

Análisis fenotípico y detección del gen *bla*_{VIM} en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas aisladas en Mérida, Venezuela.

Phenotypic analysis and detection of *bla*_{VIM} gene in metallo- β -lactamases- producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Mérida, Venezuela.

Salazar Poema^{1*}, Araque María¹, Mosqueda Noraida²

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ²Departamento de Microbiología y Parasitología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela.

Recibido septiembre 2010 - Aceptado noviembre 2010

RESUMEN

Se estudiaron fenotípica y genéticamente 13 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, con sensibilidad disminuida a los β -lactámicos de amplio espectro, provenientes de pacientes reclusos en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), y 2 cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes de la comunidad, Mérida, Venezuela. Estas cepas fueron aisladas durante el período enero a julio de 2008. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante pruebas de difusión del disco. Para determinar la actividad de metalo-enzimas se empleó la técnica del Sinergismo del Doble Disco (SDD). La detección de los genes que codifican para las principales familias de metalo- β -lactamasas (IMP, VIM, SPM), se llevó a cabo mediante la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los resultados muestran que las 15 cepas se distribuyeron en 4 patrones de susceptibilidad, los cuales tuvieron como característica común la sensibilidad a la colistina y la resistencia al imipenem, meropenem, ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam y ciprofloxacina. Independientemente del origen y del patrón de susceptibilidad, todas las cepas mostraron fenotípicamente la producción de metalo-enzimas y, mediante la PCR, se determinó la presencia de los genes que codifican para la metalo β -lactamasa de tipo VIM. Los hallazgos de este estudio demuestran la circulación de cepas de *P. aeruginosa* productora de metalo β -lactamasa tipo VIM en el IAHULA. Se reporta, por primera vez en Mérida-Venezuela, la detección de cepas con esta característica provenientes de la comunidad.

PALABRAS CLAVE

Pseudomonas aeruginosa, metalo β -lactamasa, gen *bla*_{VIM}

ABSTRACT

Thirteen *Pseudomonas aeruginosa* strains with decreased susceptibility to broad-spectrum betalactamicos from patients hospitalized in the Autonomous Institute University Hospital of The Andes (IAHULA) and two additional strains isolated in clinical specimens of patients from the community, Mérida, Venezuela, were studied. These strains were isolated from January to July 2008 and phenotypically and genetically studied. Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion. The activity of metallo-enzymes was determined by the Double Disc Synergism (DDS) technique. The study of genes encoding for the major families of metallo- β -lactamases (IMP, VIM, SPM) was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR). Results showed that 15 strains were distributed in four different susceptibility patterns, which had the common feature of colistin sensitivity and resistance to imipenem, meropenem, ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam and ciprofloxacin. Regardless of their origin or the pattern of susceptibility, all strains phenotypically (DDS) showed the production of metallo-enzymes while PCR indicated the presence of genes encoding for the metallo β -lactamase VIM-type. The findings of this study demonstrate the circulation of VIM-producing *P. aeruginosa* strains in IAHULA. The detection of strains is brought, for the first time

in Merida - Venezuela, by this characteristic from the community.

KEY WORDS

Pseudomonas aeruginosa, metallo- β -lactamase, *bla*_{VIM} gen.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno nosocomial importante que produce infecciones severas en pacientes gravemente enfermos o inmunocomprometidos [1]. En la comunidad, esta bacteria es causante de diversas infecciones, de acuerdo a su severidad, éstas pueden variar, presentándose clínicamente desde una infección ungueal, una otitis externa no complicada en nadadores hasta endocarditis en usuarios de drogas endovenosas o una osteomielitis, producto de heridas punzo penetrantes [2]. Independientemente del origen de *P. aeruginosa*, la prevalencia de las infecciones producidas por este patógeno se han incrementado en los últimos años, gracias a la gran capacidad que tiene esta bacteria para adquirir nuevos mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos [3].

