



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*

Carlos Juan Nicolau* y Antonio Oliver

Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca; Área de Microbiología, Universitat de les Illes Balears (UIB), Institut Universitari d' Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Palma de Mallorca, España

RESUMEN

Palabras clave:
Género *Pseudomonas*
Carbapenemasas
Metallo- β -lactamasas

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos nosocomiales más relevantes, así como una de las principales causas de infección respiratoria crónica en pacientes con enfermedades de base, como la fibrosis quística o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Su elevado nivel de resistencia intrínseca a los antibióticos, unido a su extraordinaria capacidad para desarrollar resistencias adicionales por mutaciones cromosómicas, hacen de este patógeno uno de los más difíciles de tratar. Aún es más preocupante, si cabe, la creciente detección en este microorganismo de múltiples determinantes de resistencia, frecuentemente localizados en integrones, adquiridos por transferencia horizontal a través de plásmidos o transposones. Entre estos mecanismos destacan las carbapenemasas, por el abanico de antibióticos afectados (pues en conjunto hidrolizan a prácticamente todos los betalactámicos), variedad y capacidad de dispersión. En el presente trabajo se revisa la epidemiología, el impacto y la detección de las carbapenemasas descritas hasta la fecha en el género *Pseudomonas*, que pertenecen principalmente a la clase B (metallobetallactamasas [MBL]: IMP, VIM, SPM, GIM, AIM o DIM)], pero también, en menor medida, a las clases A (GES y KPC) y D (OXA). La presencia de estas carbapenemasas transferibles no sólo es importante en *P. aeruginosa*, sino también en otras especies clínicamente menos relevantes dentro del género, pero que pueden actuar como reservorio y vector de dispersión de estos determinantes de resistencia. La frecuencia creciente de cepas clínicas portadoras de carbapenemasas apremia a la puesta a punto de estrategias que faciliten su detección y reduzcan la expansión de estas cepas multirresistentes y de los mecanismos transferibles implicados.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Carbapenemasas en *Pseudomonas* spp.

ABSTRACT

Keywords:
Pseudomonas spp.
Carbapenemases
Metallo- β -lactamases

Pseudomonas aeruginosa is one of the most relevant nosocomial pathogens, as well as one of the main causes of chronic respiratory infections in patients with underlying diseases such as cystic fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease. The high intrinsic antibiotic resistance of this pathogen, together with its extraordinary capacity for acquiring additional resistances through chromosomal mutations, determines a major threat for antimicrobial therapy in hospitals worldwide. Even more concerning is the increasing detection of multiple antimicrobial resistance determinants in this microorganism, frequently located on integrons, acquired by horizontal transfer through plasmids and/or transposons. Among these mechanisms, the carbapenemases are particularly relevant, due to the wide spectrum of antibiotics affected. This work reviews the epidemiology, impact, and detection of the carbapenemases described so far in the *Pseudomonas* spp., that mainly include class B enzymes (metallo- β -lactamases [MBL]: IMP, VIM, SPM, GIM, AIM, or DIM), but also, to a lower extent, class A (GES and KPC) and D (OXA) beta-lactamases. The presence of transferable carbapenemases is not only important in *P. aeruginosa*, but also in other less clinically-relevant species of the genus, since they can act as reservoirs and dispersion vectors of these resistance determinants. The growing prevalence of carbapenemase-producing clinical isolates calls for the implementation of multidisciplinary strategies to optimize the detection and minimize the dissemination of these multidrug resistant strains and the involved transferable genetic elements.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: carlos.juan@ssib.es (C. Juan Nicolau).

Introducción

Dentro de su género, *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas humanos más importantes y uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales^{1,2}. Esta circunstancia se ve favorecida por su ubicuidad y su gran capacidad para colonizar ambientes húmedos, siendo frecuente su presencia en reservorios tanto extra como intrahospitalarios, incluyendo, entre otros, las soluciones de limpieza de lentes de contacto, desinfectantes y jabones. *P. aeruginosa* es el primer causante de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV) en las unidades de cuidados intensivos (UCI), causando elevadas tasas de mortalidad (hasta del 50%) dada su facilidad para colonizar el aparataje hospitalario, incluyendo los respiradores artificiales^{1,3,4}. Sin embargo, *P. aeruginosa* puede colonizar también de forma inocua a individuos sanos (axilas, mucosa nasal, orofaringe, perineo, etc.) y, por ello, en muchas ocasiones se apunta a la propia flora del paciente como posible origen de la NAV, al ser internalizada por medio del sistema de respiración asistida, desde las vías respiratorias superiores hasta el árbol bronquial¹. Es también notable su papel como agente etiológico de otras infecciones nosocomiales de diversa índole, entre ellas las infecciones de quemaduras extensas o heridas, así como las infecciones del tracto urinario o la bacteriemia^{4,5}. *P. aeruginosa* es, además, el principal causante de infección pulmonar crónica en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas como fibrosis quística (FQ), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y bronquiectasias^{6,7}. Una de las características más preocupantes de *P. aeruginosa* es su elevado nivel de resistencia intrínseca a los antibióticos, así como su gran capacidad de desarrollo de nuevas resistencias a través de mutaciones en su cromosoma. En este sentido, cabe destacar las múltiples mutaciones en *ampR*, *ampD* o *dacB* (PBP4)^{8,9} que determinan la hiperproducción de la betalactamasa cromosómica tipo AmpC, confirmando resistencia a todas las penicilinas (incluyendo las combinaciones con inhibidores de betalactamasas, como la piperacilina-tazobactam), cefalosporinas (ceftazidima y cefepima) y monobactámicos (aztreonam). Es característica también de *P. aeruginosa* la resistencia mediada por la hiperexpresión de alguna de las múltiples bombas de expulsión codificadas en su genoma: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM, principalmente, que, dependiendo de la bomba implicada, pueden afectar a prácticamente todos los betalactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Por último, cabe destacar también la represión o inactivación de la porina OprD, que confiere resistencia a las carbapenemas^{10,11}. Esta gran capacidad de desarrollar resistencia por mutación reduce enormemente el abanico de opciones antibióticas disponible. El problema se ve aumentado, si cabe, en las cepas causantes de infección respiratoria crónica, a menudo asociadas con elevadas tasas de mutación y, por lo tanto, de desarrollo de resistencias^{12,13}, y con la formación de biopelículas en el pulmón, que limita drásticamente la actividad de los antibióticos¹⁴. Además, *P. aeruginosa* es capaz de adquirir nuevos determinantes de resistencia por transferencia horizontal. Entre los determinantes adquiridos, normalmente en forma de casetes situados en integrones, a su vez localizados en transposones o plásmidos que permiten su movilidad, destacan las betalactamasas, incluyendo las de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas, pero también las enzimas modificantes de los aminoglucósidos^{10,11}. Las otras especies del género *Pseudomonas* (*P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. putida*, etc.) poseen una menor resistencia intrínseca que *P. aeruginosa* y, a pesar de tener una menor relevancia clínica, también pueden causar problemas epidemiológicos, no sólo por producir brotes en ciertas situaciones^{15,16}, sino también por ser un reservorio ambiental de determinantes de resistencia, en forma de casetes presentes en integrones que pueden ser transmitidos a otras especies de mayor relevancia, como ciertas enterobacterias, *Acinetobacter baumannii*, o bien la propia *P. aeruginosa*¹⁷. La adquisición de estos determinantes de resistencia por parte de *P. aeruginosa* contribuye enormemente a la apa-

rición de cepas multirresistentes (MDR, del inglés *multi-drug resistance*), principalmente cuando los determinantes de resistencia incluyen alguna de las múltiples carbapenemasas que serán revisadas en este trabajo. La cada vez mayor frecuencia, diversidad y transcendencia clínica de las cepas portadoras de carbapenemasas apremia la necesidad de poner a punto procedimientos para su óptima detección en el laboratorio, adoptar medidas para reducir la expansión de las cepas y de los elementos genéticos portadores de MDR, así como la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para su tratamiento.

