

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de la metalobetalactamasa VIM-2 en Cantabria, España

María-Cruz Rodríguez*, Belén Ruiz del Castillo, Cristina Rodríguez-Mirones, María Romo, Idoia Monteagudo y Luis Martínez-Martínez

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 30 de septiembre de 2008

Aceptado el 16 de enero de 2009

On-line el 1 de mayo de 2009

Palabras clave:

Pseudomonas aeruginosa

Metalobetalactamasa

VIM-2

carbapenémicos

Integrón

RESUMEN

Introducción: En España el aislamiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas (MBL) es poco frecuente. En este artículo se describe la caracterización de 9 aislados clínicos de *P. aeruginosa* multiresistentes clonalmente relacionados, aislados en Cantabria (España) que poseen el gen *bla*_{VIM-2}.

Métodos: Los aislados de *P. aeruginosa* (uno por paciente) se han obtenido en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre enero de 2004 y diciembre de 2006. La identificación y los estudios preliminares de sensibilidad a los antimicrobianos se determinaron con el sistema MicroScan Walkaway (Dade Behring, Sacramento, California) y se confirmaron mediante microdilución de referencia.

Resultados: Las concentraciones inhibitorias mínimas de imipenem (IMP) fueron de 32 a 128 µg/ml y de 16 a 64 µg/ml para meropenem. Los 9 aislados presentaron un único patrón de Rep-PCR y tenían sensibilidad intermedia o resistencia a ceftacídima, cefepima, gentamicina, tobramicina, amikacina y ciprofloxacina. Ocho de los 9 aislados fueron sensibles a aztreonam. La tasa de hidrólisis de IMP por extractos crudos de los aislados estudiados fue de 162 ± 18 a 235 ± 28 pmol/min/µg proteína y se inhibió en presencia de 5 mM de ácido etilendiaminotetraacético. Todos los aislados poseían un integrón con los genes *aac(6')32*, *bla*_{VIM-2} y un gen que codifica para una probable transposasa, flanqueados por las regiones conservadas 5'CS y 3'CS.

Conclusión: La presencia de la MBL VIM-2 en estas cepas es suficiente para justificar su resistencia a carbapenémicos.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Cantabria, Spain, producing VIM-2 metallo-β-lactamase

ABSTRACT

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa

Metallo-β-lactamase

VIM-2

Carbapenems

Integron

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo-β-lactamases (MBL) are uncommon in Spain. This study describes the characterization of 9 new clonally related multiresistant *P. aeruginosa* isolates possessing the *bla*_{VIM-2} gene in Cantabria (Northern Spain).

Methods: *P. aeruginosa* clinical strains (1 per patient) were isolated in the Microbiology Service of Marqués de Valdecilla University Hospital between January 2004 and December 2006. Identification and preliminary susceptibility studies were performed with the MicroScan WalkAway system (Dade Behring, Sacramento, CA) and results were verified by a microdilution reference method.

Results: MICs of imipenem and meropenem for the 9 isolates ranged from 32 to 128 and 16 to 64 µg/mL, respectively. Nine isolates had a single Rep-PCR pattern and were intermediate or resistant to ceftazidime, cefepime, gentamicin, tobramycin, amikacin and ciprofloxacin. Eight of the 9 isolates were susceptible to aztreonam. Hydrolysis activity of imipenem in MBL-positive isolates ranged from 162 ± 18 to 235 ± 28 pmol/min/µg protein and was abolished in the presence of 5 mM EDTA. All isolates possessed an integron with genes *aac(6')32*, *bla*_{VIM-2} and a putative transposase-encoding gene, flanked by the conserved 5'CS and 3'CS regions.

Conclusion: In the clinical isolates studied, the presence of MBL VIM-2 sufficed to explain their resistance to carbapenems.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cruzrodriguez@humv.es (M.C. Rodríguez).

Introducción

Los carbapenémicos son antimicrobianos ampliamente empleados en el tratamiento de infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa*. La resistencia a estos compuestos se ha asociado clásicamente al efecto aditivo de 3 mecanismos moleculares: la pérdida de la porina OprD junto con la hiperproducción de la betalactamasa cromosómica AmpC y con el incremento en la expresión de la bomba de expulsión activa MexAB-OprM (que afecta a la expulsión del meropenem [MPM])¹. La resistencia a carbapenémicos se ha incrementado recientemente debido a la diseminación de metalobetalactamasas (MBL) pertenecientes a la clase B de Ambler, capaces de hidrolizar estos compuestos además de las penicilinas y cefalosporinas, pero no el aztreonam. Estas enzimas requieren zinc para su actividad catalítica y su actividad es inhibida por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*).

