

Artículo Original/ Original Article

## **Detección Fenotípica de Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013**

Clotilde Ophelie Marie Molin Queste

Laboratorio central del Hospital de Clínicas, San Lorenzo. Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Asunción.

**Cómo referenciar este artículo/  
How to reference this article:**

**Molin C.** Detección Fenotípica de Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2016;14(1):25-31.

---

### **R E S U M E N**

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas más importantes, causante de infecciones, con alto índice de morbi-mortalidad. Los carbapenemes son antibióticos que poseen un amplio espectro de actividad y son altamente potentes, que los vuelven imprescindibles en el tratamiento empírico. *P. aeruginosa* presenta diversos mecanismos de resistencia, entre ellos las carbapenemasas tipo metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs). Debido al aumento de las bacterias productoras de MBLs, es importante la aplicación de test simples, prácticos y de bajo costo, como pruebas de rutina, para la identificación de las bacterias productoras de MBLs de forma rápida. El objetivo de este trabajo fue determinar fenotípicamente la presencia de carbapenemasas en aislamientos de *P. aeruginosa*. Estudio descriptivo de corte transversal que incluyó aislamientos de *P. aeruginosa* de pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas - San Lorenzo entre febrero a julio de 2013. Se estudiaron 232 aislamientos de *P. aeruginosa*, a aquellos con sospecha de carbapenemasas se les aplicó dos métodos de detección fenotípica, discos de EDTA y discos con ácido dipicolínico - Meropenem (DPA-ME). De estos aislamientos, 30 dieron sinergia con la técnica de EDTA y 18 aislamientos positivos con los discos de DPA. A través de los métodos fenotípicos aplicados se pudo comprobar la presencia de cepas productoras de carbapenemasas tipo MBL en una frecuencia de 7,8%. Los tests de combinación de disco podrían ser útiles en la práctica diaria para proporcionar una detección rápida y fiable de MBL carbapenemasas en los aislados de *P. aeruginosa* cuando las pruebas moleculares no están disponibles.

**Palabras Claves:** Carbapenemasas, MBL, ácido dipicolínico, *P.aeruginosa*

## **Phenotypic detection of Carbapenemases in *P. aeruginosa* in patients attending the Hospital de Clinicas in San Lorenzo, from February to July 2013**

---

### **A B S T R A C T**

*P. aeruginosa* is one of the most important opportunistic pathogens that cause infections with high morbidity and mortality. Carbapenems are antibiotics with a broad spectrum of activity and highly powerful, which makes them indispensable in the empirical treatment. *P. aeruginosa* has various mechanisms of resistance, including metallo $\beta$ lactamase (MBL) type carbapenemases. Due to increasing numbers of MBL producing bacteria, it is important to apply simple tests that are practical and inexpensive as routine protocol in order to rapidly identify MBL producing bacteria. The objective of this study was to determine phenotypically the presence of carbapenemases in *P.*

Fecha de recepción: noviembre 2015. Fecha de aceptación: febrero 2016

Autor correspondiente: **Clotilde Molin.** Laboratorio central del Hospital de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Asunción.

Email: cottymolinar@hotmail.com

*aeruginosa* isolates. A descriptive cross-sectional study was performed in isolates of *P. aeruginosa* from patients attending the *Hospital de Clínicas - San Lorenzo* from February to July, 2013. Two hundred thirty two isolates of *P. aeruginosa* were studied. Those isolates suspicious of having Carbapenemasas were subjected to two phenotypic detection methods: discs of EDTA and discs of dipicolinic acid – Meropenem (DPA-ME). Of these isolates, 30 were synergistic with the technique of EDTA and 18 positive with DPA discs. The presence of strains producing MBL type carbapenemasas was determined through these phenotypic methods yielding a frequency of 7.8%. The disc combination tests may be very useful in the daily practice to provide fast and reliable detection of MBL carbapenemasas in *P. aeruginosa* isolates, where molecular biology tests are not available.

**Keywords:** Carbapenemasas, MBL, dipicolinic acid, *P. aeruginosa*

## INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas más importantes, causantes de infecciones, con altos índices de morbilidad y mortalidad (1-3). Es considerado un patógeno primariamente nosocomial, siendo común su aislamiento en pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos, en quienes además presenta una marcada multiresistencia (4).