Resistencia a las carbapenemas en *P. aeruginosa*: mecanismos y frecuencia

La resistencia a las carbapenemas en *Pseudomonas* puede tener un origen cromosómico, por mutaciones en determinados genes, o bien estar mediada por la adquisición horizontal de carbapenemasas^{10,18,19}. Entre los mecanismos mutacionales, más conocidos en *P. aeruginosa* que en las demás especies del género, destaca la represión o inactivación de la porina OprD, por la que se introducen las carbapenemas en la célula bacteriana, que confiere resistencia al imipenem y sensibilidad reducida al meropenem. Para la adquisición de resistencia de alto nivel a esta última carbapenema, y también al recientemente introducido doripenem²⁰, *P. aeruginosa* necesita, además, acumular mutaciones causantes de hiperproducción de su betalactamasa cromosómica AmpC, que se pueden dar en diferentes genes reguladores, como *ampR*, *ampD*, o *dacB*^{8,9}, o mutaciones que conduzcan a la hiperexpresión de la bomba de expulsión MexAB-OprM^{18,19,21}. Estas mutaciones pueden afectar al gen represor de la bomba, *mexR*, o bien a otros reguladores secundarios: *nalC* y *nalD*. Por otra parte, si bien la bomba MexEF-OprN no expulsa de forma significativa las carbapenemas, su hiperexpresión se relaciona con la pérdida de sensibilidad a estos antibióticos. El mecanismo por el cual se produce este hecho no es del todo conocido, pero parece deberse a que las mutaciones que determinan la hiperexpresión de la bomba, en el gen regulador *mexT*, también conllevan la reducción de la expresión de *oprD*²¹.

Sin duda, uno de los principales problemas emergentes, tanto en enterobacterias como en gramnegativos no fermentadores, incluyendo, obviamente, *Pseudomonas*, es la creciente diseminación de las carbapenemasas transferibles. Éstas pertenecen a tres de las cuatro clases estructurales definidas por Ambler²²: A y D, ambas con serina en el centro activo, y B (metaló-β-lactamasas [MBL], que necesitan zinc en su centro activo para ser funcionales)²²⁻²⁵. Por otra parte, recientemente se ha propuesto la existencia de betalactamasas tipo AmpC cromosómicas de espectro extendido (ESAC) en *P. aeruginosa*, definidas por la presencia del polimorfismo T105A, que determina una cierta actividad carbapenemasa, y que por lo tanto puede contribuir a la resistencia a estos antibióticos^{26,27}. No obstante, otros estudios recientes no encuentran una asociación de este polimorfismo con la resistencia.

Independientemente del mecanismo, la resistencia a las carbapenemas en *P. aeruginosa* es un problema notable de ámbito mundial²⁸. Según los datos del estudio SENTRY (2001-2004), la prevalencia global de cepas no sensibles al imipenem se situaría en torno al 21% (18% al meropenem), y serían particularmente elevadas en América Latina (en torno al 35%)²⁹. Aunque su frecuencia es mucho menor, las cifras de resistencia a las carbapenemas para otras especies del género *Pseudomonas* sería similar²⁹. En nuestro país, la resistencia a las carbapenemas en *P. aeruginosa* ha tenido un aumento significativo (del 14 al 18%) en los aislados resistentes a imipenem, comparando dos estudios secuenciales de 1998 y 2003, respectivamente^{30,31}. Sin embargo, la caracterización posterior de los mecanismos implicados¹⁸ reveló que la resistencia a las carbapenemas en nuestro país se debía, al menos hasta 2003, con mucha mayor frecuencia a mecanismos mutacionales, y no tanto a carbapenemasas adquiridas, pues

Tabla 1
Carbapenemasas detectadas en especies del género *Pseudomonas*

Clase ^a	Grupo funcional ^b	Carbapenemasa	Variante	Año de la primera detección	Países en que se ha detectado	Especie	Localización
A	2f	KPC	2	2006	Colombia	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica (no en integrones)
		GES	5 2	2006 2000	Puerto Rico Sudáfrica	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica, en integrones de clase 1
B	3	IMP	5 1, 2, 4, 6 a 16, 18 a 22, 25 y 26	2004 1991	China, Brasil, España Mundial, principalmente extremo Oriente-Pacífico	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i>	Plasmídica, en integrones de clases 1 y 3 (menos frecuentes)
		VIM	1 a 11, 13 a 18, y 20	1997	Mundial, principalmente Europa	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i>	Plasmídica, en integrones de clase 1 (también cromosómica)
		SPM	1	1997	Brasil, Suiza	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica (no en integrones)
		GIM	1	2002	Alemania	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica, en integrón de clase 1
		AIM	1	2007 ^c	Australia	<i>P. aeruginosa</i>	ND ^d
		DIM	1	2009 ^c	Holanda	<i>P. stutzeri</i>	Integrón de clase 1
D	2d	OXA	40	2008 ^c	España	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica (no en integrones)
			50a a 50d (PoxB ^e)	2004 ^c	Francia ^f	<i>P. aeruginosa</i>	Cromosómica

^aClase según la clasificación de Ambler²².

^bGrupo según la clasificación funcional de Bush et al³⁶.

^cCorresponde al año de publicación, no de detección.

^dND: no hay datos disponibles.

^eEn condiciones normales, PoxB no se expresa de manera significativa.

^fSe cita como país de detección, porque es donde se descubrió, pero PoxB está presente de manera intrínseca en el genoma de *P. aeruginosa*.

sólo 1 de 236 aislados de *P. aeruginosa* resistentes al imipenem o meropenem producía esta enzima, representando el 0,4% del total de aislados resistentes y < 0,1% del total de cepas de *P. aeruginosa*. Datos más recientes (2008), obtenidos en un estudio multicéntrico (10 hospitales) de bacteriemia por *P. aeruginosa* de la Red Española de Investigación en Patologías Infecciosas (REIPI), apuntan a un aumento significativo (10 veces) en la frecuencia de cepas productoras de carbapenemasa, llegando a representar el 4% de las resistentes al imipenem y el 1% del total de cepas de *P. aeruginosa*³². Estas cifras se acercan ya a los datos de otros países europeos cercanos, como Italia; en un estudio realizado en 2004, la prevalencia detectada en este país fue del 12,6% de los aislados resistentes a las carbapenemas (1,3% del total de *P. aeruginosa*)³³. Igualmente alarmantes son los datos de Extremo Oriente y América Latina; en un estudio multicéntrico reciente en Corea se detectaron MBL en el 10,8% de los aislados de *P. aeruginosa* resistentes al imipenem y, particularmente destacable, en el 66,7% de los aislados de *P. putida*³⁴. De igual forma, según muestran los datos del estudio SENTRY, cerca de la mitad de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de los hospitales brasileños son resistentes al imipenem, y casi la mitad de ellas son productoras de carbapenemasas³⁵.

Carbapenemasas en el género *Pseudomonas*

Las betalactamasas transferibles con actividad carbapenemasa pueden pertenecer a las clases A, B o D de Ambler. Los siguientes subapartados describen las características de las carbapenemasas detectadas en *Pseudomonas*, resumidas en la tabla 1.