Según el estudio multicéntrico llevado a cabo en hospitales españoles por Gutiérrez et al², la frecuencia de aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem (IMP) o a MPM es del 18,9% y la presencia de MBL en estos aislados se da con una frecuencia del 0,4%.

Las MBL descritas hasta la fecha en *Pseudomonas* spp. se agrupan en 4 grupos moleculares: IMP, VIM, GIM y SPM³. Un quinto grupo corresponde a SIM⁴, que se ha descrito únicamente en *Acinetobacter baumannii*. Los genes causantes de la producción de MBL se encuentran formando parte de un integrón⁵, que puede estar localizado en un plásmido movilizable o insertado en el cromosoma.

El objetivo de este estudio ha sido la caracterización fenotípica y genotípica de 9 aislados clínicos de *P. aeruginosa* que codifican la MBL VIM-2, detectados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla durante los años 2004 a 2006 (tabla 1).

Métodos

Los aislados de *P. aeruginosa* (uno por paciente) se han obtenido de muestras clínicas enviadas al Servicio de Microbio-

logía del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre enero de 2004 y diciembre de 2006. Como posibles productores de MBL se seleccionaron los aislados con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de IMP o de MPM superior o igual a 8 mg/l (tabla 1). La identificación y los estudios preliminares de sensibilidad a los antimicrobianos se determinaron con el sistema MicroScan Walkaway (Dade Behring, Sacramento, California, EE. UU.) y con tiras de Etest (AB Biodisk, Solna, Suecia).

Las CIM de IMP y de MPM se confirmaron mediante microdilución de referencia de acuerdo con las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute⁶. También se ha empleado la microdilución para la detección fenotípica de MBL: se consideró indicativa de la presencia de MBL una relación superior o igual a 8 del cociente entre la CIM de IMP o de MPM solos y el mismo agente combinado con 0,4 mM de EDTA (Sigma, Madrid, España) y 0,04 mM 1,10-fenantrolina (Sigma, Madrid, España). La obtención del ácido desoxirribonucleico (ADN) y las reacciones para llevar a cabo la detección simultánea de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM} y *bla*_{SIM} mediante Multiplex PCR (*polymerase chain reaction* 'reacción en cadena de la polimerasa') se han realizado usando los oligonucleótidos y las condiciones previamente descritas³.

Se han utilizado como controles en todas las reacciones de amplificación las cepas portadoras de los diferentes tipos de MBL: *P. aeruginosa* (*bla*_{VIM-2}), *P. aeruginosa* 07-406 (*bla*_{VIM-7}), *P. aeruginosa* 86-6348 (*bla*_{IMP-2}), *A. baumannii* 48-695 (*bla*_{IMP-1}), *P. aeruginosa* 86-16734 (*bla*_{IMP-13}) y *P. aeruginosa* 73-5671 (*bla*_{GIM-1}), cedidas por el Dr. Toleman (Universidad de Cardiff, Reino Unido); *A. baumannii* T104 YMC 03/9/T104 (*bla*_{SIM-1}), enviada por el Dr. Rossolini (Universidad de Siena, Italia) y *P. aeruginosa* P1088 (*bla*_{SMP-1}), donada por el Dr. Mendes (Universidad Federal de São Paulo, Brasil).

Las reacciones de amplificación y secuenciación de los integrones que codifican el *bla*_{VIM} se realizaron con los oligonucleótidos 5'CS y 3'CS (tabla 2) que hibridan con regiones conservadas de los extremos del integrón. También se ha diseñado otro grupo de oligonucleótidos (no mostrados) para secuenciar la región interna del integrón.

