

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas

Pathogenic characteristics of Pseudomonas aeruginosa strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation

Sara A. Ochoa,¹ Fernanda López-Montiel,^{1*} Gerardo Escalona,¹ Ariadna Cruz-Córdova,¹ Leticia B. Dávila,¹ Briseida López-Martínez, Yolanda Jiménez-Tapia,² Silvia Giono,³ Carlos Eslava,⁴ Rigoberto Hernández-Castro,⁵ Juan Xicohtencatl-Cortes¹

RESUMEN

Introducción. A escala mundial, se ha observado la aparición de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes durante las últimas décadas. Este patógeno oportunista produce mecanismos de resistencia a diversos antibióticos. La resistencia a carbapenémicos en cepas de *P. aeruginosa* se ha asociado con la formación de biopelículas bacterianas, favorecidas por la presencia de exopolisacáridos (EPS) embebidos en una matriz extracelular y por la producción de los pili tipo IV (T4P). El objetivo de este trabajo fue evaluar la formación de biopelículas en cepas clínicas aisladas en el Hospital Infantil de México Federico Gómez de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, a través de la cuantificación de los exopolisacáridos totales-reductores y su asociación con la expresión fenotípica de los T4P.

Métodos. Se realizaron ensayos de susceptibilidad antibiótica por el método de Kirby-Bauer en 92 cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Asimismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para imipenem (IMP) y meropenem (MEM) por el método de dilución seriada en placas con agar con un replicador de Steers. La producción de metalo- β -lactamasas fue determinada mediante la técnica de difusión en disco y de sinergismo. Las biopelículas fueron realizadas en cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, a través de la cuantificación de cristal violeta, azúcares totales (antrona) y azúcares reductores (DNS), además de la expresión fenotípica de los T4P por la actividad de *twitching motility*. La diversidad genética de las cepas formadoras de bio-

ABSTRACT

Background. In recent years, the worldwide emergence of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* has been observed. This opportunistic pathogen produces mechanisms of resistance to several antibiotics. The resistance to carbapenems in *P. aeruginosa* strains has been associated with bacterial biofilm formation, favored by the presence of exopolysaccharides (EPS) embedded in an extracellular matrix and to the production of type IV pili (T4P). We undertook this study to assess biofilm formation in clinical strains of *P. aeruginosa* resistant to carbapenems isolated at the Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) through quantification of total-reducing EPS and its association with the phenotypic expression of T4P.

Methods. Antibiotic susceptibility tests were performed using the Kirby-Bauer method in 92 clinical isolates of *P. aeruginosa*; likewise, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for imipenem (IMP) and meropenem (MEM) by the serial dilution method in agar plates with a Steers replicator. Production of metallo- β -lactamase (MBL) was determined by the disk diffusion method and synergism. Biofilm formation was performed in clinical isolates of *P. aeruginosa* resistant to carbapenems through the quantification of crystal violet, total sugar (anthrone), and reducing sugar (DNS), in addition to the phenotypic expression of T4P activity of twitching motility. The genetic diversity of strains forming biofilm and producing reducing sugars was evaluated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

¹ Laboratorio de Bacteriología Intestinal, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

² Laboratorio Clínico Central, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

³ Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Instituto Politécnico Nacional.

⁴ Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

⁵ Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

* Becario PROBEI

México, D.F., México

Fecha de recepción: 05-02-13

Fecha de aceptación: 05-03-13

películas y productoras de azúcares reductores fue evaluada mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE).

Resultados. El 30.4% (28/92) de las cepas de *P. aeruginosa* de origen pediátrico fueron recuperadas de la sala de cirugía y el 50% (46/92) de muestras de orina. Los resultados por Kirby-bauer mostraron que más de 50% de las cepas de *P. aeruginosa* fueron resistentes a 12 diferentes antibióticos. La MIC a los carbapenémicos fue de 64 µg/ml, con 43.1% (25/58) para MEM y 56.8% (33/58) para IMP. Así mismo, la producción de metalo-β-lactamasas fue observada en 43% (25/58) para MEM, 2% (1/58) para IMP y 12% (7/58) para ambas. Los análisis mostraron que 82% (48/58) de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos fueron altas formadoras de biopelículas. De éstas, 46.5% (27/58) mostraron concentraciones de EPS totales de 2000 a 6000 µg/ml y 27.5% (16/58) mostraron concentraciones de EPS reductores de 316 a 1108 µg/ml; además, 75% (44/58) de estas cepas mostraron actividad fenotípica de *twitching motility*.

Conclusiones. La detección de azúcares totales, azúcares reductores y el fenómeno de *twitching motility* son factores que favorecen el desarrollo de las biopelículas en cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Los datos sugieren que estos factores están involucrados en la formación de biopelículas que confieren a la bacteria la capacidad para sobrevivir, persistir y colonizar a su hospedero.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, cepas clínicas, resistencia a antibióticos, biopelículas, pili.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo aerobio, considerado un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno. Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C.¹ Estas características le permiten adherirse, sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias. Lo anterior favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos.^{1,2} *P. aeruginosa* puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria. Las infecciones por *P. aeruginosa* son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca, además de su capacidad para adquirir resistencia a diversos antibióticos.³

P. aeruginosa produce diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, como β-lactamasas de amplio espectro, metalo-β-lactamasas (MBL), alteración de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), mutación de porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación de

Results. There were 30.4% (28/92) of *P. aeruginosa* strains of pediatric origin and 50% (46/92) of urine samples that were recovered from the operating room. The results using the Kirby-Bauer method showed that >50% of *P. aeruginosa* strains were resistant to 12 different antibiotics. The MIC to carbapenems was 64 µg/ml, with 43.1% (25/58) for MEM and 56.8% (33/58) for IMP. Likewise, MBL production was observed in 43% (25/58) for MEM, 2% (1/58) for IMP, and 12% (7/58) for both. Qualitative and quantitative analysis showed that 82% (48/58) of *P. aeruginosa* strains resistant to carbapenems were high biofilm formers using the crystal violet method. Of the high biofilm forming strains, 46.5% (27/58) showed concentrations of total EPS between 2000 and 6000 µg/ml and 27.5% (16/58) showed concentrations of reducing EPS between 316 and 1108 µg/ml. In addition, 75% (44/58) of these strains showed phenotypic activity of twitching motility.

Conclusions. Detection of total sugars, reducing sugars, and the phenomenon of twitching motility are factors that promote the development of biofilms in clinical strains of *P. aeruginosa* resistant to MBL producers to carbapenems. Our data suggest that these factors are involved in biofilm formation, which confer bacterium with the ability to survive, persist, and colonize its host.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, clinical isolates, antibiotic resistance, biofilms, pili.