La producción de metalo β -lactamasas es uno de los mecanismos principales involucrados en la resistencia de *P. aeruginosa* a los β -lactámicos de amplio espectro. Estas enzimas hidrolizan todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas, y son inhibidas por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y el ácido dipicolínico [4]. Con base en la clasificación molecular de Ambler, estas enzimas pertenecen al grupo B y se subdividen en tres subclases (B1, B2 y B3). La subclase B1 agrupa los tipos IMP, VIM, SPM, GIM y SIM. Los primeros cuatro tipos son los más frecuentemente observados en *P. aeruginosa*, y de éstos, las metalo β -lactamasas tipo IMP y VIM son las más frecuentes en el mundo [5]. En Venezuela, se reportaron por primera vez cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasa tipo VIM-2 en el año 2004 [6], recientemente, Guevara y col. [7] detectaron la presencia del gen *bla*_{VIM-2} en cepas de *P. aeruginosa* de origen intrahospitalario en la región sur-oriental del país.

Con el objeto de conocer la presencia de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas en Mérida, Venezuela, se analizaron fenotípica y genéticamente 13 cepas con sensibilidad disminuida a los β -lactámicos de amplio espectro, provenientes

de pacientes reclusos en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes y 2 cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes de la comunidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas: Durante el periodo de enero a julio de 2008, se seleccionaron 15 cepas de *P. aeruginosa* con perfiles de resistencia a los β -lactámicos de amplio espectro y carbapenemas, pertenecientes a un banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Salud Pública en la Unidad de Larga Estancia del Ambulatorio Venezuela del estado Mérida. De estas cepas, 13 fueron aisladas de pacientes adultos reclusos en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) y 2 cepas fueron recuperadas de muestras clínicas de pacientes no hospitalizados que asistieron a dicho laboratorio.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: A todas las cepas se les determinó la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos mediante el método de difusión del disco, de acuerdo a los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) [8]. Los antibióticos probados fueron (BBL, Cockeysville, Md, USA): piperacilina/tazobactam (100/10 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefepima (30 μ g), imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), aztreonam (30 μ g), amikacina (30 μ g), gentamicina (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g) y colistina (10 μ g). La cepa control utilizada en estas pruebas fue *P. aeruginosa* ATCC 25927.

Detección fenotípica de metalo β -lactamasas: Esta prueba se realizó mediante la técnica del sinergismo del doble disco (SDD) [9], utilizando discos de imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g) y EDTA/mercaptoacético de sodio (SMA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) Los discos de EDTA/SMA fueron preparados según lo descrito por Lee y col. [9]. La detección de las metalo β -lactamasas se llevó a cabo inoculando placas de agar Mueller-Hinton (BBL, Cockeysville, Md, USA) con suspensiones de cada una de las cepas ajustadas al patrón N° 5 de McFarland. Los discos fueron ubicados de la siguiente manera: en el centro de la placa se colocó el disco EDTA/SMA y a los lados equidistantes (15 mm) se colocaron los discos de imipenem y meropenem. Las placas fueron incubadas a 36 °C en aerobiosis por 18 horas y posteriormente se procedió a realizar la lectura e interpretación de las pruebas. La producción de metalo β -lactamasa se consideró positiva cuando fue visible el incremento del halo

de inhibición entre el β -lactámico (imipenem y/o meropenem) y el disco de EDTA/SMA. Como control positivo de esta prueba se utilizó la cepa *P. aeruginosa* 77297, productora de β -lactamasa de tipo VIM, y *P. aeruginosa* ATCC 25927 como control negativo.

Detección de genes que codifican para las metalo β -lactamasas.

Extracción del ADN genómico de las cepas de *P. aeruginosa*: A partir de cultivos frescos en agar Luria Bertani (BBL, Cockeysville, Md, USA), varias colonias de las cepas en estudio fueron resuspendidas en 200 μ l de buffer TE y se sometieron a ebullición en baño de María durante 10 minutos. Por centrifugación se separó el sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano y se transfirió a tubos eppendorf, los cuales fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

Amplificación: La presencia de los genes que codifican para las metalo β -lactamasas de las familias SPM, VIM e IMP, se realizó a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores que se describen en la Tabla 1. Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 50 μ l y la mezcla estuvo compuesta por 5 μ l de cada iniciador (5 pmol/ml); 20,5 μ l de agua bidestilada ultrapura, 25 μ l de la mezcla LPU (FUNDAIM, Caracas, Venezuela) y 2,5 μ l de ADN. Las condiciones de amplificación se realizaron de acuerdo a lo descrito por Gales y col. [10], Senda y col. [11] y Tsarkis y col. [12]. Los productos de las amplificaciones fueron observados en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO, USA) y fotografiados con el sistema iluminador y cámara UVP Biodoc-It System. Como marcador de tamaño molecular se utilizó Ladder 50 pb (Bioneer, Alameda, CA, USA).