La actividad hidrolítica de los carbapenémicos se determinó mediante ensayos espectrofotométricos de acuerdo con lo descrito anteriormente⁵. De forma breve, las reacciones se llevaron a cabo en tampón de 50 mM hepes (Sigma, Madrid,

Tabla 1
Susceptibilidad a antimicrobianos en aislados clínicos productores del gen *bla*_{VIM-2}

Cepa	Datos clínicos				CIM ^a (mg/l)				CIM ^b (mg/l)								
	Muestra ^c	Servicio ^d	Edad	Sexo	IMP	IMP + EDTA	MPM	MPM + EDTA	CAZ	AZT	FEP	GTM	TOB	AMK	CIP	PTZ	CO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					1	1	0,5	0,5	4	8	0,5	2	1	2	0,094	4	0,5
<i>P. aeruginosa</i> COL1					128	0,5	128	1	256	0,25	32	256	256	64	2	256	0,5
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-2121	AT	UCI	29	V	64	1,5	32	<0,25	256	8	64	8	128	64	32	32	0,75
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-2460	AT	M INT	82	V	64	2	32	0,5	128	8	32	16	256	64	64	32	0,75
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-2470	EDTA	M INT	84	V	64	1	32	0,5	256	16	64	8	128	32	32	32	0,75
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-2633	EDTA	M INT	29	V	64	1	32	<0,5	256	8	64	16	256	32	32	32	0,75
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-2678	O	M INT	70	V	64	2	32	0,5	128	8	64	16	128	32	32	32	1
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-2760	EH	NCG	64	M	128	2	32	<0,25	256	8	64	8	128	64	32	16	0,75
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-3031	EH	T	74	V	64	2	32	0,5	128	8	32	8	128	64	32	16	0,75
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-3476	EH	M INT	29	V	128	2	64	1	128	8	32	8	128	32	32	128	0,5
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-3794	EH	T	74	V	64	1	32	1	128	4	32	32	256	64	64	16	0,5

AMK: amikacina; AT: aspirado traqueal; AZT: aztreonam; CAZ: ceftacídima; CIM: concentración inhibitoria mínima; CIP: ciprofloxacina; CO: colistina; E: esputo; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*); EH: exudado herida; FEP: cefepima; GTM: gentamicina; IMP: imipenem; M: mujer; M INT: medicina interna; MPM: meropenem; NCG: neurocirugía; O: orina directa; PTZ: piperacilina con tazobactam; T: traumatología; TOB: tobramicina; UCI: unidad de cuidados intensivos; V: varón.

^a CIM (mg/l) determinadas mediante microdilución de IMP y de MPM en presencia y ausencia de 0,4 mM de EDTA y de 0,04 mM 1,10-fenantrolina.

^b CIM (mg/l) obtenidas mediante tiras de Etest de ceftacídima, aztreonam, cefepima, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino, piperacilina con tazobactam y colistina.

^c Procedencia de las muestras: aspirado traqueal, esputo, exudado herida y orina directa.

^d Servicio en el que se ha llevado a cabo la toma de la muestra: unidad de cuidados intensivos, medicina interna, neurocirugía, traumatología.

Tabla 2
Oligonucleótidos usados en este trabajo

Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón (pb)	Uso
mexB.F	5'-GTGATCGAGCAGCAGATGAA-3'	60,1	310	Cuantificación de la expresión del gen <i>mexB</i>
mexB.R	5'-AGAGTGGGTCCTGGATGTTG-3'	59,9		
mexF.F	5'-TCAACGTGAAGGACGAACTG-3'	63	228	Cuantificación de la expresión del gen <i>mexF</i>
mexF.R	5'-TGATCGACAACCTGGAAGCTG-3'	63,1		
RT-oprD.F	5'-CTGGGCTTCGATTCAACAT-3'	61	179	Cuantificación de la expresión del gen <i>oprD</i>
RT-oprD.R	5'-GCCGAAGCCGATATAATCAA-3'	60,2		
rpsL.F	5'-GCAAGCGCATGGTCGACAAGA-3'	69	201	Amplificación y secuenciación del gen <i>oprD</i>
rpsL.R	5'-CGCTGTGCTCTTGACAGTTGTGA-3'	70,1		
oprD.F	5'-GGCAGAGATAATTTCAAACCAA-3'	59,5	1.384	Amplificación y secuenciación del gen <i>oprD</i>
oprD.R	5'-GTTGCTGTGCGGTCGATTAC-3'	60,53		
oprD2.F	5'-ACTTCACCGAGGGCAAGG-3'	61,22		Secuenciación del gen <i>oprD</i>
oprD2.R	5'-CAGAGTTGGCGAGGAAAATC-3'	59,81		
int n1	5'-GCGAAGTCGAGGCATTTCTGTC-3'	65,57	767	Amplificación y secuenciación gen <i>int</i>
int 2	5'-ATGCGTGTAAATCATCGTCGTAGAGA-3'	65,02		
5'CS	5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3'	50		Amplificación del integrón
3'CS	5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	49		
REP-1	5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3'			Rep-PCR
REP-2	5'-ACGCTTATCAGGCCTAC-3'			

Rep-PCR: reacción en cadena de la polimerasa repetida; Tm: temperatura.

