



---

*Tesina para optar por el grado de licenciado en ciencias biológicas*

# Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas* spp. productores de Metallo- $\beta$ -lactamasas

*Romina Papa Ezdra*

*Tutor: Dr. Rafael Vignoli*

*Co-tutora: Lic. Inés Bado*

*Departamento de Bacteriología y Virología*

*Instituto de Higiene*

*Tribunal:*

*Dr. Rafael Vignoli*

*Msc. Nicolás Cordeiro*

*Dra. Paola Scavone*

*Abril 2015*

# Índice

Resumen.....	3
1 .Introducción.....	4
2 .Marco teórico.....	5
2.1. Carbapenemes.....	6
2.2. Resistencia a carbapenemes: Carbapenemasas.....	6
2.3. Metallo-β-lactamasas.....	6
2.4. Contexto genético de las MBLs - Integrones.....	9
2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
2.6. Resistencia antibiótica en <i>Pseudomonas</i> spp.....	12
2.6.i. Resistencia a carbapenemes.....	14
3. Objetivos.....	15
4. Metodología.....	16
4.1. Cepas bacterianas.....	16
4.2. Ensayos fenotípicos: susceptibilidad antibiótica y screening de MBLs.....	16
4.2.i. Antibiogramas.....	16
4.2.ii. Concentraciones inhibitorias mínimas.....	16
4.2.iii. Detección de MBLs.....	17
4.3. Identificación de genes codificantes de MBLs y estudio de entornos genéticos.....	17
4.3.i. Extracción de ácidos nucleicos por shock térmico.....	17
4.3.ii. Búsqueda de genes codificantes de MBLs y caracterización de entornos genéticos por PCR.....	17
4.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	19
4.5. Secuenciación.....	20
4.6. Tipificación de los aislamientos por PFGE.....	20
5. Resultados.....	22
5.1. Cepas bacterianas.....	22
5.2. Ensayos fenotípicos.....	22
5.2.i. Antibiogramas.....	22
5.2.ii. Concentración inhibitoria mínima.....	24
5.3. Detección de MBLs.....	24
5.4. Estudio de entornos genéticos.....	26
5.5. Electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	30
6. Discusión.....	33
7. Perspectivas.....	37
8. Bibliografía.....	38

## **Resumen**

Los carbapenemes son antibióticos ampliamente utilizados a nivel intrahospitalario, sobre todo contra bacterias multirresistentes; el principal mecanismo de resistencia a éstos es la hidrólisis por carbapenemasas, entre las cuales se destacan las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) que actualmente se encuentran diseminadas en todo el mundo gracias a su asociación con elementos genéticos móviles. Dentro de los microorganismos multirresistentes portadores de MBLs se encuentran *Pseudomonas aeruginosa* y en menor medida otras especies del género como *Pseudomonas putida*. Se trata de un importante patógeno nosocomial y oportunista, cuya resistencia a carbapenemes puede deberse a la combinación de mecanismos como mutaciones que llevan a la inactivación de la porina OprD, hiperexpresión de bombas de eflujo o a la expresión constitutiva de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC; aunque el mecanismo más importante del punto de vista clínico y epidemiológico es la adquisición de carbapenemasas, siendo las MBLs las más frecuentes en el género, donde predominan los tipos VIM e IMP.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar fenotípica y genótipicamente aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y *P. putida* portadores de MBLs. Para ello se recurrió a técnicas fenotípicas de determinación de susceptibilidad antibiótica (disco difusión y test elipsométrico) y test de *screening* por sinergia de doble disco utilizando carbapenemes y EDTA como inhibidor. La identificación de MBLs se realizó por PCR, al igual que la caracterización de sus entornos genéticos. Para la tipificación molecular se utilizó la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

En un número total de 34 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* (n=25) y *P. putida* (n=9), se detectaron test de *screening* positivos en todos los casos, amplificándose por PCR el gen *bla*<sub>VIM</sub> en 28 aislamientos, el cual luego de secuenciado resultó ser *bla*<sub>VIM-2</sub>; mientras que en los 6 restantes no se amplificó ninguna MBL. De los 28 aislamientos con VIM, en 26 se amplificaron regiones variables de diferentes tamaños como 1000 pb (n=10), 1900 pb (n=1), 3500 pb (n=2) y 4000 pb (n=13), algunos de los cuales se asociaron a genes como *bla*<sub>GES-7</sub>, *aacA4*, *aacA7* y *catB*. El análisis por PFGE reveló la presencia de cuatro pulsotipos entre los aislamientos de *P. aeruginosa* VIM positivos: uno de ellos con los aislamientos del centro del departamento de Florida, otro con los del un nosocomio de Montevideo y los dos restantes con las cepas de otros dos centros de Montevideo, a los que también pertenecieron dos aislamientos agrupados en un mismo pulsotipo de *P. putida*.

Si bien puede arrojar falsos positivos, el *screening* de MBLs es una forma simple y económica para orientar hacia la presencia de este tipo de carbapenemasas previo a la confirmación molecular, de todos modos el diagnóstico de estas enzimas puede resultar problemático. La asociación de *bla*<sub>VIM-2</sub> a integrones de clase 1 puede facilitar su diseminación, junto con otros genes de resistencia que pueden presentarse o incorporarse en un futuro en la plataforma; esto limita aún más las opciones terapéuticas disponibles. La presencia de pulsotipos compartidos entre hospitales públicos de Montevideo sugeriría la existencia de vías de diseminación entre las instituciones involucradas. Además la situación del hospital F1 es de endemia y debería estudiarse en mayor profundidad para lograr una intervención acorde al problema.

# **1. Introducción**

Una de las principales invenciones de la medicina moderna fue el descubrimiento de las propiedades terapéuticas y preventivas de ciertos agentes contra las infecciones producidas por diferentes microorganismos, destacándose fundamentalmente el hallazgo de la penicilina y el comienzo de su utilización a mediados del siglo XX (Pillai *et al.* 2010; Tenover *et al.* 1995).

El comienzo del uso de antimicrobianos también constituyó un punto de inflexión en los procesos de presión de selección artificial de mecanismos de resistencia, los cuales se incrementaron y complejizaron con el uso corriente y masivo de los mismos (Tenover *et al.* 1995). Independientemente de esto, se asume que los mecanismos de resistencia provienen desde la era pre-antibiótica, surgiendo probablemente en bacterias productoras de agentes antimicrobianos, ampliamente diseminadas en el ambiente (aguas y suelos). Estas bacterias serían potenciales patógenos para los humanos, y además podrían proliferar, promoviendo la diseminación de sus mecanismos de resistencia en forma vertical y/u horizontal a otras (Opal & Pop-Vicas 2010).

Actualmente, la resistencia antibiótica representa un problema creciente para el sistema de salud, fundamentalmente debido al surgimiento de bacterias multirresistentes, entre las que se destacan diversos bacilos Gram negativos, como algunas especies del género *Pseudomonas*. Estos microorganismos multirresistentes son un importante desafío dado que limitan las opciones terapéuticas aumentando las probabilidades de mala elección de terapias empíricas, lo cual conduce a fallos terapéuticos asociándose a una mala evolución de los pacientes (Magiorakos *et al.* 2011, Woodford *et al.* 2011). Genéricamente se denominan bacterias multirresistentes a aquellas que presentan resistencia *in vitro* a más de un agente antimicrobiano, sin tomar en cuenta su resistencia intrínseca; sin embargo el uso de este término y su concepto no son utilizados uniformemente y varían entre diferentes autores. Esto ha sido abordado por Magiorakos y cols. (2011), quienes generaron un consenso a partir de la creación de categorías de antibióticos terapéuticamente relevantes para un grupo o especie bacteriana particular, y así evaluar su susceptibilidad, es decir, si la bacteria muestra un resultado resistente, intermedio o no sensible en estudios de sensibilidad *in vitro*. Definen entonces multirresistencia como la no susceptibilidad a por los menos un antibiótico en tres o más categorías, resistencia extrema cuando presenta no susceptibilidad a por lo menos un agente en todas las categorías exceptuando dos, y panresistencia cuando son no sensibles a todos los antibióticos de todas las categorías.

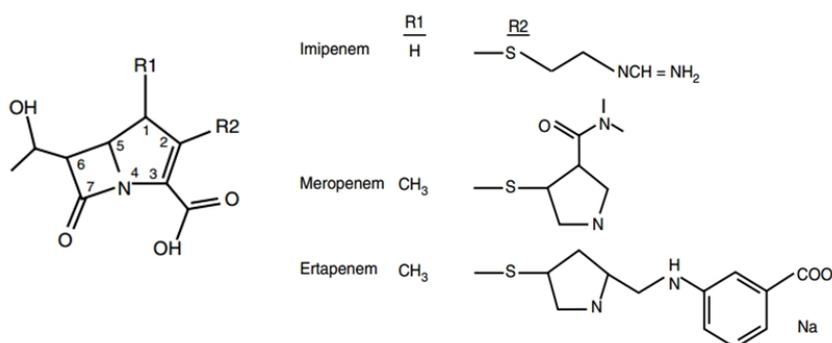
El tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas multirresistentes conduce al uso de antibióticos de amplio espectro como los carbapenemes, los cuales son ampliamente utilizados en infecciones intrahospitalarias (Fresnadillo *et al.* 2010).

## 2. Marco teórico

### 2.1. Carbapenemes

Los carbapenemes (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) conforman la clase de antibióticos con mayor espectro de acción dentro del grupo de los  $\beta$ -lactámicos. Presentan una estructura con dos anillos, uno  $\beta$ -lactámico (común a este grupo) y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado, diferenciándose los diferentes carbapenemes por las sustituciones en las posiciones 1 y 2 de éste último (Fresnadillo *et al.* 2010) (Figura 1).

Al igual que el resto de los  $\beta$ -lactámicos, su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la pared celular, durante su última etapa o transpeptidación (Bado *et al.* 2008a; Fresnadillo *et al.* 2010). Durante esta etapa ocurre el entrecruzamiento entre los pentapéptidos asociados a las moléculas de N-acetil murámico del peptidoglicano, llevado a cabo por las peptidasas o PBP (*penicillin-binding proteins* - proteínas de unión a la penicilina). Dichas moléculas son el blanco de los carbapenemes y su inhibición por los mismos provoca un debilitamiento en la pared celular, permitiendo la entrada de agua a la bacteria, con su consecuente muerte por lisis osmótica (Bado *et al.* 2008a).



**Figura 1.** Estructura central de los carbapenemes y grupos sustituyentes (R1 y R2) en imipenem, meropenem y ertapenem. *Modificado de Chambers 2010.*

El espectro de acción de los carbapenemes es muy amplio, incluye bacilos y cocos Gram positivos, con excepción de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, *Enterococcus faecium* y enterococos resistentes a  $\beta$ -lactámicos, y presentan una excelente actividad anaerobiocida; con respecto a Gram negativos, tienen muy buena actividad sobre enterobacterias, *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp., son efectivos contra la mayoría de los bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (los cuales son resistentes a ertapenem), mientras que especies como *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* son intrínsecamente resistentes a los carbapenemes (Bado *et al.* 2008a; Chambers 2010; Fresnadillo *et al.* 2010).

## 2.2. Resistencia a carbapenemes: Carbapenemasas

La resistencia a carbapenemes es poco frecuente, siendo menor que la documentada para otros  $\beta$ -lactámicos. Puede ser mediada por alguno de los siguientes mecanismos, aunque normalmente es consecuencia de la asociación de varios de ellos (Fresnadillo *et al.* 2010): (1) trastornos en la permeabilidad, mecanismo fundamentalmente hallado en Gram negativos, donde se ve disminuida la expresión de las porinas de tipo Opr; (2) presencia de sistemas de expulsión activa (eflujo), que expulsan al antibiótico fuera de la célula; (3) modificación del sitio blanco, es decir, la síntesis de PBP con menor afinidad por el antibiótico, siendo el más destacado la adquisición de un gen *mecA* en *S. aureus*, el cual codifica para una nueva PBP (PBP2a o PBP2') que no es reconocida por el antibiótico (4) producción de carbapenemasas, es decir, enzimas que hidrolizan la molécula del antibiótico (Bado *et al.* 2008b, Chambers 2010). Este último es el mecanismo de resistencia a carbapenemes más relevante del punto de vista clínico y epidemiológico en bacilos Gram negativos (Queenan & Bush 2007), y es al que se hará referencia a continuación.

Las carbapenemasas se clasifican en dos grupos funcionales, que a su vez se corresponden con tres de las cuatro clases moleculares de  $\beta$ -lactamasas de la clasificación de Ambler (Bush & Jacoby 2010; Cornaglia *et al.* 2011). El grupo de las serin-carbapenemasas, incluye  $\beta$ -lactamasas de las clases A y D de Ambler las cuales poseen serina en su sitio activo; mientras que las metalo-carbapenemasas o metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) corresponden a la clase B de Ambler, presentan al menos un ión de zinc en su sitio activo (Queenan & Bush 2007) y se profundizará en ellas más adelante.

Las serin-carbapenemasas de clase A, incluyen KPC que se ha asociado principalmente a enterobacterias; y con baja frecuencia las variantes de GES con actividad carbapenemasa (GES-2, -4, -5, -6) halladas fundamentalmente en *Pseudomonas aeruginosa*. Estas enzimas son inhibibles de forma variable por agentes como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, y presentan un perfil de hidrólisis amplio que incluye todos los  $\beta$ -lactámicos. Por otra parte, las  $\beta$ -lactamasas de clase D representan un grupo extremadamente heterogéneo de enzimas, dentro de las cuales algunas presentan actividad carbapenemasa, tal es el caso de las derivadas de OXA-23, OXA-24, OXA-51, y OXA-58, fundamentalmente predominantes en *Acinetobacter baumannii* y otros no fermentadores (Cornaglia *et al.* 2011; Queenan & Bush 2007); y las variantes de OXA-48 (la enzima tipo OXA con mayor perfil de hidrólisis), y sus derivadas OXA-163 y OXA-162, que se han reportado en enterobacterias y representan un problema creciente a nivel global (Poirel *et al.* 2012).