El fenotipo "salvaje" de *P. aeruginosa* se caracteriza por su sensibilidad a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, ceftazidimas, cefepima, cefoperazona, aztreonam y carbapenémicos, y presenta resistencia natural a muchos antimicrobianos. También desarrolla mutaciones cromosómicas y adquiere material genético que incrementa su resistencia. El número de cepas multiresistentes ha aumentado en los últimos años, y ha hecho que se rescaten antibióticos, como colistina, que se dejaron de usar por su toxicidad, y que en ocasiones es la única opción de tratamiento (5,6).

Los carbapenemes son antibióticos  $\beta$ -lactámicos producidos por diferentes especies de *Streptomyces*. Están dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las  $\beta$ -lactamasas. Poseen un amplio espectro de actividad y son altamente potentes, lo cual hace que sean imprescindibles en el tratamiento empírico donde se sospecha la presencia de un patógeno multiresistente (7-9).

*P. aeruginosa* presenta diversos mecanismos de resistencia contra los agentes terapéuticos (3, 10-12), como: a) las Beta- lactamasas que son enzimas capaces de romper e inactivar el anillo beta-lactámico que forma parte de la estructura molecular de los antibióticos beta-lactámicos (8), b) las  $\beta$ -lactamasas AmpC que median la resistencia a cefalosporinas, aztreonam, e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Presentan baja afinidad a los carbapenemes, sin embargo, pueden ocurrir mutaciones espontáneas, que llevan a la producción constitutiva de esta enzima en suficiente cantidad y puede hidrolizar los antibióticos antes mencionados (11), c) Las bombas de expulsión, siendo la más frecuente MexAB-OprM, que media la expulsión de meropenem, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina y trimetoprim. La MexXY-OprM expulsa aminoglucósidos (8), d) las pérdidas de porinas. La OprD, es la principal vía de entrada de los carbapenémicos, la pérdida de esta porina comporta una disminución de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a estos antibióticos, lo que lleva a una resistencia (8,13,14) y e) Las carbapenemasas de serina: poseen un residuo de serina en su sitio activo.

Están incluidas en la clasificación molecular de Ambler Clase A: en general hidrolizan todos los  $\beta$ -lactámicos (1). Corresponden principalmente a las enzimas de tipo KPC, IMI y GES. Teniendo la particularidad de ser inhibido total o parcialmente por el ácido borónico y el ácido clavulánico. Clase D: corresponden, esencialmente a las enzimas de tipo oxacilinasas. Estas enzimas hidrolizan fuertemente las carbapenemasas pero poco y nada a las cefalosforinas de tercera generación, son resistentes a los inhibidores tazobactam y ácido clavulánico. Clase B: corresponden a las Metallo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) de tipo VIM, IMP y NDM, hidrolizan fuertemente a todas los beta-lactámicos a excepción del aztreonam (15). Las MBL son producidas intrínsecamente por microorganismos como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium sp*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus*, *Aeromonas spp.* (8,16).

Las MBLs necesitan de iones bivalentes,  $Zn^{++}$ , como cofactor para la reacción de hidrólisis de  $\beta$ -lactámicos, por tanto, estas enzimas pueden ser identificadas por test fenotípicos. Para la búsqueda en el laboratorio de las enzimas MBL se han propuesto ensayos fenotípicos (17) basados principalmente en la acción de agentes quelantes como el etilendiaminotetracético (EDTA), el ácido dipicolínico (DPA) o derivados del ácido succínico, capaces de interaccionar con el zinc necesario para la acción catalítica de dichas enzimas.

Estos ensayos consisten en colocar un disco de imipenem (IM) y un disco de EDTA a una distancia de 15 mm de borde a borde y otro de meropenem (ME) contrapuesto al de IM. Otro inhibidor también utilizado es el DPA combinado con ME, donde un aislamiento positivo muestra un incremento  $\geq 5$ mm en el halo entre ME y ME-DPA (18).

Debido a los numerosos relatos de bacterias productoras de MBLs en diferentes regiones del mundo, es importante la aplicación en los laboratorios hospitalarios, los test simples, prácticos y de bajo costo, como pruebas de rutina, para que se puedan rastrear a las bacterias productoras de MBLs. El estudio realizado por Pasteran *et al.* mostró que DPA detecta enzimas de MBL con una sensibilidad y especificidad del 97% y 81%, respectivamente. Los autores analizaron un total de 149 aislados de *P. aeruginosa*, de los cuales 38 resultaron ser MBL (19). En Paraguay aún no se tiene registros de estudios realizados con este tipo de discos.

