

RECYT

Año 20 / N° 30 / 2018 / 62–68

Sensibilidad a carbapenemes y producción de carbapenemasas en especies de *Pseudomonas* de origen ambiental

Carbapenems susceptibility and carbapenemase production in *Pseudomonas* species of environmental origin

Adriana E. Quiroga Zingaretti, Eduardo R. Pegels, Valeria M. Almeida,
Margarita E. Laczeski, Patricia N. Oviedo, Marina I. Quiroga*

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Cátedra de Bacteriología,
Departamento de Microbiología. Av. Mariano Moreno 1375, 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

* E-mail: marinaquiroga@fceqyn.unam.edu.ar / dramarinaquiroga@gmail.com

Resumen

Se investigó la sensibilidad a carbapenemes en 238 aislamientos de *Pseudomonas* spp. recuperados de muestras ambientales. En 198 (128 aislamientos con sensibilidad intermedia/resistencia a imipenem (IMP) y/o meropenem (MER) y 70 sensibles a ambos antimicrobianos) de los 238 aislamientos estudiados, se investigó fenotípicamente y genotípicamente la producción de carbapenemasas. El 8,8% de los aislamientos fue resistente a IMP y el 25,2% a MER. Nueve cepas recuperadas de agua mostraron fenotípicamente la producción de MBL. Todas fueron identificadas como *P. otitidis*. En ninguno de estos aislamientos se detectó la presencia de los genes bla_{IMP} , bla_{SPM} , bla_{VIM} , bla_{KPC} , ni bla_{NDM} . La presencia de bacterias resistentes en el ambiente, exigiría acciones de control y saneamiento ambiental dado el impacto que podría representar para la salud pública.

Palabras clave: Carbapenemes; *Pseudomonas*; Medio ambiente; β -lactamasas; Reservorios.

Abstract

Susceptibility to carbapenems in 238 isolates of *Pseudomonas* spp. recovered from environmental samples was investigated. In 198 (128 isolates with intermediate sensitivity / resistance to imipenem (IMP) and / or meropenem (MER) and 70 susceptible to both antimicrobials) of the 238 isolates studied, the production of carbapenemases was investigated phenotypically and genotypically. 8.8% of the isolates were resistant to IMP and 25.2% to MER. Nine strains recovered from water showed phenotypically the production of MBL. All of them were identified as *P. otitidis*. The genes bla_{IMP} , bla_{SPM} , bla_{VIM} , bla_{KPC} , or bla_{NDM} were not detected in none of these isolates. The presence of resistant bacteria in the environment would require actions of control and environmental sanitation due to the impact that could represent on public health.

Keywords: Carbapenems; *Pseudomonas*; Environment; β -Lactamases; Reservoirs.

Introducción

En los últimos años, el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos y los mecanismos de resistencia involucrados, se ha transformado en una importante área de estudio y en un problema mundial de salud pública provocado por el amplio uso de antimicrobianos en medicina humana y veterinaria, así como por su utilización como aditivos en alimentación animal.

La mayoría de los antibióticos se excretan sin modificaciones, lo que ha incrementado la preocupación sobre el impacto potencial de residuos de antibióticos en el medio ambiente que pudieran ejercer una presión selectiva sobre los microorganismos que lo habitan, transformándolos en nichos o reservorios de determinantes de resistencia a antimicrobianos (1).

Entre los microorganismos Gram-negativos, con amplia distribución en el ambiente, se encuentran *Pseudomonas* spp. Estas especies han demostrado poseer la capacidad de adaptarse rápidamente a condiciones desfavorables, como es la presión ejercida por el uso de antimicrobianos, adquiriendo determinantes de resistencia que permite inactivarlos, alterar el sitio blanco de acción de los antibióticos, modificar su pared celular o sobre expresar sistemas de eflujo (2).