## 2.3. Metallo- $\beta$ -lactamasas

Las MBLs de mayor relevancia fueron descritas en la década de los ochenta, siendo el primer reporte en una cepa de *P. aeruginosa* en Japón en 1988, y en los últimos 30 años se transformaron

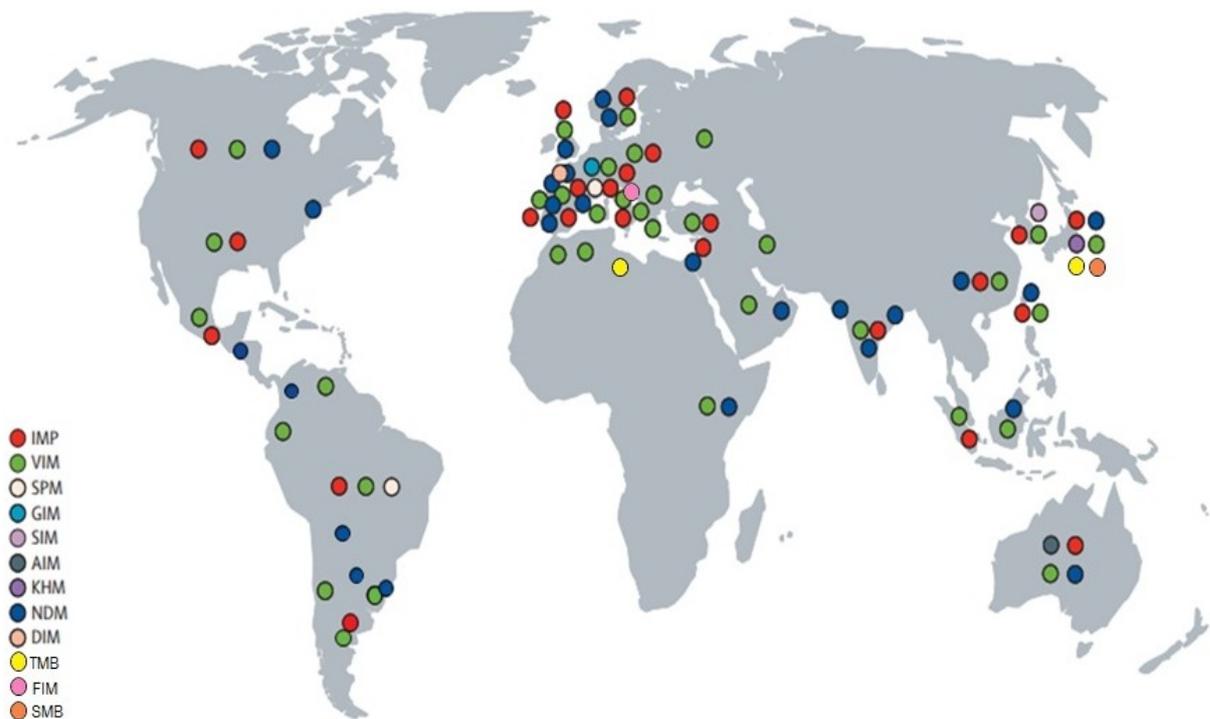
en un problema global debido a su diseminación entre los bacilos Gram negativos de mayor importancia clínica (Cornaglia *et al.* 2011).

Tienen actividad hidrolítica sobre todos los carbapenemes y la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos, pero a diferencia de las carbapenemasas de clase A, no hidrolizan monobactams y tampoco son inhibibles por los inhibidores convencionales de  $\beta$ -lactamasas (Cornaglia *et al.* 2011; Queenan & Bush 2007). Como ya se mencionó, presentan iones de zinc en su sitio activo, aquellas enzimas que tienen dos iones pertenecen a las subclases B1 y B3, mientras que las que tienen uno solo pertenecen a la subclase B2; la presencia de estos iones las hace inhibibles por quelantes de iones divalentes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Cornaglia *et al.* 2011).

Las MBLs pueden ser residentes, cuando son codificadas por genes cromosómicos, tal es el caso de las presentes en bacterias de importancia clínica como *Bacillus* spp., *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, algunas *Aeromonas* sp., algunas flavobacterias y *Pseudomonas otitidis*. Por otro lado, las MBLs de mayor importancia clínica y epidemiológica son las adquiridas, es decir, aquellas que pueden ser transferidas a través de elementos genéticos móviles; éstas pertenecen mayoritariamente a la subclase B1 (Cornaglia *et al.* 2011), pero también pueden ser de la subclase B3 (Wachino *et al.* 2012).

Hasta el momento se han descrito doce tipos diferentes de MBLs adquiridas: IMP, VIM, SPM, NDM, GIM, SIM, AIM, KHM, DIM (Cornaglia *et al.* 2011), TMB (El Salabi *et al.* 2012), SMB (Wachino *et al.* 2012) y FIM (Pollini *et al.* 2012); cuyas distribuciones se representan en la Figura 2 y se detallará a continuación.

Las MBLs más diseminadas son las de los tipos IMP, VIM y NDM, con diferentes variantes más distribuidas y otras más restringidas. IMP se ha descrito en países de todos los continentes en *P. aeruginosa*, enterobacterias y *A. baumannii*, y con menor frecuencia en otros bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas mendocina*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Aeromonas caviae*, y también en *Serratia marcescens* (Cornaglia *et al.* 2011). VIM también se encuentra ampliamente diseminada, existiendo reportes de todos los continentes tanto en *P. aeruginosa* como en enterobacterias, siendo más frecuente en la primera; también hay reportes de su hallazgo en *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *A. baumannii*, *A. xylosoxidans*, *S. marcescens* y *Aeromonas hydrophila*. Por último, la enzima NDM predomina en enterobacterias, se ha diseminado ampliamente por Asia (fundamentalmente India y países cercanos), reportándose también en Europa (donde también se halló en *A. baumannii*), Oceanía, África, Norteamérica y América del Sur (Cornaglia *et al.* 2011; Seija *et al.* 2015).



**Figura 2.** Aproximación a la distribución actual de las diferentes metalo- $\beta$ -lactamasas. Modificado de Cornaglia et al. 2011.

El resto de las carbapenemasas presenta una distribución más restringida, confinadas normalmente a escasas regiones o países: SPM en Brasil (*P. aeruginosa*), GIM con alta prevalencia en Alemania (*P. aeruginosa* y enterobacterias), SIM en Korea (*A. baumannii*) e India (enterobacterias), AIM en Australia (*P. aeruginosa*), KHM en Japón (*Citrobacter freundii*), DIM en Holanda (*Pseudomonas sutzeri*) (Cornaglia et al. 2011; El Salabi et al. 2012), TMB en Libia (*A. xylosoxidans*) (El Salabi et al. 2012) y Japón (*A. baumannii*) (Kayama et al. 2014), FIM en Italia (*P. aeruginosa*) (Pollini et al. 2012), y SMB en Japón (*S. marcescens*) (Wachino et al. 2012).

Particularmente en Latinoamérica, se han reportado variantes de carbapenemasas del tipo IMP, VIM, SPM y NDM en diferentes grupos de bacilos Gram negativos. En Brasil, predomina SPM en *P. aeruginosa*, se han reportado casos de VIM e IMP en *P. aeruginosa* y la segunda también en enterobacterias. IMP también se ha reportado en Argentina y México, mientras que VIM se ha hallado en Argentina, Chile, Venezuela, Colombia y México, principalmente en *Pseudomonas* spp., en México también asociada a enterobacterias (Cornaglia et al. 2011). Por otra parte, la MBL de tipo NDM fue la última en reportarse en este continente, hallada primero en Guatemala en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*, la siguieron hallazgos en Colombia, México, Honduras, Brasil y Paraguay (Seija et al. 2015).

En Uruguay la primer MBL en hallarse fue VIM en el año 2011, específicamente su variante VIM-2 presente en aislamientos de *P. aeruginosa* (Gutierrez et al. 2011; Ingold et al. 2011); mientras que en el 2013 se detectó el primer aislamiento de NDM-1 en un aislamiento de *C.*

*freundii* (Bado *et al.* 2013), al cual le han seguido otros aislamientos de enterobacterias con la misma enzima, asociados generalmente a organismos multirresistentes (Seija *et al.* 2015).

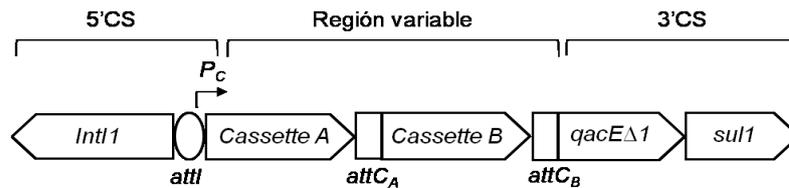
## 2.4. Contexto genético de las MBLs - Integrones

La capacidad de diseminación de los genes codificantes de MBLs entre bacterias de una misma especie, género o incluso entre géneros diferentes, se debe principalmente a eventos de transferencia horizontal, mediados por su asociación a elementos genéticos capaces de movilizar genes, como los integrones, los cuales a su vez son capaces de asociarse a plásmidos o transposones (elementos genéticos móviles) que promueven su diseminación intra e inter-especie (Cornaglia *et al.* 2011; Queenan & Bush 2007; Walsh *et al.* 2005).

Los integrones son plataformas de ADN capaces de incorporar genes en forma de *cassettes* mediante eventos de recombinación sitio-específica, mediados por una integrasa que ellos mismos codifican. De acuerdo a la secuencia de su integrasa, se clasifican en clases, siendo los integrones de clases 1, 2 y 3 los que más frecuentemente se han involucrado a determinantes de resistencia antibiótica (Cambray *et al.* 2010). Todos presentan cuatro componentes básicos, que son el gen que codifica para la integrasa (*intl*), una secuencia de recombinación sitio-específica (*attI*), un promotor ( $P_C$ ) y una región variable donde se insertan los *cassettes* génicos (Ramírez *et al.* 2010; Walsh *et al.* 2005). Éstos últimos, son moléculas de ADN circular de aproximadamente 1 kilobase (kb) que salvo excepciones no presentan un promotor propio y que normalmente consisten en un único gen y una secuencia denominada *attC* o elemento *59 base* (de tamaño variable) que es utilizada para la recombinación junto con la secuencia *attI*, lo que permite su inserción en la región variable del integrón y su expresión gracias al promotor  $P_C$  (Cambray *et al.* 2010). Dado que la inserción de *cassettes* en el integrón se da en el sitio *attI*, cada nuevo *cassette* se insertará en el extremo 5' del mismo, y por lo tanto más cerca del promotor, esto quiere decir que los genes más recientemente adquiridos tendrán mayores niveles de expresión (Opal & Pop-Vicas 2010).

Los integrones más frecuentemente asociados a MBLs son los de clase 1 (donde se encuentran codificadas enzimas como VIM, IMP, GIM, SIM), aunque también se han hallado en integrones de clase 3 (donde se hallaron genes codificantes de IMP) (Queenan & Bush 2007; Walsh *et al.* 2005); por otra parte, no se han encontrado genes de MBLs asociados a integrones de clase 2 (Ramírez *et al.* 2010).

Los integrones de clase 1 tienen dos regiones conservadas: la región conservada 5' (5'CR) contiene el gen *intl1*, la secuencia *attI* y el promotor, mientras que la 3' (3'CR) presenta los genes *qacEA1* y *sul1*, que codifican mecanismos de resistencia a amonios cuaternarios y a sulfonamidas respectivamente. Entre 5'CR y 3'CR se halla la región variable en la cual se insertan los *cassettes* génicos como ya fue mencionado (Toleman *et al.* 2006; Walsh *et al.* 2005) (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de un integrón de clase 1. La región conservada 5' (5'CS) presenta el gen codificante de la integrasa de clase 1 (*int11*), el sitio de integración *attI* y el promotor  $P_C$ ; la región conservada 3' (3'CS) presenta los genes *qacEΔ1* y *sul1*. Entre las dos regiones conservadas se halla la región variable en la que se insertan los *cassettes* génicos con sus respectivos sitios de integración *attC*.

También se conocen integrones de clase 1 complejos (cuyos primeros representantes descritos fueron In6 e In7) que se caracterizan por presentar una segunda secuencia conservada denominada ISCR u *orf513*, codificante de una recombinasa hipotética (a la que se asocian otros genes de resistencia antibiótica), y una duplicación de los genes *qacEΔ1* y *sul1*; dentro de los genes de resistencia asociados a estos elementos se han detectado genes codificantes de β-lactamasas de espectro extendido de tipo CTX-M-2 y la MBL de tipo SPM-1 (Vignoli et al. 2006; Toleman et al. 2006).

## 2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es la principal especie patógena dentro de su género y de la familia *Pseudomonadaceae* (Nicolau & Oliver 2010; Pier & Ramphal 2010). Se trata de un bacilo Gram negativo recto o ligeramente curvo, cuya morfología macroscópica se caracteriza por la producción de pigmentos, típicamente un color verdeazulado, en colonias planas, usualmente con un brillo metálico, aunque también pueden presentar morfologías más mucoides. Otra particularidad de *P. aeruginosa* es la producción de un olor frutado característico (Pier & Ramphal 2010).

Se trata de un microorganismo no exigente del punto de vista nutricional, no fermentador, que puede crecer sobre una amplia variedad de medios; es capaz de metabolizar diversas fuentes de carbono, produciendo ácido a partir de glucosa, fructosa y xilosa, pero no de lactosa y sacarosa (Pier & Ramphal 2010), esto es resultado de la acción de diferentes cadenas respiratorias de oxígeno (Madigan et al. 2012). Si bien se lo considera aerobio estricto, es capaz de crecer en anaerobiosis gracias a una cadena respiratoria que utiliza nitrato como aceptor final de electrones, en un medio de cultivo que presente dicho compuesto (Madigan et al. 2012). Es oxidasa positivo y puede crecer a 42°C, lo cual lo diferencia de otras especies dentro del género como *P. fluorescens* y *P. putida*, las cuales se asocian menos frecuentemente a infecciones (Pier & Ramphal 2010).

En cuanto a su ultraestructura, presentan un único flagelo polar y numerosas fimbrias. Puede producir un exopolisacárido, denominado alginato, cuya sobreexpresión origina colonias mucoides. El lipopolisacárido es completo en el 10 - 30% de las moléculas (con polisacárido O), mientras que el resto presenta solo el core y el lípido A (moléculas rugosas). La membrana externa presenta numerosas proteínas de membrana externa (OMPs) (Pier & Ramphal 2010).

*P. aeruginosa* es un patógeno nosocomial, oportunista, lo cual refleja su capacidad para crecer en ambientes con nutrientes mínimos, sobre todo húmedos (Nicolau & Oliver 2010; Pier & Ramphal 2010). Es ubicuo, y fuera del hospital se lo puede hallar en suelos, agua, plantas y como colonizador de animales y humanos sanos, o produciendo infecciones asociadas a la comunidad, por ejemplo infecciones urinarias u otitis externa (Pier & Ramphal 2010).

Dentro del ambiente hospitalario se caracteriza por permanecer en diferentes sitios, que pueden ser fuente de infección: colonización de superficies húmedas de los pacientes hospitalizados (axilas, orejas, perineo), objetos inanimados (sumideros, desagües, baños, duchas, floreros) y otros objetos que entran en contacto con agua, como ventiladores respiratorios, soluciones de limpieza, comidas, etc. En la comunidad, las fuentes más frecuentes son piscinas, jacuzzis y soluciones de limpieza de lentes de contacto (Pier & Ramphal 2010). En el ambiente nosocomial, es frecuente la adquisición de la bacteria a través del personal de salud, fundamentalmente a través de manos contaminadas con bacterias de otros pacientes del ambiente, y también por el contacto directo de las fuentes ambientales ya mencionadas; los pacientes colonizados son un importante reservorio (Tacconelli *et al.* 2014).