España), pH 7,0 suplementado con 5 µM de sulfato de cinc (Sigma, Madrid, España) a 25 °C en un volumen de 1 ml. La hidrólisis del IMP se midió a 297 nm usando una concentración inicial de 150 mM. En todas las reacciones se emplearon como controles positivo y negativo *P. aeruginosa* COL-1 productora de VIM-2⁷ y *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente.

El gen *oprD* que codifica una porina de membrana externa se amplificó y se secuenció con los oligonucleótidos *oprD.F* y *oprD.R* (tabla 2).

La expresión de los genes *mexB*, *mexF* y *oprD* se cuantificó mediante RT-PCR (*real time polymerase chain reaction* 'reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real'). Se partió del ácido ribonucleico (ARN) total obtenido con el equipo RNeasy (Qiagen, Barcelona, España); para eliminar el posible ADN contaminante se trataron las muestras con desoxirribonucleasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad de las muestras se determinaron con el sistema Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad, California, EE. UU.). Un µg de ARN total de cada muestra se transcribió con el equipo i-script[®] Select cDNA Synthesis (Bio-Rad, California, EE. UU.); a continuación, los ADN complementarios de los genes *mexB*, *mexF* y *oprD* se cuantificaron usando el sistema ABI 7000 Real Time PCR (Applied Biosystems, California, EE. UU.). Para la reacción de amplificación se usó el equipo iTaq[®] SYBR Green with Rox (Bio-Rad, California, EE. UU.). Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de estos genes aparecen indicados en la tabla 2. Para corregir los posibles errores en la cuantificación debidos a diferencias en la cantidad inicial de ARN total empleado y así comparar los resultados de las diferentes muestras se eligió como control interno de la reacción el gen ribosómico *rpsL*⁸. Los resultados se presentan como la relación de la expresión entre los genes estudiados (*mexB*, *mexF* o *oprD*) y el gen de referencia (*rpsL*)⁹. La expresión relativa de cada gen en cada uno de los aislados se compara con respecto a la expresión del mismo gen en la cepa control *P. aeruginosa* ATCC 27853. Se considera que los genes *mexB* y *mexF* se encuentran sobreexpresados en un aislado clínico con respecto a la cepa parental cuando hay un incremento en la expresión de *mexB* superior o igual a 2 órdenes de magnitud y de *mexF* superior o igual a 10 órdenes de magnitud. Estos valores se encuentran dentro del rango de otros estudios¹.

La *P. aeruginosa* JFL30 y la *P. aeruginosa* JFL05¹⁰ son cepas de referencia que sobreexpresan los genes que codifican las bombas de expulsión MexAB-OprM y MexEF-OprN, respectivamente y se han empleado como controles positivos.

La relación clonal de los aislados productores de MBL se analizó mediante detección de regiones extragénicas palindrómicas repetidas con PCR (Rep-PCR)¹¹ con los oligonucleótidos REP-1 y REP-2. Los aislados se han considerado no relacionados genéticamente cuando se han detectado 2 o más bandas de diferencia entre éstos.

Resultados y discusión

Durante los 2 años de estudio, se aislaron en el laboratorio 163 aislados clínicos no sensibles a IMP o a MPM (CIM para IMP o para MPM superior o igual a 8 mg/l). En 9 de los aislados con CIM de IMP de 32 a 128 µg/ml y de MPM de 16 a 64 µg/ml, (tabla 1) se ha detectado la presencia de una MBL mediante el método fenotípico de microdilución en caldo. Este resultado se ha corroborado mediante Multiplex PCR, obteniéndose en los 9 aislados un amplicón de 380 pb. La secuenciación de este fragmento ha hecho posible la identificación del gen *bla_{VIM-2}* en todos los amplificadores.