ADN-girasas y bombas de expulsión activa.^{4,5} Los carbapenémicos (imipenem y meropenem) son antibióticos de amplio espectro empleados para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa*. La resistencia específica a carbapenémicos es atribuida a la falta de permeabilidad en la porina (OprD), a un incremento en la expresión de las bombas de expulsión activa (MexAB-OprD) y a la producción de metaloenzimas.⁵⁻⁷

P. aeruginosa resistente a los carbapenémicos está asociada con la producción de metaloenzimas y tiene la capacidad para hidrolizar todos los antibióticos β-lactámicos, excepto el aztreonam; además, es responsable de los brotes intrahospitalarios en centros terciarios.^{6,8-10} Tres grupos de MBL han sido identificados: clase A (dependientes de serina e inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico, son inducibles y no transferibles), clase B (dependientes de zinc, inhibidas por el EDTA, inducibles o asociadas a plásmidos conjugativos) y clase C (oxacilinasas).^{6,7}

La resistencia a diversos antibióticos y sustancias con actividad antimicrobiana ha sido asociada con la formación de biopelículas bacterianas, así como la fagocitosis por componentes del sistema inmune adaptativo.¹¹ Así mismo, diversas infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa* han sido relacionadas con su capacidad para

desarrollar biopelículas; las cuales, están embebidas en una matriz extracelular formada por proteínas de membrana externa, pili, exopolisacáridos (EPS) y ácidos nucleicos.¹² Los componentes de los EPS involucrados en la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* están codificados principalmente por diversos genes que se encuentran localizados en tres operones independientes: *algU*, *psl* y *pel*.^{12,13}

Los pili tipo IV (T4P) producidos por *P. aeruginosa* presentan un movimiento independiente del flagelo a través de una superficie sólida, por una acción de relajación y contracción, llamado *twitching motility*. Los T4P han sido asociados con la formación de biopelículas, un evento esencial en la colonización del hospedero.¹⁴⁻¹⁶ Estas estructuras filamentosas, localizadas en un polo de la bacteria, están involucradas en diversos mecanismos, como la adhesión a células humanas, formación de microcolonias, agregación bacteriana, receptor por fagos, evasión de la respuesta inmune y señalización celular.¹⁶⁻¹⁸

En las últimas décadas, mundialmente se ha observado la aparición de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos de uso común en el tratamiento de infecciones asociadas con este patógeno.⁹ El objetivo de este trabajo fue evaluar la formación de biopelículas en cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), a través de la cuantificación de los exopolisacáridos (EPS) totales-reductores y su asociación con la expresión fenotípica de los T4P.

MÉTODOS

Cepas bacterianas

Un total de 92 cepas de *P. aeruginosa* fueron seleccionadas y aisladas de muestras clínicas de pacientes pediátricos del HIMFG, durante el período de febrero de 2008 a enero de 2009. La identificación fenotípica de estas cepas se realizó mediante el sistema automatizado Vitek® (bioMérieux), en el Laboratorio Clínico Central y mediante pruebas bioquímicas convencionales, en el Laboratorio de Bacteriología Intestinal del HIMFG. La identificación bioquímica se basó en la producción de catalasa-oxidasa, presencia de pigmentos (piocianina y pioverdina), crecimiento en citrato de sodio, crecimiento a 42°C, reducción de nitratos e hidrólisis de arginina. Las cepas fueron cultivadas en agar BHI (Brain Heart Infusion) (Becton, Dickinson, France) y conservadas en leche descremada a -70°C.

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Los ensayos de susceptibilidad a antibióticos se realizaron por el método de difusión en disco de papel filtro (Kirby-Bauer) de acuerdo con la CLSI-2012 (Clinical Laboratory Standard Institute). Cinco colonias de cada cepa fueron cultivadas en caldo Mueller Hinton (MH) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) a 37°C con agitación constante de 2 a 5 horas hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (NMF). A partir de la suspensión bacteriana se realizó una siembra masiva en placas con agar MH utilizando un hisopo estéril. Inmediatamente, se colocaron los discos de los antibióticos en las placas inoculadas y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Para los ensayos de susceptibilidad se evaluaron un total de 12 antibióticos: piperacilina-tazobactam (100/10 µg), ticarcilina-clavulánico (75/10 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefepime (30 µg), aztreonam (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), meropenem (10 µg) e imipenem (10 µg) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Los halos de inhibición se determinaron y compararon con los cuadros de referencia, de acuerdo con la CLSI-2012. La sensibilidad o resistencia para cada cepa fue reportada con base en los criterios establecidos por la CLSI-2012. Las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (American Type Culture Collection, Rockville USA) fueron utilizadas como controles de calidad.

Determinación de la MIC a carbapenémicos

La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada para las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem (IMP) y meropenem (MEM) por el método de dilución seriada en placas con agar MH, utilizando un replicador Steers, de acuerdo con la CLSI-2012. Diluciones seriadas por triplicado de los antibióticos (IMP y MEM) se utilizaron en un rango de 0.031 a 512 µg/ml. Una suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 1.5×10^8 bacterias/ml se colocó en los pozos del Steers y se replicó en placas con agar MH con las diluciones de los antibióticos.

Identificación de cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo-β-lactamasas

Se emplearon las técnicas de difusión en disco y de sinergismo para evaluar la presencia de MBL, utilizando dos discos de IMP (10 µg) y dos de MEM (10 µg); un disco con cada antibiótico fue impregnado con 10 µl de EDTA (0.5 M).

Como control de reactivo se utilizó un disco con EDTA y sin antibiótico. Los discos se colocaron en una placa de agar MH conteniendo un césped de una suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 1.5×10^8 bacterias/ml. Las cepas de *P. aeruginosa* con halos ≥ 7 mm de diámetro de diferencia entre los discos de IMP+EDTA e IMP sin EDTA se consideraron como productoras de MBL.¹⁰

En la prueba de sinergismo se colocaron discos de IMP y MEM a una distancia de 1.5 cm con respecto a un segundo disco blanco impregnado con 10 μ l de EDTA 0.5 M; se incubaron a 37 °C por 24 horas. Un incremento del halo de inhibición hacia el disco de EDTA fue considerado como una prueba positiva. La cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue utilizada como control negativo y una cepa clínica productora de MBL (IMP y MEM), como positivo.¹⁰

Formación de biopelículas de cepas clínicas de *P. aeruginosa*

Se realizaron análisis cualitativos y cuantitativos de las biopelículas producidas por cepas clínicas de *P. aeruginosa*, de acuerdo con el protocolo descrito por Xicohtencatl-Cortes y colaboradores.¹⁴ Las cepas clínicas de *P. aeruginosa* se incubaron para su crecimiento en caldo soya-tripticasa (TSB), a 37°C y por 24 horas. Para la formación de biopelículas, se inocularon placas de 24 pozos conteniendo 1 ml de TSB, con 50 μ l (1.5×10^8 bacterias/ml) de una suspensión bacteriana de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* e incubadas a 37°C y por 24 horas. Las biopelículas se lavaron con PBS (*Phosphate Buffered Saline*, solución amortiguadora de fosfatos) pH 7.4 y se fijaron con formalina al 2% a 4°C por toda la noche. Posteriormente, la solución fijadora se removió con PBS y las películas se tiñeron con 1 ml de cristal violeta al 1% por 15 min. Se eliminó el exceso de cristal violeta y se añadió 1 ml de metanol al 70% para la cuantificación de las biopelículas a una densidad óptica de 600 nm (DO_{600nm}). Así mismo, las biopelículas, contenidas en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro, se montaron sobre portaobjetos y se visualizaron con un microscopio de luz a 100X. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres tiempos diferentes. *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* K-12 HB101 se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Determinación de carbohidratos totales en biopelículas de *P. aeruginosa*

