
403 Ps aer	792	30/09/2008	M	77	Secreción traqueal
411 Ps aer	944	30/09/2008	F	ND	Herida quirúrgica
413 Ps aer	153	30/09/2008	M	74	Hemocultivo
429 Ps aer	818	01/10/2008	F	ND	Herida quirúrgica
437 Ps aer	508	02/10/2008	M	ND	Herida quirúrgica
438 Ps aer	170	01/10/2008	M	26	Secreción traqueal
443 Ps aer	3560	01/10/2008	F	75	Espujo

F, femenino; M, masculino; ND, no determinado

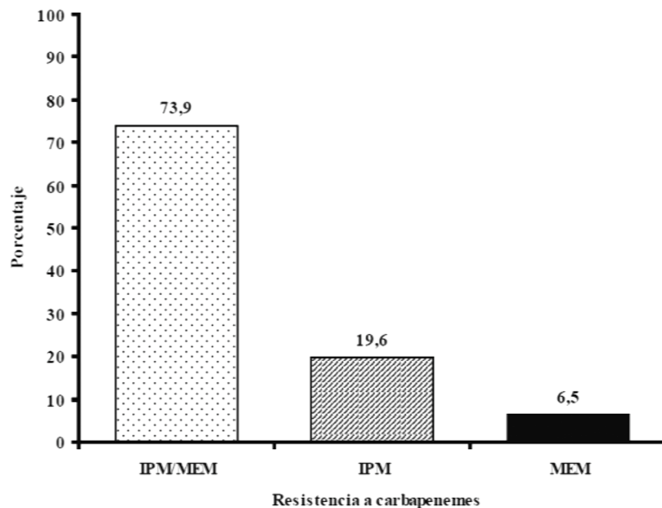


Figura 2. Porcentaje de resistencia a carbapenemes en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

ducían MBLs (7). Estos mecanismos no fueron analizados en el presente trabajo.

En cuanto a la ubicación de los genes que codifican MBLs, el estudio demostró que fueron pocos los aislados de *P. aeruginosa*, alrededor del 14,0%, encontrados como “cassettes” génicos en la región variable de integrones clase 1; a pesar de encontrarse a estos elementos genéticos ampliamente distribuidos entre los bacilos Gram negativos no fermentadores (19,23).

La presencia del “cassette” portador del gen *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* en un integrón no confiere movilidad por sí solo, pero sí pueden encontrarse insertos en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones. Los integrones al encontrarse asociados a plataformas genéticas móviles incrementan su diseminación y transferencia intra e interespecífica (18).

CONCLUSIONES

Los 129 aislados clínicos fueron confirmados como *Pseudomonas aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas.

La identificación genotípica de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue positiva para los 129 aislados.

La mayoría de aislados resistentes a carbapenemes, imipenem y meropenem (73,9%), presentaron genes que codifican metalo- β -lactamasas.

Los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* fueron encontrados en la mayoría de aislados resistentes a carbapenemes en un 70,6% y 17,6%, respectivamente. Un bajo porcentaje de aislados presentaron ambos genes. El gen *bla_{SPM}* no fue encontrado en ningún aislado resistente de origen hospitalario.

Un considerable porcentaje del total de los aislados resistentes a carbapenemes fueron ubicados en integrones clase 1.

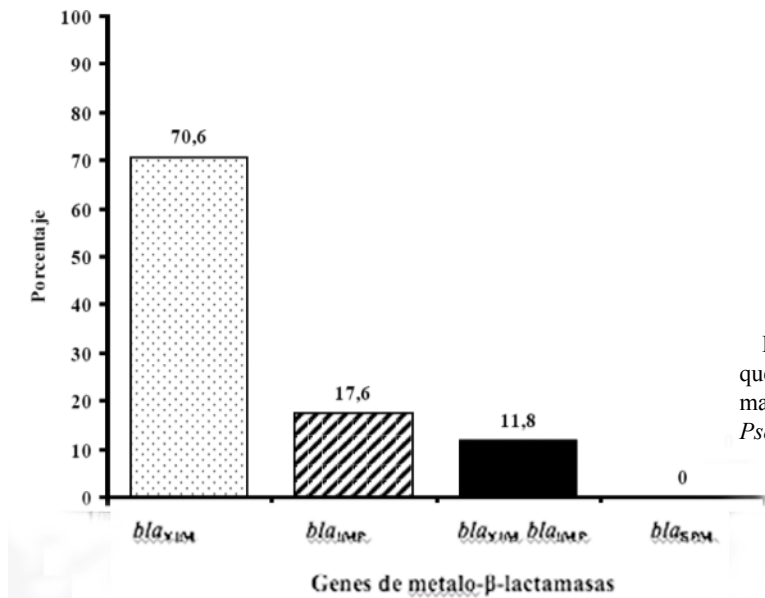


Figura 3. Porcentaje genes que codifican metalo-β-lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