El conocimiento del perfil de resistencia de los aislamientos de *P. aeruginosa* en un hospital y la detección de la presencia de carbapenemasas constituyen una información relevante y de gran utilidad para que el sistema de vigilancia y epidemiología del hospital pueda tomar las medidas de contención necesarias para evitar su diseminación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, descriptivo de corte transversal, en el que se estudiaron aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos a partir de cultivos de rutina provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios que acudieron al Hospital de Clínicas – San Lorenzo en el periodo de febrero a julio de 2013.

Para el estudio, se incluyeron todas las muestras que fueron enviadas al laboratorio, con correcta identificación del paciente. Las variables analizadas fueron la presencia o ausencia de carbapenemasas en los aislamientos de *P. aeruginosa*, los datos del paciente como sexo, servicio del que provenía (UCIA, UCIP, quirófano, CCM, Urología), y el tipo de muestra (orina, secreción purulenta, hemocultivo, líquidos de punción, secreción traqueal).

La identificación y el perfil de resistencia a los antibióticos (MER meropenem, IMP imipenem, AK amicacina, GEN gentamicina, CIP ciprofloxacina, FEP cefepime, CS colistina, CAZ ceftazidima, TZP tazobactam piperacilina) de los aislamientos de *P. aeruginosa* se realizaron por el sistema Vitek 2C (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) y también por la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer, siguiendo las recomendaciones y teniendo en cuenta los puntos de corte de *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) 2013 (20). Se consideraron los aislamientos con posible presencia de carbapenemasas aquellas con halos de inhibición para ceftazidima (CAZ)  $\leq 22$  mm por la técnica de difusión en disco y  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$  (I, R) por vitek-2C y para Meropenem (ME)  $\leq 23$ mm (I,R) y  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ .

Una vez determinada la sensibilidad de los aislados a CAZ, IMP y ME, se realizaron los métodos de detección fenotípica de las carbapenemasas: con EDTA (Monodiscos Britania) y KIT ROSCO KPC/MBL (Rosco Diagnostica- Denmark). Los discos de EDTA fueron colocados entre IM y ME a una distancia de 15 mm de borde a borde en una placa de Müller Hinton, y el KIT ROSCO KPC/MBL que utiliza discos de ME y ME DPA para confirmar la presencia de MBLs.

La lectura e interpretación se realizó después de 24 hs de incubación. Una prueba positiva para los discos de EDTA consiste en el agrandamiento o deformación de la zona de inhibición del desarrollo alrededor del disco de IM y/o ME hacia el disco de EDTA. Con el KIT ROSCO KPC/MBL, se mide la zona de inhibición del disco de ME y de ME-DPA, y una diferencia de halo  $\geq 5$  mm confirma la presencia de MBLs.

Los datos fueron ingresados en una planilla del programa Microsoft Excel 2010 y posteriormente analizados por el mismo programa utilizando estadística descriptiva.

## RESULTADOS

De un total de 232 aislamientos de *P. aeruginosa*, 54 fueron seleccionados para el estudio, por presentar valores de CIM a CAZ, ME e IM, según Vitek 2C, resistente y/o intermedio. El perfil de sensibilidad a ceftazidima, meropenem e imipenem de los aislamientos de *P. aeruginosa* se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Perfil de sensibilidad a ceftazidima, meropenem e imipenem en aislamientos de *P. aeruginosa*. Servicio de Microbiología, Hospital de Clínicas San Lorenzo, febrero a julio 2013. n=54

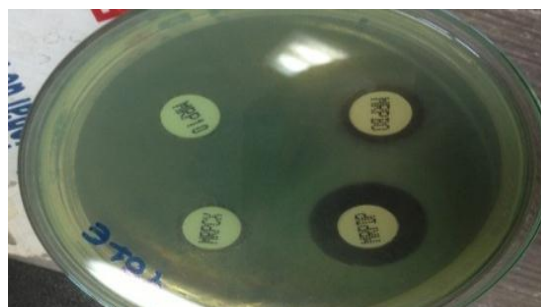
Antibióticos	Cepas Sensibles	Cepas Intermedias	Cepas Resistentes
CAZ	-	14 (26%)	40 (74%)
IM	-	9 (17%)	45 (83%)
ME	7 (13%)	3 (6%)	44 (81%)

Nota: ceftazidima, imipenem y meropenem.