Carbapenemasas de clase A

Las carbapenemasas de la clase A pertenecen al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush et al³⁶, y comprenden cinco grupos: SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBC. Todas tienen en común tres motivos

altamente conservados, esenciales para su actividad: a) Ser₇₀-X-X-Lys; b) Ser₁₃₀-Asp-Asn, y c) Glu₁₆₆. Los grupos SME, IMI y NMC son, principalmente, de codificación cromosómica, y nunca se han detectado en *Pseudomonas*. Las enzimas pertenecientes al grupo SME (1 a 3) se han hallado tan sólo en *Serratia marcescens*, y las IMI (1 y 2) y NMC-A, en *Enterobacter*^{24,37}. En general, hidrolizan todos los betalactámicos, aunque la eficacia catalítica o de hidrólisis, que viene dada por el cociente k_{cat}/K_m , sobre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación es bastante modesta^{24,37}.

Las carbapenemasas tipo KPC se describieron por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* (de ahí sus iniciales)³⁸, y se han ido detectando periódicamente y en diferentes variantes: hasta ahora, hay descritas de la KPC-1 a la KPC-10, principalmente en enterobacterias²⁴. Se han detectado prácticamente en todo el mundo, con mayor frecuencia en Norteamérica^{24,37}. En *P. aeruginosa* han sido detectadas en sólo dos variantes: KPC-2 en una cepa clínica en Colombia, y KPC-5, en Puerto Rico, que de hecho se ha descrito únicamente en *P. aeruginosa*^{39,40}. Las carbapenemasas KPC son plasmídicas en todos los casos estudiados. Aunque sus genes no están en forma de casetes en integrones, sí están asociados a elementos móviles como secuencias de inserción o transposasas, y dada su presencia predominante en *K. pneumoniae*, un microorganismo cuya capacidad como vector de diseminación de determinantes de resistencia es bien conocida, han llegado a ser las más extendidas dentro del grupo funcional 2f^{24,37}. Su espectro de hidrólisis incluye todos los betalactámicos, si bien la eficacia de hidrólisis sobre las carbapenemasas y las monobactamas es hasta 10 veces menor que sobre las penicilinas y las cefalosporinas.

Las carbapenemasas tipo GES/IBC se describieron por primera vez, casi en paralelo, en dos variantes: GES-1 (siglas procedentes de *Guiana extended spectrum*, por su país de origen) en una cepa de *K. pneumoniae*⁴¹, e IBC-1 (del inglés *integron borne cephalosporinase*) en un aislado de *Enterobacter cloacae* en Grecia⁴², ambas en el año 2000. Difieren en sólo un aminoácido, y fueron definidas como BLEE, con unas tasas de hidrólisis de carbapenemasas prácticamente nulas. La

nomenclatura de la familia GES/IBC fue revisada, y se llegó a un consenso para el cambio de las IBC por GES. En general, las GES poseen hasta un 36% de identidad en aminoácidos con respecto a KPC-2, y un 35% con respecto a SME-1^{43,44}. A lo largo del tiempo se han ido describiendo nuevas variantes (hasta la GES-12), pero sólo cuatro con actividad carbapenemasa: GES-2, -4, -5 y -6. Se ha propuesto que la presencia de asparragina o serina en la posición 170 es clave en la actividad carbapenemasa de tales variantes⁴³. El hallazgo de las GES no es tan frecuente como el de otras carbapenemasas, aunque se han aislado prácticamente en todo el mundo, desde América hasta el sudeste asiático, pasando por Europa e incluso Sudáfrica^{24,37}. En *P. aeruginosa* se han detectado, de entre las que tienen actividad carbapenemasa, tan sólo las variantes GES-2 y GES-5, siempre de codificación plasmídica en el seno de integrones⁴⁵⁻⁴⁷. Además, recientemente se ha descrito por primera vez la asociación de dos GES diferentes en un mismo integrón, en una cepa clínica de *P. aeruginosa*⁴⁸. En este caso se trata de una GES-1 seguida de una GES-5, hecho que se ha atribuido a una posible duplicación del gen *bla_{GES-1}*, seguida de la selección de un cambio de nucleótido y aminoácido que define a GES-5. La selección positiva de tal mutación se debería a la ampliación de espectro de la enzima GES-5 hacia las carbapenemasas⁴⁸. Las GES con actividad carbapenemasa parecen tener una actividad modesta sobre los monobactámicos, si bien se ha descrito la variante GES-9 en una cepa de *P. aeruginosa*, con importante actividad sobre el aztreonam, aunque sin hidrólisis detectable sobre las carbapenemasas⁴⁹.

Carbapenemasas de clase B

Las carbapenemasas de clase B (en concreto, las de la subclase B1), más conocidas como MBL, son quizá el grupo más relevante de carbapenemasas, tanto por diversificación en diferentes variantes aminoacídicas como por su diseminación prácticamente mundial, y en diferentes microorganismos. Como elemento definitorio, las MBL de la subclase B1 (a la que pertenecen las MBL que podemos hallar en *Pseudomonas* por transferencia horizontal) poseen un motivo de unión de zinc del tipo His-X-His-X-Asp, al que se unen dos iones de zinc, necesarios para la actividad de la enzima^{23,24}. Así pues, todas las MBL tienen también en común su inhibición por quelantes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Dentro de ellas, se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM. Las MBL AIM-1 y DIM-1 se han detectado recientemente en *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, en Australia y Holanda, respectivamente, pero la información disponible acerca de ellas es aún muy escasa^{50,51}. KHM-1 se ha detectado sólo en *Citrobacter freundii*, y presenta una moderada actividad sobre las carbapenemasas, viéndose claramente superada por la actividad sobre las cefalosporinas⁵².

Del resto de grupos de MBL destacan las IMP y las VIM como las más extendidas y habitualmente detectadas, relacionándose con brotes causados por cepas de *Pseudomonas* portadoras. Las IMP (IMP-1) se detectaron por vez primera en 1991 en Japón, en *S. marcescens*⁵³. Hasta hoy se han descrito variantes aminoacídicas hasta la IMP-26 (recogidas en la web de nomenclatura de betalactamasas www.lahey.org/Studies, actualizada en octubre de 2009), en distintos microorganismos, y prácticamente en todo el mundo, aunque con una mayor predominancia por la región del sudeste asiático-Pacífico²⁴. A excepción de IMP-3, -5, -17, -23 y -24, el resto se han detectado en *Pseudomonas*. Destaca, por su rareza, el hallazgo de IMP-8 sólo en *P. mendocina*, así como la presencia de IMP-1 en *P. putida* y *P. fluorescens* (además de en *P. aeruginosa*), IMP-12 sólo en *P. putida*⁵⁴, IMP-19 en *P. putida* (además de en *P. aeruginosa*) e IMP-22 en *P. fluorescens*⁵⁵ (además de en *P. aeruginosa*). El resto se han detectado sólo en la especie *P. aeruginosa*. Las IMP más próximas entre sí se engloban en el *cluster* de IMP-1, que incluye a las IMP-3, -4, -6 y -10. A partir de aquí, sin la formación de *clusters* claros, las IMP se van distanciando de este primer grupo, hasta llegar a IMP-12, la variante más distante de IMP-1²³. Los genes de las IMP se hallan en forma de

casetes en integrones plasmídicos, principalmente de clase 1, aunque también se han detectado en clase 3^{23,24,56,57}.