El control epidemiológico de las infecciones por *P. aeruginosa*, requiere de la determinación de la fuente y prevalencia del microorganismo en el ambiente intrahospitalario. Para ello se puede recurrir a diversas técnicas basadas en rasgos fenotípicos o genotípicos de la bacteria. Actualmente las técnicas moleculares basadas en el genoma han sustituido a las fenotípicas, principalmente debido a su alto poder discriminatorio. Entre ellas se reconocen electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), *multi locus sequence typing* (MLST), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP y PCR-RFLP), entre otros. Los análisis por PFGE han demostrado ser altamente discriminatorios de clones, mientras que MLST es útil para discriminar entre clones diferentes (Pier & Ramphal 2010).

En cuanto a su capacidad patogénica, el rol e importancia de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* dependen en gran medida de la respuesta inmune del huésped, el sitio de infección, la presencia de comorbilidades y de factores de riesgo; debido a que se trata de un patógeno oportunista que toma ventaja del compromiso del individuo. Sus factores de virulencia son variados: exotoxinas, endotoxinas, sistemas de secreción de tipo 3, pili, flagelo, proteasas, fosfolipasas, sistemas de captación de hierro, exopolisacáridos, capacidad de formación de biofilms, piocianinas. Además posee un genoma de gran tamaño (aproximadamente 6 mega

bases) que presenta gran plasticidad para incorporar y modificar ADN exógeno (Pier & Ramphal 2010).

Como factores de riesgo para adquirir infecciones por *P. aeruginosa* se destacan la presencia de quemaduras y otras heridas en la piel, catéteres intravenosos o urinarios, tubos endotraqueales, ventilación mecánica, tratamientos antibióticos, quimioterapia y cirugías; pudiendo adquirirse de cualquiera de las fuentes antes mencionadas. Un período de colonización suele preceder al menos un 50% de las infecciones invasivas (Pier & Ramphal 2010).

La infección más importante por su gravedad es la bacteriemia, que presenta más de un 50% de tasa de mortalidad y frecuentemente se debe a infecciones secundarias del tracto respiratorio o urinario, asociadas a la presencia de ventiladores mecánicos o catéteres urinarios (Pier & Ramphal 2010). El sitio de infección más frecuente es el tracto respiratorio, siendo uno de los agentes más frecuentes de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVIM), presentando una alta tasa de mortalidad (hasta 50%) (Nicolau & Oliver 2010), donde la colonización previa de las vías respiratorias y la antibióticoterapia previa suelen ser los predisponentes principales (Pier & Ramphal 2010); además suele causar infecciones crónicas en el tracto respiratorio de individuos con fibrosis quística o con daño bronquial. Otras infecciones frecuentes son las del tracto urinario a partir de un cuerpo extraño (*stent*, catéter) o su obstrucción luego de una cirugía; infecciones de piel y tejidos blandos por la presencia de quemaduras u otras heridas (Nicolau & Oliver 2010; Pier & Ramphal 2010); infecciones oculares relacionadas a traumatismos o daños superficiales causados por lentes de contacto, cirugías o quemaduras; en el oído, son agentes de “oído de nadador” y otitis media crónica supurativa. Infecciones de estas características también se presentan en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Otras infecciones menos frecuentes son las óseas, articulares y cardiovasculares (Pier & Ramphal 2010).

## **2.6. Resistencia antibiótica en *Pseudomonas* spp.**

*P. aeruginosa* es uno de los bacilos Gram negativos no fermentadores más importantes del punto de vista clínico como se mencionó anteriormente, en parte debido a que presenta diversos determinantes intrínsecos de resistencia antibiótica y también puede adquirir otros, llevando a la existencia de multirresistencia (Nicolau & Oliver 2010; Vila & Marco 2010). Otras especies de éste género, como *P. putida*, si bien presentan menor relevancia clínica, son consideradas un reservorio de mecanismos de resistencia transferibles, que pueden ser adquiridos por otras especies de mayor importancia, sobre todo *P. aeruginosa* (Juan *et al.* 2010; Nicolau & Oliver 2010).

Al igual que todos los Gram negativos, *Pseudomonas* spp. son naturalmente resistentes a vancomicina (Radice *et al.* 2011). Los determinantes de resistencia antibiótica han sido estudiados con mayor profundidad en *P. aeruginosa*, y por ello es a la que se hará referencia. Tres mecanismos contribuyen a la resistencia intrínseca a antibióticos en *P. aeruginosa*: (1) Baja permeabilidad de su membrana externa, la cual constituye una barrera semipermeable que induce a las moléculas de antibiótico a ingresar a través de porinas como OprF y OprD. (2) Expresión de

sistemas de eflujo o complejos de expulsión activa, que presentan tres componentes, una proteína citoplasmática (transportador), una de membrana externa y otra en el espacio periplásmico. Los que más contribuyen a la resistencia natural son los sistemas MexAB-OprM y MexXY-OprM (Vila & Marco 2010), involucrados en la resistencia a ertapenem principalmente (Fresnadillo *et al.* 2010). (3) Síntesis de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de clase C, denominada AmpC, que es inducible por cefoxitin e imipenem, presenta actividad cefalosporinasa (aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, y algunas de tercera como cefotaxime y ceftriaxona) y no es inhibible por ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam (Vila & Marco 2010).

En conjunto, estos determinantes contribuyen a la resistencia a aminopenicilinas (incluidas sus combinaciones con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas), cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxime, ceftriaxona, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclinas, ácido nalidíxico (Radice *et al.* 2011; Vila & Marco 2010), nitrofurantoína, novobiocina (Vila & Marco 2010), ertapenem, cefamicinas, tigeciclina, macrólidos y lincosamidas. Estos mecanismos contribuyen en menor medida a la resistencia intrínseca en *P. putida* a aminopenicilinas (incluidas sus combinaciones con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas), cefalosporinas de primera y segunda generación (Radice *et al.* 2011).

En *P. aeruginosa* la resistencia adquirida se debe a dos procesos principalmente: modificaciones en la expresión de los mecanismos de resistencia natural y la adquisición de genes de resistencia a través de transferencia horizontal (Nicolau & Oliver 2010; Radice *et al.* 2011). La porina OprD es la principal vía de entrada de imipenem a la bacteria, por lo tanto su pérdida o inactivación conduce a la disminución de la sensibilidad a este agente. La hiperproducción de sistemas de eflujo como MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, que dependiendo del sistema involucrado, puede afectar la actividad de diferentes grupos de antibióticos como  $\beta$ -lactámicos (incluyendo meropenem), fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Nicolau & Oliver 2010; Vila & Marco 2010). Mutaciones cromosómicas en sus genes regulatorios, pueden llevar al aumento de los niveles de expresión de la  $\beta$ -lactamasa AmpC, conduciendo a una expresión constitutiva de la misma, que confiere resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos con excepción de carbapenemes (Vila & Marco 2010).

La adquisición de genes de resistencia a través de transferencia horizontal es un mecanismo de gran importancia para *P. aeruginosa*. Se han descrito en esta bacteria diversas  $\beta$ -lactamasas de clase A, como  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado TEM-1,-2, PSE, CARB;  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de los tipos TEM, SHV, PER, VEB;  $\beta$ -lactamasas de tipo GES con y sin actividad carbapenemasa (Vila & Marco 2010); y carbapenemasas del tipo KPC. También se han hallado diversas  $\beta$ -lactamasas de clase D conocidas como OXA, cuyo espectro de hidrólisis es variable, pero normalmente afecta cefalosporinas de tercera generación, existiendo un grupo que hidroliza carbapenemes; y carbapenemasas de clase B ampliamente descritas en *P. aeruginosa* (Nicolau & Oliver 2010).

Dentro de los mecanismos de resistencia a otros grupos de antibióticos se destacan las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosforiltransferasas) y enzimas metilantes del ARN ribosomal como las de tipo Rmt; mientras que la resistencia a fluoroquinolonas principalmente está mediada por mutaciones en los genes que codifican la girasa o topoisomerasa IV, afectando el blanco de estos antibióticos (Vila & Marco 2010).

### **2.6.i. Resistencia a carbapenemes**

Como ya se mencionó, dentro de los mecanismos de resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, las carbapenemasas juegan un papel fundamental, pero también las mutaciones de los mecanismos intrínsecos anteriormente mencionados, que en conjunto pueden contribuir a la resistencia a carbapenemes: mutaciones que llevan a la inactivación de OprD, hiperexpresión de bombas de eflujo o a la expresión constitutiva de AmpC (Nicolau & Oliver 2010; Vila & Marco 2010).

Las carbapenemasas más frecuentemente halladas en *Pseudomonas* spp. son las metalo- $\beta$ -lactamasas, ampliamente distribuidas en *P. aeruginosa*, pero también halladas en otras especies como *P. putida* y *P. fluorescens*. Dentro de este grupo, las de tipo IMP y VIM son las más comunes en el género y las más diseminadas mundialmente; además en *P. aeruginosa* también se han descrito los tipos SPM, GIM, AIM, y FIM, y DIM en *P. stutzeri* (Cornaglia *et al.* 2011; Nicolau & Oliver 2010). Como ya se mencionó, muchas de estas enzimas se encuentran codificadas en genes que normalmente se insertan en integrones, lo cual permite su diseminación horizontal por asociación a elementos genéticos móviles.

Otras carbapenemasas menos frecuentemente halladas en *Pseudomonas* son las de clase A, de los tipos KPC y GES, y las de clase D que se ha hallado solo el tipo OXA-40 (Nicolau & Oliver 2010).

### 3. **Objetivos**

#### Objetivo general:

Detectar la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) en aislamientos clínicos de *Pseudomonas* spp; y determinar las relaciones clonales de dichos aislamientos.

#### Objetivos específicos:

- Caracterizar fenotípica y genotípicamente las MBLs.
- Caracterizar el entorno genético de las MBLs.
- Tipificar los aislamientos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), para determinar la relación clonal entre los mismos.

## **4. Metodología**

### **4.1. Cepas bacterianas**

Se trabajó con 34 cepas de *P. aeruginosa* (n=25) y *P. putida* (n=9) con sensibilidad disminuida a carbapenemes (imipenem y/o meropenem) y con sospecha de la presencia de MBLs a partir de los estudios de susceptibilidad realizados en los laboratorios clínicos de los hospitales de los que provenían.

Las cepas fueron recuperadas entre los años 2011 y 2013 de cinco centros hospitalarios de Montevideo (M1 a M4) y Florida (F1). De las cuatro instituciones de Montevideo, dos de ellas pertenecieron al ámbito público (M1 y M2) y otras dos fueron privadas (M3 y M4).

La identificación y perfil de sensibilidad (mediante aproximación por extrapolación) de las cepas se realizó previamente en los laboratorios clínicos correspondientes a cada hospital, mediante los sistemas automatizados VITEK® 2 (*BioMérieux*) o Phoenix® (*BD*). Los resultados fueron interpretados según las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2014.

### **4.2. Ensayos fenotípicos: susceptibilidad antibiótica y *screening* de MBLs**

#### **4.2.i. Antibiogramas**

Se realizaron ensayos de disco difusión por la técnica de Kirby-Bauer en agar Müller-Hinton (MHA), según las indicaciones del CLSI 2014, con discos comerciales de imipenem (IPM) 10 µg, meropenem (MEM) 10 µg, cefepime (FEP) 30 µg y ceftazidime (CAZ) 30 µg. Adicionalmente se realizó el control de calidad correspondiente con una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (*American Type Culture Collection*). Los halos de inhibición se midieron y se interpretaron según los puntos de corte establecidos en la guía del CLSI 2014.

#### **4.2.ii. Concentraciones inhibitorias mínimas**

Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los aislamientos para imipenem y meropenem mediante test elipsométrico, con tiras comerciales de E-test (*bioMérieux*®) con gradientes entre 0.002 y 32 µg/ml para ambos antibióticos. Los resultados se interpretaron según la guía del CLSI 2014.

### **4.2.iii. Detección de MBLs por test de *screening***

El algoritmo aplicado para la búsqueda de metalo- $\beta$ -lactamasas se basó en las recomendaciones de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" de Buenos Aires, donde se plantea que un aislamiento de *P. aeruginosa* es sospechoso de presentar una carbapenemasa si presenta un halo de MEM  $\leq 23$  mm y CAZ  $\leq 22$  mm en el antibiograma por disco difusión; seguido por un ensayo de *screening* positivo con un inhibidor (INEI-ANLIS 2012).

Los tests de *screening* para MBLs se realizaron a través de ensayos de sinergia con doble disco, sembrando placas de MHA según las indicaciones del CLSI 2014 para disco difusión. Se utilizaron monodiscos de EDTA (conteniendo EDTA 372  $\mu$ g y mercaptoacetato de sodio 900  $\mu$ g) como agente inhibidor de MBLs, y a una distancia de 10 a 15 mm del mismo se colocaron discos de IPM 10  $\mu$ g, MEM 10  $\mu$ g, FEP 30  $\mu$ g y CAZ 30  $\mu$ g. Un agrandamiento del halo de inhibición entre alguno de los discos de antibiótico y el disco de EDTA fue interpretado como *screening* positivo (Cejas *et al.* 2008; Nicolau & Oliver 2010).

## **4.3. Identificación de genes codificantes de MBLs y estudio de entornos genéticos**

### **4.3.i. Extracción de ácidos nucleicos por shock térmico**

Cada cepa se aisló en medio tripticasa soja agar (TSA) y tras 18-24 horas de incubación se tomaron 4-5 colonias que se suspendieron en *buffer* TE-Tritón 1X (EDTA 0.1M, TRIS-HCl 1M, Tritón 1%). Las suspensiones se sometieron una etapa de calentamiento a 100°C por 10 minutos, y luego una de enfriamiento a -20°C por 5 minutos; finalmente se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm y se conservó el sobrenadante, que contenía los ácidos nucleicos bacterianos. Las extracciones de ADN se conservaron en *freezer* a -20°C.

### **4.3.ii. Búsqueda de genes codificantes de MBLs y caracterización de entornos genéticos por PCR**

A las cepas que resultaron positivas para el test de *screening*, se les realizó búsqueda de genes codificantes de MBLs mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con *primers* específicos para los genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> y *bla*<sub>NDM</sub>, que codifican para las enzimas VIM, IMP, SPM, SIM, GIM y NDM respectivamente (Tabla 1).

Se realizó la búsqueda de integrones de clase 1, 2, 3 y del elemento *ISCR1*; para lo cual se hicieron ensayos de PCR con *primers* específicos de los genes codificantes de las integrasas de clase 1, 2 y 3 (*int11*, *int12* e *int13*), y de la recombinasa hipotética *orf513* de *ISCR1* (Tabla 1). También se estudió la presencia de regiones variables de integrones de clase 1, comprendidas

entre las regiones conservadas 5' y 3' (3'CS y 5'CS) donde suelen insertarse los genes en forma de *cassettes* (Tabla 1).