Se determinó la producción de carbohidratos totales en las biopelículas de las cepas clínicas de *P. aeruginosa*

resistentes a carbapenémicos. Estas fueron desarrolladas por triplicado en placas de 24 pozos, como se describió previamente. Una suspensión bacteriana de 0.5 ml de las biopelículas de cada una de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* fue resuspendida en 1.5 ml de una solución de antrona fría al 2% en ácido sulfúrico. La mezcla de reacción se incubó a punto de ebullición por 10 min y se leyó con un espectrofotómetro a 600 nm. Para determinar la concentración de los azúcares totales, los datos obtenidos se extrapolaron en una curva tipo de glucosa de 0-10,000 μ g/ml, previamente estandarizada.¹⁹

Determinación de carbohidratos reductores en biopelículas de *P. aeruginosa*

Se determinaron por triplicado los carbohidratos reductores en las cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, por el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Los ensayos se realizaron preparando una mezcla de reacción con 5 g de DNS y 150 g de tartrato doble de sodio-potasio, disueltos en 250 ml de agua destilada caliente. Inmediatamente, se adicionaron 100 ml de hidróxido de sodio 2 N y se aforó a un volumen de 500 ml con agua destilada. Una suspensión de 1.5 ml de las biopelículas formadas por las cepas clínicas se mezcló con 2 ml de NaOH 2 N y se incubó en baño maría por 15 min, para la obtención una lisis alcalina. Posteriormente, se mezcló una alícuota de 0.5 ml de la lisis alcalina con 0.5 ml de la solución de DNS. La mezcla se incubó por 10 min en baño maría y se leyó con el espectrofotómetro a 600 nm. Los resultados obtenidos se extrapolaron en una curva tipo de glucosa de 0-2,000 μ g/ml, previamente estandarizada.¹⁹

Ensayos de *twitching motility* en la formación de biopelículas

El procedimiento para determinar el fenómeno de *twitching motility* en las cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Xicohtencatl-Cortes y colaboradores.¹⁴ Previamente, las cepas se crecieron en agar TSA (Agar Soya y Tripticasa), a 37°C y por 24 horas. Una colonia de cada cepa fue inoculada verticalmente en cada pozo de medio PPLO (*Pleuropneumonia-like organism broth*) al 1% de agar bacteriológico. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas y los halos observados se midieron para indicar la producción de *twitching motility*. Las cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* K-12 HB101 fueron los controles positivo y negativo, respectivamente.

Electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE)

Para determinar los perfiles de PFGE, se seleccionaron 16 cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, con una alta producción de EPS reductores asociados con su capacidad para desarrollar biopelículas. La extracción de ADN se realizó en bloques de agarosa, de acuerdo con el protocolo descrito por Morales-Espinosa y colaboradores.²⁰ Se mezclaron 150 µl de una suspensión bacteriana con 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1.8%. El bloque de fusión generado se incubó con 1.5 ml de una solución de lisis EC [Tris-HCl 1 M (pH 8.0), NaCl 1 M, EDTA 0.5 M (pH 8.0), desoxicolato de sodio 0.5%, N-lauril-sarcosinato de sodio 12.5%, RNasa 5 mg/ml y lisozima 10 mg/ml] a 37°C y por 24 horas. Posteriormente, los bloques se incubaron en una solución ESP [Tris HCl 10 Mm (pH 7.4), EDTA 1 Mm, N-lauril-sarcosinato de sodio 0.25% y proteinasa K 0.1 mg/ml]. Finalmente, los bloques se lavaron siete veces con una solución de TE en frío [Tris-HCl 10 Mm (pH 8.0), EDTA 1 Mm (pH 8.0)] y se mantuvieron en la misma solución a 4°C. Los bloques se trataron con 3 ml de la enzima de restricción *SpeI* (30 U) y se incubaron a 37°C por toda la noche.²⁰ Los fragmentos de digestión se separaron mediante un CHEF-Mapper (Bio-rad®), utilizando un gel de agarosa al 1% teñido con 1.0 mg/ml de bromuro de etidio. El corrimiento se realizó con TBE 0.5% (Tris-borato-EDTA) a 10°C y con pulsos de 2-50 s por 20 horas a 6 V/cm.²⁰ El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó utilizando un marcador de peso molecular Lambda Ladder PFGE (Biolabs). El análisis de los patrones de PFGE se realizó empleando el programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versión 2.0). Para expresar en el dendrograma la similitud entre las cepas, se estimó el coeficiente de similitud de Jaccard y el agrupamiento, mediante el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average). Los patrones de PFGE generados se interpretaron con base en los lineamientos de Tenover y colaboradores.²¹

RESULTADOS

P. aeruginosa se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y es considerada un patógeno oportunista. Se caracteriza principalmente por colonizar pacientes inmunocomprometidos. En este estudio se seleccionaron 92 cepas clínicas de *P. aeruginosa*, aisladas de pacientes

pediátricos del HIMFG durante el periodo de febrero de 2008 a enero de 2009. Mediante el sistema ViteK® (bio-Mérieux) y pruebas bioquímicas convencionales se identificaron las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos de diferentes salas de servicio: 30.4% (28/92) de la sala de cirugía, 16.3% (15/92) de la unidad de terapia intensiva pediátrica, 10.8% (10/92) de la sala de pediatría, 9.7% (9/92) de urgencias, 7.6% (7/92) de terapia quirúrgica, 7.6% (7/92) de nefrología, 4.3% (4/92) de oncología, 3.3% (3/92) de terapia de urgencias, 3.3% (3/92) de neurocirugía, 3.3% (3/92) terapia intermedia y 3.3% (3/92) de la unidad de cuidados intensivos neonatales (Figura 1A). Así mismo, las cepas de *P. aeruginosa* fueron recuperadas de diferentes muestras clínicas: 50% (46/92) de orina, 31.5% (29/92) de sangre venosa, 6.5% (6/92) de catéter, 6.5% (6/92) de sonda, 3.2% (3/92) de broncoaspirado y 2.1% (2/92) de cultivo de herida quirúrgica (Figura 1B).

Los resultados obtenidos por el método de Kirby-Bauer en las 92 cepas clínicas de *P. aeruginosa* mostraron una mayor resistencia, de 50%, a 12 antibióticos probados: aztreonam (63%), gentamicina (64.1%), ciprofloxacina (64.1%), levofloxacina (66.3%), ceftazidima (64.1%), ceftriaxona (66.1%), cefotaxima (75%), cefepime (63%), ticarcilina-clavulánico (73.9%) y piperacilina-tazobactam (63%) (Figura 2A). El 63% de las cepas fueron identificadas como multirresistentes, debido a que mostraron resistencia por lo menos a 3 grupos diferentes de antibióticos (Figura 2A). Así mismo, se observó una resistencia de 63% (58/92) a IMP, 60.8% (56/92) a MEM y una resistencia intermedia de 2.17% a MEM. Por otro lado, la MIC para MEM e IMP mostró que 63% (58/92) de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* fueron resistentes a carbapenémicos, confirmando los resultados obtenidos con los perfiles de resistencia por Kirby-Bauer (Figura 2).