Las VIM (VIM-1), por su parte, se detectaron por vez primera en *P. aeruginosa* en Verona, en 1997⁵⁸, de ahí sus siglas: *Veronese IMipenemase*. Las enzimas tipo VIM son las detectadas de forma más habitual en Europa, en donde la VIM-2 se ha convertido en predominante. De hecho, puede decirse que VIM-2 es, probablemente, la carbapenemasa más común en todo el mundo²³. De todas las variantes (hasta 23) recogidas en www.lahey.org/Studies, las VIM-1, -2, -4 y -6 se han detectado en *P. aeruginosa* y *P. putida*. VIM-2 fue detectada, además, en otra especie ambiental: *P. pseudoalcaligenes*⁵⁹. Del resto de VIM, todas han sido detectadas en *P. aeruginosa*, además de ciertas variantes en otras especies no pseudomonadales, con las excepciones de: VIM-12, un híbrido entre VIM-1 y VIM-2, y que sólo se ha detectado en enterobacterias⁶⁰; VIM-19, sólo hallada en *K. pneumoniae*, y VIM-23, sólo en *E. cloacae*. En cuanto a la organización dentro del grupo de las VIM, el árbol filogenético parece tener tres *clusters* bien diferenciados. El de VIM-7 (única representante) está claramente separado de los dos otros: VIM-1 (que contiene a VIM-4, y VIM-13, entre otras) y VIM-2 (que contiene a la mayoría de variantes del grupo). Si bien se han hallado casos de codificación cromosómica de los genes de VIM, lo más habitual es la presencia de estos genes en forma de casetes en integrones de clase 1²⁴. Respecto al espectro de hidrólisis, VIM-1 parece hidrolizar mejor a prácticamente todos los betalactámicos (sobre todo, a ciertas cefalosporinas) que VIM-2, lo cual parece explicarse por cambios de aminoácidos cercanos o en el propio centro activo de la enzima⁶¹. Las IMP, en general, parecen tener una menor eficiencia en la hidrólisis que las VIM.

Los grupos SPM, GIM y SIM, con un solo representante cada uno, parecen tener una distribución geográfica mucho más restringida que las IMP y VIM, y sólo en el caso de SPM-1 se han detectado brotes por cepas portadoras⁶². La identificación de SPM-1 (*Sao Paulo metallo-β-lactamase*) se realizó en un aislado clínico de *P. aeruginosa* en 2001. Esta MBL presentó localización plasmídica, aunque no relacionado con integrones o elementos móviles, y un porcentaje de identidad en aminoácidos del 35% con IMP-1. Hoy en día, esta MBL está ampliamente diseminada en Brasil⁶³, y hace muy poco tiempo se ha detectado el primer caso en Europa⁶⁴. GIM-1 se detectó en Alemania (*German IMipenemase*), en diferentes aislados clínicos de *P. aeruginosa*, presentando una identidad aminoacídica próxima al 40% con respecto a las MBL tipo IMP. Se demostró su presencia en un integrón de clase 1 situado en un plásmido no transferible de 22 Kb. En cuanto a sus características de hidrólisis de betalactámicos, GIM-1 mostró una menor actividad, en general, que el resto de MBL clínicamente relevantes⁶⁵. Finalmente, SIM-1 (*Seoul IMipenemase*) se ha detectado únicamente en *A. baumannii* en Corea, y presenta un 69% de identidad en aminoácidos con respecto a las IMP⁶⁶.

Carbapenemasas de clase D

Las betalactamasas tipo OXA se detectan, sobre todo, en *A. baumannii*, habitualmente como casetes en integrones situados en plásmidos o transposones, aunque también, en ciertos casos, asociadas a secuencias de inserción⁶⁷. Sin embargo, también se han hallado, más raramente, en *P. aeruginosa* y otras especies próximas, como *Ralstonia* o *Aeromonas*^{67,68}. Como característica definitoria, las OXA, al pertenecer a la clase D, poseen cuatro motivos conservados: a) Ser₇₀-X-X-Lys; b) Ser₁₁₈-X-Val/Ile, que es equivalente al motivo Ser-Asp-Asn en las betalactamasas de clase A; c) Lys₂₁₆-Thr/Ser-Gly, común a la gran mayoría de serín-betalactamasas, y d) Trp₂₃₂-X-X-Gly⁶⁷.

Las primeras OXA, descritas en la década de 1980, inicialmente se caracterizaron por sus elevados cocientes k_{cat}/K_m sobre cloxacilina y oxacilina (de ahí su nombre), pero sin afectar significativamente a los carbapenémicos ni a las cefalosporinas de espectro extendido⁶⁹. Hasta la fecha se han descrito más de 100 variantes aminoacídicas de OXA (www.lahey.org/Studies). No obstante, sólo determinadas va-

riantes de OXA-2 y OXA-10 (también denominada PSE-2) se engloban por su comportamiento hidrolítico dentro de las BLEE, pues afectan a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y también a las monobactamas. Estas OXA de espectro extendido se detectaron por primera vez en Turquía⁶⁸. Sin embargo, ninguna de ellas afecta significativamente a las carbapenemas, al contrario que un grupo de aproximadamente 50 enzimas OXA, sólo remotamente relacionadas (en cuanto a sus secuencias aminoácídicas) con las OXA sin actividad carbapenemasa. La primera OXA con actividad carbapenemasa, inicialmente denominada ARI-1 y, posteriormente, renombrada como OXA-23, fue descrita en 1993 por Paton et al⁷⁰ en una cepa de *A. baumannii*. A partir de entonces, la diversificación ha sido enorme, y las nuevas variantes se han clasificado en nueve subfamilias. Los miembros de cada subfamilia tienen una identidad en aminoácidos de aproximadamente un 92%, mientras que la identidad entre miembros de distintas subfamilias varía entre un 40 y un 70%⁶⁷. Las subfamilias son: a) OXA-23 (incluyendo las -23, -27 y -49); b) OXA-24 (incluyendo -24, -25, 26-, -40 y -72); c) OXA-51 (incluyendo -51, de -64 a -71, de -75 a -78, -83, -84, -86 a -89, -91, -92, -94, y -95); d) OXA-58; e) OXA-55 (incluyendo -55 y -SHE [de *Shewanella algae*]); f) OXA-48 (incluyendo -48, -54 y -SAR2); g) OXA-50 (incluyendo de -50a a -50d, conocidas como enzimas PoxB); h) OXA-60 (incluyendo de -60a a -60d), e i) OXA-62²⁴.

No obstante, en *P. aeruginosa*, la única carbapenemasa transferible de clase D detectada es la OXA-40, en dos aislados clínicos en nuestro país⁷¹. Las betalactamasas PoxB (OXA-50a a -50d)^{72,73} fueron caracterizadas como oxacilinasas cromosómicas presentes de forma natural en el cromosoma de *P. aeruginosa*, pero que, en condiciones normales, no parecen expresarse. Varios estudios han demostrado que, en ausencia de expresión de *ampC*, la expresión de *poxB* se ve aumentada^{72,73}, y aunque la hidrólisis sobre el imipenem es detectable, el papel de esta subfamilia de OXA en la resistencia a carbapenemas parece, al menos, cuestionable. En general, la acción de las carbapenemas tipo OXA sobre las carbapenemas es bastante modesta (mayor eficacia hidrolítica sobre el imipenem que sobre el meropenem), aunque siempre superior al efecto sobre las cefalosporinas de espectro extendido y monobactamas, prácticamente nula. El nivel de inhibición que provocan los clásicos inhibidores de betalactamasas (clavulanato, tazobactam) sobre las OXA es variable, aunque en general bastante débil, al contrario de lo que ocurre con el NaCl, que se muestra como un fuerte inhibidor de su actividad²⁴.