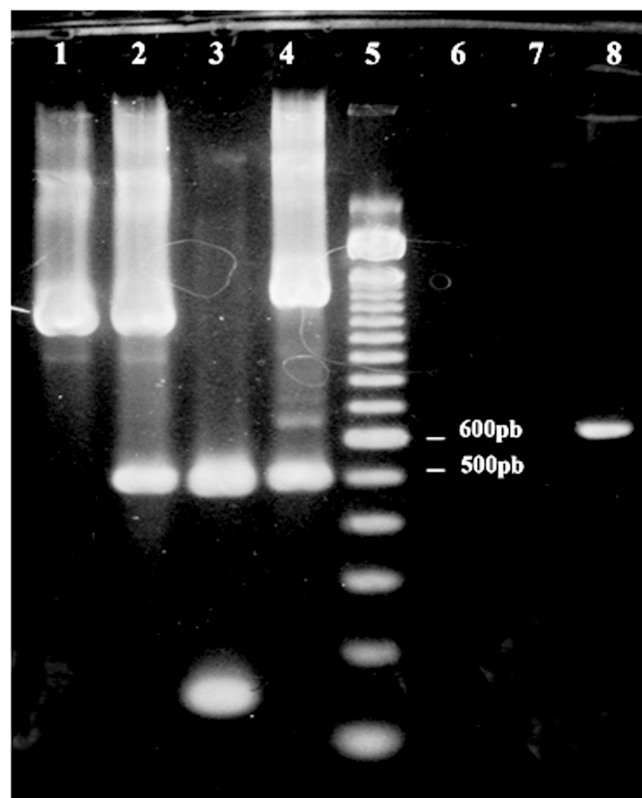


Figura 4. Representación gráfica de electroforesis de los genes *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes. Canaletas 1, integrón; canaleta 2 y 4, integrón y gen *bla*_{VIM}; canaleta 3, gen *bla*_{VIM}; canaleta 5, marcador de peso molecular 100pb; canaletas 6 y 7, control negativo y canaleta 8, gen *bla*_{IMP}

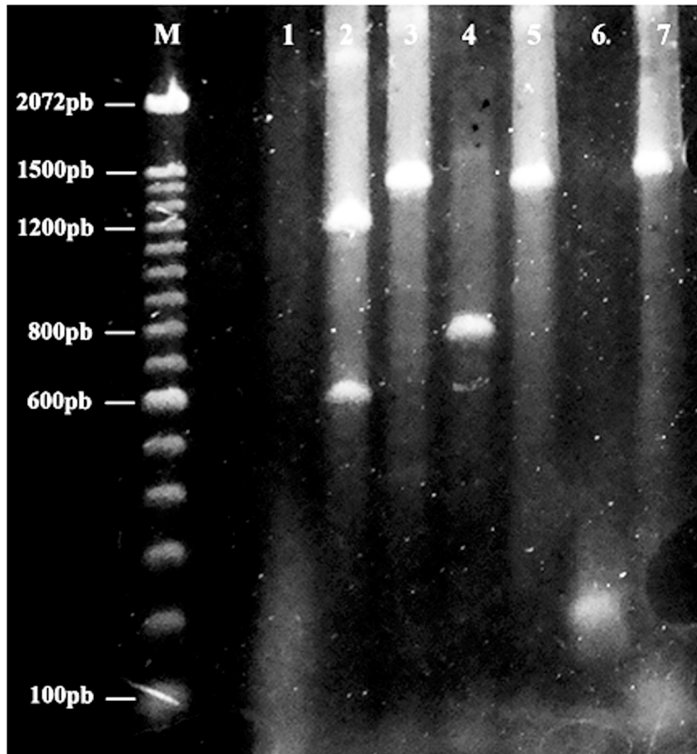


Figura 5. Representación gráfica de electroforesis del gen *bla*_{IMP} de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes. M, marcador de peso molecular 100pb; canaleta 1, control negativo; canaleta 2, integrón y gen *bla*_{IMP}; canaleta 3, 4 y 5, integrón; canaletas 6 ausencia integrón y canaleta 7 integrón.