Los aislados fueron también resistentes a cefepima y a ceftacídima, y todos éstos menos uno (HUMV-2470) son sensibles a aztreonam. Salvo este último, los aislados presentan, pues, el patrón característico de producción de MBL. Como en otros casos fueron también resistentes a los aminoglucósidos evaluados (gentamicina, tobramicina y amikacina) y mostraron un alto grado de resistencia a ciprofloxacina (CIM > 32 µg/ml). Todos fueron sensibles a colistina (tabla 1).

La amplificación mediante PCR del gen de la integrasa *intI1* con los oligonucleótidos *int n1* e *int2* (tabla 2) permitió obtener un fragmento de un tamaño mayor al esperado en los 9 aislados objeto de estudio. La secuenciación del fragmento ha hecho posible identificar la presencia de una secuencia de inserción de 1,1 kb (*IS-like element*) que interrumpe el gen de la integrasa (fig. 1). Esto se ha descrito recientemente en cepas de *P. aeruginosa* portadoras de MBL aisladas en España por Gutiérrez et al².

El análisis clonal que se realizó mediante Rep-PCR englobó en un único grupo a los 9 aislados de *P. aeruginosa*. Se han seleccionado 2 de éstos (HUMV-2121 y HUMV-2633) como representantes para estudios posteriores.

Para la secuenciación completa del integrón en los aislados HUMV-2121 y HUMV-2633 se ha amplificado en primer lugar la región que contiene los casetes de resistencia con oligonucleótidos (tabla 2) que hibridan con las regiones conservadas de los

extremos 5'CS y 3'CS del integrón (fig. 1). El amplicón obtenido tiene un tamaño de 3.552 pb; el gen *bla*_{VIM-2} se encuentra precedido por otro gen que codifica la acetiltransferasa *aac* (6')₃₂ recientemente descrita², que confiere resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina. Este resultado explica la resistencia a aminoglucósidos que se ha señalado previamente. En el extremo 3'CS, el integrón contiene un gen que codifica una transposasa. Todos los datos indican que se trata del mismo integrón descrito

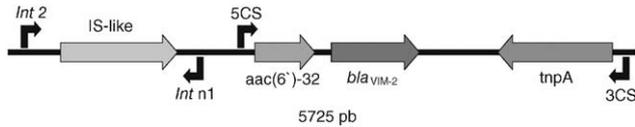


Figura 1. Estructura del integrón que contiene los aislados HUMV-2121 y HUMV-2633. Aparecen señalados con flechas los sitios en los que alinean los oligonucleótidos 5'CS y 3'CS empleados para la amplificación de los casetes de resistencia y la transposasa, así como los oligonucleótidos int n1 e int 2 usados para la amplificación del gen de la integrasa.

Tabla 3
Actividad de hidrólisis del imipenem en extractos crudos

Cepa	Actividad específica (pmol/min/μg de la proteína)	
	Extracto crudo	Extracto crudo + EDTA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	57 ± 8	0,1 ± 0,1
<i>P. aeruginosa</i> COL-1	372 ± 34	0,2 ± 0,1
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-2121	235 ± 44	2 ± 0,5
<i>P. aeruginosa</i> HUMV-2163	162 ± 18	2 ± 0,3

Actividad de hidrólisis del imipenem en extractos crudos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* COL-1 (control positivo), de los aislados clínicos HUMV-2121 y HUMV-2633, en ausencia y presencia de EDTA. EDTA: ethylene diamine tetra-acetic ácido edético.

por primera vez por Gutiérrez et al². Los ensayos de conjugación llevados a cabo utilizando como donadores los aislados clínicos HUMV-2121 y HUMV-2633 y como recipiente la cepa *Escherichia coli* DH5α no han permitido en ningún caso obtener transconjugantes resistentes a IMP. El plásmido obtenido a partir de las cepas HUMV-2121 y HUMV-2633 se introdujo mediante transformación química en *E. coli* DH5α y se observó que la CIM de IMP en *E. coli* DH5α pasa de 0,19 μg/ml a 1 μg/ml en la misma cepa con el plásmido. Este resultado indica la localización plasmática del gen *bla*_{VIM-2} y, por tanto, del integrón que lo contiene.