Detección de carbapenemasas en el laboratorio

La figura 1 muestra un esquema de los pasos que hay que seguir en la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa*. Al contrario de lo que ocurre generalmente en *Enterobacteriaceae*, la producción de carbapenemasas en *P. aeruginosa* suele conferir resistencia de alto nivel a las carbapenemas, debido principalmente a su mayor resistencia intrínseca, determinada por la producción de la cefalosporinasa inducible AmpC, la expresión basal de bombas de expulsión (sobre todo MexAB-OprM) y la menor permeabilidad de su membrana externa. En este sentido, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del imipenem y del meropenem generalmente están en el intervalo de 8 a > 128 µg/ml en las cepas clínicas de *P. aeruginosa* portadoras de MBL²⁴. Por lo tanto, el primer condicionante para pensar en la presencia de carbapenemasas es que la cepa no sea sensible a las carbapenemas. Esto es, sin duda, una ventaja respecto a las enterobacterias, en las que las CMI de las carbapenemas en cepas productoras de carbapenemasas se sitúan frecuentemente por debajo de los puntos de corte. Sin embargo, y al menos en teoría, también es posible la presencia de una carbapenemasa con una CMI de 4 µg/ml o incluso menor, si se da en una cepa con algún mecanismo de hipersensibilidad a las carbapenemas, como podría ser la hiperproducción de MexCD-OprJ, pudiendo dificultar la detección de la carbapenemasa¹⁹. Del mismo modo, las CMI de las carbapenemas en otras especies

menos resistentes del género *Pseudomonas*, aún portando carbapenemasa, podrían ser igualmente menores, y camuflar la presencia de estos determinantes. En cualquier caso, el principal reto de la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa* no es la falta de sensibilidad del cribado por CMI de carbapenemas, sino su especificidad extremadamente baja, ya que actualmente es mucho más habitual la resistencia a carbapenemas por mecanismos mutacionales que la mediada por carbapenemasas. Ésta sería, por consiguiente, una clara desventaja en comparación con las enterobacterias, en las que la contribución de los mecanismos de resistencia mutacionales a la resistencia a las carbapenemas es infinitamente menor. Es, por lo tanto, necesario acotar más el cribado de las cepas productoras de carbapenemasas, antes de pasar a los ensayos específicos de detección, con datos adicionales de sensibilidad. En síntesis, deben considerarse posibles candidatas a la producción de carbapenemasas las cepas que sean intermedias/resistentes (I/R) al imipenem o al meropenem, y que además sean I/R a ceftazidima, cefepima o piperacilina-tazobactam (v. fig. 1). Aun así, la explicación más común será la combinación de varios mecanismos cromosómicos (con frecuencia, inactivación de OprD más hiperproducción de AmpC o MexAB-OprM), aunque, en este contexto, la sensibilidad al aztreonam apuntaría hacia la presencia de una MBL. No obstante, la resistencia fenotípica a este fármaco no descartaría en absoluto la presencia de una MBL, ya que no es infrecuente que exista, adicionalmente, resistencia cromosómica a este antibiótico en cepas productoras de MBL.

En cualquier caso, después del cribado por patrón de sensibilidad es siempre necesario utilizar ensayos fenotípicos, bioquímicos o genéticos para constatar la presencia de carbapenemasas. La técnica considerada de referencia es la demostración bioquímica de actividad carbapenemasa (en extractos obtenidos por sonicación), mediante la cuantificación por espectrofotometría de la hidrólisis del imipenem. No obstante, esta técnica puede ser tediosa y poco aplicable al laboratorio de diagnóstico microbiológico, por lo que generalmente es preferible la utilización de ensayos fenotípicos seguidos, idealmente, de la comprobación mediante técnicas moleculares, a través de la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen de la carbapenemasa correspondiente (en la reciente revisión de Queenan y Bush se recoge una tabla con los cebadores necesarios)²⁴.

Una primera técnica fenotípica para detectar la presencia de carbapenemasas adquiridas, aunque no permite discriminar la clase (A, B o D), es el test modificado de Hodge^{74,75}, que si bien se utiliza con más frecuencia en enterobacterias, también puede ser útil en *Pseudomonas*. Este ensayo se basa en la sensibilidad al imipenem que muestra la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, que se siembra en césped en una placa de Müller-Hinton, y cuyo halo de inhibición alrededor del disco se ve disminuido en presencia de una estría de una *Pseudomonas* productora de carbapenemasa. La carbapenemasa es producida y secretada al medio extracelular, permitiendo el crecimiento, en las proximidades de la estría, de la cepa sensible de *E. coli*, lo que da lugar a la deformación del halo (fig. 2). En un primer estudio, la prueba de Hodge fue menos eficaz que la de la sinergia de doble disco (DDST, del inglés *Double-Disc Synergy Test*) con imipenem y EDTA, de tal manera que, de un total de 52 cepas de *Pseudomonas* productoras de MBL, la primera identificó como positivas sólo a 34, mientras que las 18 restantes dieron resultados ambiguos. Además, se obtuvieron resultados ambiguos en nueve cepas más, no productoras de carbapenemasa, que podrían haber sido interpretadas como falsos positivos. En cambio, la DDST no dio ningún falso positivo, e identificó correctamente las 52 cepas portadoras de MBL⁷⁴. Posteriormente se demostró que la adición de ZnSO₄, a razón de 70 µg/ml en la placa de Müller-Hinton, o bien en los discos de imipenem a 140 µg/disco, mejoraba las prestaciones de la prueba de Hodge. Así, de 39 cepas productoras de MBL de las cuales tres se habían dado inicialmente como negativas y diez como ambiguas, después de la adición del ZnSO₄, todas dieron resultados positivos⁷⁵. Sin embargo,

