

Detección fenotípica de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Phenotypic Detection of Metallo-beta-lactamase in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa

**Perozo Mena, Armindo José^{1,2};
Castellano González, Maribel Josefina¹;
Ling Toledo, Eliana² y Arraiz, Nailé^{1,3}**

¹Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

²Centro de Referencia Bacteriológica, Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo.

³Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigaciones Endocrino Metabólicas Dr. Feliz Gómez, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia

aperozomena@cantv.net; aperozomena@interlink.net.ve;
maribelcast@interlink.net.ve; maribeljo@cantv.net

Resumen

Pseudomonas aeruginosa, es considerado uno de los más importantes gérmenes hospitalarios, siendo común su aislamiento en pacientes hospitalizados, adicionalmente, este microorganismo presenta una marcada multiresistencia, lo que incrementa la mortalidad. El tratamiento de estos pacientes suele ser difícil, ya que además de su resistencia natural, *Pseudomonas* puede adquirir mecanismos de resistencia para prácticamente la totalidad de los antimicrobianos disponibles para su tratamiento, por lo que cada vez es más frecuente y necesario el empleo de antibióticos como los carbapenems, lo que facilita la adquisición de mecanismos de resistencia a estas drogas. El presente estudio intenta determinar la producción de metalobetalactamasas (MBL) en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando para ello dos métodos fenotípicos. Se utilizó el método del doble disco (MDD) y el test de Hodge modificado (MHT). Se analizaron 726 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, el 20,11% (146) de estos fueron resistentes a imipenem (IPM) y meropenem (MEM), por lo que se les realizaron los dos métodos fenotípicos, de los 146 aislados resistentes a carbapenems, 139 fueron positivas para el MDD, mientras que 144 lo fueron para el MHT, estos dos métodos permitieron confirmar la presencia de una carbapenemasa tipo MBL en el 98,63%

de los aislados de *P. aeruginosa*, por otra parte, cinco aislados no fueron positivos para el MDD pero si para el MHT, lo que indicaría la presencia de carbapenemasas no MBL en estos aislado, también se obtienen 2 aislados que a pesar de ser IPM y MEM resistentes fueron negativos por los dos métodos fenotípicos utilizados, esto indicaría la presencia de un mecanismo de resistencia no enzimático que confiere resistencia a carbapenems. La utilización de métodos fenotípicos para la detección de MBL en aislados de *P. aeruginosa* es una opción bastante aceptable para utilizar en laboratorios de rutina donde pruebas especializadas de biología molecular no están disponibles.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, MBL, imipenem, meropenem.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is considered one of the most important hospital germs; its isolation is common in hospitalized patients. In addition, this microorganism has a marked multi-resistance, which increases mortality. Treatment of these patients is often difficult, since in addition to its natural resistance, *Pseudomonas* can obtain resistance mechanisms to virtually all antimicrobial drugs available for its treatment; due to this, its appearance is increasingly frequent and necessitates the use of antibiotics such as carbapenems, which facilitates the acquisition of resistance mechanisms to these drugs. This study attempts to determine the production of metallo-beta-lactamase (MBL) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, utilizing two phenotypic methods: the double disc method (MDD) and the modified Hodge test (MHT). 726 clinical isolates of *P. aeruginosa* were analyzed; 20.11% (146) of these were resistant to imipenem (IPM) and meropenem (MEM); 139 were positive for the MDD, while 144 were positive for the MHT. These two methods permitted confirming the presence of an MBL-type carbapenemase in 98.63% of *P. aeruginosa* isolates; five isolates were negative for the MDD but positive for the MHT, indicating the presence of non-MBL-type carbapenemase in these isolates. Also, 2 isolates were obtained that, despite being resistant to IPM and MEM, were negative according to the two phenotypic methods used; this would indicate the presence of a non-enzymatic resistance mechanism conferring resistance to carbapenems. The use of phenotypic methods for detecting MBL in *P. aeruginosa* isolates is quite an acceptable option for use in routine laboratories where specialized molecular biology tests are not available.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, MBL, imipenem, meropenem