Por último se realizaron ensayos de PCR para el estudio en profundidad de algunos integrones, donde se utilizaron combinaciones con los *primers* de región variable y los de genes como *bla<sub>VIM</sub>* (5CS/VIM-R y 3CS/VIM-F), *bla<sub>GES</sub>* y *aac* (Tabla 1), e incluso combinaciones entre ellos.

Se utilizó un protocolo genérico de PCR para todas las reacciones, con algunas variantes según el gen que se buscaba amplificar. El volumen final de reacción fue de 25 µl con las siguientes concentraciones finales: *buffer* de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 0.2 mM (0.4 mM para *orf513*), *primers* 0.5 µM (0.6 µM para *int11* y *orf513*), 0.625 U Taq Polimerasa (1 U para *orf513*, *Int11* y región variable), 2.5 µl de ADN molde (2 µl para regiones variables) y agua de calidad molecular (mili-Q) estéril. Las reacciones se realizaron en un termociclador, en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 1 minuto, hibridación con los *primers* a la temperatura indicada para cada uno (ver Tabla 1) durante 1 minuto, y polimerización a 72°C 1 minuto (2 minutos para regiones variables y *orf513*); al inicio de los 30 ciclos se realizó una desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos y el final de los mismos una polimerización final a 72°C 10 minutos. Adicionalmente, para cada ensayo de amplificación, se incluyeron controles positivos y controles de mezcla.

En el caso de las combinaciones de los *primers* de regiones variables con otros genes, las temperaturas de hibridación dependieron de las temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) de cada *primer* utilizado (4°C menos que la  $T_m$  de menor valor) y en algunos casos se aumentó el tiempo de polimerización (72°C) a 3 minutos.

**Tabla 1.** Lista de *primers* utilizados para la amplificación por PCR de las diferentes MBLs y para el estudio de entornos genéticos, con sus respectivas secuencias, temperaturas de hibridación y tamaño esperado del amplicón. También se indica el número de referencia de cada primer utilizado para el mapeo de regiones variables (Resultados, Figura 11).

Gen	Primer	Número	Secuencia (5'-3')	Temperatura de hibridación	Tamaño del amplicón
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM-F	1	TAGGAATTCACCATGTTCAAACCTTTGAGTAAGT	55°C	801 pb
	VIM-R	2	ATAAAGCTTAGCTACTCAACGACTGAGCGA		
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	int/imp		AGTCAGGTTTGGCAGATCCGT	56°C	703 pb
	imp-R		GGTTTAACAAAACAACCACC		
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	NDM-F		GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	56°C	620 pb
	NDM-R		CGGAATGGCTCATCACGATC		
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	SPM-F		ATGAACTCACCTAAATCGAGAGCC	60°C	614 pb
	SPM-R		AAACAGCAGTTTCTTCTTGCC		
<i>bla<sub>SIM</sub></i>	SIM-F		TATTCGGCACTTTAAATACCGCG	62°C	635 pb
	SIM-R		GCCACAGTGAAATCGGAGACG		
<i>bla<sub>GIM</sub></i>	GIM-F		CTTGTAGCGTTGCCAGCTTT	56°C	722 pb
	GIM-R		TTAATCAGCCGACGCTTCAG		
<i>Int1</i>	I5		ACCGCCAACCTTCAGCACAT	59°C	928 pb
	I3		GCGTTCGGTCAAGTTCTGG		
<i>Int2</i>	intI2-F		TTATTGCTGGGATTAGGC	54°C	232 pb
	intI2-R		ACGGCTACCCTCTGTTATC		
<i>Int3</i>	intI3-F		CGAATGCCCAACAACCTC	45°C	921 pb
	intI3-R		ATCTGCCAAACCTGACTG		
<i>orf513</i>	F12R		AAACCAGCATGGTTGGCTAC	54°C	1210 pb
	ORFend		CCGTTAAGCTCTTATGTGGG		
<b>RV</b>	5CS	3	GGCATCCAAGCAGCAACG	56°C	Variable
	3CS	4	AAGCAGACTTGACCTGAT		
<i>bla<sub>GES</sub></i>	GES-F	5	GAAAAAGCAGCTGAGATCG	56°C*	Variable
	GES-R	6	CAACAACCCAATCTTTAGGA	56°C*	
<i>aac</i>	aac-F	7	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	59°C*	Variable
	aac-R	8	CTCGAATGCCTGGCGTGT	59°C*	

\*Para estos *primers* se indica la temperatura de *melting*  $T_m$

#### 4.4. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%, en *buffer* Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X (Tris Base 89mM; Ácido Bórico 89mM; EDTA 25mM, pH 8). A los productos obtenidos luego de la amplificación se les adicionó *buffer* de carga 6X (0.25% azul de Bromofenol, 30% glicerol) a una concentración final de 1X, de modo que las muestras no difundieran desde los pocillos y que permitiera observar el frente de corrida; y de esta forma se cargaron en los pocillos del gel. Además de las muestras y sus respectivos controles, se cargó en un uno de los carriles un marcador de peso molecular, que permitió estimar el tamaño de los productos de PCR, que según los resultados esperados se utilizaron marcadores de de 100 a 1000 pares de bases (pb) o de 250 a 10000 pb.

Los geles, inmersos en TBE, se sometieron a un campo eléctrico en una cuba de electroforesis, donde las muestras se separaron según su tamaño. Posteriormente el gel se sumergió 10-15 minutos en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), un agente fluorescente que se intercala entre las bases del ADN, que al exponerse en un transiluminador UV permitió

observar las bandas correspondientes a los amplicones y al marcador de peso molecular a la altura correspondiente con su tamaño.

#### 4.5. Secuenciación

La identidad de los productos amplificados fue confirmada por su secuenciación. Para ello se amplificaron los genes por PCR y los productos fueron purificados mediante *kits* comerciales (*Qiagen*) según el instructivo del fabricante. El ADN purificado fue secuenciado por el Servicio de Secuenciación del *Institut Pasteur* de Montevideo.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con el programa *Chromas Lite 2.1* (*Technelysium* ©), las cuales se compararon contra la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), mediante la herramienta BLASTn (Altschul *et al.* 1990); esto permitió confirmar la presencia de un gen determinado y su alelo.

#### 4.6. Tipificación de los aislamientos por PFGE

Los perfiles genotípicos de las cepas fueron comparados por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), a partir de un protocolo de *PulseNet* (2013) modificado, procediendo según los siguientes pasos:

- Suspensiones bacterianas: Se prepararon a partir de cultivos en TSA monomicrobianos y frescos (18-24 horas a 37°C) de todas las cepas, suspendiendo colonias en 2 o 3 ml de *buffer* de suspensión celular (Tris 0.1 M, EDTA 0.1 M) hasta llegar a una turbidez equivalente a 8.4 en la escala McFarland, medido con un turbidímetro DEN-1B *BioSan*.
- Armado de bloques: En primera instancia se preparó la agarosa LF (*Amresco*<sup>TM</sup>) para bloques al 1%, conteniendo SDS 1% y *buffer* TE (Tris 0.1 M, EDTA 0.1 M). Los bloques se armaron en un soporte con 150 µl de suspensión bacteriana, 150 µl de agarosa (termostatizada a 56°C), y 0.5 mg/ml de Proteinasa K (*Bioline*<sup>®</sup>). Una vez sólidos, se colocaron en 2 µl de *buffer* de lisis (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, N-lauril sarcosina 1%) con 0.25 mg/ml de Proteinasa K y se incubaron 18 horas en un baño a 56°C con agitación. Por último, para cada bloque se realizaron 5 lavados de 15 minutos en baño a 56°C con agitación, 2 con agua mili-Q y 3 con *buffer* TE.

Esto se realizó para todos los aislamientos, y además para la cepa de referencia *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup H9812 (*Salmonella* Braenderup).

- Digestión: Los bloques se cortaron con un grosor de 3 mm, cada uno se colocó en un tubo con 200 µl de mezcla de restricción, y se incubaron 18 horas a 37°C.

Para la restricción de *Pseudomonas* spp. se utilizó la enzima *SpeI* (*Thermo Scientific*<sup>®</sup>), la cual realiza entre 15 y 25 cortes del genoma bacteriano, en una solución en agua mili-Q conteniendo 10 U de enzima y 1X de *buffer* de la misma. En el caso de *S. Braenderup*, la enzima utilizada fue *XbaI* (*Thermo Scientific*<sup>®</sup>), en una solución en agua mili-Q con 30 U de enzima y 1X de su *buffer*.

- Electroforesis: El gel se armó con agarosa LF al 1% con *buffer* Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X, donde se ordenaron los bloques. Una vez sólido, el gel se colocó en la cuba electroforética para campo pulsado, sumergido en *buffer* TBE.

La corrida se realizó a un voltaje de 6 V/cm, con pulso inicial 4 segundos y pulso final 40 segundos, durante 20 horas a 14°C.

- Revelado del gel: Luego de la corrida se realizó la tinción del gel en bromuro de etidio ( $1 \times 10^{-3}$  mg/ml), durante 30 minutos en agitación, y luego de un paso de 10 minutos de decoloración en agua mili-Q, se expuso el gel a un transiluminador UV para observar los patrones de bandas de cada cepa y tomar una foto.

- Interpretación de los resultados: los patrones de restricción fueron analizados con el programa *Bionumerics* 6.6 (*Applied Maths* 2011), con el cual se definieron las bandas y se normalizaron utilizando la cepa de referencia *S. Braenderup* H9812. La comparación de los asilamientos se realizó utilizando el algoritmo *Dice* para calcular el coeficiente de similitud basado en el patrón de bandas, y así construir dendrogramas según el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), utilizando 0.5% de optimización y 0.8% de tolerancia.

La interpretación del dendrograma se realizó utilizando como referencia una similitud entre los aislamientos  $\geq 80\%$  para considerarlos como clonalmente relacionados (pertenecientes a un mismo pulstipo), y de 100% para considerar dos cepas como genéticamente idénticas (*Singh et al.* 2006).

## 5. Resultados

### 5.1. Cepas bacterianas

Entre 2011 y 2013 se recibieron un total de 34 aislamientos de *P. aeruginosa* y *P. putida* con sospecha de presencia de MBLs, cuyas procedencias y distribución de especies se resumen en la Tabla 2.

Los sitios de aislamiento fueron variados: herida de cirugía plástica, urocultivo, herida de pie diabético, lesión de pie, hemocultivo, secreciones respiratorias, líquido pleural, exudado ótico, úlcera de cadera; pero estos datos no se obtuvieron para la totalidad de los aislamientos.

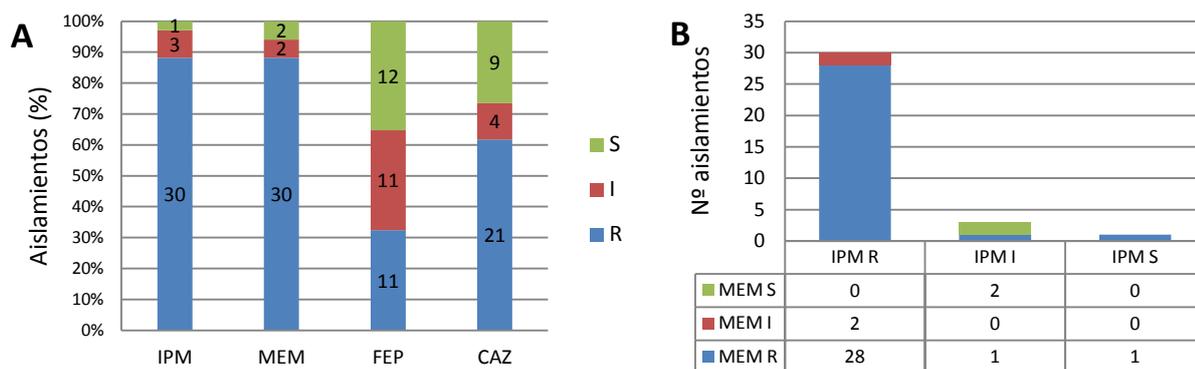
**Tabla 2.** Número de aislamientos de *P. aeruginosa* y *P. putida* correspondientes a cada centro hospitalario y período de recepción de los mismos.

Hospital	Nº <i>P. aeruginosa</i>	Nº <i>P. putida</i>	Período
M1	3	3	Marzo 2011 - Diciembre 2013
M2	3	3	Abril 2011 - Febrero 2013
M3	4	0	Setiembre 2012 - Enero 2013
M4	1	0	Julio 2011
F1	14	3	Noviembre 2011 - Diciembre 2013
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>9</b>	

### 5.2. Ensayos fenotípicos

#### 5.2.i. Antibiogramas

El estudio de susceptibilidad antibiótica por el método de disco difusión de Kirby-Bauer reflejó altos niveles de resistencia a los carbapenemes. Se observó que un total de 30 cepas fueron resistentes a IPM (88.24%), 3 tuvieron resistencia intermedia (8.82%) y 1 fue sensible (2.94%); mientras que 30 cepas fueron resistentes a MEM (88.24%), 2 tuvieron resistencia intermedia (5.88%) y 2 fueron sensibles (5.88%) (Figura 4A). Un total de 28 aislamientos fueron resistentes a IPM y MEM (Figura 4B). Los resultados de este estudio se resumen en la Tabla 3.



**Figura 4.** Estudio de susceptibilidad antibiótica por el método de disco difusión: **A.** Para el total de los aislamientos (n=34) se representa el porcentaje que fueron sensibles (S), resistentes (R) o con resistencia intermedia (I) para los antibióticos imipenem (IPM), meropenem (MEM), cefepime (FEP) y ceftazidime (CAZ); dentro de cada barra se muestra el número de aislamientos. **B.** Comparación del número de aislamientos S, R e I para MEM e IPM.

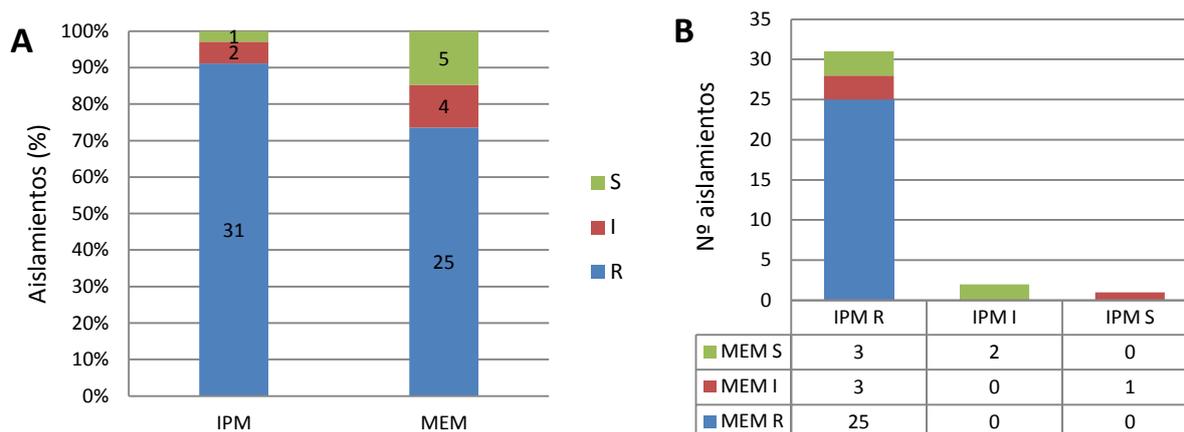
**Tabla 3.** Resumen de los resultados de susceptibilidad antibiótica y PCR: Para cada aislamiento (n=34), se observan los resultados obtenidos tras la interpretación según CLSI 2014 de los ensayos de disco difusión y concentración inhibitoria mínima (CIM); así como el resultado de PCR para *bla<sub>VIM</sub>*. El prefijo en el número de aislamiento indica la especie *P. aeruginosa* (Pa) o *P. putida* (Pp).