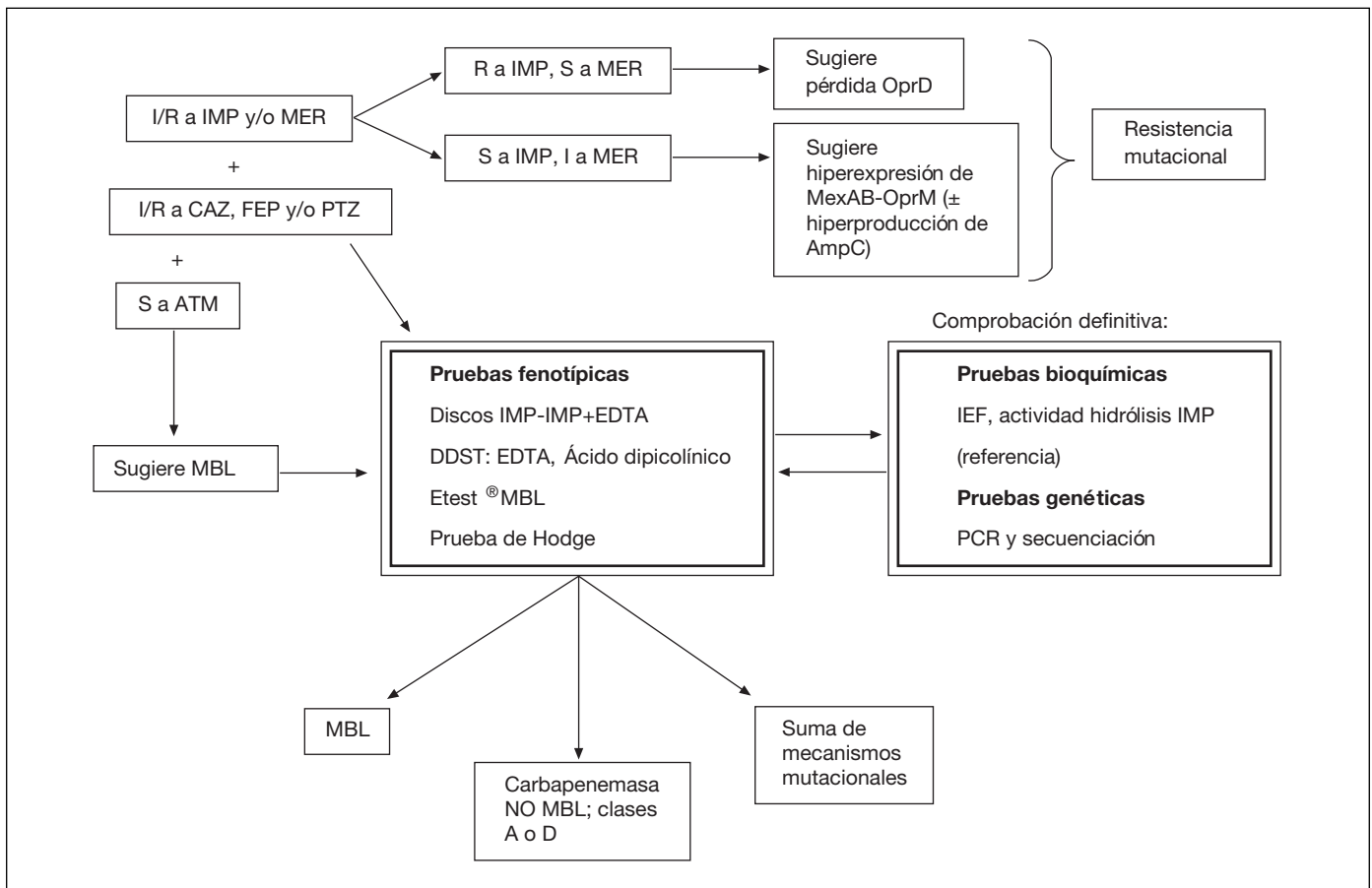


Figura 1. Esquema de la detección en el laboratorio de diagnóstico microbiológico de carbapenemasas en *P. aeruginosa*. Cribado por patrón de sensibilidad y detección por técnicas fenotípicas, bioquímicas y/o genéticas. ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; FEP: cefepima; I: intermedio; IEF: isoelectroenfoque; IMP: imipenem; MBL: metalo- β -lactamasa; MER: meropenem; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PTZ: piperacilina-tazobactam; R: resistente; S: sensible.

dos recientes trabajos realizados en la India siguen destacando la mayor fiabilidad de la DDST sobre la prueba de Hodge para la detección de carbapenemasas en *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos^{76,77}.

Para la comprobación fenotípica de la presencia de MBL en concreto, se pueden realizar varios ensayos, todos ellos basados en la inhibición de estas carbapenemasas por quelantes de cationes divalentes. Entre ellas, la utilización de discos de imipenem e imipenem + EDTA (v. fig. 2) prueba que mostró un 100% de sensibilidad en un estudio realizado en 2002⁷⁸. No obstante, pueden surgir problemas de interpretación cuando la diferencia entre ambos halos es cercana a los 5 mm, punto de corte utilizado frecuentemente. Otra aproximación es la prueba de sinergia DDST utilizando discos de EDTA, ácido dipicolínico (v. fig. 2), ácido mercaptopropiónico, o ácido sodio-mercaptopoacético, junto con discos de imipenem o meropenem (también con menor frecuencia otros como la ceftazidima) a una distancia variable de 5 a 15 mm, en función del nivel de resistencia. Finalmente, se puede emplear el Etest® MBL (AB Biodisk, Solna, Suecia). Se considera una prueba positiva cuando se documenta una diferencia de más de tres diluciones entre las CMI del imipenem y del imipenem + EDTA, con una sensibilidad del 94% según el trabajo de Walsh et al⁷⁹. Se han detectado casos de falsos negativos, cuando la CMI del imipenem es baja (cercana a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), como podría ser en los casos de hipersensibilidad a las carbapenemasas^{79,80}. Además, cuando las CMI al imipenem son tan bajas, se llega al límite mínimo de detección de este tipo de Etest®, como ocurre con enterobacterias o especies más sensibles del género

Pseudomonas, en las que deben utilizar los ensayos anteriores. En un trabajo reciente⁸¹ se destacó la influencia de los distintos medios Müller-Hinton comerciales sobre la fiabilidad de los Etest® MBL, probablemente debido a la distinta concentración de iones dependiendo de cada casa comercial. En este sentido, el Müller-Hinton de BioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia) demostró ser el que más falsos negativos causaba, mientras que Difco (BD, Franklin Lakes, Estados Unidos) provocaba un alarmante porcentaje de falsos positivos. Ante esta situación, parece necesario complementar el Etest® MBL con otro tipo de pruebas.

Si bien para la detección de MBL en *Pseudomonas*, aunque no son infalibles, existen distintas aproximaciones fenotípicas útiles; la detección fenotípica de carbapenemasas de las clases A y D en *Pseudomonas* es mucho más complicada. Esto se debe a que tanto en el caso de las OXA (clase D) como en el de las principales carbapenemasas de clase A detectadas en *P. aeruginosa* (GES y KPC), el efecto de los inhibidores clásicos de serín-beta lactamasas (clavulánico, tazobactam o sulbactam) es bastante variable y modesto. No obstante, la DDST con amoxicilina-ácido clavulánico, en combinación con discos de imipenem y meropenem, añadiendo incluso cefalosporinas de espectro extendido, en ocasiones puede dar resultados positivos, dependiendo de la variante de carbapenemasa implicada y de la presencia o no de mecanismos mutacionales concomitantes. En cualquier caso, la detección de carbapenemasas de clase A y D en *Pseudomonas* debe pasar, prácticamente de forma inevitable, por la utilización de métodos bioquímicos o genéticos.