La actividad de hidrólisis del IMP observada en extractos crudos de los aislados HUMV-2121 y HUMV-2633 fue de 235 ± 44 pmol/min/μg y de 162 ± 18 pmol/min/μg, respectivamente; esta capacidad de hidrólisis es totalmente inhibida tras incubar las muestras con 5mM de EDTA (tabla 3). Estos resultados indican que VIM-2 se expresa en las cepas estudiadas.

La porina OprD es el canal de entrada de los carbapenémicos de uso clínico en *P. aeruginosa*. Las mutaciones del gen *oprD* son bastante frecuentes y se relacionan de forma directa con la resistencia a carbapenémicos en esta especie¹². Aunque algunas cepas de *P. aeruginosa* que producen MBL poseen también mutaciones de *oprD*, no se ha observado esta asociación en estas cepas (fig. 2). En los 2 aislados estudiados, HUMV-2121 y HUMV-2633, la secuencia y la expresión del gen *oprD* no presenta diferencias con respecto a la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853. Además, el estudio de las proteínas de membrana externa de ambos aislados (separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS) permitió comprobar la presencia de una proteína de 46 kD, compatible con la expresión de OprD (datos no mostrados), y los valores de expresión del gen *oprD* medidos por RT-PCR en los aislados HUMV-2121 y HUMV-2633 no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a los de la cepa de referencia (tabla 4). Todos estos datos indican que OprD no está implicada en la resistencia a carbapenémicos en los aislados clínicos de este estudio.

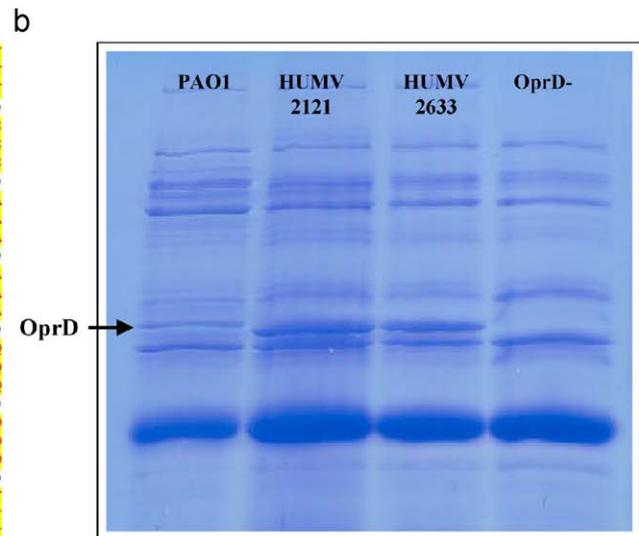
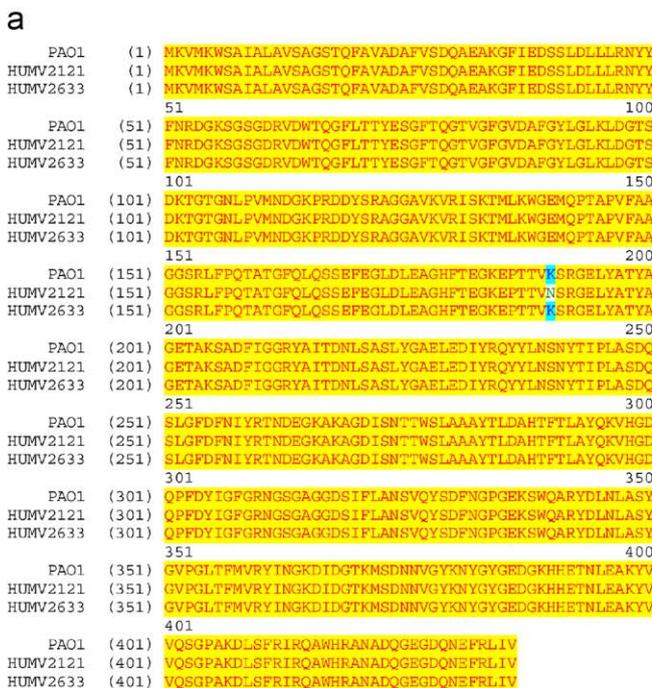


Figura 2. a) Alineamiento de la proteína oprD en los aislados clínicos HUMV-2121 y HUMV-2633 y de la cepa de referencia PAO1. b) Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas de membrana externa de los aislados HUMV-2121, HUMV-2633, PAO1 y un mutante en el gen *oprD*.