La MIC observada en las cepas clínicas de *P. aeruginosa* fue de 43.1% (25/58) a MEM y 56.8% (33/58) a IMP, con una concentración de 64 mg/ml del antibiótico. Además, 8.6% (5/58) de las cepas mostraron una MIC $\geq$ 256 µg/ml a MEM (Figura 2B). La producción de MBL en las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, con el método de difusión en disco (con y sin EDTA) y de sinergismo con doble disco, mostraron resultados similares: 43% (25/58) de las cepas fueron negativas a la producción de ambas MBL, 43% (25/58) fueron productoras de MBL para MEM, 2% (1/58) de MBL para IMP y 12% (7/58) a ambas MBL (Figura 2C).

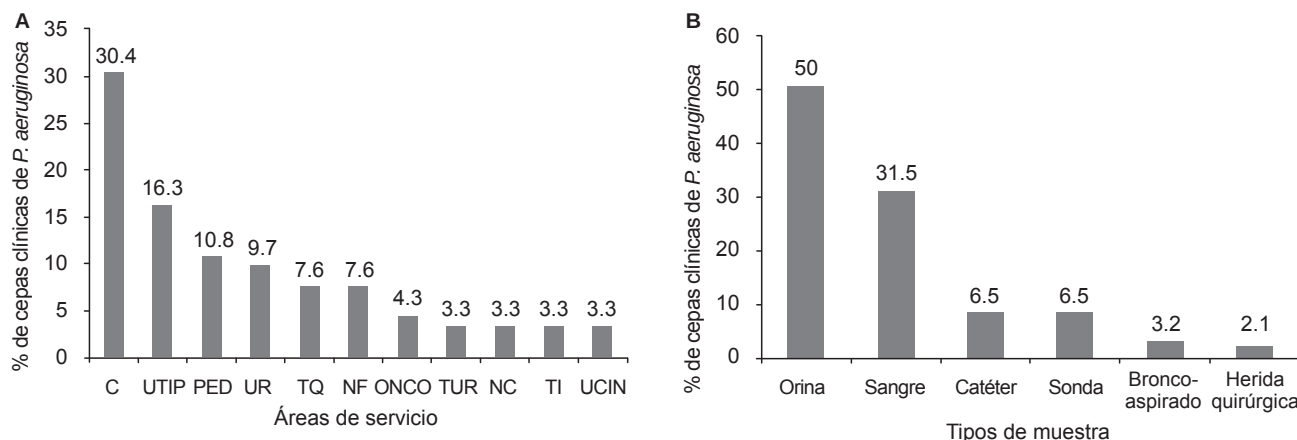


Figura 1. Identificación de cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes y sensibles, en diferentes áreas de servicio (A) y tipos de muestra (B). C: cirugía, UTIP: unidad de terapia intensiva pediátrica, PED: pediatría, UR: urgencias, TQ: terapia quirúrgica, NF: nefrología, ONCO: oncología, TUR: terapia de urgencias, NC: neurocirugía, TI: terapia intermedia y UCIN: unidad de cuidados intensivos neonatales.

Se realizaron análisis cualitativos y cuantitativos de las biopelículas en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, únicamente para las 58 cepas resistentes a carbapenémicos. El 82.7% (48/58) de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* mostraron valores de absorbancia de 8.8 a 212 de DO_{600nm} . Estas se consideraron como altas formadoras de biopelículas (Cuadro 1). Por otro lado, el 15.5 % (9/58) de las biopelículas con valores de absorbancia de 4.4 a 8.7 de DO_{600nm} , se consideraron como medianas formadoras de biopelículas. El 1.7% (1/58) con valores de absorbancia de 1.0 a 4.3 de DO_{600nm} , como bajas productoras de biopelículas (Cuadro 1). De manera interesante resultó que 55% (32/58) de las cepas de *P. aeruginosa* altas formadoras de biopelículas fueron aisladas principalmente de muestras de orina, 10.3% (6/58) de sonda, 6.8% (4/58) de sangre, 3.4% (2/58) de catéter, 3.4% (2/58) de broncoaspirado y 3.4% (2/58) de herida quirúrgica (Figura 3A). Una cepa (1/58) baja formadora de biopelículas fue identificada en sangre. Las cepas medianas formadoras de biopelículas fueron encontradas en diferentes porcentajes: 8.6% (5/58) en muestras de orina, 1.7% (1/58) en sangre, 3.4% (2/58) en catéter y 1.7% (1/58) en broncoaspirado (Figura 3A). Los análisis cualitativos de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* bajas, medianas y altas, mostraron diferentes niveles de formación de biopelículas cuando se observaron por microcopia de luz a 100X (Figura 3B). La cepa de laboratorio K-12 HB101 no productora de biopelícula fue utilizada como control negativo (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los exopolisacáridos totales de las biopelículas con el método

de antrona se extrapolaron en una curva tipo de glucosa de 0-10,000 $\mu g/ml$ con un coeficiente de correlación lineal $r = 0.9924$, previamente estandarizada (datos no mostrados). De acuerdo con el análisis de las biopelículas de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos se clasificaron, en función de la cantidad de EPS detectado, en tres grupos: 18.9% (11/58) como bajas productoras de EPS con una concentración entre 40-577 $\mu g/ml$, 34.4% (20/58) como medianas productoras de EPS con una concentración entre 578-2000 $\mu g/ml$ y 46.5% (27/58) como altas productoras de EPS con una concentración entre 2001-6000 $\mu g/ml$ (Cuadro 1). Por otro lado, la cuantificación de los azúcares reductores fue determinada por el método de DNS, utilizando una curva tipo de glucosa de 0-2,000 $\mu g/ml$ con un coeficiente de correlación lineal de $r = 0.9631$. El 27.5% (16/58) de las biopelículas fueron consideradas como altas productoras de EPS reductores, con valores de 316-1,108 $\mu g/ml$; el 27.5% (16/58), medianas productoras de EPS reductores, con valores de 207-315 $\mu g/ml$; y 44.8% (26/58) bajas productoras de EPS reductores, con valores de 83-206 $\mu g/ml$ (Cuadro 1).

La formación de *twitching motility* fue determinada en 58 cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Los resultados mostraron que 75.8% (44/58) de las cepas produjeron halos de diferentes diámetros, indicando la presencia de los T4P (Figura 4). Interesantemente, 53.4% (31/58) de las cepas aisladas de orina mostraron actividad de *twitching motility*, guardando una alta correlación con la formación de biopelículas (55%) por cristal violeta (Figura

ra 3). Además, este mismo fenómeno se observó en bajos porcentajes en cepas aisladas de catéter, herida quirúrgica y sangre, mientras que en cepas aisladas de broncoaspirado no se observó una actividad de *twitching motility* (Figura 4).

Se realizaron ensayos de PFGE en 16 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y altas productoras de EPS reductores durante la formación de biopelículas. El análisis del dendrograma mostró la presencia de cuatro patrones (A, B, C y D) de restricción con la enzima Spe I, generando perfiles de entre 16 y 20 bandas, con pesos moleculares >436.5 kb y <48.5 kb (Figura 5). El patrón A agrupó el mayor número de cepas, con 68.7% (11/16); el patrón B, con 18.7% (3/16); el patrón C, con 6.2% (1/16); y el patrón D, con 6.2% (1/16) (Figura 5).