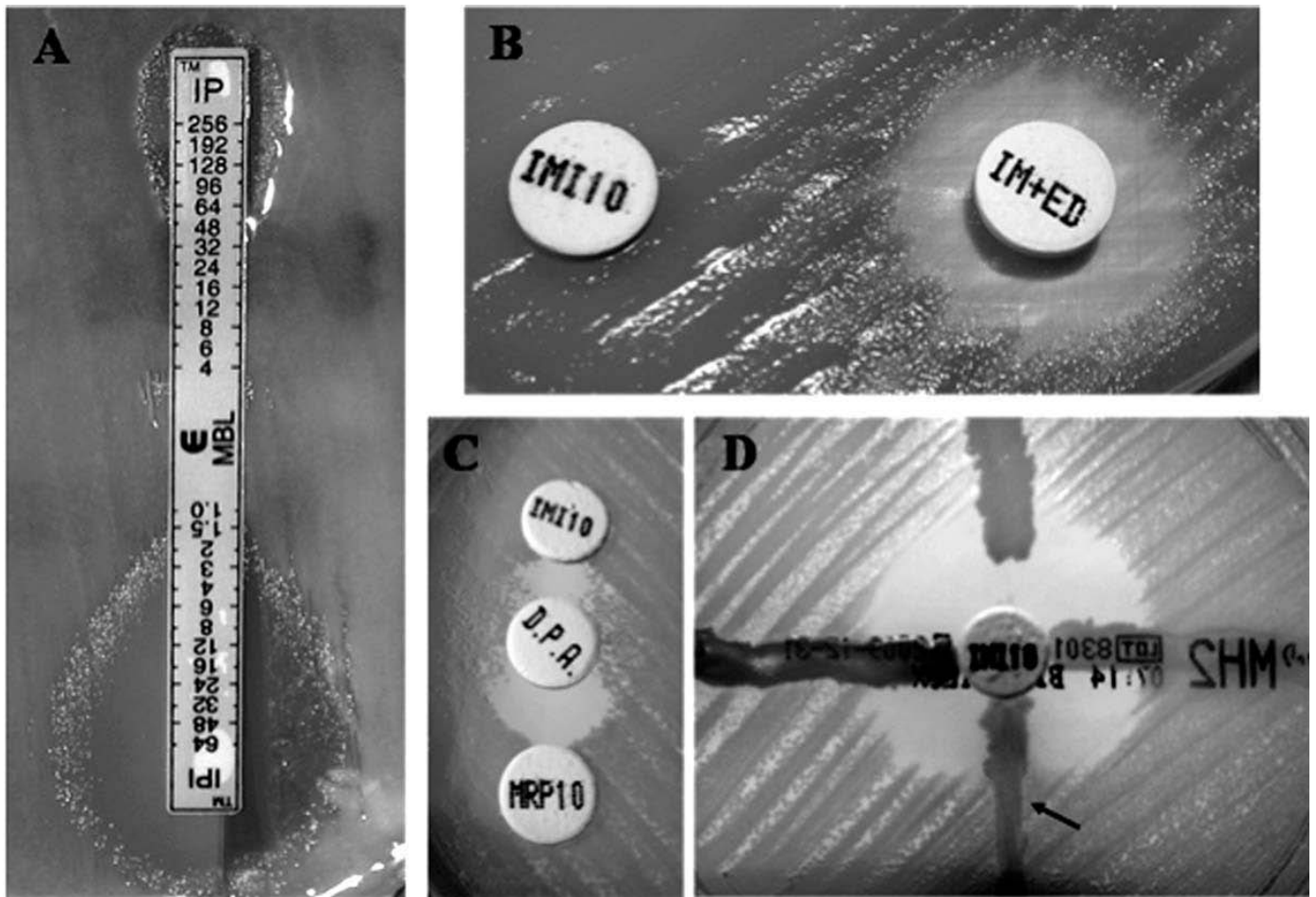


Figura 2. A. Etest® MBL positivo en una cepa de *P. aeruginosa* mucoide portadora de VIM-2. B. Diferencia en los halos de inhibición de imipenem e imipenem + EDTA en una cepa de *P. aeruginosa* portadora de VIM-2. C. DDST con discos de ácido dipicolínico, meropenem e imipenem, en una cepa de *P. aeruginosa* portadora de VIM-2. D. Prueba de Hodge modificada en la que se aprecia la reducción del halo de inhibición del crecimiento de la cepa de *E. coli*, alrededor de la estría marcada con la flecha. Dicha estría pertenece a una cepa de *P. aeruginosa* productora de VIM-2, mientras que el resto de estrías son cepas de *P. aeruginosa* no productoras de carbapenemasa, incluyendo cepas sensibles y resistentes por inactivación de OprD.

Carbapenemasas en especies de *Pseudomonas* detectadas en los hospitales españoles

Si bien la prevalencia de cepas de *Pseudomonas* productoras de carbapenemasa en España es todavía relativamente baja comparada con la de otros países, su detección ha dejado ya de ser un hecho infrecuente, como lo demuestran los datos de los diversos estudios publicados, resumidos en la tabla 2. La primera detección de una carbapenemasa adquirida por *Pseudomonas* en nuestro país (en concreto, VIM-2) se dio en una cepa perteneciente a un estudio retrospectivo en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima e imipenem (total: 52 cepas), obtenidas en el Hospital de Sant Pau de Barcelona, durante el período 1996-2001⁸². En 2007 se describió el primer brote epidémico (también por una cepa productora de VIM-2) en el Hospital de Bellvitge (Barcelona), que afectó a 34 pacientes en un período de, aproximadamente, 2 años (2004-2006)⁸³. También en el año 2007 se publicó el primer estudio multicéntrico nacional de epidemiología molecular y mecanismos de resistencia a las carbapenemasas en el que se analizaron 236 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en noviembre de 2003¹⁸. No obstante, sólo una cepa (0,4%) fue productora de carbapenemasa (VIM-2). Según los datos del año 2008 del estudio multicéntrico de bacteriemia por *P. aeruginosa* REIPI, la prevalencia de cepas productoras de carbapenemasa habría aumentado de forma significativa (10 veces) en los últimos años, llegando ya al 4% de las resistentes a imipenem, todas

ellas productoras de VIM-2³². Además, de las múltiples detecciones de VIM-2 en nuestro país (v. tabla 2), se ha identificado una nueva variante (VIM-13) recientemente caracterizada bioquímicamente a partir de una cepa del Hospital de Son Llàtzer de Palma de Mallorca, y posteriormente detectada también en otro hospital de la isla (Son Dureta)^{17,84}. También en Palma de Mallorca se ha detectado recientemente una alta frecuencia (14%) de aislados de *P. putida* productores de MBL (VIM-1 y VIM-2). Resulta interesante que el integrón portador de VIM-2 se localizara en el mismo transposón detectado en las cepas de *P. aeruginosa* productoras de VIM-2, lo cual parece sugerir que *P. putida* podría actuar como reservorio de estos importantes determinantes de resistencia¹⁷.

Finalmente, cabe destacar la reciente descripción en nuestro país de una cepa de *P. aeruginosa* productora de una carbapenemasa de clase A (GES-5) diseminada en 24 pacientes del Hospital Doce de Octubre de Madrid en 2007-2008⁴⁸. Cabe destacar que el clon implicado fue el ST235, ampliamente diseminado internacionalmente, y que ya había mostrado previamente su capacidad para adquirir otras betalactamasas importantes (VIM, PER y OXA, entre otras)⁸⁵. Curiosamente, este mismo clon (ST235) resultó ser el portador de la VIM-13 descrita en los hospitales de Mallorca¹⁷. Por último, se ha descrito también la presencia de la carbapenemasa de clase D OXA-40 en dos aislados de *P. aeruginosa*, presente en el mismo plásmido descrito en *A. baumannii*, también en España (Hospital de Santa Marina, Bilbao)^{71,86}.

Tabla 2
Resumen de los estudios publicados acerca de carbapenemasas detectadas en el género *Pseudomonas* en hospitales españoles

Referencia del estudio	Especie	N.º pacientes infectados (n.º de clones)	Prevalencia	Carbapenemasa (n.º de casos)	Hospital (localidad)	Año(s) de detección	Características relevantes
82	PA	1 (1)	2% de los aislados de PA resistentes a CAZ e IMP (total: 52)	VIM-2 (1)	Sant Pau (Barcelona)	1996-2001	1.ª detección de VIM en España
18	PA	1 (1)	0,08% del total de aislados (1.250) de PA. 0,4% de los aislados de PA resistentes a IMP y/o MER (236)	VIM-2 (1)	General Yagüe (Burgos)	2003	1.º estudio español multicéntrico de la resistencia a carbapenemas en PA
87	PA	1 (1)	Detección esporádica	VIM-2 (1)	Son Llätzer (Palma de Mallorca)	2004	
83	PA	34 (1)	Brote epidémico	VIM-2 (34)	Bellvitge (Barcelona)	2004-2006	1.º brote epidémico por una cepa de PA productora de MBL en España
88	PA	9 (1)	Brote epidémico	VIM-2 (9)	Marqués de Valdecilla (Santander)	2004-2006	
84	PA	1 (1)	Detección esporádica	VIM-13 (1)	Son Llätzer (Palma de Mallorca)	2005	1.ª descripción de la variante VIM-13
89	PA	3 (1)	Brote epidémico	VIM-2 (3)	Joan March (Palma de Mallorca)	2007	1.ª descripción de infección pulmonar crónica por PA mucoide productora de MBL
71	PA	2 (1)	Detección esporádica	OXA-40 (2)	Santa Marina (Bilbao)	2008	1.ª detección de una OXA carbapenemasa transferible en PA
48	PA	24 (1)	2% del total de aislados (1.182) de PA. 50% de los aislados de PA resistentes a cefalosporinas, penicilinas y carbapenemas (48). Brote epidémico	GES-5 (24)	12 de Octubre (Madrid)	2007-2008	1.ª descripción de un integrón portador de dos variantes GES. 1.ª detección de GES en el clon mundialmente distribuido ST235
	PA	9 (9)	0,75% del total de aislados (1.182) de PA. 18,7% de los aislados de PA resistentes a cefalosporinas, penicilinas y carbapenemas (48)	VIM-2 (9)			
17	PP	8 (8)	14% de las infecciones causadas por el grupo <i>P. putida/fluorescens</i> (57)	VIM-1 (2) VIM-2 (6)	Son Dureta (Palma de Mallorca)	2005-2008	1.ª detección de una MBL (VIM-1) en PP en España. Clon portador de VIM-13: ST235. Clon mayoritario portador de VIM-2: ST179, asociado con infecciones pulmonares crónicas
	PA	11 (4)	0,3% de las infecciones causadas por PA (3.694)	VIM-13 (2) VIM-2 (9)			