Fecha de recepción	Aislamiento	Disco difusión (*)				CIM (µg/ml) (*)				PCR (**) <i>bla<sub>VIM</sub></i>
		IPM	MEM	FEP	CAZ	IPM	MEM			
Marzo/2011	PaV2	R	R	S	S	≥32	R	2	S	+
Abril/2011	Pa60-2	I	S	S	S	≥32	R	6	I	+
Mayo/2011	Pa11-15	R	R	I	I	≥32	R	1,5	S	+
Julio/2011	PaCG	R	R	S	S	6	I	1,5	S	-
Noviembre/2011	Pa356	R	R	I	R	≥32	R	2	S	+
Noviembre/2011	Pp829	R	R	S	I	≥32	R	≥32	R	+
Marzo/2012	Pa561	I	R	S	S	2	S	3	I	-
Marzo/2012	Pa607	S	R	S	S	≥32	R	≥32	R	-
Abril/2012	Pp166	R	R	S	S	≥32	R	≥32	R	+
Mayo/2012	Pp717	R	R	S	R	≥32	R	≥32	R	+
Mayo/2012	Pa570	R	I	R	R	≥32	R	12	R	-
Julio/2012	Pp155	R	R	I	R	≥32	R	≥32	R	+
Agosto/2012	Pa523	R	R	R	S	≥32	R	≥32	R	+
Setiembre/2012	Pa663	R	R	R	I	≥32	R	≥32	R	+
Setiembre/2012	Pa231E	R	I	S	S	8	R	4	I	-
Octubre/2012	Pp144	R	R	R	R	≥32	R	≥32	R	+
Octubre/2012	Pa179	R	R	I	R	≥32	R	≥32	R	+
Noviembre/2012	Pa911	R	R	S	R	≥32	R	≥32	R	+
Noviembre/2012	Pp621	R	R	R	R	≥32	R	≥32	R	+
Diciembre/2012	Pa248	I	S	S	S	4	I	1	S	-
Diciembre/2012	Pp531	R	R	R	R	≥32	R	≥32	R	+
Enero/2013	Pa139	R	R	R	R	≥32	R	≥32	R	+
Febrero/2013	Pp114	R	R	I	R	≥32	R	≥32	R	+
Febrero/2013	Pa213	R	R	I	R	≥32	R	4	I	+
Febrero/2013	Pa926	R	R	R	R	≥32	R	≥32	R	+
Marzo/2013	Pa149	R	R	R	R	≥32	R	≥32	R	+
Abril/2013	Pa517	R	R	S	R	≥32	R	≥32	R	+
Mayo/2013	Pa559	R	R	I	R	≥32	R	≥32	R	+
Julio/2013	Pa089	R	R	I	R	≥32	R	≥32	R	+
Julio/2013	Pa318	R	R	R	R	≥32	R	≥32	R	+
Julio/2013	Pa782	R	R	I	R	≥32	R	≥32	R	+
Noviembre/2013	Pa794	R	R	I	I	≥32	R	≥32	R	+
Diciembre/2013	Pa931	R	R	I	R	≥32	R	≥32	R	+
Diciembre/2013	Pp189	R	R	R	R	≥32	R	≥32	R	+

(\*)Resistente (R), intermedio (I), sensible (S). Antibióticos: imipenem (IPM), meropenem (MEM), cefepime (FEP), ceftazidime (CAZ). (\*\*) Positivo (+), negativo (-).

### 5.2.ii. Concentración inhibitoria mínima

Las CIM determinadas por test elipsométrico también reflejaron altos niveles de resistencia a IPM y MEM, aunque los rangos de CIM fueron variadas, siendo entre 2 y  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  para IPM y entre 1 y  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  para MEM (Tabla 3). Veintitrés aislamientos fueron resistentes a ambos antibióticos, otros 6 fueron resistentes a IPM (3 sensibles a MEM y 3 intermedios), 2 aislamientos mostraron resistencia intermedia a IPM y sensibilidad a MEM, y 1 fue sensible a IPM e intermedio a MEM (Figuras 5A y 5B).



**Figura 5.** Estudio de susceptibilidad a imipenem (IPM) y meropenem (MEM) realizado por E-test: **A.** Para el total de los aislamientos ( $n=34$ ) se representa el porcentaje que fueron sensibles (S), resistentes (R) o con resistencia intermedia (I) para ambos antibióticos; dentro de cada barra se muestra el número de aislamientos correspondiente. **B.** Comparación del número de aislamientos S, R e I para MEM e IPM.

### 5.3. Detección de MBLs

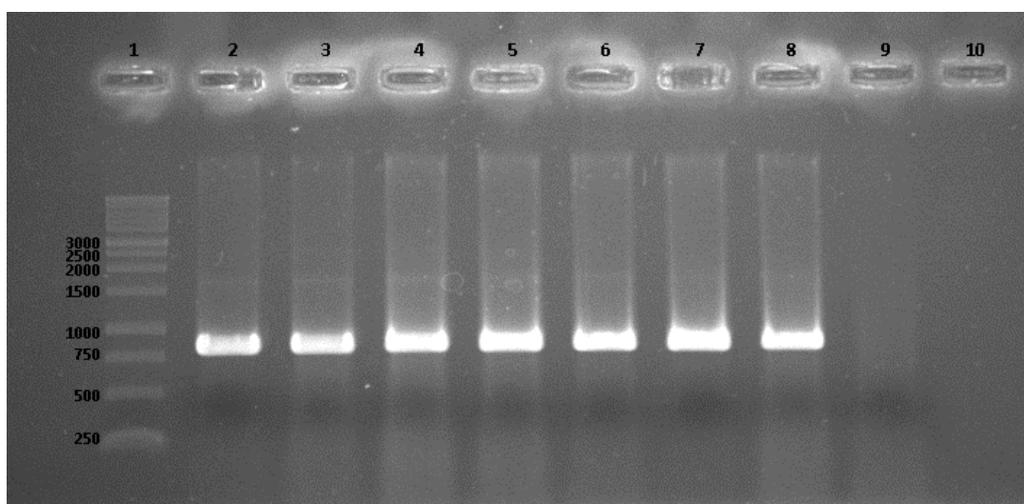
De las 34 cepas disponibles, solo 4 no cumplieron con el criterio del algoritmo utilizado (halos de MEM  $\leq 23$  mm y CAZ  $\leq 22$  mm), pero de todas formas se prosiguió con su estudio, dado que presentaron resistencia o susceptibilidad disminuida a carbapenemes en los estudios de disco difusión o CIM, o que presentaban un estudio de sinergia previamente realizado en el hospital de origen (el cual se repitió al momento de recepción de la cepa).

Las 34 cepas estudiadas resultaron positivas para el test de *screening* de MBLs, observándose un agrandamiento del halo de inhibición entre el disco de antibiótico y el de EDTA (Figura 6).

En un total de 28 aislamientos se amplificó por PCR el gen *bla<sub>VIM</sub>*, dicho resultado se visualizó en geles de agarosa al 1% como una banda de 800 pb, al igual que el control positivo utilizado (Figura 7). La posterior secuenciación del amplicón permitió identificar la variante *bla<sub>VIM-2</sub>* del gen. Los 6 aislamientos restantes resultaron negativos para la amplificación con los *primers* específicos para los genes *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>* y *bla<sub>GIM</sub>*.

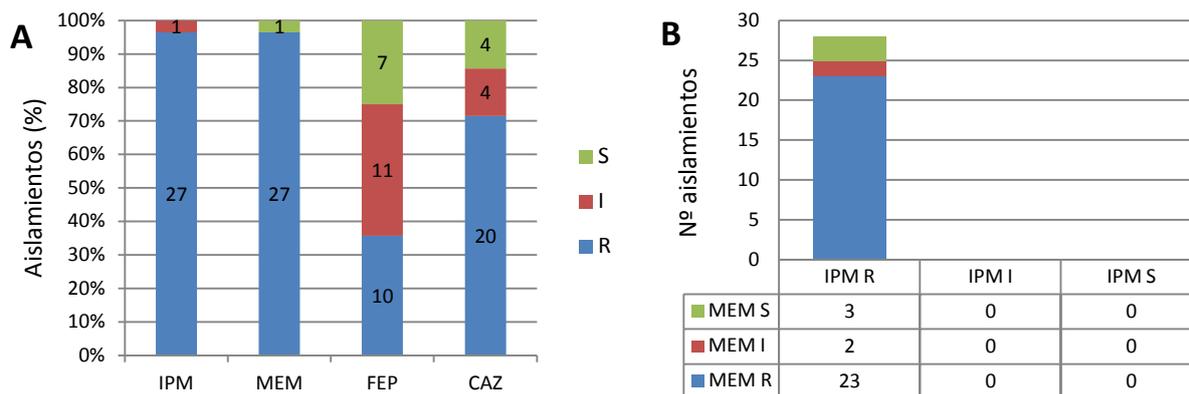


**Figura 6.** Sinergia positiva entre discos de EDTA y de meropenem (MEM) e imipenem (IPM). El agrandamiento del halo indica un test de *screening* positivo.



**Figura 7.** Electroforesis de los productos de PCR para el gen *bla<sub>VIM</sub>*. Carriles: (1) Marcador de peso molecular *1 kb Ladder* (Promega); (2, 3, 4) muestras positivas para *bla<sub>VIM</sub>*, banda única de 800 pb; (5) muestra negativa para *bla<sub>VIM</sub>*; (6) control positivo de *bla<sub>VIM</sub>*, banda de 800 pb; (7) control de mezcla.

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos en la PCR para cada cepa, así como de su estudio de sensibilidad. La totalidad de los aislamientos *bla<sub>VIM</sub>* positivos (n=28) fueron resistentes a IPM por el método elipsométrico, exhibiendo una CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 23 de ellos presentaron el mismo valor de CIM para MEM, mientras que para los 5 restantes fue menor (Figura 8B). Por la técnica de disco difusión se observaron 27 aislamientos resistentes a IPM y MEM, y uno sensible a MEM y con sensibilidad intermedia para IPM. En cuanto a la susceptibilidad a FEP y CAZ, se observaron menos cepas sensibles con respecto al total (n=34) (Figura 8A); es decir que en el totalidad de los aislamientos hubo 12 sensibles a FEP y 9 a CAZ, mientras que entre los *bla<sub>VIM</sub>* positivos fueron 7 y 4 respectivamente, con un único aislamiento sin *bla<sub>VIM</sub>* resistente a ambos antibióticos.



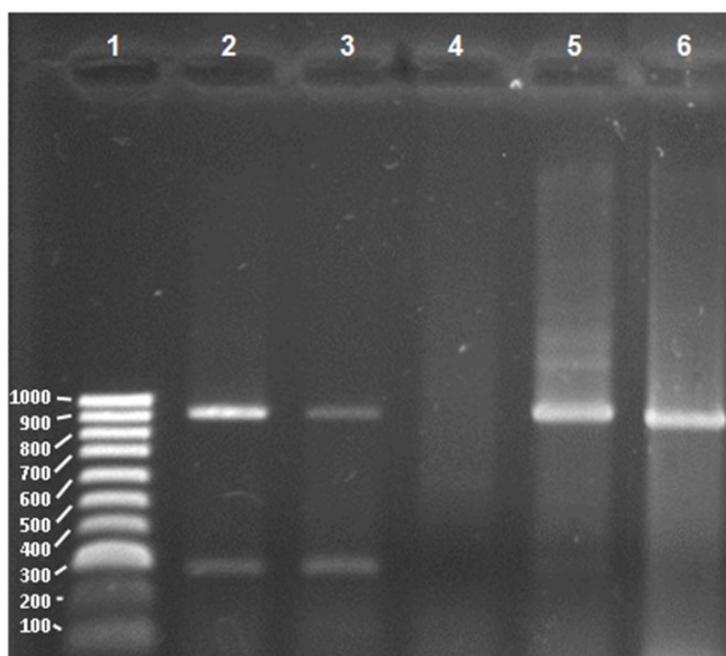
**Figura 8.** Estudios de susceptibilidad antibiótica en aislamientos *bla<sub>VIM</sub>* positivos (n=28). **A.** Representación del porcentaje de aislamientos S, R o I para los antibióticos imipenem (IPM), meropenem (MEM), cefepime (FEP) y ceftazidime (CAZ), determinada por disco difusión; dentro de cada barra se muestra el número de aislamientos correspondiente. **B.** Comparación del número de aislamientos sensibles (S), resistentes (R) y con sensibilidad intermedia (I) para los antibióticos imipenem (IPM) y meropenem (MEM), determinado por test elipsométrico.

#### 5.4. Estudio de entornos genéticos

En primera instancia se realizó el estudio del contexto genético de los genes *bla<sub>VIM</sub>* previamente amplificados, mediante PCRs con *primers* para la amplificación de *intl1*, *intl2*, *intl3* y *orf513*.

De las 34 cepas estudiadas, se amplificó el gen de la integrasa de clase 1 (*intl1*) en 18 aislamientos, obteniéndose en dichos casos la banda esperada de 930 pb en el resultado de la corrida electroforética, coincidente con el tamaño del control positivo (Figura 9). De estos 18 aislamientos, 17 fueron *bla<sub>VIM</sub>* positivos (9 *P. putida* y 8 *P. aeruginosa*), mientras que uno correspondió a una *P. aeruginosa bla<sub>VIM</sub>* negativo (Pa570). En los restantes 16 aislamientos (11 VIM positivos y 5 negativos) no se hallaron las bandas del tamaño esperado para integrones de clase 1.

Por otro lado, no se obtuvieron productos de amplificación para los genes codificantes de integrasas de clase 2 y 3, ni para *orf513*, habiéndose amplificado los controles positivos en cada caso.



**Figura 9.** Electroforesis de la PCR para el *int11*. Carriles: (1) Marcador de peso molecular *Hyper Ladder IV* (*Bioline*); (2) control positivo de *int11*, banda de 930 pb; (3, 5, 6) muestras positivas para *int11*; (4) muestra negativa para *int11*.