Introducción

Pseudomonas aeruginosa, es considerado un patógeno nosocomial que ha emergido como uno de los más importantes gérmenes hospitalarios, siendo común su aislamiento en pacientes de unidades de cuidados intensivos (UCI), en quienes además presenta una marcada multiresistencia, incrementando la mortalidad asociada (1). El tratamiento de las infecciones causadas por este agente suele ser difícil, ya que además de su

amplia resistencia natural producida principalmente por la baja permeabilidad de su membrana externa, también puede adquirir mecanismos de resistencia para prácticamente la totalidad de los antimicrobianos disponibles para su tratamiento (2, 3). En respuesta a esto, es cada vez más frecuente y necesario el empleo de antibióticos de amplio espectro como los carbapenems en las instituciones hospitalarias, lo que facilita la adquisición de mecanismos de resistencia, ya que se ha demostrado que la administración

de estas drogas es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de resistencia (4).

En el estudio SENTRY para Latinoamérica, *P. aeruginosa* ocupó el tercer puesto entre los agentes patógenos aislados con mayor frecuencia, luego de los aislamientos reportados de *S. aureus* y *E. coli* (5). A nivel local, el Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos (PROVENRA), reporta un 8% de aislamientos de cepas de *P. aeruginosa*, a partir de muestras clínicas en Venezuela, es decir un tercer lugar en frecuencia de aislamiento al igual que el estudio SENTRY (6). Por otra parte, el Boletín de Etiología y Resistencia Bacteriana del Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, ubica a *P. aeruginosa* en el quinto lugar de frecuencia de aislamientos con un 7,63% (7). Estos datos demuestran el importante papel que desempeña este microorganismo como patógeno dentro de nuestras instituciones de salud.

Los mecanismos más frecuentemente implicados en la resistencia a carbapenems en *Pseudomonas aeruginosa* son la disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa debido al decremento en la expresión de porinas; disminución de la concentración intracelular del antibiótico mediada por la presencia de bombas de eflujo; y modificación e inactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas (8). En relación a los mecanismos enzimáticos, las dos betalactamasas (BL) que con mayor frecuencia pueden llevar a resistencia a los carbapenems son las del grupo AmpC y las carbapenemasas del tipo metalo-beta-lactamasas (MBL) (8, 9). Las BL tipo AmpC presentan baja afinidad por los carbapenems; sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria altera sus porinas (espe-

cialmente OprD), la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplásmico permite que la enzima lo hidrolice, lo que favorece la expresión de resistencia a los carbapenems. Por otra parte, las MBLs se caracterizan por producir resistencia a todos los BL, incluyendo los carbapenems, pero presentan susceptibilidad variable al aztreonam, las MBL se transfieren fácilmente entre diferentes microorganismos, ya que se encuentran ubicadas en genes cassetes, localizados principalmente en integrones tipo 1, así como en plásmidos o transposones (10-13).

De estos mecanismos, el que merece especial atención es la producción de MBL, ya que confiere resistencia a un amplio rango de agentes antimicrobianos, se disemina rápidamente dentro de instituciones hospitalarias y aumenta significativamente las tasas de morbilidad, por lo que este trabajo se propone determinar la incidencia de aislados clínicos de *P. aeruginosa* productores de MBL, utilizando para ello el método del disco con un agente quelante como el ácido etilendiamintetraacético (EDTA)/ácido tioglicólico (SMA) y el test de Hodge modificado para confirmar la presencia de este mecanismo de resistencia enzimático.

Materiales y métodos

La población estudiada estuvo conformada por 726 aislados clínicos de *P. aeruginosa* obtenidas a partir de los cultivos de rutina practicados con fines diagnósticos a los pacientes que asisten al Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (CRBSAHUM). Se estudiaron cepas aisladas de pacientes hospitalizados de ambos sexos, y cualquier edad.