En especial y desde hace algunos años, la aparición de cepas resistentes a los β -lactámicos por producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y luego de carbapenemasas (serino y metalo- β -lactamasas, MBL) (3), tanto en aislamientos de origen humano como veterinario, ha dado como resultado una alerta mundial acerca del grave problema que representa su difusión, así como la

necesidad de la búsqueda de reservorios humanos, animales y ambientales (4, 5). Estos microorganismos resistentes se han difundido rápidamente en todo el mundo, exigiendo la implementación de medidas de detección y vigilancia a fin de establecer esquemas terapéuticos apropiados y la aplicación de medidas de control de infecciones.

La presencia de microorganismos ubicuos del medio ambiente (*Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., Enterobacterias) portadores de resistencia a antimicrobianos, y en especial a β -lactámicos, la familia más numerosa y más utilizada empíricamente en la práctica clínica, ya ha sido demostrada en aislamientos clínicos de la provincia de Misiones (6, 7). Sin embargo, se desconoce la difusión de esta resistencia en aislamientos recuperados de otros orígenes.

Por lo tanto, se evidencia la necesidad de conocer e identificar posibles reservorios de estos microorganismos a fin de evaluar la diseminación de bacterias resistentes a antimicrobianos en el medio ambiente con potencial impacto en la salud humana, por lo que se plantea como objetivo de este trabajo conocer la sensibilidad a carbapenemes e investigar la presencia de cepas portadoras de determinantes de resistencia a dichos β -lactámicos en especies de *Pseudomonas* recuperadas de muestras ambientales de diferentes orígenes, en Misiones, Argentina.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 238 aislamientos de colección consecutivos y no repetitivos identificados como *Pseudomonas* spp. recuperadas de muestras ambientales de diferentes orígenes (agrícolas, aguas, alimentos) en la Provincia de Misiones. No participaron del estudio aislamientos clínicos de *Pseudomonas* spp. o recuperados del ambiente hospitalario.

Las cepas se recibieron de distintos laboratorios: Laboratorio de Microbiología Industrial y Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de las Carreras de Ingeniería Química y de Ingeniería de los Alimentos de la FCEQyN, Laboratorio de Bromatología del Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Misiones y cepas de colección de la Cátedra de Bacteriología de la FCEQyN. Los aislamientos de suelos provinieron de plantaciones de yerba y caña de azúcar de la Provincia. Los aislamientos de alimentos estudiados provinieron de muestras obtenidas en ferias francas (frutas, verduras y leche cruda), verdulerías y pollerías de la Provincia. Mientras que, los aislamientos de agua provinieron de muestras obtenidas en arroyos, ribera del río Paraná, perforaciones, tanques de almacenamiento, agua de red y desagües.

Antes de iniciar los estudios, los aislamientos fueron transferidos a placas de agar CLDE por técnica de aislamiento que se incubaron en atmósfera aeróbica a 35° C durante 18-20 horas con la finalidad de corroborar la pureza y viabilidad de las cepas. Posteriormente, fueron transferidos a dos estrías de agar tripticosa soya que se incubaron a 35°- 37° C en aerobiosis durante 18-20 horas

adicionales. Una de las estrías se utilizó para efectuar pruebas bioquímicas mínimas (ausencia de fermentación de glucosa, producción de oxidasa y de pigmento) por métodos convencionales a fin de corroborar la identificación realizada en los laboratorios que proveyeron las cepas. La segunda estría se utilizó para conservar nuevamente la cepa en agua estéril a 4° C.

En todos los aislamientos se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a imipenem (IMP, Merck Sharp & Dohme, Research Laboratories, Rahway, NJ, USA) y meropenem (MER, Aztra-Zéneca, Milán, Italia) por el método de dilución en agar según normas y puntos de corte del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2014 (8) y 2015 (9). Los ensayos se realizaron por duplicado.

Para el estudio fenotípico de la producción de carbapenemasas se seleccionaron las cepas que presentaron sensibilidad intermedia o resistencia a IMP y/o MER. Se incluyeron aislamientos, seleccionados al azar, de cepas sensibles a los dos antimicrobianos estudiados y se trabajó con el método Carba-Blue propuesto por Pires *et al.* (10) modificado por Pasteran *et al.* (11); y con el método propuesto por Dortet *et al.* (12) modificado por Pasteran *et al.* (13) denominado Carba NP.