DISCUSIÓN

P. aeruginosa es un patógeno nosocomial oportunista de gran relevancia que, debido a su capacidad de resistencia a múltiples antibióticos, dificulta el tratamiento de los pacientes. Su versatilidad para permanecer en el ambiente y en sustratos (como soluciones desinfectantes, jabones, material quirúrgico y de uso común en hospitales), la convierten en una bacteria de interés en infecciones nosocomiales.^{1,22} Una característica importante de esta bacteria es su resistencia natural a diversos antibióticos y su capacidad de adquirir, de manera horizontal, material genético que favorece el intercambio génico entre especies intrahospitalarias, como se ha observado en la transferencia

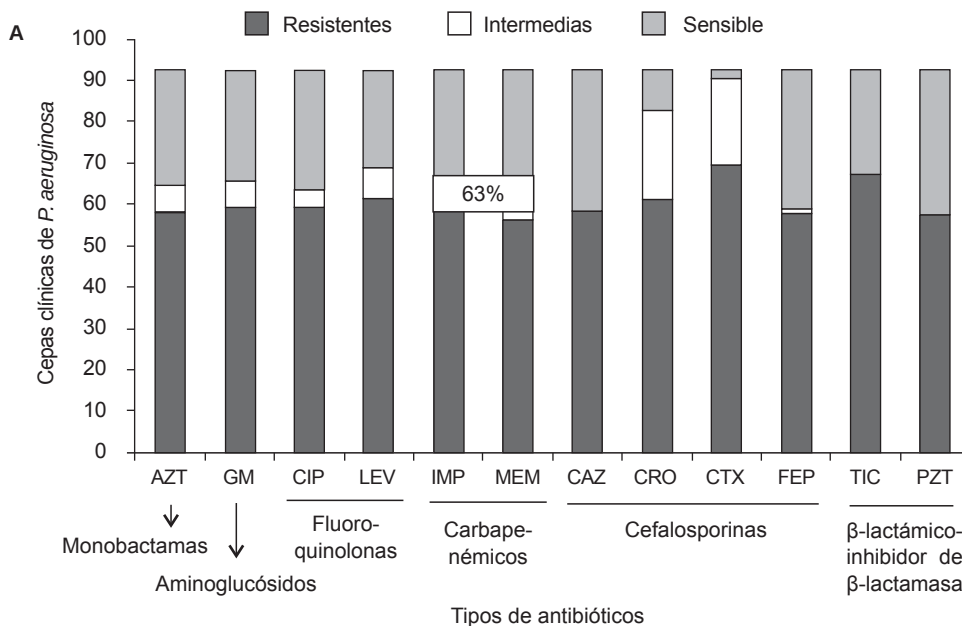
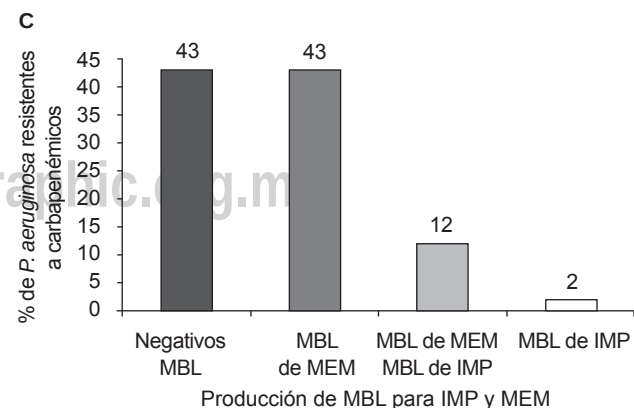
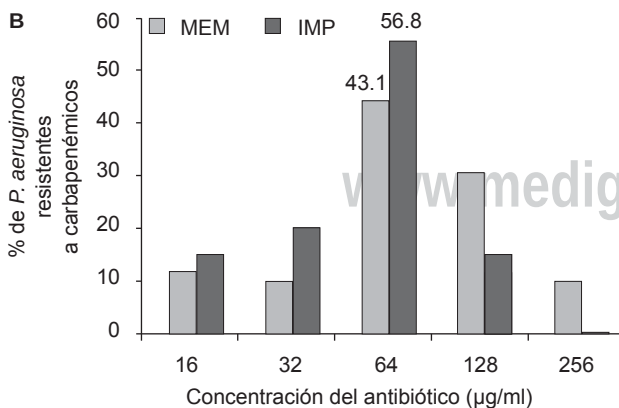


Figura 2. A) Susceptibilidad a 12 antibióticos de cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico. AZT (Aztreonam), GM (Gentamicina), CIP (Ciprofloxacina), LEV (Levofloxacina), IMP (Imipenem), MEM (Meropenem), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CTX (Cefotaxima), FEP (Cefepime), TIC (Ticarcilina-clavulánico) y PZT (Piperacilina-tazobactam). **B)** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de MEM y IMP en 58 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. **C)** Determinación de la producción de metalo-β-lactamasas (MBL) por sinérgico con doble disco para IMP y MEM en 58 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.



de genes de b-lactamasas de espectro extendido y MBL entre patógenos intrahospitalarios, como *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*.²³

Los carbapenémicos son antibióticos utilizados como tratamiento de elección en infecciones originadas por *P. aeruginosa*. En los últimos años, en varios países (África, Europa, México, Centro y Sudamérica),^{8,24,25} se ha observado un incremento de cepas de *P. aeruginosa* resistentes

a carbapenémicos, originando un problema de salud de gran interés para los tratamientos terapéuticos.²⁶⁻²⁸ Los datos obtenidos en este trabajo mostraron un rango de resistencia mayor a 50% para diferentes grupos de antibióticos y el 63% de las cepas fueron identificadas como multi-resistentes. Estos datos correlacionan con la información reportada en otros países de América Latina.^{25,26} Gomes y colaboradores discutieron la importancia que presentaron

Cuadro 1. Cuantificación de las biopelículas de las 58 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos, mediante diversos métodos

Biopelículas	Método de cuantificación		
	Cristal violeta No. cepas (%)	Antrona No. cepas (%)	DNS No. cepas (%)
Bajas	1 (1.7%) DO600nm 1.0-4.3	11 (18.9%) VC= 40-577 µg/ml	26 (44.8%) VC= 83-206 µg/ml
Medianas	9 (15.5%) DO600nm 4.4-8.7	20 (34.4%) VC= 578-2000 µg/ml	16 (27.5%) VC= 207-315 µg/ml
Altas	48 (82.7%) DO600nm 8.8-212	27 (46.5%) VC= 2001-6000 µg/ml	16 (27.5%) VC= 316-1108 µg/ml
Total	58	58	58

VC = valor de corte; DO_{600nm} = densidad óptica a 600 nm; DNS = ácido 3,5-dinitrosalicílico.