TABLA 1
Iniciadores utilizados en la amplificación de las principales metalo β -lactamasas

Gen	Iniciadores	Referencia
<i>bla_{SPM}</i>	SPM-F 5'- CCTACAATCTAACGGCGACC - 3'	10
	SPM-R 5'- TCGCCGTGTCCAGGTATAAC - 3'	
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F 5'- CTACCGCAGCAGAGTCTT TG - 3'	11
	IMP-R 5'- AACCAAGTTTGCCCTTACCAT - 3'	
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F 5'- AGTGGTGAGTATCCGACAG - 3'	12
	VIM-R 5'- ATG AAAGTGCCTGGAGAC - 3'	

RESULTADOS

Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana permitieron evidenciar que el 100% de las cepas analizadas mostraron resistencia a los carbapenemas (meropenem e imipenem), ceftazidima, cefepima, piperacilina/tazobactam y ciprofloxacina. La resistencia a los aminoglucósidos estuvo en el orden del 93% (14/15) y 86,67% (13/15) para la gentamicina y amikacina, respectivamente, siguiéndole en orden, con un 40% (6/15), la resistencia al aztreonam. Todas las cepas fueron inhibidas por la colistina.

Con base en los perfiles de susceptibilidad, las cepas de *P. aeruginosa* fueron distribuidas en cuatro patrones, de los cuales, el I y II agruparon las cepas intrahospitalarias y el III y IV, las provenientes de la comunidad (Tabla 2). El patrón de susceptibilidad más frecuente fue el I, conformado por MER^R, IMP^R, CAZ^R, FEP^R, TZP^R, AMK^R, GEN^R, ATM^S, COL^S, CIP^R y se observó en 9 cepas de origen intrahospitalario. Este patrón fue el único que incluyó *P. aeruginosa* sensibles al aztreonam, característica que constituyó la diferencia con respecto al patrón II, correspondiente a cepas del mismo origen. Las dos cepas provenientes de la comunidad correspondieron a patrones independientes (III y IV); en ambos casos se observó sensibilidad a la amikacina, pero se diferenciaron entre sí por la resistencia a la gentamicina (patrón IV).

TABLA 2
Características fenotípicas y genéticas de las cepas de *P. aeruginosa* de origen intrahospitalario y comunitario productoras de metalo β -lactamasas

Patrón	Perfil de Susceptibilidad	Origen			Detección por PCR genes que codifican para metalo β -lactamasas		
		Nosoc N°	Comun N°	SDD	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{SPM}</i>
I	MER ^R , IMP ^R , CAZ ^R , FEP ^R , TZP ^R , AMK ^R , GEN ^R , ATM ^S , CIP ^R , COL ^S	9	0	+	+	-	-
II	MER ^R , IMP ^R , CAZ ^R , FEP ^R , TZP ^R , AMK ^R , GEN ^R , ATM ^R , CIP ^R , COL ^S	4	0	+	+	-	-
III	MER ^R , IMP ^R , CAZ ^R , FEP ^R , TZP ^R , AMK ^S , GEN ^S , ATM ^R , CIP ^R , COL ^S	0	1	+	+	-	-
IV	MER ^R , IMP ^R , CAZ ^R , FEP ^R , TZP ^R , AMK ^S , GEN ^R , ATM ^R , CIP ^R , COL ^S	0	1	+	+	-	-

Nosoc: nosocomial; Comun: comunidad; MER: meropenem; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; TZP: piperacilina/tazobactam; AMK: amikacina; GEN: gentamicina; ATM: aztreonam; COL: colistina; CIP: ciprofloxacina; SDD: sinergismo del doble disco. +: detección positiva; -: resultado negativo.