La búsqueda de regiones variables de integrones de clase 1 se realizó para la totalidad de los aislamientos VIM positivos (n=28), a pesar de que en 11 de ellos no se amplificó el gen *int11*, y para el aislamiento Pa570. Se observaron bandas correspondientes a regiones variables en 26 aislamientos, entre los cuales se incluían 10 de los 11 en los que no se amplificaron integrasas de clase 1. No se amplificaron regiones variables en una *P. putida* que tenía integrón de clase 1, en una *P. aeruginosa* cuya PCR para *int11* resultó negativa, ni en el aislamiento Pa570 que presentó integrón de clase 1 pero no VIM.

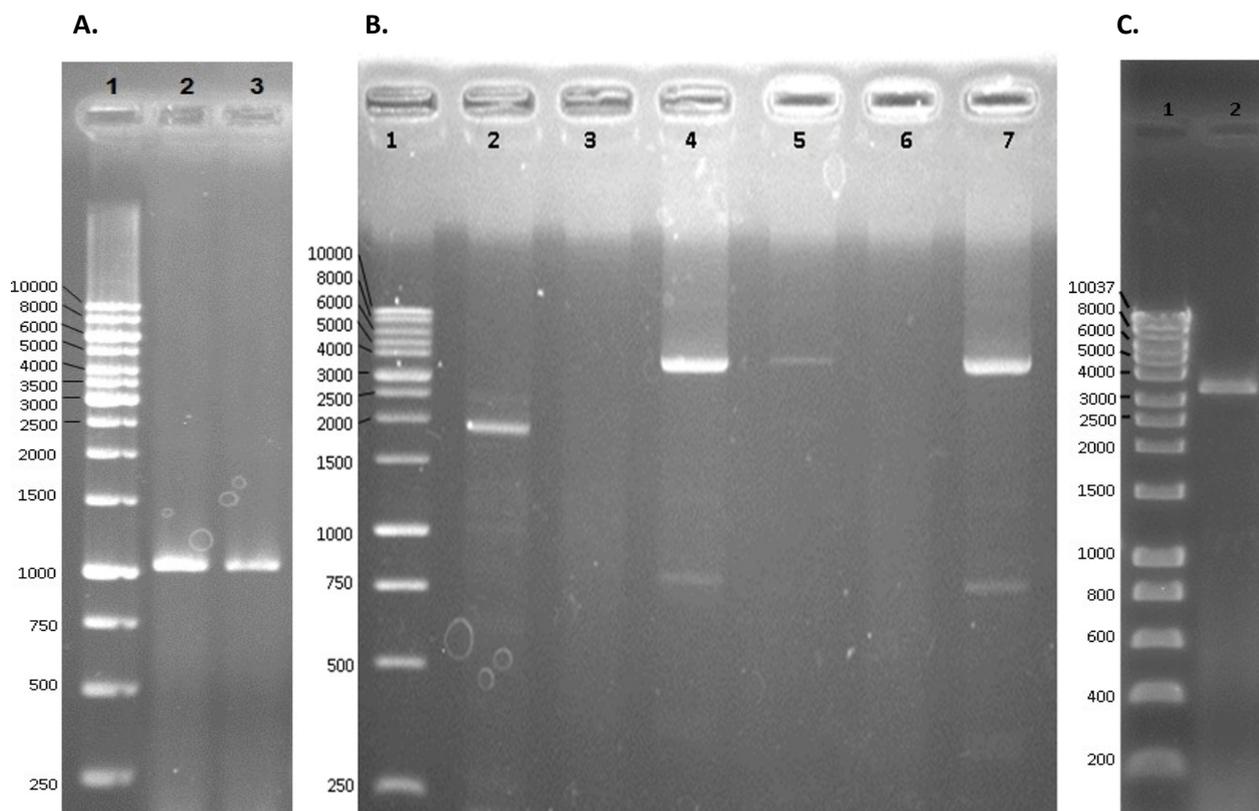
Adicionalmente, para constatar la presencia de los genes *bla<sub>VIM</sub>* en los integrones, y la ubicación dentro del mismo, se amplificaron las regiones combinando los *primers* 5CS/VIM-R y VIM-F/3CS.

Se hallaron al menos 4 integrones de clase 1 diferentes en base a los productos de amplificación obtenidos de las PCRs de regiones variables:

- Integrón con región variable de 1000 pb, en 10 aislamientos (2 *P. putida* y 8 *P. aeruginosa*); con segmentos de 900 pb tanto para el producto de amplificación de 5CS/VIM-R como para VIM-F/3CS (Figura 10A).
- Integrón con región variable de 1900 pb, en un aislamiento de *P. putida*; cuyo segmento amplificado con 5CS/VIM-R fue de 900 pb y en el cual no se logró amplificar el segmento VIM-F/3CS (Figura 10B).

- Integrón con región variable de aproximadamente 3500 pb, en 2 aislamientos de *P. putida* (Pp717 y Pp189); los cuales presentaron un segmento de 900 pb al amplificarse con los *primers* 5CS/VIM-R, en los cuales se pudo amplificar la región VIM-F/3CS hallándose un segmento de unos 3500 pb (Figura 10C).

- Integrón con región variable de 4000 pb, en 10 aislamientos de *P. aeruginosa* y 3 de *P. putida*; cuyos segmentos 5CS/VIM-R fueron de 900 pb, y los comprendidos entre VIM-F/3CS de unos 4000 pb (Figura 10B).



**Figura 10.** Productos de PCR de regiones variables (*primers* 5CS/3CS). **A.** Carriles: (1) Marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 kb* (*Fermentas*); (2,3) regiones variables de aproximadamente 1000 pb. **B.** Carriles: (1) Marcador de peso molecular *1 kb Ladder* (*Promega*); (2) región variable de 1900 pb; (4, 5, 7) regiones variables de 4000 pb. **C.** Carriles: (1) Marcador de peso molecular *Hyper Ladder I* (*Bioline*); (2) región variable de 3500 pb.

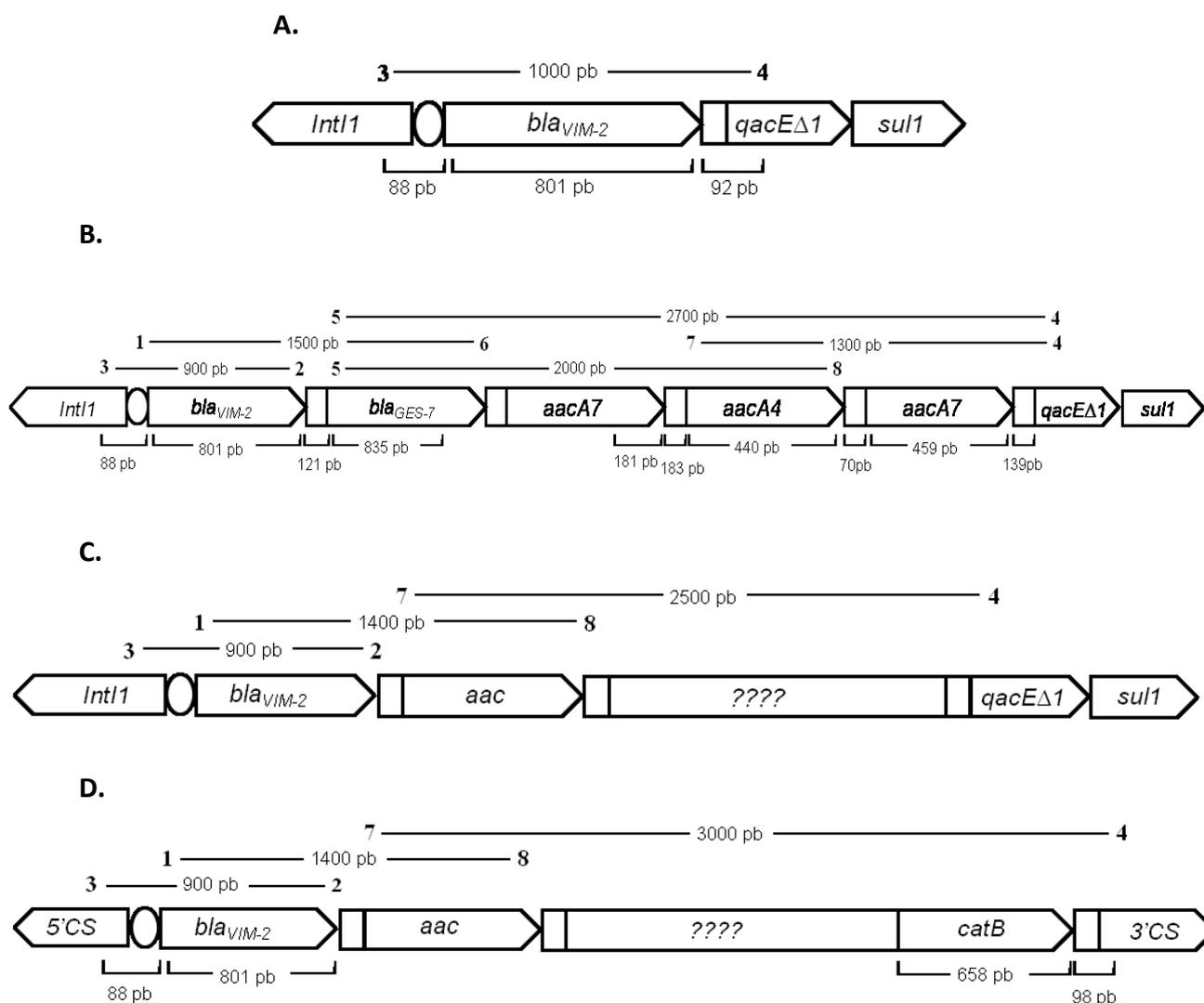
Para el estudio en mayor profundidad de los integrones hallados, se seleccionaron algunos aislamientos dentro de cada grupo de integrones: un aislamiento con integrón de 1000 pb, otro con integrón de 4000 pb y las dos cepas con integrones de 3500 pb.

La secuenciación de la región comprendida entre los extremos 5'CS y 3'CS de uno de los aislamientos que presentó una región variable de 1000 pb (PaV2), permitió constatar que *bla*<sub>VIM-2</sub> era el único gen en estos integrones (Figura 11A), con un tamaño de secuencia de 998 pb, coincidiendo con lo amplificado por PCR.

El aislamiento Pp717 (integrón de 3500 pb) fue estudiado más profundamente, y se lograron amplificar los genes *bla<sub>GES</sub>* y *aac*. Para ubicar a estos genes dentro del mismo integrón se realizaron PCRs combinando los *primers* de amplificación de la región variable y de los genes *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>GES</sub>* y *aac*. Los tamaños de los amplicones obtenidos se muestran en la Figura 11B. Adicionalmente se secuenciaron algunos de dichos segmentos lo cual permitió realizar un mapeo del integrón casi completamente, observándose que el primer gen del *cassette* (hacia el extremo 5'CS) era *bla<sub>VIM-2</sub>*, seguido de *bla<sub>GES-7</sub>*, al cual le seguirían tres genes codificantes de resistencia a aminoglucósidos *aacA7*, *aacA4* y nuevamente *aacA7* (Figura 11B).

En el aislamiento Pp189 se amplificó un gen del tipo *aac*, que en las PCRs con combinaciones de *primers* de éste gen, *bla<sub>VIM</sub>* y región variable se obtuvieron los amplicones que se presentan en la Figura 11C, observándose que el primer gen del *cassette* es *bla<sub>VIM-2</sub>*, seguido de *aac*.

Por otra parte, se secuenciaron los extremos 3'CS y 5'CS de uno de los integrones de 4000 pb (aislamiento Pa517), en el cual se constató la presencia de *bla<sub>VIM-2</sub>* como primer gen *cassette* (hacia 5'CS), mientras que la secuencia con el *primer* 3CS mostró la presencia de un gen de resistencia a cloranfenicol *catB*. Adicionalmente se logró amplificar un gen *aac* en este integrón, que luego de la combinación de diferentes *primers* permitió observar que se hallaba adyacente a *bla<sub>VIM-2</sub>* (Figura 11D).



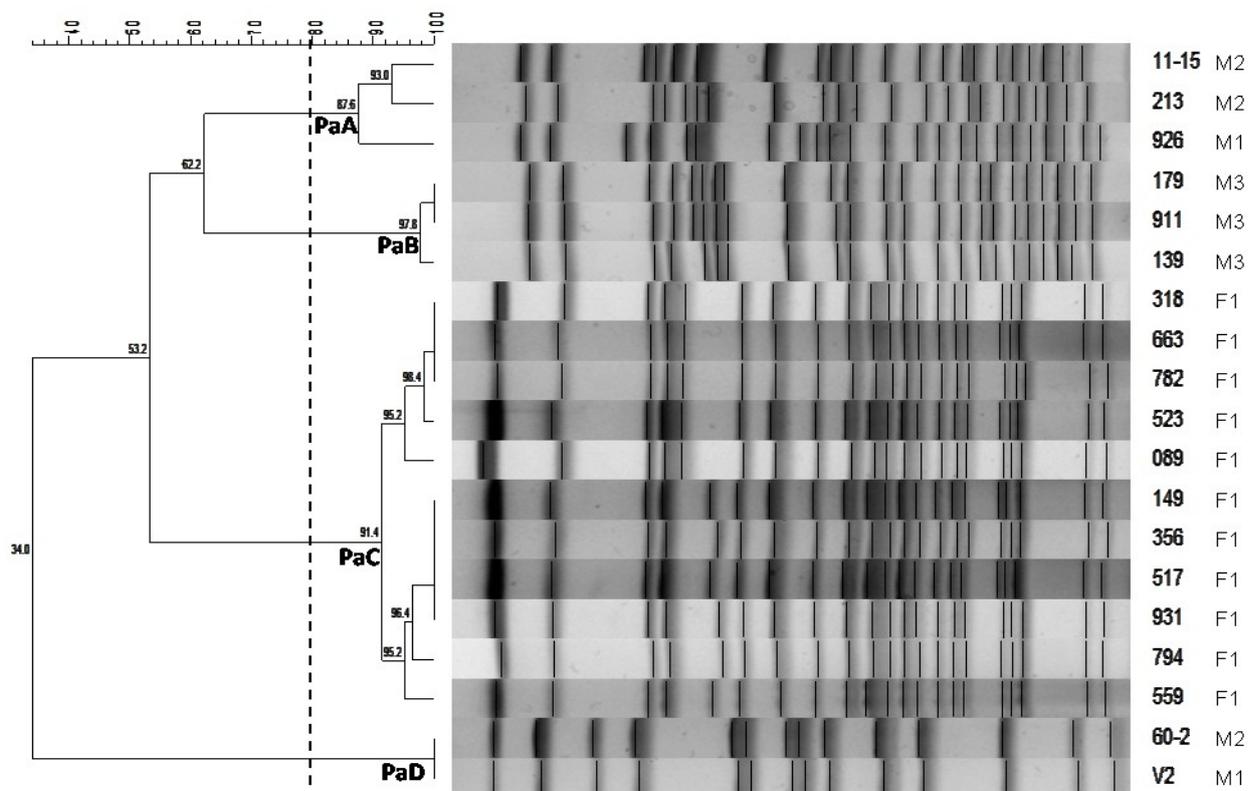
**Figura 11.** Representación esquemática (no a escala) de los integrones caracterizados, sobre el modelo de integrón de clase 1. Cada flecha representa un gen, indicando el sentido de su transcripción. Los círculos representan el sitio *attI* del integrón de clase 1, y los rectángulos pequeños indican los sitios *attC* del *cassette*. En la parte superior de cada integrón de muestra se muestran las regiones amplificadas por PCR con los *primers* indicados por un número (ver referencias en la Tabla 1), y en la inferior las regiones secuenciadas con sus tamaños. **A.** Aislamiento PaV2; **B.** aislamiento Pp717; **C.** aislamiento Pp189; **D.** aislamiento Pa517.