En todas las cepas que dieron resultados positivos con los métodos de Carba-Blue y/o Carba NP, se ensayaron los métodos de sinergia frente a discos de IMP (10 μ g, Laboratorios Bio-Rad, Francia) y MER (10 μ g, Laboratorios Bio-Rad, Francia) con discos de EDTA (Ácido etilendiaminotetracético, concentración final: 1 μ g/disco) (14) para la búsqueda de metalo- β -lactamasas (MBL).

Tanto para la determinación de la CIM como para los ensayos fenotípicos se incluyeron como controles cepas patrones: *P. aeruginosa* productora de VIM (control positivo) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (control negativo).

Todos los aislamientos donde se observó fenotípicamente la presencia de enzimas carbapenemasas, fueron estudiados genotípicamente a fin de detectar la presencia de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, y *bla*_{NDM}. La elección de los genes a ensayar se realizó en base a la epidemiología de la zona y a la detección previa de estos genes en cepas de entorno clínico.

En todos los ensayos de PCR se trabajó con ADN total obtenido por lisis bacteriana a partir de cultivos jóvenes. Tres a cinco colonias de cada cepa se suspendieron en 100 μ L de agua destilada estéril contenidos en microtubos. Seguidamente, se sometieron las muestras a ebullición en baño María seco (Thermounit Dry Bath CHE-100) durante 10 min, posteriormente se centrifugaron (Microcentrífuga Denville 260D) durante 5 min a 13000 rpm. Se recuperaron los sobrenadantes en nuevos microtubos y se los conservó a -20° C hasta su utilización.

Para la detección de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM} y *bla*_{VIM}, se utilizó la técnica de PCR múltiple y cebadores (Imp-F 5'-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C-3' / Imp-R

5'-CCA AAC YAC TAS GTT ATC T-3'; Spm-F 5'-AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG-3'/Spm-R 5'-ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG-3' y Vim-F 5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT A-3'/ Vim-R 5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3') propuestos por Ellintong *et al.* (15), con el siguiente esquema de ciclado: un ciclo de 5 min a 94° C, 35 ciclos de 15 seg a 94° C, un ciclo de 15 seg a 50° C, un ciclo de 15 seg a 72° C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72° C. La reacción de amplificación fue preparada en un volumen total de 25 µL (23 µL de PCR master mix más 2 µL de ADN molde) incluyendo 0,2 µL de Taq ADN polimerasa (Inbio Highway, Argentina, concentración final 0,04U/µL), 1 µL de la mezcla de dNTP's (Inbio Highway, Argentina) a concentración final de 0,4mM, 1 µL de MgCl₂ (Inbio Highway, Argentina) a concentración final de 1 mM, 1 µL de cada cebador ImpF e Imp R a concentración final de 0,4 mM, 0,25 µL de cada cebador SpmF, SpmR, VimF y Vim R a concentración final de 0,1mM, 2,5 µL de PCR buffer 1X (concentración final) y 15,3 µL de agua ultrapura. Se utilizaron como controles positivos, las cepas: *P. aeruginosa* portadora del gen *bla*_{IMP}, *P. aeruginosa* portadora del gen *bla*_{SPM}, y *P. aeruginosa* portadora del gen *bla*_{VIM} y como control de reacción, 25 µL de mezcla de reacción de PCR sin ADN molde.

Para la detección de *bla*_{KPC}, se utilizó la técnica de PCR simple y cebadores (Kpc-F 5'-ATGTCAGTATCGCCCGTGT-3'/ Kpc-R 5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCA-3') propuestos por Akpaka *et al.* (16), según el siguiente esquema de ciclado: un ciclo de 5 min a 95° C, 29 ciclos de 1 min a 95° C, un ciclo de 1 min a 55° C, un ciclo de 1 min a 72° C y un ciclo de extensión final de 10 min a 72° C. Como control positivo se utilizó la cepa patrón: *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen *bla*_{KPC}.