Tabla 4Expresión relativa de los genes *mexB*, *mexF* y *oprD*

Cepa	Expresión relativa de mRNA/rpsl			
		<i>mexB</i>	<i>mexF</i>	<i>oprD</i>
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	0,8 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,00
<i>P. aeruginosa</i>	JFL05	ND	1 686 ± 43	ND
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1-L	ND	1,00	ND
<i>P. aeruginosa</i>	JFL30	13,1 ± 3,45	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1-V	1,00	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i>	HUMV-2121	0,93 ± 0,07	5 ± 0,8	1,4 ± 0,4
<i>P. aeruginosa</i>	HUMV-2633	0,65 ± 0,09	1,62 ± 0,2	2,1 ± 0,1

Incremento relativo en la expresión de mRNA del gen *mexB* (MexAB-oprM) respecto a *P. aeruginosa* PAO1-V, *mexF* (MexEF-OprN) respecto a *P. aeruginosa* PAO1-L y *oprD* (OprD) respecto a *P. aeruginosa* ATCC 27853.

mARN: messenger ribonucleic acid 'ácido ribonucleico mensajero'; ND: No definido.

La expresión de la bomba de expulsión MexAB-OprM se relaciona con la expulsión del MPM y su sobreexpresión en cepas clínicas se traduce en un aumento de la CIM de este antimicrobiano¹³. Por otra parte, la sobreexpresión de MexEF-OprN suele asociarse a la represión de la expresión de *oprD*, siendo este último hecho (y no la actividad de la bomba propiamente dicha) la causa de un aumento de la CIM de IMP¹⁴. En los 2 aislados, HUMV-2121 y HUMV-2633, los valores de expresión de ARN mensajero de *mexB* y *mexF* determinados mediante RT-PCR no se observaron diferencias significativas con respecto a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (tabla 4). En conjunto, la presencia de la MBL VIM-2 en estas cepas es suficiente para justificar su resistencia a carbapenémicos. Ninguno de los otros mecanismos de resistencia estudiados contribuye al fenotipo de resistencia a estos antimicrobianos.

Aunque la prevalencia de clones epidémicos multirresistentes de *P. aeruginosa* productores de MBL es todavía baja en el hospital, se sigue llevando a cabo una vigilancia continua que permita su detección, con el objetivo de prevenir su diseminación. Hay que tener en cuenta, además, que la existencia de integrones que contienen casetes de resistencia puede contribuir a agravar el problema en otras especies. Durante el período de estudio, además de los 9 aislados de *P. aeruginosa* que se describen aquí, también se han podido identificar otros 3 aislados clínicos de *Pseudomonas putida* procedentes de hemocultivos que contienen un integrón de clase 1 con los genes *bla*_{VIM-2} y *aacA4* (manuscrito en preparación).

Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* y *P. putida* productores de VIM-2 suponen un grave problema terapéutico que es necesario controlar, tanto para reducir su expansión a nuevos pacientes como para prevenir la diseminación de la resistencia a otros microorganismos capaces de causar infecciones nosocomiales.

Agradecimientos

El Ministerio de Sanidad y Consumo, el Instituto de Salud Carlos III (proyecto PI050690), la Red Española de Investigación de Enfermedades Infecciosas (REIPI RD06/0008) y el Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV) financiaron este estudio.

Bibliografía

- Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1633–41.
- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Spanish hospitals: Molecular epidemiology and mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:4329–35.
- Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol*. 2007;45:544–7.
- Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4485–91.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1584–90.
- Standards NCfCL. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:891–7.
- Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1797–802.
- Pfaffl MW. HGWaDL. Relative expression software tool for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(9e36).
- Linares JF, López JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martínez JL. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III. *Journal of bacteriology*. 2005;187:1384–91.
- Vila J, Marcos MA, Jiménez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A baumannii* complex. *Journal of Medical Microbiology*. 1996;44:482–9.
- Conejo MC, García I, Martínez-Martínez L, Picabea L, Pascual A. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2313–5.
- Giske C, Boren C, Wretling B, Kronvall G. Meropenem susceptibility breakpoint for *Pseudomonas aeruginosa* strains hyperproducing *mexB* mRNA. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:662–9.
- Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1085–90.