El aislamiento de las cepas de *P. aeruginosa* a partir de las diferentes muestras clíni-

cas fue realizado por el personal del CRB-SAHUM, para ello utilizaron las técnicas de aislamiento convencionales descritas en el Manual de Microbiología Clínica (14; 15), para la identificación se utilizó el equipo automatizados VITEK 2C (Biomerieux®) y las tarjetas de identificación para Gram negativos GN; estas tarjetas permiten la identificación de la mayor parte de los bacilos Gram negativos de interés clínico (incluyendo especies de *Pseudomonas*), en un tiempo máximo de 7 horas.

Una vez identificada la cepa como *Pseudomonas aeruginosa*, se procedió a determinar la susceptibilidad a imipenem (IPM) y meropenem (MER) utilizando el método de difusión del disco (16), para ello se preparó una suspensión ajustada al patrón 0,5 de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) del microorganismo en estudio y se inoculó, con un hisopo de algodón, la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (MH) a manera de césped para obtener un crecimiento confluyente, luego se colocó en la superficie del agar un disco de IPM y MEM de 10 µg cada uno. El medio de cultivo se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ de 18 a 24 horas antes de realizar la lectura de los resultados. Para la interpretación de la prueba de susceptibilidad a IPM y MER se utilizaron los criterios del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (17), considerándose susceptible un tamaño de la zona de inhibición ≥ 23 mm, intermedio de 20 a 22 mm y resistentes ≤ 19 mm para ambos antimicrobianos.

Una vez determinada la susceptibilidad a IPM y MEM se utilizó el método fenotípico del doble disco (MDD) con EDTA/SMA (750/300 µg) para determinar si la resistencia a carbapenems era debido a la presencia de una enzima del tipo MBL. Este método fue descrito por Arawaka y cols. (18), y se basa en que las MBL necesitan como cofactor en la reacción iones metálicos como el Zn^{+2} , el

EDTA es un agente quelante que posee la capacidad de atrapar estos iones metálicos y por consiguiente inhibir la acción de la enzima, por lo que en esta prueba se utiliza el EDTA/SMA como inhibidor de MBL, mientras que, otras carbapenemasas (KPC, OXA, SME, NDM, etc.), la presencia de mecanismos de hiperproducción de AMP-C, impermeabilidad y eflujo, no son inhibidas por el EDTA. Para realizar la prueba se utiliza una placa de agar Müller-Hinton (MH), esta placa es sembrada con un inóculo estandarizado (0,5 McFarland), luego se colocó un disco de papel Whatman N° 6 con un diámetro de 9mm en la placa y se impregnó con 10µl de EDTA/SMA, posteriormente se colocaron a cada lado del disco de EDTA/SMA un disco de IPM y MEM a una distancia de 15 mm centro-centro. Una vez colocados los discos, se incubó la placa en atmosfera aeróbica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ de 18 a 24h. Después de la incubación se procede a realizar la lectura de la prueba, esta se considera positiva cuando se observa una ampliación o distorsión (efecto sinérgico) entre los discos de imipenem y meropenem con el disco de EDTA/SMA. Esta prueba tiene el inconveniente de producir un 15% de falsos positivos, por lo que se realizó la confirmación con el Test de Hodge Modificado (MHT).

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

Para realizar la prueba, se inoculó la superficie de una placa de agar MH, con una suspensión de colonias de un cultivo joven de *Escherichia coli* ATCC 25922, ajustada al estándar 0,5 de la escala de McFarland. Se dejó secar por tres minutos la superficie de la placa y se colocó un disco de IPM en el centro de la placa, posteriormente, se realizó una estría desde el borde del disco hacia la periferia de la placa para cada cepa de *P. aeruginosa* sospechosa de la producción de MBL, se pueden colocar máximo cuatros aislados en placas de Petri de 90 mm. Las placas se incubaron en atmósfera aerobia por 18-24 h a 35°C. La presencia de una zona de distorsión del halo de inhibición alrededor de la estría del microorganismo probado será interpretada como positiva para la producción de MBL por el método de Hodge modificado. Para el control de calidad de la prueba del doble disco como para el Test de Hodge modificado, se utilizó un control positivo (*P. aeruginosa* CRB 3256-08) y un control negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853).