Para la detección de *bla*_{NDM}, se utilizó la técnica de PCR simple y cebadores (Ndm-F 5'-GGAATGGCTCATCACGATCA-3'/ Ndm-R 5'-GCATTAGCCGCTGCATTGAT-3') propuestos por Pasteran *et al.* (17), según el siguiente esquema de ciclado: un ciclo de 5 min a 94° C, 29 ciclos de 1 min a 95° C, un ciclo de 1 min a 58° C, un ciclo de 1 min a 72° C y un ciclo de extensión final de 10 min a 72° C. Como control positivo, se utilizó la cepa patrón *Providencia rettgeri* portadora del gen *bla*_{NDM}.

Tanto para la detección de *bla*_{KPC} como de *bla*_{NDM}, las reacciones de amplificación fueron preparadas en un volumen total de 20 µL (19 µL de PCR master mix más 1 µL de ADN molde) incluyendo 0,1 µL de Taq ADN polimerasa (Inbio Highway, Argentina, concentración final 0,025U/µL), 0,4 µL de la mezcla de dNTP's (Inbio Highway, Argentina) a concentración final de 0,2 mM, 1,2 µL de MgCl₂ (Inbio Highway, Argentina) a concentración final de 1,5 mM, 1 µL de cada cebador a concentración final de 0,25 mM, 2 µL de PCR buffer 1X (concentración final) y 13,3 µL de agua ultrapura. Como control de reacción se utilizaron 20 µL de mezcla de reacción de PCR sin ADN molde.

Los controles positivos utilizados fueron cepas salvajes provistas por el Laboratorio de Resistencia Microbiana, Facultad Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo GENE PRO: TC-E y los resultados de los productos de amplificación obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 2%. La corrida electroforética se realizó a 4,4 V/cm durante 30 min en una cuba SubSystem 70 modelo E-0310 (Labnet Internacional, Inc.) conectada a una fuente de poder Power Station 300Plus (Labnet Internacional, Inc.). Para la visualización de las bandas, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (BrEt) (10 mg/mL). Las muestras se observaron bajo luz UV y las corridas fueron fotografiadas con cámara digital Canon Power Shot G10.

Los aislamientos donde se detectó la producción de carbapenemasas fueron identificados en el Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, del Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, por espectrometría de masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF).

Resultados

Se inició el estudio con 288 aislamientos: 92 de suelos, 100 de alimentos y 96 de agua. Luego de la siembra para controlar su pureza y viabilidad y corroborar la identificación bioquímica, continuaron en estudio 238 aislamientos confirmados como *Pseudomonas* spp. (74 de suelos, 87 de alimentos y 77 de agua).

Al realizar la CIM, se observó que 81,1% (193/238) de los aislamientos eran sensibles a IMP (rango: ≤0,25-2 µg/mL), 10,1% (24/238) presentaban sensibilidad intermedia (4 µg/mL) y 8,8% (21/238) eran resistentes a este antimicrobiano (rango: 8-≥32 µg/mL). Mientras que para MER se observó que 52,5% (125/238) de los aislamientos eran sensibles (rango: ≤0,25-2 µg/mL), 22,3% (53/238) mostraban sensibilidad intermedia (4 µg/mL) y 25,2% (60/238) eran resistentes (rango: 8-≥32 µg/mL). En ambos casos según los puntos de corte del CLSI (Sensible: ≤ 2 µg/mL, Intermedio: 4 µg/mL, Resistente ≥ 8 µg/mL).

Doce de las cepas resistentes a IMP fueron recuperadas de agua, siete de suelo y dos de alimentos. Mientras que, 30 cepas recuperadas de alimentos, 18 de suelo y 12 de agua fueron resistentes a MER.