LITERATURA CITADA

1. RUIZ, S. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
2. ROSENTHAL, D.; MAKI DG, L.; MEHTA, A.; ALVAREZ-MORENO, C.; HIGUERA, F.; CUELLAR, L.; MADANI, N. 2008. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary for 2002-2007, issued January 2008. *American Journal of Infection Control*. 36: 627-637.
3. CANO, M.; DOMÍNGUEZ, M.; EZPELETA, C.; PADILLA, B.; RAMÍREZ, E.; MARTÍNEZ, L. 2008. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 26: 220-229.

4. RAHAL, J. 2008. The role of carbapenems in initial therapy for serious Gram negative infections. *Bio-Med Central LTD*. 12 (Suppl 4).
5. OLIVER, A. 2009. Impacto de la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente productora de metalo- β -lactamasas en los hospitales: presente y futuro. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27: 255-256.
6. PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 34: 235-240.
7. ANDRADE, V. 2005. Emergencia de la resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas. *Bioquímica*. 30: 52-58.
8. WALSH, T.; TOLEMAN, M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. 2005. Metallo- β -lactamase: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 306-325.
9. AUBRON, C.; POIREL, L.; FORTINEAU, N.; NICOLAS, P.; COLLET, L.; NORDMANN, P. 2005. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo- β -lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microbial Drug Resistance*. 11:254-259.
10. PAGNIEZ, G.; RADICE, M.; CUIROLO, A.; RODRÍGUEZ, O.; RODRÍGUEZ, H.; CAY, C.; FAMIGLIETTI, A.; GUTKIND, G. 2006. Prevalencia de metalo- β -lactamasas a carbapenemes en un hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*. 38: 33-37.
11. GILLINGS, M.; BOUCHER, Y.; LABBATE, M.; HOLMES, A.; KRISHNAN, S.; HOLLEY, M.; STOKES, W. 2008. The Evolution of class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*. 190: 5095-5100.
12. LOLANS, K.; QUEENAN, A.; BUSH, K.; SAHUD, A.; QUINN, J. 2005. First Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an Integron-borne Metallo- β -lactamase (VIM-2) in the United States. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 3538-3540.
13. SÁNCHEZ, D.; MARCANO, D.; SPADOLA, E.; LEÓN, L.; PAYARES, D.; UGARTE, C.; SALGADO, N.; GUEVARA, A.; TORRES, S.; RODRÍGUEZ, J.; FLORES, R. 2008. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales en Venezuela. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 39 (2).
14. OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; PORN, R.; OHTA, M. 2004. Molecular Characterization of an Enterobacterial Metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows Imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38: 71-78.

15. LAURETTI, L.; RICCIO, A.; MAZZARIOL, G.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, R.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. 2000. Cloning and Characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43: 1584-1590.
16. CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.; JONES, R.; SCHMID, F.; WALSH, T. 2004. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1} encoding a new subclass of Metallo- β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48: 4654-4661.
17. MAGALHAES, V.; LINS, A.; MAGALHAES, M. 2005. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Hospitals in Recife, PE, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 123-125.
18. IYOBE, S.; YAMADA, H.; MINAMI, S. 2006. Insertion of a carbapenemase gene cassette into an integron of a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 39: 824-829.
19. XU, Z.; LI, L.; SHIRTLIFF, M.; ALAM, M.; YAMASAKI, S.; SHI, L. 2009. Occurrence and Characteristics of Class 1 and 2 Integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Southern China. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 230-234.
20. XU, J.; MOORE, J.; MURPHY, P.; MILLAR, C.; ELBORN, J. 2006. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa* – comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 3: 21-25.
21. PITOUT, J.; GREGSON, D.; POIREL, L. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo- β -Lactamases in a large centralized laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 3129 – 3135.
22. SIARKOU, V.; VITTI, D.; PROTONOTARIOU, E.; IKONOMIDIS, A.; SOFIANOU, D. 2009. Molecular epidemiology of Outbreak related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla*_{VIM-17} Metallo- β -lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53: 1325-1330.
23. GOOTZ, T. 2010. The global problem of antibiotic resistance. *Critical Reviews in Immunology*. 30: 79-93.
24. GIBB, A.; TRIBUDDHARAT, R.; MOORE, T.; LOUIE, W.; KRULICKI, D.; LIVERMORE, M.; PALEPOU, F.; WOODFORD, N. 2002. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 255-258.