CAZ: ceftazidima; IMP: imipenem; MER: meropenem; PA: *P. aeruginosa*; PP: *P. putida*.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido posible, en parte, gracias a la financiación de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Redes de Investigación Colaborativa del Instituto de Salud Carlos III (RD06-0008-0024).

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 5.ª ed. Nueva York: Churchill Livingstone; 2000. p. 1980-2003.
- Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:43-8.
- Lynch JP. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest.* 2001;119 Suppl 2:S373-84.
- Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet.* 2003;361:2068-77.
- Mousa HA. Aerobic, anaerobic and fungal burn wound infections. *J Hosp Infect.* 1997;37:317-23.
- Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4:35-51.
- Martinez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1526-33.
- Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4733-8.
- Moya B, Dötsch A, Juan C, Blazquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a non-essential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000353.

10. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002;34:634-40.
11. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallee M, van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutics options in the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:560-78.
12. Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3382-6.
13. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 2000;288:1251-4.
14. Pedersen SS. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *APMIS.* 1992;Suppl 28:S1-79.
15. Souza Dias MB, Habert AB, Borrasca V, Stempluk V, Ciolli A, Araujo MR, et al. Salvage of long-term central venous catheters during an outbreak of *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia* infections associated with contaminated heparin catheter-lock solution. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:125-30.
16. Aumeran C, Paillard C, Robin F, Kanold J, Baud O, Bonnet R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* outbreak associated with contaminated water outlets in an oncohaematology paediatric unit. *J Hosp Infect.* 2007;65:47-53.
17. Juan C, Zamorano L, Mena A, Alberti S, Perez JL, Oliver A. Metallo- β -lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug-resistance elements that are efficiently amplified by transference to successful *P. aeruginosa* clones. *J Antimicrob Chemother.* 2009 (En prensa).
18. Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:4329-35.
19. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:582-610.
20. Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* in vitro: activity against characterized isolates, mutants, and transconjugants and resistance selection potential. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3086-92.
21. 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.
22. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289:321-31.
23. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:306-25.
24. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58.
25. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* 2007;2:501-12.
26. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1766-71.
27. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Sep 8 [Epub ahead of print].
28. Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: What are the treatment options? *Drugs.* 2009;69:1879-901.
29. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:315-21.
30. Bouza E, Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Diaz MS. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:981-2.
31. Sanchez-Romero I, Cercenado E, Cuevas O, Garcia-Escribano N, Garcia-Martinez J, Bouza E, et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: second national study. *Rev Esp Quimioter.* 2003;20:222-9.
32. Suarez C, Peña C, Campo A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Impact of carbapenem-resistance on *Pseudomonas aeruginosa* (PA) bloodstream infections outcome. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, 2009. Resumen: K-332.
33. Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R, Mugnaioli C, Pini B, de Luca F, et al. First countrywide survey of acquired metallo-beta-lactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4023-9.
34. Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho JH, Kang JO, et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. *Yonsei Med J.* 2009;50:335-9.
35. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 4:S276-8.
36. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:211-33.
37. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:470-82.
38. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-61. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:809.
39. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1553-5.
40. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:557-62.
41. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:622-32.
42. Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2247-53.
43. Lee SH, Jeong SH. Nomenclature of GES-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2148.
44. Jacoby GA. Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1123-9.
45. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, de Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2598-603.
46. Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:1261-2.
47. Labuschagne CJ, Weldhagen GF, Ehlers MM, Dove MG. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:527-30.
48. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4930-3.
49. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3593-7.
50. Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR, et al. A novel subgroup Metallo- β -lactamases (MBL) AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. En: Abstracts of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, 2007. Abstract C1-593, p. 75. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
51. Poirel L, Rodríguez-Martínez J, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp Y, Nordmann P, et al. Characterization of blaDIM-1, a novel integron-located metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in Netherlands. En: Oral sessions of the 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, 2009. Session 0309, p. 61. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Basel, Switzerland.
52. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4194-7.
53. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:71-8.
54. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1522-8.
55. Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, Galleni M, Segatore B, Sacchetti E, et al. Identification of bla(IMP-22) in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:901-8.
56. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2909-13.
57. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5407-13.
58. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante A, Fontana R, et al. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1584-90.
59. Quinteira S, Ferreira H, Peixe L. First isolation of blaVIM-2 in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2140-1.
60. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleki LS, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, et al. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:5153-6.
61. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:257-66.
62. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-(beta)-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:1148-51.
63. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection.* 2007;35:457-60.

64. El Salabi A, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo- β -lactamase, SPM-1, in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 [Epub ahead of print].
65. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4654-61.
66. 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.
67. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:373-83.
68. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-86.
69. Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999;5:865-79.
70. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 1993;2:81-7.
71. Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57:493-5.
72. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2043-8.
73. Kong KF, Jayawardena SR, del Puerto A, Wiehlmann L, Laabs U, Tümmler B, et al. Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene.* 2005;358:82-92.
74. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:88-91.
75. 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-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4623-9.
76. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-beta-lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res.* 2005;121:780-3.
77. Noyal MJ, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SC. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of non-fermentative Gram-negative bacteria. *Indian J Med Res.* 2009;129:707-12.
78. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3798-801.
79. Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol.* 2002;40:755-9.
80. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;49:5-11.
81. Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Lee PS, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C. Appropriate Müller-Hinton agar is crucial for the performance of metallo-lactamase Etest. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, 2009. Abstract number: P812.
82. Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:932-3.
83. Peña C, Suarez C, Tubau F, Gutierrez O, Dominguez A, Oliver A, et al. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:1026-9.
84. Juan C, Beceiro A, Gutierrez O, Alberti S, Garau M, Perez JL, et al. Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3589-96.
85. Empel J, Filczak K, Mrówka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2829-34.
86. Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4741-3.
87. Gutierrez-Urbon O, Requena-Rodriguez MJ, Diaz-Antolin P, Oliver-Palomo A. Isolation of multi-resistant carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* (VIM-2) and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* (SHV-2) in a perianal ulcer in a patient with hematological disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23:574-5.
88. Rodriguez MC, Ruiz del Castillo B, Rodriguez-Mirones C, Romo M, Monteagudo I, Martinez-Martinez L. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Cantabria, Spain, producing VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 [Epub ahead of print].
89. Juan C, Gutierrez O, Renom F, Garau M, Gallegos C, Alberti S, et al. Chronic respiratory infections by mucoid carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains, a new potential public health problem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2285-6.