El estudio fenotípico de la producción de carbapenemasas se realizó sobre 198 (128 cepas que presentaron sensibilidad intermedia o resistencia a IMP y/o MER y 70 cepas sensibles a los dos antimicrobianos estudiados) de los 238 aislamientos seleccionados (Tabla 1).

Tabla 1: Sensibilidad a carbapenemes de *Pseudomonas* ambientales estudiadas fenotípicamente para la búsqueda de producción de carbapenemasas.

	N° de Cepas				Porcentaje
	Alimentos	Suelos	Agua	Total	
S a IMP/MER	17	28	25	70	35,3
Solo S a IMP	45	19	19	83	41,9
Solo S a MER	6	2	7	15	7,6
R a IMP/MER	9	10	11	30	15,2
Total	77	59	62	198	100

S: Sensible, R: Resistente, IMP: Imipenem, MER: Meropenem

De las 198 cepas estudiadas fenotípicamente, nueve dieron resultados positivos con los métodos de Carba-NP y Carba-Blue (4,5%), siendo recuperadas de agua (cinco de agua de perforación y cuatro de agua de red).

Cuatro de los nueve aislamientos fueron resistentes solo a MER, dos solo a IMP, dos a MER e IMP y uno fue sensible a ambos carbapenemes. Todos fueron identificados por MALDI-TOF como *P. otitidis*.

Los nueve aislamientos dieron resultados positivos en los ensayos de sinergia con discos de EDTA, indicando la presencia de carbapenemasas tipo MBL.

En ninguno de los nueve aislamientos se detectó la presencia de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, ni *bla*_{NDM}.

Discusión

La colección de todos los genes presentes en microorganismos patógenos y no patógenos que, de manera directa o indirecta, contribuyen a la resistencia antibiótica ha sido denominado “resistoma antibiótico” (18).

Mucho antes de que surgiera la era antibiótica, las comunidades bacterianas naturales han interactuado con los antibióticos y desarrollado mecanismos de resistencia que le han permitido su adaptación y proliferación en distintos ambientes (19, 20).

Así, la existencia de microorganismos ambientales portadores de genes de resistencia, favorecida por su rápida multiplicación y su capacidad de intercambiar material genético, los han convertido en potenciales fuentes de genes capaces de ser transferidos a patógenos humanos.

Hoy en día, el uso, en muchos casos sin control adecuado, de antibióticos en medicina humana y veterinaria y en la agricultura ha provocado un peligroso aumento de bacterias resistentes a antibióticos, generando un importante problema de salud pública. El incremento de la resistencia a antibióticos es un claro ejemplo del impacto que tiene la actividad humana sobre los ecosistemas.

Durante la última década, varios estudios han puesto de manifiesto la presencia de microorganismos resistentes en el medio ambiente como reservorios de genes de resistencia de interés clínico (21, 22, 23).

La provincia de Misiones no ha quedado exenta de la realidad mundial, la presencia de microorganismos de

interés clínico portadores de genes de resistencia y en muchos casos multirresistentes ha sido descrita en diversas publicaciones (24, 25) así como en microorganismos recuperados de alimentos (26).

Nuestros resultados muestran la presencia de *Pseudomonas* resistentes a imipenem y meropenem en 238 aislamientos ambientales estudiados. Esta resistencia se presentó de diferentes maneras: algunas cepas solo fueron resistentes a uno de los dos antimicrobianos estudiados y otras a ambos antimicrobianos.

Dichos resultados son semejantes a los obtenidos por Kittinger *et al.* (27), quienes estudiando aislamientos de *Pseudomonas* recuperados del Danubio hallaron que el mayor porcentaje de cepas (30,4%) eran resistentes a meropenem siendo menor la resistencia a imipenem (2,1%).

Numerosos trabajos (28, 29, 30) han puesto de manifiesto que tanto las fuentes de agua fresca (27) como las tratadas (31, 32) son reservorios ambientales de microorganismos resistentes e incluso que los tratamientos utilizados podrían ser vehículos potenciales para la selección e incremento de bacterias multirresistentes en el ambiente acuático.