Independientemente del origen y del patrón de susceptibilidad, todas las cepas mostraron fenotípicamente la producción de metalo β -lactamasas mediante la técnica SDD. Genéticamente, esta característica fue confirmada al obtenerse amplicones de 261 pb, aproximadamente, correspondientes a la detección de genes de la familia tipo VIM (Tabla 2, Fig. 1).

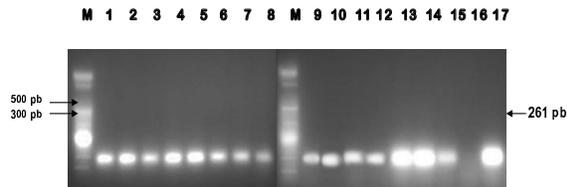


Fig. 1. Amplificación del gen bla_{VIM} , en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemas. Línea M: Marcador molecular (50 pb.), línea 1 al 13: *P. aeruginosa* de origen intrahospitalario, 14 y 15: *P. aeruginosa* de origen comunitario, 16: control negativo, 17: control positivo (*P. aeruginosa* 834B).

DISCUSIÓN

El fenómeno de la resistencia a los β -lactámicos de amplio espectro en *P. aeruginosa* representa un problema de salud pública mundial en ascenso [1, 3-5]. Este hecho ha obligado a mejorar las técnicas para su detección precoz, así como a profundizar los conocimientos genéticos relacionados con los mecanismos de resistencia involucrados [3, 4, 7]. En este contexto, se ha descrito que las metalo-enzimas son uno de los principales mecanismos implicados en la resistencia a los β -lactámicos de amplio espectro en *P. aeruginosa*. Las metalo β -lactamasas más frecuentemente encontradas en Latinoamérica son las pertenecientes a la subclase B1 tipo VIM [5, 6]. En Venezuela, la metalo β -lactamasa VIM-2 fue descrita en 3 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de un hospital de Caracas [6], posteriormente, Sánchez y col., en el 2008 [13], reportan la presencia de este patógeno productor de VIM en 4 hospitales del país, en el que incluyeron instalaciones militares y de atención infantil. Recientemente, en el 2009, Guevara y col., [7], señalan la detección del gen bla_{VIM-2} en *P. aeruginosa* multirresistentes en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela.

En este estudio, se demuestra la detección del gen $bla_{VIM-like}$ en 13 cepas de *P. aeruginosa* de origen intrahospitalario y en 2 cepas provenientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. Estas cepas, también presentaron resistencia asociada a la ciprofloxacina (100%), gentamicina (93%), amikacina

(86,67%) y en menor frecuencia al aztreonam (40%). Es posible que la distribución de las cepas estudiadas en 4 patrones de susceptibilidad diferentes, se deba a la presencia de determinantes de resistencia adicionales que median la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de expulsión, alteraciones de la permeabilidad de la pared celular, entre otros mecanismos [14].

Es importante destacar, que 2 cepas productoras de VIM fueron aisladas de pacientes procedentes de la comunidad. Aunque se desconocen datos sobre los antecedentes de hospitalización en el IAHULA u otro centro hospitalario del país, es probable que estos pacientes hayan sido colonizados previamente por *P. aeruginosa*, o posiblemente, los elementos genéticos que codifican para la producción de metalo-enzima presentes en esta bacteria, pudieron ser transferidos en forma horizontal a la flora bacteriana indígena durante una estancia hospitalaria. Estudios previos [15-17] han demostrado que infecciones producidas por *P. aeruginosa* u otros bacilos gramnegativos productores de metalo-enzimas en pacientes de la comunidad, fueron antecedidas por un estado de portador intestinal prolongado, producto de una colonización intrahospitalaria. Por tanto, se requieren estudios de epidemiología molecular que permitan establecer la relación o diversidad clonal de las cepas estudiadas, para confirmar la fuente y mecanismos de diseminación, tanto dentro, como fuera del recinto hospitalario.