Resultados

De los 726 aislados clínicos de *P. aeruginosa* probados en esta investigación, solo

146 (20,11%) mostraron resistencia a los carbapenems (IPM y MEM) mediante el método del disco, lo que sugiere probablemente la presencia de una enzima carbapenemasa tipo metalobetalactamasa.

Al realizar el MDD con EDTA/SMA, 139 (95,21%) cepas mostraron efecto sinérgico entre este disco y el de IPM o MEM (Figura 1), lo que sugiere la presencia de una metalobetalactamasa, sin embargo, este método posee de un 10 a un 15% de resultados falsos positivos debido a que el EDTA es capaz de solubilizar la membrana externa de especies de *Pseudomonas*, por lo que se debe confirmar un resultado positivo. A los 146 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, se les realizó también el MHT, dando positivo en 144 (98,63%) de las cepas (Figura 2). La Tabla 1 resume los resultados del DD y HMT.

Discusión

Al comparar los resultados de ambos métodos se puede concluir que de los 726 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, el 20,11% es resistente a los carbapenems, probablemente por un mecanismo enzimático (producción de MBL). Un estudio realizado por Crespo y col. (21) en Cali, Colombia indica que para el

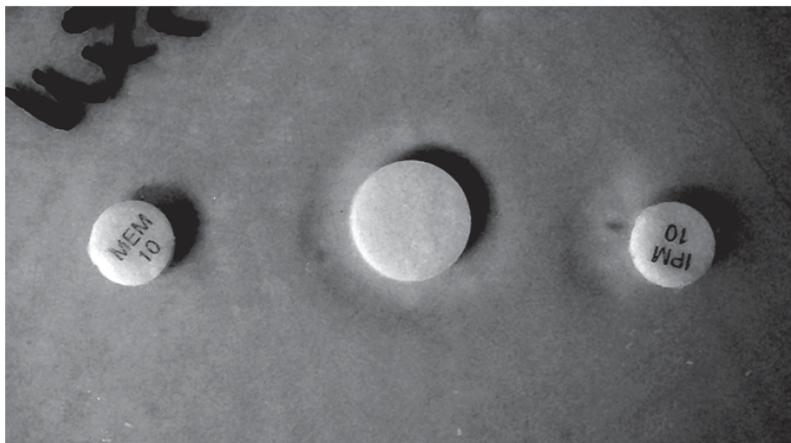


Figura 1. Método del doble disco, donde se observa el efecto sinérgico entre el disco de EDTA/SMA (centro) e imipenem (derecha).

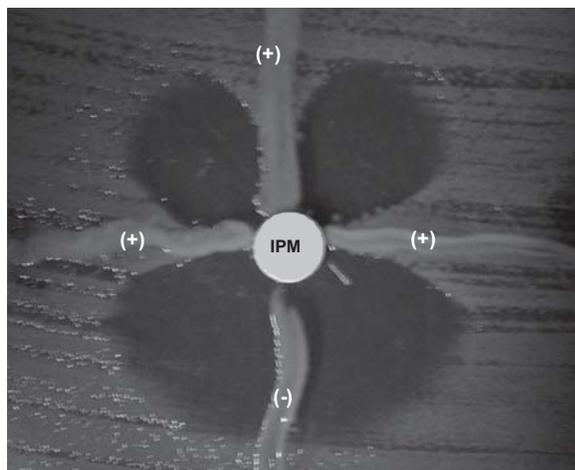


Figura 2. Test de Hodge Modificado.

Tabla 1. Resultados del método del doble disco y Hodge Modificado en 146 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a IMP y MEM.