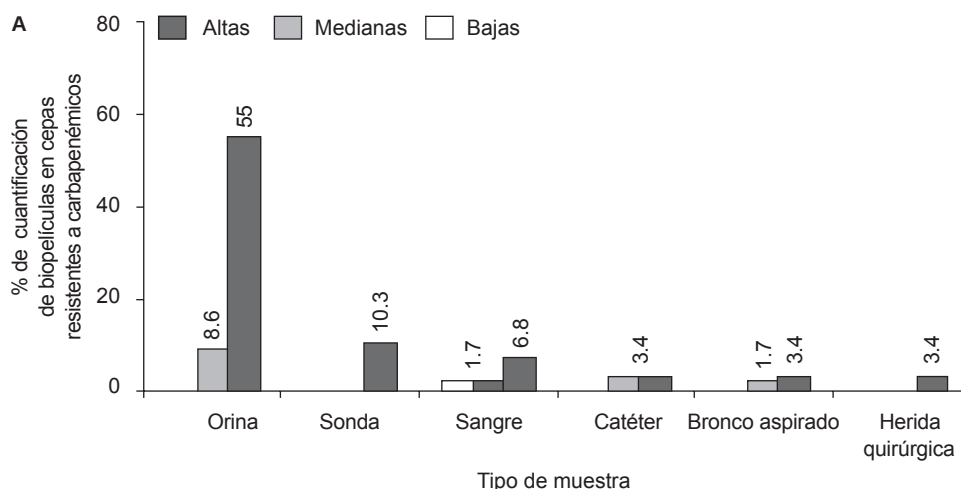


Figura 3. A) Análisis cualitativo del porcentaje de formación de biopelículas en cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. **B)** Análisis cuantitativos de la formación de biopelículas por cristal violeta de cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Las imágenes fueron procesadas por microscopía de luz a 100X. i) Baja formadora de biopelículas (2.31 DO_{600nm}); ii) mediana formadora de biopelículas (4.92 DO_{600nm}) y iii) alta formadora de biopelículas (212 DO_{600nm}).

las cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes, relacionadas con la mortalidad de pacientes hospitalizados con SIDA y con la necesidad de una intervención multidisciplinaria en la prevención y manejo de estas infecciones.²⁹

Las cepas estudiadas fueron recuperadas de niños hospitalizados en las diferentes áreas de servicio del HIMFG, considerado un hospital de tercer nivel. Las salas de cirugía, unidad de terapia intensiva pediátrica y pediatría, fueron las áreas que mostraron un porcentaje mayor de aislamiento de este patógeno nosocomial, con 30.4% (28/92), 16.3% (15/92) y 10.8% (10/92), respectivamente. Además, las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos fueron principalmente aisladas en muestras de orina, con un porcentaje de aislamiento de 50% (46/92). Estos datos guardan una correlación directa con la presencia de *P. aeruginosa* como uno de los principales agentes etiológicos en infección de vías urinarias, sitio donde se disemina para producir infecciones sistémicas.³⁰ Hammami y colaboradores³¹ y Vitkauskienė y colaboradores³² describieron la presencia de cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos en diversas unidades de cuidados intensivos hospitalarios.

El tratamiento de las infecciones nosocomiales causadas por cepas de *P. aeruginosa*, a través del uso excesivo de carbapenémicos (meropenem e imipenem), ha facilitado el surgimiento de una elevada resistencia a estos antibióticos. En los estudios realizados por Kumar y colaboradores, en aislados de *P. aeruginosa* de origen nosocomial en la India, se concluyó que la elevada prevalencia de ce-

pas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de MBL se debió al uso excesivo de los carbapenémicos a nivel hospitalario, durante el tratamiento de las infecciones nosocomiales.³³ Los resultados en las cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico del HIMFG mostraron un perfil de resistencia elevado a meropenem e imipenem de 63.4% (58/92) y 60.8% (56/92), respectivamente. En este trabajo se consideró importante la identificación de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL como un mecanismo de resistencia a estos antibióticos.²⁷ Los resultados mostraron que 43% (25/58) de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos de origen clínico fueron productoras de MBL para MEM, 2% (1/58) productoras de MBL para IMP, 12% (7/58) para ambas MBL y 43% (25/58) negativas para la producción de MBL. De acuerdo con estos datos, las cepas clínicas de *P. aeruginosa* mostraron una alta frecuencia de casos de MBL para meropenem, un carbapenémico ampliamente utilizado para el tratamiento de infecciones intrahospitalarias producidas por este microorganismo.^{9,27}

La producción de MBL en imipenem se encontró en 2%, en comparación con la producción de 43% de MBL para meropenem. Imipenem es un antimicrobiano utilizado en combinación con cilastatina, para favorecer la absorción y biodisponibilidad del antibiótico, aunque ocasiona efectos secundarios, una limitante para el uso restringido en pacientes pediátricos.^{4,28} Las cepas de *P. aeruginosa* fueron productoras de ambas MBL en 12%, lo que indicó una rápida diseminación de la resistencia bacteriana. Las MBL se encuentran codificadas en plásmidos, elementos móviles fáciles de desplazar a nivel hospitalario entre bacterias del mismo género y con otros patógenos que circulan en el ambiente hospitalario.¹⁰ Recientemente, en la India, se ha reportado una prevalencia de 26.9% de cepas de *P. aeruginosa* de origen hospitalario productoras de MBL multirresistentes, con una mortalidad de 34.2% en los pacientes infectados.³³

Además de la producción de MBL, como un factor reconocido y causante de resistencia en cepas nosocomiales, la producción de biopelículas por *P. aeruginosa* dificulta el tratamiento de las infecciones intrahospitalarias debido a su estructura altamente organizada, que funciona como una barrera para la acción antimicrobiana.^{34,35} Las bacterias dentro de las biopelículas son más resistentes a cambios físicos y químicos por diversos agentes quimioterapéuticos; comparado con bacterias en su fase de

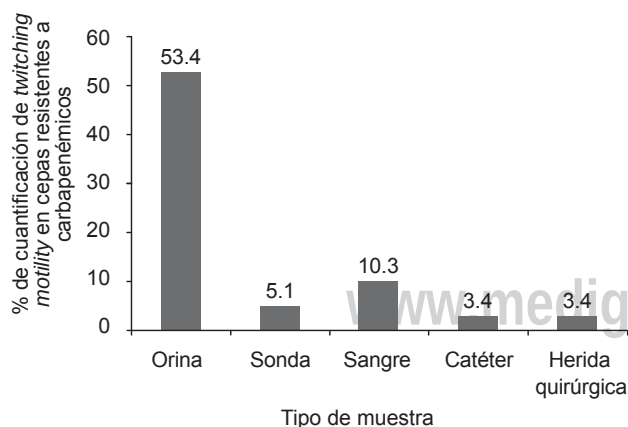


Figura 4. Análisis cualitativos de la actividad de *twitching motility* en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos de diferentes orígenes.