A los 54 aislamientos seleccionados se les aplicaron los dos métodos fenotípicos, observándose que 30 dieron sinergia por la técnica de doble disco con EDTA: ME – EDTA – IM (Figura 1), mientras que por la técnica con los discos del Kit Rosco KPC/ MBL, se obtuvieron 18 aislamientos con la probable presencia de carbapenemasa tipo MBLs, observándose una diferencia de halos entre ME y ME-DPA  $\geq 5$ mm (Figura 2) que corresponde a una frecuencia de 7,8%.



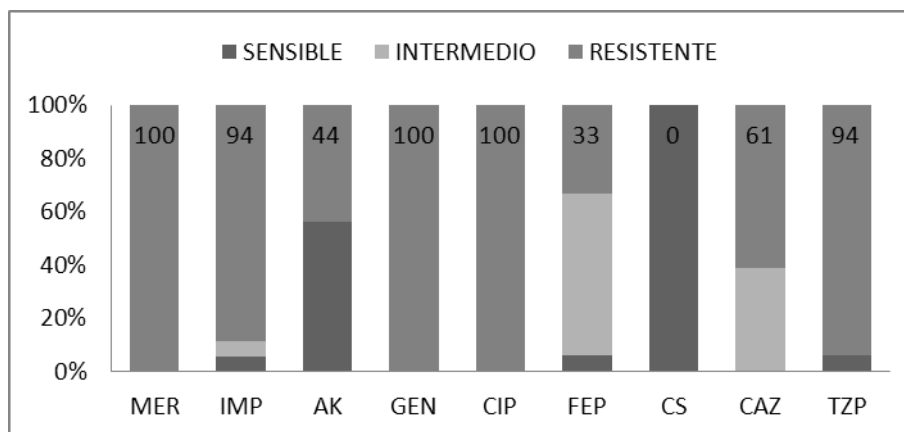
**Figura 1:** Efecto sinérgico del EDTA con IM y ME.



**Figura 2:** Diferencia de halos  $\geq 5$ mm entre ME y ME-DPA en aislados de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas tipo MBL.

Las muestras biológicas de las que se aislaron *P. aeruginosa* con probable MBLs fueron orina, secreción traqueal, hemocultivo, secreciones purulentas, líquidos de punción, pero orina (6/18) 33% y secreción traqueal (5/18) 28% fueron los más frecuentes. El 61% de los aislamientos fue de muestras de pacientes del sexo masculino. El 95% de los aislamientos provenía de internados adultos de diferentes salas: UCIA (38%), Cátedra de Clínica Médica (28%), Urgencias Adultos (18%), Urología (5%), Traumatología (5%) y el 5% provenía de Consultorio Externo.

En el perfil de sensibilidad para *P. aeruginosas* portadoras de probable MBLs se observó 100% de resistencia a meropenem, gentamicina, ciprofloxacina, 94% a imipenem y piperacilina tazobactam, 61% a ceftazidima, 44% a amikacina y 33% a cefepime. Así también se observó sensibilidad del 100% para colistina, 56% para amikacina, y 6% para imipenem, cefepime y piperacilina tazobactam. Los valores intermedios fueron registrados para imipenem 6%, cefepime 61% y ceftazidima 39%. Figura 3



Nota: MER meropenem, IMP imipenem, AK ampicilina, GEN gentamicina, CIP ciprofloxacina, FEP cefepime, CS colistina, CAZ ceftazidima, TZP tazobactam piperacilina.

**Figura 3.** Perfil de sensibilidad para *P. aeruginosa* con probable MBLs aisladas en diversas muestras clínicas. n=18

## DISCUSIÓN

La detección de MBLs en *P. aeruginosa* constituye un hecho observable en todos los países del mundo, lo cual denota una frecuencia creciente en los últimos años (21). Las *P. aeruginosa* MBLs en el ámbito hospitalario se asocian con un problema clínico importante, así como a programas de control de infecciones, por lo que se requiere disponer de métodos diagnósticos confiables y precisos para su identificación (22,23).

La *P. aeruginosa* productora de MBLs se identificó por primera vez en Japón en 1991 (24). En un estudio multicéntrico realizado en Paraguay en 2011 -2013, de 671 bacilos gram negativos no fermentadores portadores de la enzima MBLs, se obtuvieron 20 aislamientos de MBLs, correspondiente a un 3%, de éstos 5 resultaron ser *P. aeruginosa*. Se realizaron pruebas de sinergia con EDTA, métodos microbiológicos y moleculares (25).