Test de Hodge	Disco EDTA/SMA	
	(+)	(-)
(+)	139	5
(-)	0	2

año 1996, la presencia de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL era del 2%, para el año 1997 del 28% y para el año 2003 era superior al 40%, estos resultados son superiores a los obtenidos en esta investigación. Por otra parte, Castanheira y col. (22) en la India, reportan un 35,5% de cepas de *Pseudomonas* spp. con susceptibilidad disminuida a IPM y MEM, las que después confirman como productoras de MBL mediante reacción en cadena de la polimerasa; mientras que Yan y col. (23) en Taiwan, reportan un 10% de cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de MBL, valor inferior al obtenido en nuestro estudio. Estos resultados indican que la incidencia de MBL en aislados clínicos de *Pseudomonas* está estrechamente relacionada con la ubicación geográfica, por lo que es imperativo rea-

lizar estudios que permitan determinar la incidencia local de este mecanismo de resistencia en nuestras instituciones de salud.

El 95,21% de los aislados de *P. aeruginosa* resistentes a IPM y MEM, por el método del disco, fueron positivos en el MDD utilizando una mezcla EDTA/SMA como agente inhibidor, esto sugiere la presencia de un mecanismo de resistencia enzimático muy probablemente producción de MBL. Galani y col. (24) reportan un 99% de sensibilidad y un 91,9% para la detección de MBL, por lo que lo recomiendan como método de rutina para la detección de cepas productoras de MBL. Por otra parte Guevara y col. (25), en Venezuela también reporta una buena especificidad y especificidad (superior al 95%), utilizando discos de IPM con EDTA/SMA. Lee y col. (26), reportan una sensibilidad y especificidad del 100% para el método del doble disco con IPM/EDTA.

Por otra parte, el 98,67% de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas dieron positivo el MHT, este valor es superior al detectado por el método del doble disco (95,21%), debido principalmente a que el MHT detecta la presencia de cualquier mecanismo enzimático de resistencia, mientras que el MDD solo detecta la presencia de MBL. En el MTH, la especificidad del método está dada por el antibiótico utilizado como sustrato en la prueba, en este caso IPM, por lo que el método detecta la presencia de enzimas que hidrolizan a los carbapenems, es decir, carbapenemasas; en nuestro medio, la resistencia a carbapenems en *Pseudomonas* spp. se debe principalmente a la producción de MBL, sin embargo existen otras carbapenemasas no MBL que pueden conferir resistencia a los carbapenems como por ejemplo KPC, SME y NDM-1 entre otras, estos mecanismos enzimáticos de resistencia pueden ser detectados por el MHT pero no por el MDD, lo que expli-

ca la diferencia existente entre los dos métodos.

Al analizar los resultados de la Tabla 1, se observa que existe una buena correlación entre el MDD y el MHT, sin embargo, se observa que 5 aislados fueron positivos para el MTH y negativos para el MDD, esto puede ser debido a la presencia de otras carbapenemasas no MBL. Por otra parte se observa que 2 aislados resistentes a IPM y MEM por el método del disco fueron negativos por el MDD y el MTH, esto probablemente indicaría la presencia de un mecanismo de resistencia no enzimático, posiblemente producido por un sistema de eflujo (27-29) o por la pérdida de porinas específicas a nivel de la membrana externa (28-30), que impiden la entrada del antibiótico al interior de la bacteria.

Diferentes autores recomiendan el MDD y el MTH para la detección de MBL en aislados de *Pseudomonas* spp. (20, 25, 26, 29), este estudio demuestra que estos métodos son una buena recomendación para laboratorios de rutina donde métodos moleculares no están disponibles (29, 31). La utilización de ambos métodos permite detectar de manera adecuada la producción de MBL en aislados de *Pseudomonas* spp., incluso permite la detección de carbapenemasas no MBL en estas cepas, lo que resulta útil en el laboratorio para dirigir de manera óptima la terapéutica aplicada a los pacientes, así como, la activación rápida de los programas de control de infecciones nosocomiales, para de esta manera evitar la diseminación de la resistencia.