El aztreonam se considera una alternativa terapéutica en infecciones producidas por *P. aeruginosa* productora de metalo-enzima [1,18]. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que solo el 60% de las cepas estudiadas fueron sensibles a este antibiótico, a diferencia de las cifras reportadas por Guevara y col. [7] y Tsakris y col. [16], quienes encontraron un 100% y 73% de sensibilidad al aztreonam, respectivamente, en cepas *P. aeruginosa* productoras de VIM. No obstante, el uso de un monobactámico no se descarta como opción terapéutica, pero requerirá de la comprobación previa de la susceptibilidad bacteriana a este antibiótico.

Recientemente, Daikos y col. [17] demostraron que el uso de una terapia combinada con drogas activas como la colistina asociada a un aminoglucósido o con una carbapenema, disminuyó notablemente la mortalidad de pacientes con infecciones graves producidas por bacilos gramnegativos productores de metalo-enzimas. En este estudio se encontró que todas las cepas estudiadas fueron sensibles a la colistina. Considerando lo descrito en la literatura [19-21] y los resultados obtenidos, la polimixina

E, utilizada con criterio clínico y microbiológico, puede representar una alternativa efectiva para la terapéutica combinada en infecciones producidas por *P. aeruginosa* productora de metalo β -lactamasa.

En conclusión, los hallazgos de este estudio, permitieron determinar la presencia de cepas de *P. aeruginosa* productora de metalo β -lactamasa tipo VIM en el IAHULA, y se reporta por primera vez en Venezuela, la detección de cepas con esta característica provenientes de la comunidad. En este contexto, es importante implementar estrategias que permitan mantener estas cepas bajo vigilancia epidemiológica, establecer protocolos de laboratorio para su detección precoz y aplicar nuevas políticas que aseguren el uso adecuado de los agentes antimicrobianos, dentro y fuera de las instalaciones hospitalarias.

RERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Rossolini GM, Mantegoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2005; 11 (S4): 17-32.
- [2] Martínez P, Gómez L, Garau A. Infecciones por *Pseudomonas*. Tratado SEIMC de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2007. p 347-356.
- [3] Paterson D. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Clin Infect Dis. 2006; 43 (S2): S43-S48.
- [4] Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM, on behalf of the ASCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in gram negative pathogens: open issues. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29: 380-388.
- [5] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile- β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007; 20: 440-458.
- [6] Mendes R, Castanheira M, García P, Guzman M, Toleran M, Walsh T, Jones R. First isolation of *bla*_{VIM-2} in Latin América: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 1433-1434.
- [7] Guevara A, de Waard J, Araque M. Detección del gen *bla*_{VIM-2} en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasa aisladas en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela. Rev Chil Infect. 2010; 26 (4): 336-341.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth informational supplement. M100-S16. Wayne (PA), USA. 2009.
- [9] Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4623-4629.
- [10] Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. J Antimicrob Chemother. 2003; 52: 699-702.
- [11] Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla*_{VIM}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2909-2913.
- [12] Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1290-1292.
- [13] Sánchez DI, Marcano D, Spadola E, León LV, Payares DJ, Ugarte C, et al. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales en Venezuela. Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel". 2008; 39(2): 17-22.
- [14] Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 3531-3536.
- [15] Tsakris A, Ikonmidis A, Ponlou A, Spanakis N, Purnaras S, Markou F. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo- β -lactamase. J Antimicrob Chemother. 2007; 60: 136-139.
- [16] Tsakris A, Ponlou A, Kristo I, Pittaras T, Spanakis N, Pournaras S, et al. Large dissemination of VIM-2-metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. J Clin Microbiol. 2009; 48: 3524-3529.
- [17] Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M, Kosmidis C, Vryonis E, Skoutelis A, et al. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo- β -lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(5): 1868-1873.
- [18] Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol. 2007; 2: 501-512.
- [19] Miyajima Y, Hiramatsu K, Mizukami E,

Morinaga R, Ishii H, Shirai R, Kishi K, Tokimatsu I, Saikawa T, Kadota J. In vitro and in vivo potency of polymyxin B against IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents. 2008; 32(5): 437-440.

[20] Viedma EJC, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, Chaves F, Oliver A. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the

extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(11): 4930-4933.

[21] Oie S, Fukui Y, Yamamoto M, Masuda Y, Kamiya A. *In Vitro* antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Infect Dis. 2009; 9:123 doi:10.1186/1471-2334-9-123.