En este estudio, de un total de 232 aislamientos de *P. aeruginosa*, 30 de ellas dieron sinergia por la técnica de doble disco con EDTA, lo que sugiere la presencia de un método enzimático muy probablemente producción de MBL, con los discos de DPA-ME se obtuvieron 18 *P. aeruginosa* con probable MBL. Esta diferencia puede deberse a que el método de doble difusión con EDTA tiene el inconveniente de producir falsos positivos (26,27), debido a que el EDTA es capaz de aumentar la permeabilidad de la membrana externa, incrementando así la susceptibilidad a *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp* a varios antimicrobianos (27). En cuanto a los discos de DPA, éstos presentan una sensibilidad y especificidad de 97% y 81% respectivamente (19), por lo que estos resultados se deberían confirmar por biología molecular, ya que son las técnicas de referencia para detectar la producción de MBL, pero no son aplicables en todos los laboratorios por su elevada complejidad y costo. Por ello, el uso de estos métodos fenotípicos resultan útiles para su uso diario en los laboratorios de baja complejidad para detectar la presencia de MBL en forma rápida, eficaz, sencilla, confiable y sobre todo de bajo costo.

Este es el primer estudio fenotípico utilizando el KIT de ROSCO KPC/MBL que demuestra la presencia de enzimas MBLs en aislados de *P. aeruginosa*, en el Hospital de Clínicas de Paraguay - San Lorenzo, obteniendo una frecuencia de 7,8%. Comparando con otros estudios realizados en América del Sur para la detección de MBLs en aislamientos de *P. aeruginosa* hay una cierta similitud en los resultados, se observa que la frecuencia en Perú fue del 7% (28), en Argentina fue del 14% (29), en Brasil 8,2% (30), y en Colombia 11,7% (10).

Las muestras biológicas de las que se aislaron mayor porcentaje de *P. aeruginosa* con probable MBLs fueron orina (6/18) 33% y secreción traqueal (5/18) 28%, lo que sugiere enfatizar más la búsqueda en dichos materiales. Los mismos provenían de UCIA (38%), Cátedra de Clínica Médica (28%), Urgencias Adultos (18%), Urología (5%), Traumatología

(5%) y Consultorio (5%). Este fenómeno, que antes estaba limitado a las unidades de cuidados intensivos, se ha diseminado a otras áreas de hospitalización creando datos alarmantes en la morbi-mortalidad de cada hospital.

Según el perfil de sensibilidad para los 18 aislamientos de *P. aeruginosa* se observó que el 100% de ellos era sensible a colistina, sin embargo, con los demás antibióticos la sensibilidad fue menor, así la sensibilidad para amikacina fue de 56%, y para imipenem, cefepime, piperacilina tazobactam fue de 6%. Por lo tanto se puede decir que la droga de elección, en terapias combinadas sigue siendo la colistina a pesar de su toxicidad (5). El conocimiento de la epidemiología y de los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos propios de cada unidad hospitalaria es de gran utilidad ya que proporciona herramientas sólidas a los médicos responsables de la toma de decisión en el manejo de pacientes con infección grave.