## 5.5. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Se realizó el ensayo de PFGE para todos los aislamientos de *P. aeruginosa* y *P. putida*, con y sin *bla*<sub>VIM-2</sub>, y se construyeron los dendrogramas correspondientes.

El dendrograma obtenido para los aislamientos de *P. aeruginosa* portadores de *bla*<sub>VIM-2</sub> se muestra en la Figura 12, donde se observa que los 19 aislamientos tipificados, se agruparon en 4 pulsotipos, por presentar un coeficiente de similitud mayor al 80%. El pulsotipo PaA, agrupó a tres aislamientos, uno del hospital M1 y dos de M2 que a su vez presentaron mayor similitud. El pulsotipo PaB agrupó a las tres *P. aeruginosa* provenientes de M3, de las cuales dos fueron

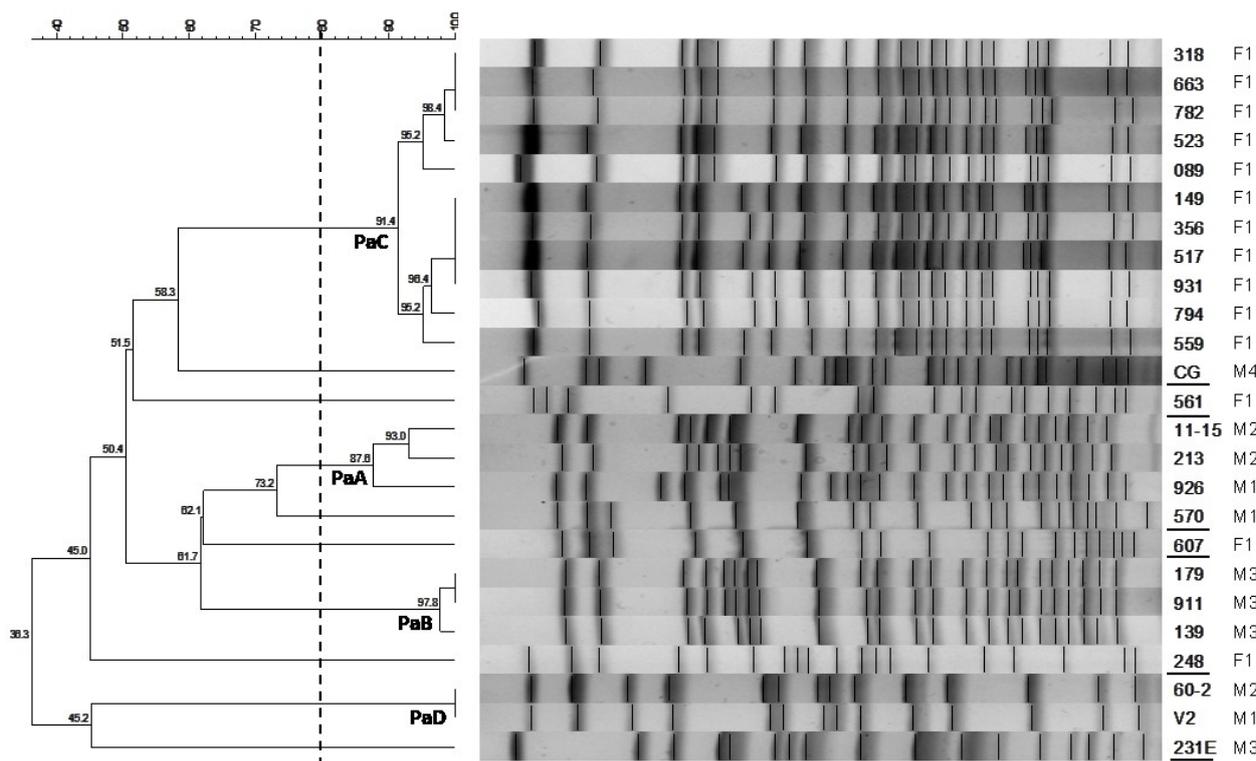
idénticas y presentaron una diferencia de dos bandas con la restante. En el pulsotipo PaC se agruparon todos los aislamientos del centro F1, entre los cuales se observan dos variantes o *clusters* diferenciadas por dos bandas. Por último, en el pulsotipo PaD se agruparon dos aislamientos idénticos pertenecientes a los hospitales M1 y M2.



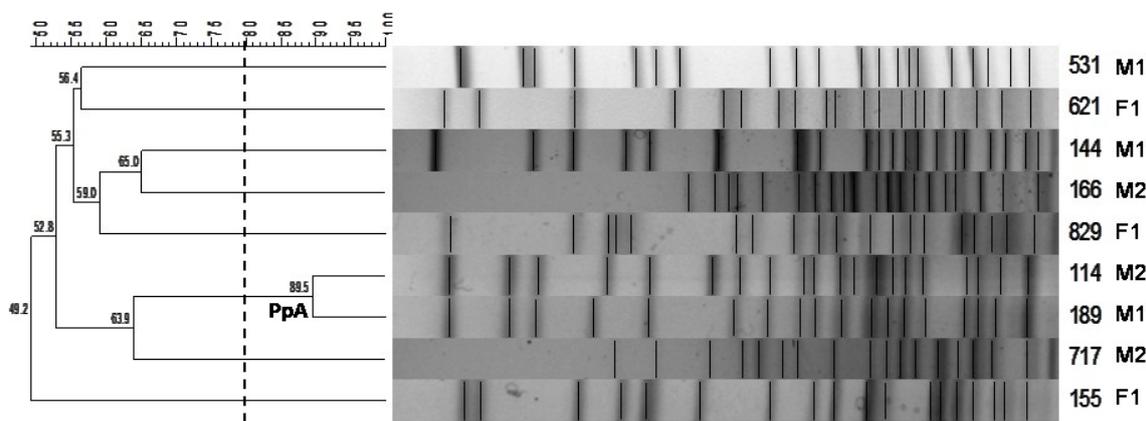
**Figura 12.** PFGE de los aislamientos de *P. aeruginosa* *bla*<sub>VIM-2</sub> positivos. Dendrograma y patrón de bandas para cada aislamiento (nombre a la derecha con su respectivo hospital de origen). La línea punteada indica el límite en el coeficiente de similitud (80%) utilizado para definir los diferentes pulsotipos, los cuales se indican como PaA, PaB, PaC y PaD.

En el dendrograma construido con el total de las *P. aeruginosa* (con y sin *bla*<sub>VIM-2</sub>) (Figura 13) se observó que las cepas negativas para *bla*<sub>VIM-2</sub> no se relacionaron entre sí ni con las productoras de VIM-2.

Por último, el dendrograma construido con los 9 aislamientos de *P. putida* (Figura 14) mostró que los mismos no presentan una relación clonal, a excepción de dos aislamientos que se agruparon en un mismo pulsotipo (PpA) provenientes de los hospitales M1 y M2.



**Figura 13.** PFGE de todos los aislamientos de *P. aeruginosa* (*bla*<sub>VIM-2</sub> positivos y negativos). Dendrograma y patrón de bandas para cada aislamiento (nombre a la derecha con su respectivo hospital de origen). La línea punteada indica el límite en el coeficiente de similitud (80%) utilizado para definir los diferentes pulsotipos, algunos de los cuales se indican como PaA, PaB, PaC y PaD. Los aislamientos subrayados corresponden a *P. aeruginosa* sin *bla*<sub>VIM-2</sub>.



**Figura 14.** PFGE de los aislamientos de *P. putida*. Dendrograma y patrón de bandas para cada aislamiento (nombre a la derecha con su respectivo hospital de origen). La línea punteada indica el límite en el coeficiente de similitud (80%) utilizado para definir los diferentes pulsotipos, uno de ellos se indica como PpA.

## 6. Discusión

En el presente trabajo se detectaron MBLs en los 34 aislamientos estudiados mediante ensayos fenotípicos de sinergia de doble disco con EDTA como inhibidor, de los cuales 28 presentaron el gen *bla<sub>VIM-2</sub>*, mientras que en los 6 restantes no se logró amplificar ninguna de las MBL para las que se disponía *primers*. De estos 6 aislamientos, 4 no cumplían el criterio utilizado en el algoritmo de detección de MBLs propuesto por el Instituto Malbrán y por lo tanto podrían tratarse de falsos positivos.

La técnica de *screening* de MBLs más aceptada hasta el momento es el MBL E-test (test elipsométrico doble que combina un carbapeneme con y sin inhibidor), pero métodos alternativos como el test de sinergia de doble disco y el de discos combinados, que utilizan inhibidores como EDTA o ácido mercaptopropiónico (MPA), son más simples y económicos (Franklin *et al.* 2006; Qu *et al.* 2009). El ensayo de sinergia de doble disco ha mostrado resultados discordantes en diferentes trabajos, por ser una técnica subjetiva, dependiente del observador, en la que en ocasiones puede ser dificultoso diferenciar entre una sinergia verdadera y una intersección de los halos de inhibición del antibiótico y el inhibidor (Franklin *et al.* 2006; Picão *et al.* 2008; Qu *et al.* 2009). Además, otros factores pueden afectar la interpretación del ensayo, como la distancia entre los discos (Hattori *et al.* 2013), el género bacteriano y tipo de inhibidor (Qu *et al.* 2009); el EDTA puede tener una acción bactericida, que puede ocasionar en un agrandamiento del halo de inhibición, y por lo tanto resultar en falsos positivos (Franklin *et al.* 2006; Picão *et al.* 2008), esto también se observó con el mercaptoacetato de sodio (SMA) (Picão *et al.* 2008). Por lo tanto, los 6 aislamientos en los que no se amplificó ninguna MBL por PCR podrían ser falsos positivos como ya se dijo, principalmente los 4 que no cumplen con las condiciones del algoritmo. De todos modos la implementación de *screening* de MBLs por sinergia de doble disco en laboratorios de rutina puede ayudar en el tamizaje rápido de aislamientos, previo a la confirmación molecular.

Otra posibilidad es que estas 6 cepas presenten un tipo de MBL diferente a las que se buscaron, o una nueva variante de MBL; siendo ésta una debilidad de la técnica de PCR ya que permite detectar únicamente genes conocidos (Picão *et al.* 2008). De todos modos, dado que varios mecanismos intrínsecos pueden contribuir a la resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*, el método más fiable hasta el momento para el diagnóstico de carbapenemasas es la PCR (Queenan & Bush 2007).

Por otra parte, existen reportes de una especie genotípica y fenotípicamente relacionada con *P. aeruginosa*, denominada *Pseudomonas otitidis*, que presenta una MBL de subclase B3 intrínseca denominada POM. Dada la alta homología de estas dos especies, la identificación de *P. otitidis* es dificultosa y suele lograrse únicamente por secuenciación del ARNr 16S. Además su resistencia a los carbapenemes suele ser variable, exponiendo incluso sensibilidad a los mismos, y que además suelen ser sensibles a ceftazidime (Lee *et al.* 2012; Thaller *et al.* 2011), lo cual se observó en algunos de los aislamientos estudiados. Se deberán realizar estudios adicionales que permitan confirmar la identidad de dichos aislamientos para descartar la presencia de esta especie.

En relación al estudio de susceptibilidad, se observó que todos los aislamientos portadores de *bla*<sub>VIM-2</sub> fueron resistentes a por lo menos un carbapeneme, con valores de resistencia más variables a cefepime y ceftazidime. De los 28 aislamientos *bla*<sub>VIM-2</sub> positivos, 5 *P. aeruginosa* presentaron valores de MIC a MEM menores de 4 µg/ml, a pesar de que en la bibliografía se estipula que los aislamientos de esta especie que presentan una carbapenemasa suelen tener valores de 8 a >128 µg/ml para este antibiótico, pudiendo existir hasta MIC de 4 µg/ml (Nicolau & Oliver 2010), lo cual no coincide con lo hallado. En relación a esto también se hallaron aislamientos portadores de VIM-2 sensibles a FEP y CAZ, lo cual tampoco es coincidente con lo previamente descrito, ya que se espera que una *Pseudomonas* spp. productora de carbapenemasa tenga resistencia o sensibilidad intermedia a estos dos antibióticos (Nicolau & Oliver 2010). Esto puede conducir a diagnósticos erróneos por la no detección de una MBL, y a fallas terapéuticas, debido al tratamiento con carbapenemes de bacterias productoras de carbapenemasas cuando exhiben CIMs en el rango de sensibilidad, aunque también existen reportes de casos exitosos de ello (Cornaglia *et al.* 2011). Por otro lado los aislamientos en los que no se hallaron MBLs presentaron mayores niveles de susceptibilidad que los portadores de VIM, lo cual podría apoyar la hipótesis de que se trata de falsos positivos.

VIM-2 presenta una amplia distribución y podría ser la carbapenemasa más prevalente en el mundo (Nicolau & Oliver 2010), aunque Cronaglia *et al.* (2011) estipulan que tendría menor prevalencia que algunas variantes de IMP, también ampliamente distribuidas. Esta enzima se ha hallado anteriormente en la región, particularmente en *Pseudomonas* spp. existen reportes de Brasil, Venezuela, Chile, Colombia (Cornaglia *et al.* 2011) y Argentina (Pagniez *et al.* 2006).

Tal como se ha reportado en la bibliografía (Queenan & Bush 2007; Walsh *et al.* 2005), el gen *bla*<sub>VIM-2</sub> fue hallado en integrones de clase 1 en la mayoría de los aislamientos, en algunos casos como único *cassette* en el integrón, y en otros, acompañado de genes como aminoglucósido 6'-N-acetiltransferasa (entre ellos *aacA4* y *aacA7*), β-lactamasa de clase A del tipo *bla*<sub>GES-7</sub> y cloranfenicol acetiltransferasa *catB1*. La resistencia a aminoglucósidos así como a quinolonas es común en gérmenes portadores de MBLs, dando origen a multirresistencia e incluso panresistencia, lo cual reduce las opciones terapéuticas; para estos casos se reservan antibióticos como colistín y fosfomicina, e incluso tratamientos combinados con un carbapeneme (Cornaglia *et al.* 2011).