crecimiento platónico.^{34,35} En este estudio se evaluó la formación de biopelículas en cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico resistentes a carbapenémicos mediante tres métodos, cristal violeta, antrona y DNS. Los análisis cualitativos y cuantitativos de los ensayos por cristal violeta, mostraron que 82.7% (48/58) de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos fueron altas formadoras de biopelículas, mientras que 15.5% (9/58) de las cepas fueron consideradas medianas formadoras de biopelículas y 1.7% (1/58) bajas formadoras de biopelículas. Mediante este método se determinó que, de las cepas aisladas de orina, 55% (32/58) fueron clasificadas como cepas altas formadoras de biopelículas. Subramanian y colaboradores realizaron estudios de biopelículas en bacterias aisladas de

muestras de orina, identificando a *P. aeruginosa* como un patógeno involucrado en la formación de biopelículas, con una capacidad para mantener una alta resistencia a diversos antibióticos.^{36,37}

La presencia de EPS totales fue determinada por el método de antrona en las biopelículas de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Así mismo, la cuantificación de los azúcares totales mostró una heterogeneidad en la producción de EPS, con valores de 40-6,000 µg/ml en las 58 cepas de *P. aeruginosa*. El 18.9% (11/58) de las cepas mostraron valores de EPS entre 40-577 µg/ml y fueron clasificadas como bajas formadoras de biopelículas; el 34.4% (20/58) mostraron valores entre 578-2,000 µg/ml y fueron clasificadas como medianas

Coefficiente de similitud = Jaccard
r=0.99556

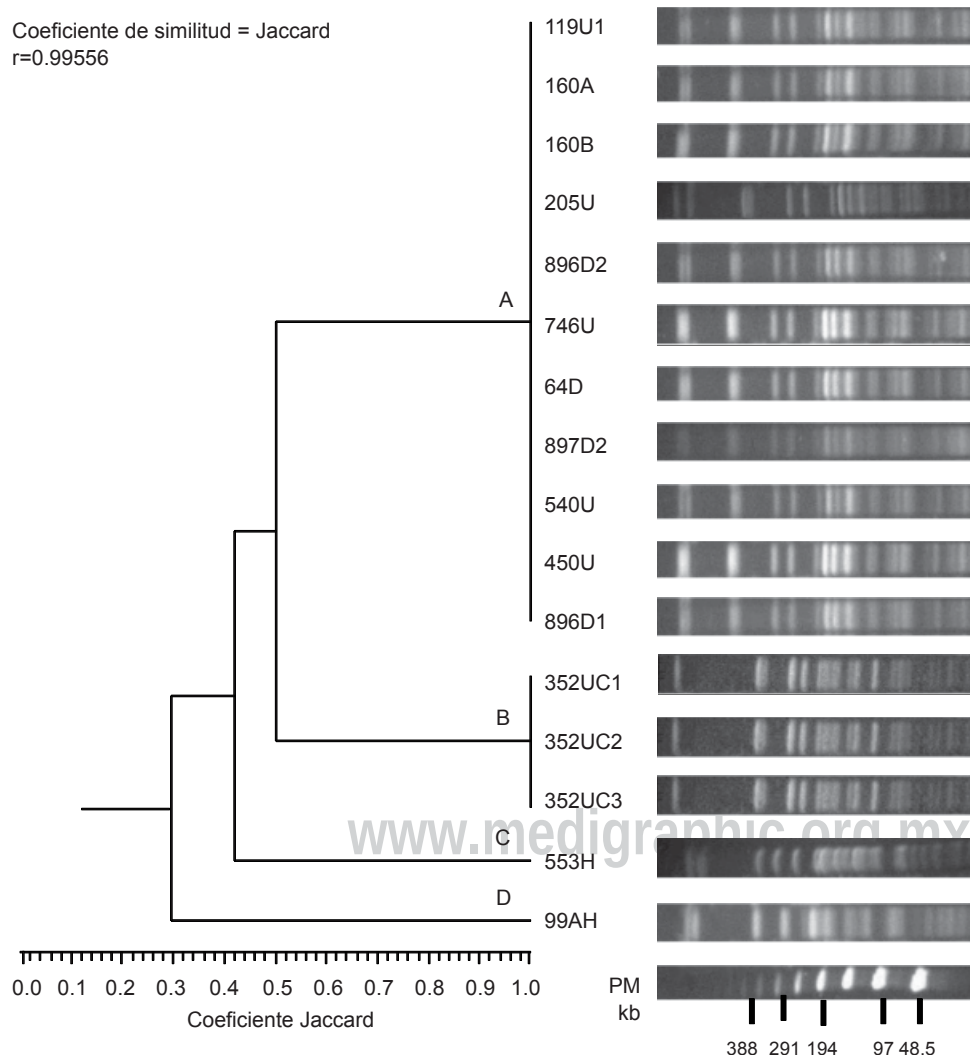


Figura 5. Dendrograma de los 16 productos de PFGE en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos altas formadoras de biopelículas, por el método de DNS.

formadoras de biopelículas; y el 46.5% (27/58) mostraron valores entre 2001-6000 µg/ml y fueron clasificadas como altas formadoras biopelículas. Considerando este mismo criterio, se determinaron los niveles de azúcares reductores involucrados en la formación de biopelículas en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos por el método de DNS. El 44.8% (26/58) de las *P. aeruginosa* fueron clasificadas como bajas formadoras de biopelículas, con valores entre 83-206 µg/ml; el 27.5% (16/58) fueron clasificadas como medianas formadoras de biopelículas, con valores entre 207-315 µg/ml; y 27.5% (16/58) como altas formadoras de biopelículas, con valores entre 316-1108 µg/ml. Independientemente del método de detección empleado para determinar cuantitativamente la formación de biopelículas en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, se observó un alto porcentaje de cepas clasificadas como altas productoras de biopelículas. Así mismo, un alto contenido de azúcares totales-reductores, elementos estructurales de la bacteria que son requeridos para la colonización de su hospedero. Irie y colaboradores realizaron modelos de biopelículas en *P. aeruginosa*, y demostraron la presencia de un mensajero intracelular secundario con actividad de diguanilato-ciclase, que actúa estimulando la producción de los componentes de la matriz polisacárido de la biopelícula y la actividad del operón *psI* para la producción de alginato.³⁸

La actividad de *twitching motility* en *P. aeruginosa* es generada por la presencia de los T4P, involucrados en la formación de biopelículas en superficies bióticas y abióticas.^{39,40} Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que 75.8% de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos produjeron halos de diferentes diámetros, indicando la expresión fenotípica de los T4P. Además, el 53.4% de las cepas clínicas con actividad de *twitching motility* fueron observados en muestras de orina. Esto correlaciona con los altos porcentajes (55%) de las muestras altas formadoras de biopelículas cuantificadas con cristal violeta.

El análisis por PFGE en las 11 cepas agrupadas en el patrón A mostraron un perfil altamente relacionado, con una similitud de 100%, indicando la presencia de la misma clona, de acuerdo con los criterios de Tenover y colaboradores.²¹ El patrón B mostró 66.7% de similitud con el patrón A. Por otra parte, los patrones C y D mostraron una similitud de 46.2 y 59.2% con el patrón A, respectivamente.