Referencias bibliográficas

- (1) Harris A, Torres-Viera C, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore M, Carmeli Y. Epidemiology and Clinical Outcomes of Patients with Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical Infectious Diseases 1999 May 1; 28(5):1128-33.
- (2) Pagniez G, Radice M. Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. Revista Argentina de Microbiología 2006; 38(33): 37.
- (3) Sociedad Argentina de Bacteriología (SADEBAC). Consenso sobre criterio de ensayo, interpretación e Informe de las pruebas de sensibilidad en los BGNNF de importancia clínica. www.aam.org.ar 2005.
- (4) Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Antibiotic Susceptibility Patterns. Clinical Infectious Diseases 1997 Nov 1; 25(5):1094-8.
- (5) Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Brazilian Journal of Infectious Diseases 2004; 8:25-79.
- (6) Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos. Etiología y Resistencia Bacteriana en Venezuela. 28-5-2011. Caracas, Venezuela. 28-5-2011.
- (7) Pineda M, Bonilla X, Perozo-Mena A. Boletín Sobre Etiología y Resistencia Bacteriana. 2008. Centro de Referencia Bacteriológica SAHUM.
- (8) The inhibitors of cell wall synthesis. In: Scholar E, Pratt W, editors. The Antimicrobial Drugs. Second Edition ed. New York: Oxford University Press; 2000. p. 51-80.
- (9) Suarez CJ, Kattan JN, Guzmán AM, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para supresión y control. Infectio 2006; 10:85-93.
- (10) Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo- β -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. J Clin Microbiol 2003 Dec 1; 41(12):5407-13.

- (11) Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR. Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2003 Oct 1; 52(4):583-90.
- (12) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991 Jan 1; 35(1):147-51.
- (13) Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-Encoded Metallo- β -Lactamase (IMP-6) Conferring Resistance to Carbapenems, Especially Meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 May 1; 45(5):1343-8.
- (14) Henry D, Speert D. *Pseudomonas*. In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th Edition ed. Washington DC: ASM Press; 2011. p. 677-91.
- (15) Kiska D, Gillighan P. *Pseudomonas*. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 734-48.
- (16) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966 Apr; 45(4):493-6.
- (17) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement*. M100-S22[32]. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- (18) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *J Clin Microbiol* 2000 Jan 1; 38(1):40-3.
- (19) Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1978 Jan; 7(1):102-3.
- (20) Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003 Oct 1; 41(10):4623-9.
- (21) Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo- β -Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004 Nov 1; 42(11):5094-101.
- (22) Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem Resistance among *Pseudomonas aeruginosa* Strains from India: Evidence for Nationwide Endemicity of Multiple Metallo- β -Lactamase Clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the Newly Characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Mar; 53(3):1225-7.
- (23) Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, et al. Metallo- β -Lactamases in Clinical *Pseudomonas* Isolates in Taiwan and Identification of VIM-3, a Novel Variant of the VIM-2 Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Aug 1; 45(8):2224-8.
- (24) Galani I, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giamarellou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo- β -lactamase production in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2008 Mar 1; 61(3):548-53.
- (25) Guevara A, Gamboa A, Machado M, Vera M. Evaluación del ácido etilendiaminotetraacético y del mercaptoacético de sodio en la detección de metalo β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* mediante la técnica del disco combinado. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2010; 30(1):11-7.
- (26) Lee K, Chong Y, Shin H, Kim Y, Yong D, Yum J. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-

- producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology & Infection* 2001; 7(2):88-91.
- (27) Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Sep 1; 39(9):1948-53.
- (28) Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MaD, Rodríguez C, Moya B, et al. Overexpression of AmpC and Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections: Prevalence and Impact on Resistance in a Spanish Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 May 1; 55(5):1906-11.
- (29) Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- β -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *J Clin Microbiol* 2005 Jul 1; 43(7):3129-35.
- (30) Buscher KH, Cullmann W, Dick W, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1987 May; 31(5):703-8.
- (31) Valenza G, Joseph B, Elias J, Claus H, Oesterlein A, Engelhardt K, et al. First Survey of Metallo- β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a German University Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Aug 1; 54(8):3493-7.