En la base de datos de integrones *Integrall* (<http://integrall.bio.ua.pt/>) existen numerosos reportes de integrones de clase 1 con la coexistencia del gen *bla*<sub>VIM-2</sub> y *aacA4* o *aacA7*, incluyendo algunos con ambos en la misma plataforma, tanto en *P. aeruginosa* como en *P. putida*, además de la presencia de otras clases de la familia de aminoglucósido acetiltransferasas; aunque en ninguno de ellos se encontraron las configuraciones presentadas en este trabajo. Por otro lado, tampoco se halló en la bibliografía consultada integrones en este género que portaran *bla*<sub>VIM-2</sub> junto con el

gen *catB1*, ni con *bla*<sub>GES-7</sub> u otras de las variantes de GES. Existe un reporte de la presencia de *bla*<sub>VIM-2</sub> y *bla*<sub>GES-7</sub> en un aislamiento de *E. coli*, pero no presentes en el mismo integrón (Galani *et al.* 2006).

El gen *bla*<sub>VIM-2</sub> se presentó como primer *cassette* en todos los integrones estudiados, lo cual indica que el mismo fue la última adquisición en la plataforma, y que tendrían un alto nivel de expresión debido a su cercanía al promotor (Opal & Pop-Vicas 2010). Para finalizar con la caracterización de estos integrones se diseñarán *primers* internos a los mismos, que permitirán secuenciarlos completamente.

No se logró amplificar la región variable en dos aislamientos con *bla*<sub>VIM</sub>, uno de ellos tampoco había presentado *int11*, aunque de todos modos se amplificaron regiones variables en 10 cepas cuya PCR para dicho gen fue negativa. Estos dos aislamientos podrían presentar integrones de tamaños mayores a los hallados (>4000 pb) y pudieron no encontrarse con las condiciones de PCR utilizadas; otra posibilidad es que el gen *bla*<sub>VIM</sub> no se encuentre asociado a integrones sino a otro tipo de elementos genéticos.

En el caso de las 10 cepas en las que no se amplificó *int11* pero que sí presentaron regiones variables, se podría pensar en la presencia de una secuencia de inserción en el gen codificante de la integrasa, como se ha reportado para integrones de clase 2 (Bado *et al.* 2010). Bajo esta hipótesis, la ausencia de productos de amplificación de *int11* en estas cepas podría explicarse por un mayor tamaño del gen de la integrasa (por la presencia de la secuencia de inserción), cuya amplificación no fue posible debido a que el tiempo de polimerización no fue suficiente durante el ensayo de PCR. Otra posibilidad es que dicha secuencia de inserción haya encontrado otra similar corriente arriba del integrón y que luego haya sufrido una escisión, llevándose consigo al integrón sin el gen *int11*, lo cual podría también explicar la ausencia de productos de amplificación durante el ensayo de PCR.

A grandes rasgos, la diseminación de *Pseudomonas* spp. con metalo-β-lactamasas en nuestro país ha sido policlonal, aunque esta situación epidemiológica puede estudiarse separando los casos de Montevideo y de Florida.

En Montevideo se han encontrado relaciones clonales entre aislamientos de *P. aeruginosa* *bla*<sub>VIM-2</sub> positivas pertenecientes a un mismo hospital (M3) y entre dos instituciones públicas diferentes (hospitales M1 y M2). Las cepas de M3 se agruparon en un único pulsotipo (PaB), y se aislaron en un estrecho periodo de tiempo; mientras que los aislamientos de las Instituciones públicas de Montevideo (M1 y M2) compartieron pulsotipos en todos los casos (PaA, PaD, PpA), donde los aislamientos del pulsotipo PaD se obtuvieron en fechas cercanas (marzo y abril de 2011), coincidiendo además con la emergencia de *bla*<sub>VIM-2</sub> en nuestro país (Gutierrez *et al.* 2011; Ingold *et al.* 2011), mientras que en los restantes no se observó una relación temporal. Los aislamientos restantes de *P. putida* y las *P. aeruginosa* sin *bla*<sub>VIM-2</sub> mostraron una elevada divergencia.

La presencia de pulsotipos compartidos entre los dos hospitales públicos de Montevideo estudiados, podría indicar una diseminación cruzada de *P. aeruginosa* portadora de *bla*<sub>VIM-2</sub> entre los mismos, esto podría deberse a varios factores, entre ellos el tráfico de pacientes entre un centro y otro o personal de salud trabajando en ambos centros, los cuales actuarían como vectores mecánicos para la dispersión de la bacteria; otra posibilidad es que la fuente del microorganismo sea inerte, y que pueda presentarse en materiales y proveedores de uso común por los servicios públicos. Para evaluar estas hipótesis sería interesante estudiar aislamientos clínicos de otros nosocomios públicos de Montevideo y/o realizar estudios de colonización en los pacientes, con el fin de trazar relaciones clonales.

En el caso del nosocomio F1 se presentó la particularidad del mayor número de cepas recibidas, entre las cuáles todas las que presentaron *bla*<sub>VIM-2</sub> (n=11) se agruparon en un mismo pulsotipo (PaC), cuyos *clusters* no mostraron una relación temporal. En este caso se podría hablar de una situación de endemia en el nosocomio, es decir, un problema sostenido en el tiempo y con constantes desafíos debido a la presencia de pacientes infectados (Tacconelli *et al.* 2014). Un estudio en profundidad de este evento epidemiológico podría realizarse a través de estudios de colonización de pacientes internados en el hospital, e incluso más profundamente con un estudio ambiental y de monitoreo del personal de salud, que permitiría hallar un posible reservorio del microorganismo.

*P. aeruginosa* presenta una epidemiología compleja, en la que normalmente coexisten cepas epidémicas y esporádicas (Tacconelli *et al.* 2014) como se observó en este trabajo. La presencia de esta bacteria con una metalo- $\beta$ -lactamasa, sobre todo si presenta resistencia a otros grupos de antibióticos (cepas multirresistentes) implica la toma de diferentes medidas con el fin de evitar su dispersión dentro del centro de salud y entre los mismos. Para ello la guía de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) publicada en 2014 (Tacconelli *et al.* 2014) propone algunas estrategias basadas en experiencias previamente publicadas, específicamente para *P. aeruginosa* se incluyen abordajes como higiene de manos y educación al personal de salud, precaución de contacto, aislamiento de contacto, cultivos de vigilancia, limpieza del ambiente y equipamiento en contacto con los pacientes, desinfección de elementos compartidos y estrategias para la optimización del uso de antibióticos.

En conclusión, *Pseudomonas* spp. portador de *bla*<sub>VIM-2</sub> es un patógeno nosocomial que en los últimos años ha tomado protagonismo en nuestro medio. La presencia de dicho gen en integrones de clase 1 podría haber facilitado diseminación, y a su vez habría permitido su asociación con otros determinantes de resistencia, disminuyendo las opciones terapéuticas. La detección de metalo- $\beta$ -lactamasas continúa siendo un desafío, sobre todo en éste género bacteriano donde existe una importante resistencia a carbapenemes debido a mecanismos no enzimáticos y por la presencia de aislamientos con MBLs con bajos niveles de resistencia. Es necesario el abordaje multidisciplinario para el diseño de estrategias que permitan evitar la dispersión de este tipo de microorganismos.

## 7. Perspectivas

Con el fin de profundizar en algunos de los resultados obtenidos, se espera poder lograr alguno de los siguientes objetivos:

- Ahondar en la identificación de los aislamientos que presentaron *screening* positivo para MBLs en los que no se amplificaron genes de estas enzimas. Se espera realizar ensayos de identificación por espectrometría de masas con MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight*) con el sistema *Biotyper* que se dispone en el Instituto de Higiene. También se pretende realizar ensayos de hidrólisis de carbapenemes.

- Culminar con la identificación de los integrones y sus regiones variables, a partir de *primers* internos a los mismos.

- Determinar si el gen *bla<sub>VIM-2</sub>* se encuentra en plásmidos, a través de ensayos de conjugación y extracción de plásmidos con posterior PCR.

- Estudiar los diferentes pulsotipos de *P. aeruginosa* portadores de *bla<sub>VIM-2</sub>* mediante MLST, para determinar los secuenciotipos circulantes en nuestro medio.

- Comparar los aislamientos estudiados con otros aislamientos de los hospitales estudiados e incluir nuevos centros públicos de Montevideo.

- Evaluar la capacidad de formación de biofilms en los distintos aislamientos, debido a que éste factor de virulencia también podría contribuir a la resistencia antibiótica.

## 8. Bibliografía

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; 215(3):403-410.

Bado I, Cordeiro N, García V, Robino L, Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos. Temas de Bacteriología y Virología. 3ª ed Oficina del libro FEFMUR; 2008a. p. 725-750.

Bado I, García V, Robino L, Cordeiro N, Seija V, Vignoli R. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Temas de Bacteriología y Virología. 3ª ed Oficina del libro FEFMUR; 2008b. p. 751-762.

Bado I, Outeda M, Caiata L, Papa R, Rieppi G, Seija V, Vignoli R. Primer reporte de NDM-1 en un hospital universitario en Uruguay. *XVI Congreso Panamericano de Patología Clínica*. Santiago de Chile, 2013.

Bado I, Cordeiro NF, Robino L, García-Fulgueiras V, Seija V, Bazet C, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36(453-458).

Bush K & Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2010; 54(3): 969-976.

Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet*. 2010; 44:141-166.

Cejas D, Almuzara M, Santella G, Tuduri A, Palombarani S, Figueroa S, Gutkind G, Radice M. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Rev Argent Microbiol*. 2008; 40(4):238-245.

Chambers HF. Carbapenems and Monobactams. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7<sup>th</sup> ed Elsevier; 2010. p. 341-345.

*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth informational supplement. 2014; 34(1).

Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(5):381-393.

El Salabi A, Borra PS, Tolemann MA, Samuelsen Ø, Walsh TR. Genetic and biochemical characterization of a novell metallo-  $\beta$ -lactamase, TMB-1, from a *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2012; 56(5):2241-2245.

Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(9): 3139-3144.

Fresnadillo Martínez JM, García García MI, García Sánchez E, García Sánchez JE. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(2):53-64.

Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chryssouli Z, Giamarellou H. Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 and extended-spectrum  $\beta$  lactamase GES-7: identification of the In8 integron carrying the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 432-433.

Gutiérrez C, Bado I, Cordeiro N, Palacio R, Vignoli R. Resistencia a carbapenems y detección de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital de Clínicas. *Revista uruguaya de patología clínica.* 2011; 48:7-12.

Hattori T, Kawamura K, Arakawa Y. Comparison of test methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66:512-518.

Ingold AJ, Castro M, Nabón A, Borthagaray G, Máquez C. Detección del gen codificante de la metalo- $\beta$ -lactamasa VIM-2 en un integrón de clase 1 asociado con el gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en el Uruguay: primera comunicación. *Rev Argent Microbiol.* 2011; 43:198-202.

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (INEI-ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán". Programa nacional de control de calidad en bacteriología. Boletín Informativo Nº5. 2012. Recuperado de: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/Bolet%C3%ADn-5-Comentarios-Enc-44-24-10-2012-.pdf>

INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. [Base de datos online] Aveiro: Universidade de Aveiro; 2009. Disponible en: <http://integrall.bio.ua.pt/>

Juan C, Zamorano L, Mena A, Albertí S, Pérez JL, Oliver A. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(3):474-478.

Kayama S, Shigemoto N, Shimizu W, Kuwahara R, Ikeda M, Ikebe K, Maeda K, Hisatsune J, Ohge H, Sugai M. Tripoli metallo- $\beta$ -lactamase-1 (TMB-1)-producing *Acinetobacter* spp. with decreased resistance to imipenem in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(4): 2477-2478.

Lee K, Kim C, Yong D, Yum JH, Chung MH, Chong Y. POM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas otitidis* isolate from a patient with chronic otitis media. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;72: 295-296.

Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. Bacteria: The *Proteobacteria*. Brock Biology of microorganisms. 13th ed. Pearson; 2012. p. 475-516.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18:268–281.

Nicolau JC, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(1):19-28.

Opal SM & Pop-Vicas A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. Principles of anti-infective therapy. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7<sup>th</sup> ed Elsevier; 2010. p. 279-295.

Pagniez G, Radice M, Cuirolo A, Rodríguez O, Rodríguez H, Vay C, Famiglietti A, Gutkind G. Prevalencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Rev Argent Microbiol*. 2006; 38: 33-37.

Picão RC, Andrade SS, Gianinni Nicoletti A, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- $\beta$ -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(6): 2028-2037.

Pier GB & Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7<sup>th</sup> ed Elsevier; 2010. p.2835-2860.

Pillai SK, Eliopoulos GM, Moellering RCjr. Principles of anti-infective therapy. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7<sup>th</sup> ed Elsevier; 2010. p.267-278.

Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemoter*. 2012; 67:1597-1606.

Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolini GM. FIM-1, a new acquired metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2012; 57(1):410-6.

*PulseNet<sup>TM</sup> International* - The International Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance. Standard operating procedure for *PulseNet* PFGE of *Escherichia coli* O157:H7,

*Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2013. Recuperado de: [http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05\\_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf](http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf)

Qu T, Zhang J, Wang J, Tao J, Yu Y, Chen Y, Zhou Y, Li L. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(4): 1136-1142.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(3): 440-458.

Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, Casellas JM, Famiglietti A, Qinteros M, Bantar C, Galas M, Kovensky Pupko J, Nicola F, Pasterán F, Soloaga R, Gutkind G. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Rev Argent Microbiol*. 2011; 43(2):136-153.

Ramírez MS, Piñeiro S, Argentinian Integron Study Group, Centrón D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2010; 54(2): 699-706.

Seija V, Medina Presentado JC, Bado I, Papa Ezdra R, Batista N, Gutierrez C, Guirado M, Vidal M, Nin M, Vignoli R. Sepsis caused by New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (blaNDM-1) and qnrD-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomicin and meropenem: case report and literature review. *Int J Infect Dis*. 2015; 30:20-26.

Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *ClinMicrobiol Rev*. 2006; 19(3): 512-530.

Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, Kahlmeter G, Pan A, Petrosillo N, Rodríguez-Baño J, Singh N, Venditti M, Yokoe DS, Cookson B. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(1):1-55.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan A. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(9):2233-2239.

Thaller MC, Boriggiani L, Di Lallo G, Chong Y, Lee K, Dajcs J, Stroman D, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamase production by *Pseudomonas otitidis*: a species-related trait. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2011; 55(1): 118-123.

Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006; 70(2): 296-316.

Vignoli R, Cordeiro N, Seija V, Schelotto F, Radice M, Ayala J, Power P, Gutking G. Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38:84-86.

Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(10):726-736.

Wachino J, Yamaguchi Y, Mori S, Kurosaki H, Arakawa Y, Shibayama K. Structural insights into the subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor mercaptoacetate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(1):101-109.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordamnn P. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(2):306-325.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35(5):736-755.