Estos valores de similitud fueron considerados como no relacionados.^{41,42} Diversos métodos de tipificación, como PFGE, se han empleado en estudios epidemiológicos en *P. aeruginosa*, con la finalidad de entender la relación clonal de las cepas y su perfil clínico.⁴² Yousefi y colaboradores caracterizaron genotípicamente una colección de clonas de *P. aeruginosa* multirresistentes, aisladas de una unidad hospitalaria de quemados en Irán, e identificaron, por PFGE, la presencia de 12 diferentes genotipos con una similitud mayor de 80%.⁴³ Recientemente, 14 cepas mexicanas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de origen hospitalario mostraron 4 patrones clonales.⁴⁴

Un alto porcentaje de la población infantil que ingresa al HIMFG son pacientes inmunocomprometidos, lo cual favorece la colonización e infección por cepas de *P. aeruginosa* resistentes carbapenémicos. La detección de azúcares totales, azúcares reductores y la actividad de *twitching motility*, son factores que están involucrados en el desarrollo de las biopelículas; además, de la resistencia a carbapenémicos y la producción de MBL en cepas de *P. aeruginosa*. Estos factores pueden facilitar la colonización e infección de este patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Institutos de Salud por la beca PROBEI, otorgada a la QBP Fernanda Citlalli López Montiel. Los autores también agradecen a Ana Karina Espinosa por su asistencia técnica y a Maribel Martínez Carrión por la conservación de las cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Este trabajo fue financiado por recursos obtenidos de Fondos Federales del Hospital Infantil de México Federico Gómez con número de registro HIM/2010/026.

Autor de correspondencia: Dr. Juan Xicohtencatl Cortes
Correo electrónico: juanxico@yahoo.com

REFERENCIAS

1. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959-964.
2. Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:61-66.

3. Breidenstein EBM, De la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol 2011;19:419-426.
4. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genetics and genomics for the study of bacterial resistance. Salud Publica Mex 2009;51(suppl 3):S439-S446.
5. Tan TT. "Future" threat of gram-negative resistance in Singapore. Ann Acad Med Singapore 2008;37:884-890.
6. Sánchez A, Salso S, Culebras E, Picazo JJ. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Esp Quimioter 2004;17:336-340.
7. Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg LC, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. BMC Microbiol 2010;10:217.
8. Pitout JD, Revathi G, Chow BL, Kabera B, Kariuki B, Nordmann P, et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. Clin Microbiol Infect 2008;14:755-759.
9. Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, et al. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:346-352.
10. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol 2005;43:3129-3135.
11. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. Int J Oral Sci 2011;3:55-65.
12. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr Opin Microbiol 2007;10:644-648.
13. Kipnis E, Sawa T, Wiwnwr-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect 2006;36:78-91.
14. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Saldaña Z, Ledesma MA, Puente JL, Girón JA. The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. J Bacteriol 2009;191:411-421.
15. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 1997;192:99-108.
16. Bertrand JJ, West JT, Engel JN. Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2010;192:994-1010.
17. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol 1998;30:295-304.
18. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. Sensors 2012;12:2519-2538.
19. Tapia-Jiménez AM, Castro-Escarpullí G, Enríques-Nieto C. Cuantificación de Exopolisacárido Producido en la Biopelícula de *Aeromonas* spp. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional, México D.F.; 2010.
20. Morales-Espinosa R, Soberón-Chávez G, Delgado-Sapién G, Sandner-Miranda L, Méndez JL, González-Valencia G, et al. Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. PLoS ONE 2012;7:e37459.
21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-2239.
22. Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. Sci Total Environ 2012;426:366-374.
23. Warnes SL, Highmore CJ, Keevil CW. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health. mBio 2012;3:e00489-12.
24. Rodríguez MC, Ruiz del Castillo B, Rodríguez-Mirones C, Romo M, Monteagudo I, Martínez-Martínez L. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Cantabria, Spain, producing VIM-2 metallo-beta-lactamase. Enferm Infec Microbiol Clin 2010;28:99-103.
25. Wirth FW, Picoli SU, Cantarelli V, Gonçalves AL, Brust FR, Santos LM, et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from southern Brazil. Braz J Infect Dis 2009;13:170-172.
26. Tsakris A, Poulou 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;47:3524-3529.
27. Rojas LF, Newton-Sánchez O, Martínez AG, Salinas DY, Ramírez RI, Tinoco FJC, et al. Identificación de genes responsables de resistencia a carbapenémicos en cepas nosocomiales de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de algunos hospitales de México. Enferm Infec Microbiol 2009;29(suppl 1):S58.
28. Romano-Mazzotti L, Gayosso C, Alcántar CMD, Santos-Preciado JI, Alpuche-Aranda CM. Transmisión cruzada: un factor primordial en bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenemes en un hospital pediátrico de tercer nivel. Enferm Infec Microbiol 2008;28(suppl 1):S83.
29. Gomes MZ, Machado CR, da Conceição Mde S, Ortega JA, Neves SM, Lourenco MC, et al. Outbreaks, persistence, and high mortality rates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in a hospital with AIDS-predominant admissions. Braz J Infect Dis 2011;15:312-322.
30. Gales AC, Sader HS, Jones RN; SENTRY Participants Group (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). Diagn Microbiol Infect Dis 2002;44:289-299.
31. Hammami S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ghazzi R, Saidani M, Amine S, Ben Redjeb S. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamase in a kidney transplantation unit. Diagn Pathol 2011;6:106.
32. Vitkauskienė A, Skrodenienė E, Dambrauskienė A, Bakasytė G, Macas A, Sakalauskas R. Characteristics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in patients with ventilator-associated pneumonia in intensive care units. Medicina (Kaunas) 2011;47:652-656.
33. Kumar SH, De AS, Baveja SM, Gore MA. Prevalence and risk factors of Metallo β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in burns and surgical wards in a tertiary care hospital. J Lab Physicians 2012;4:39-42.

34. Sommerfeld RS, Fiegel J. Nutrient dispersion enhances conventional antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:177-181.
35. Lopes SP, Ceri H, Azevedo NF, Pereira MO. Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:260-263.
36. Subramanian P, Shanmugam N, Sivaraman U, Kumar S, Selvaraj S. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *Australas Med J* 2012;5:344-348.
37. De la Fuente-Núñez C, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EB, Horsman S, et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2696-2704.
38. Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR, Hill PJ, Harwood CS, Wozniak DJ. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:20632-20636.
39. Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol* 2012;66:493-520.
40. Jain R, Behrens AJ, Kaeffer V, Kazmierczak BI. Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations. *J Bacteriol* 2012;194:4285-4294.
41. Hall AJ, Fothergill JL, Kaye SB, Neal TJ, McNamara PS, Southern KW, Winstanley C. Intracolonial genetic diversity amongst cystic fibrosis and keratitis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2013;62(Pt 2):208-216.
42. Waters V, Zlosnik JE, Yau YC, Speert DP, Aaron SD, Guttman DS. Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:3341-3350.
43. Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S, Aghazadeh M, Iversen A, Edquist P, et al. A multiresistant clone of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 773 spreading in a burn unit in Orumieh, Iran. *APMIS* 2013;121:146-152.
44. Castillo-Vera J, Ribas-Aparicio RM, Nicolau CJ, Oliver A, Osorio-Carranza L, Aparico-Ozores G. Unusual diversity of acquired β -lactamases in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Mexican hospital. *Microb Drug Resist* 2012;18:471-478.