Es necesario continuar buscando MBLs en *P. aeruginosa* en un perfil de antibiótico que lo indique, especialmente en muestras de orina y de vías respiratorias, usando el método de difusión por monodisco de EDTA y el KIT de ROSCO KPC/MBL, a fin de mejorar la sensibilidad. La confirmación mediante PCR constituye un paso posterior importante y confirmatorio de la presencia de MBLs. La detección rutinaria de MBLs garantizará la atención óptima del paciente y la introducción oportuna de medidas de prevención.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nicolau C, Olivier A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*, Enferm Inecc Microbiol Clin. 2010;28(1);19-28.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Sachresckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 5ta. Ed, Bs As, Edit Panamericana. 2001.
- González M, Ribas R, Coria R, Donis J, Aparicio G. Detección de la beta lactamasa de espectro extendido OXA-141 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quísticas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012 Nov;30(9):535-41.
- Perozo A, Castellano M, Chávez T, Ling E, Arraiz N. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de MBL en aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Kasmera. 2013;41(2):115-26.
- Sánchez A, Salso S, Culebras E, Picazo J. Resistencia a carbapenems por Metaloenzimas en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. Rev. Esp. Quimioterap. 2004;17(4):336-40.
- Zanol F, Ulrich S, Morsch F. Detecção de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2010;46(4):309-14.
- Gall N, Andremont A, Armand L. Resistance aux carbapenems: Vers une nouvelle impasse? Journal des Anti-infectieux. 2011;13(2):87-102. Doi : 10.1016/j.antinf.2011.03.005
- Jimeno A, Alcalde MM, Blazquez A. Detección de un brote epidémico por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-betalactamasa. Rev. Clin Esp. 2011;211(4):187-91.
- Moreno K. Terapéutica Médica. Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. Rev. Med. Cos Cen. 2013;70(608);559-605.
- Martínez P, Máximo M, Máttar S. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productores de Metallo- $\beta$ -lactamasas en el principal Hospital de Córdoba. Infectio. 2005;9:6-15.
- Martínez P, Mercado M, Máttar S. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productoras de metalo-beta-lactamasas en el principal hospital de Córdoba. Infectio 2005; 9(1):
- Suárez C, Kattan J, Guzmán A, Villegas M, Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Artículo de revisión. Infect. 2006;10(2):85-93.
- Piersigilli A, Enrico MC, Bongiovanni ME, Bilbao L, Martínez G, Ledesma E. Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de Beta lactamasa de espectro extendido en un centro privado de Córdoba. Rev Chil Infect 2009;26(4):331-5.
- Villa J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. Enferm. Infecc. Microbiol. Clín. 2010;28(10):726-36.
- Gómez C, Leal A, Pérez M, Navarrete M. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: Entendiendo a un peligroso enemigo. Rev. Fac. Med 2005;53(1):27-34.
- Boutet A, Pantel A, Sotto A, Lavigne J. Les entérobactéries productrices de carbapénémases. Alin&as. 2012(2):1-5.

17. Oliver A. Impacto de la diseminación de *P. aeruginosa* multiresistente productora de metalo-β lactamasa en los hospitales, presente y futuro. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(5):255-6.
18. Walsh T., Toleman M., Poirel L, Nordmann P. Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):306-25.
19. Ruiz M, Motjé M, Garcia D, Tejerina P, Puig I, Pérez D *et al.* Caracterización fenotípica de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* predictores de carbapenemasas y detección de genes de resistencia tipo VIM. IDIBGI-Girona 2013. Disponible en: [http://www.progenie-molecular.com/Poster\\_SEIMP-Zaragoza-OXVI-Pseudomonas\\_052013.pdf](http://www.progenie-molecular.com/Poster_SEIMP-Zaragoza-OXVI-Pseudomonas_052013.pdf)
20. Pasterán F, Veliz O, Faccione D, Guerriero L, Rapoport M, Mendez T *et al.* A simple test for the detection of KPC and metallo-β-lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Sep;17(9):1438-41.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23. 2013;33(1). CLSI, Wayne, Pa, USA.
22. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC (2002). 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;45(8):2224-8.
23. Lee K, Lim Y, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem EDTA Double Disk Synergy Test for Differentiating Metallo Beta Lactamase Producing Isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4623-9.
24. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(1):147-51.
25. Pitout J, Gregson D, Poirel L, McClure J, Le P, Church L *et al.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo-Beta-Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3129-35.
26. Franco R, Martínez M, Melgarejo N, Falcón M, Kawabata A, Almada P *et al.* Carbapenemasas tipo metalo beta lactamasas circulantes en hospitales de Asunción y Central. LCSP. Paraguay. 2013. Disponible en: <https://temaslibres2013.blogspot.com/2013/10/carbapenemasas-tipo-metalobetactamasa.html?m=1>
27. Perozo A, Castellano M, Ling Eliana, Arraiz Nailat. Detección fenotípica de metalobetactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasmera.* 2012;40(2):113-21. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222012000200002&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222012000200002&lng=es).
28. Galloso P, Lezcano M, Quiroga M. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo-β-Lactamasas. *Rev.cienc. tecnol.* N° 14 Posadas jul./dic. 2010.
29. Díaz J. Detección de Metalo betalactamasa (MBL) en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a las carbapenemasas en un Hospital Nacional. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Farmacia y Bioquímica. 2008
30. Cejas D, Almuzara M, Santella G, Tuduri A, Palombarani S, Figueroa S. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aislados en un hospital de Buenos Aires. *Rev. Argent microbiol.* 2008;40(4):238-245.
31. Galetti R. Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBL e de genes envolvidos na resistência a os carbapenêmicos. [Tesis de maestria] Ribeirão Preto: Universidade de Sai Paulo. Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirão Preto. 2010.