También, al igual que otros autores (33), hemos detectado la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en cepas recuperadas de muestras de suelos. Diversos autores han planteado que la actividad humana actúa como un enriquecimiento selectivo de bacterias resistentes en el ambiente (29) así como el uso de efluentes de plantas de tratamiento de agua utilizado para irrigación de suelos (34, 35).

Considerando no solo el uso de efluentes contaminados para riego, sino también que cuando el hombre o los animales consumen antibióticos entre el 30% al 90% se excretan sin modificaciones en el ambiente (36), la presencia de bacterias resistentes en agua y alimentos de consumo humano que hemos observado, muestra una posible vía de transmisión. Ha sido demostrado que los genes de resistencia a antimicrobianos son detectables por PCR cuantitativa hasta 16 meses después de estar expuestos al medio ambiente (37), lo que aumenta sus posibilidades de diseminación.

La búsqueda fenotípica de carbapenemasas mostró la presencia de metalo-enzimas en 9 aislamientos de *P. otitidis* recuperados de agua. En ninguno de los 9 aislamientos detectamos la presencia de los genes codificantes de las MBL estudiadas (IMP, VIM, SPM-1, NDM, KPC).

Sin embargo, se ha descrito que *P. otitidis* posee una MBL constitutiva denominada POM-1, que pertenece a la subclase B3 y es activa frente a carbapenemes y otros β -lactámicos (38, 39), lo que podría ser una explicación de la detección de producción de MBL en nuestros aislamientos. Por otra parte, este microorganismo ha sido asociado con infecciones óticas en humanos (otitis aguda externa, otitis media aguda, otitis media supurativa crónica) (40), siendo encontrado en ambientes acuáticos (41).

Es de importancia considerar la detección de una cepa

fenotípicamente productora de MBL, pero que mostraba sensibilidad tanto a imipenem como a meropenem. Otros autores (42) se han referido al riesgo que representan, ya que habría una sub-estimación de su prevalencia, pudiendo actuar como reservorios silenciosos, con habilidad para diseminarse.

El porcentaje de aislamientos fenotípicamente productores de MBL que hemos detectado (4,5%) es solo ligeramente superior al informado por Pappa *et al.* (3,8%) (43) quienes estudiaron cepas de *P. aeruginosa* recuperadas de diferentes ambientes acuáticos en Grecia.

Conclusiones

Nuestro estudio muestra la presencia de aislamientos de *Pseudomonas* de origen ambiental resistentes a imipenem y/o meropenem. La resistencia a carbapenemes observada podría deberse a mecanismos distintos a la producción de MBL tipo IMP, VIM, SPM-1, NDM o KPC tales como impermeabilidad por déficit en la expresión de proteínas de la membrana externa, la sobreexpresión de sistemas de eflujo de tipo MexAB-OprM o la coexistencia de más de uno de estos mecanismos.

Hemos detectado aislamientos de *P. otitidis* productores de MBL distintas a las estudiadas, lo que nos obliga a profundizar en su caracterización genotípica y su perfil de sensibilidad a antimicrobianos.

La presencia de bacterias resistentes en el ambiente en la provincia de Misiones que hemos detectado, exigiría acciones de control y saneamiento ambiental dado el impacto que podría representar para la salud pública.

Agradecimientos: Al Dr. Gabriel Gutkind e integrantes del Laboratorio de Resistencia Microbiana, Facultad Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires por la provisión de las cepas salvajes productoras de carbapenemasas. Al Dr. Carlos Vay del Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, del Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, por la identificación de las cepas por espectrometría de masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF).

Bibliografía

- Zhang, X.X., Zhang, T., y Fang, H.H.P. *Antibiotic resistance genes in water environment*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 397–414, 2009.
- Nicolau, C.J. y Oliver, A. *Carbapenemasas en especies del género Pseudomonas*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 28(1):19–28, 2010.
- Hong, D.J., Bae, I.K., Jang, I.H., Jeong, S.H., Kang, H.K., y Lee, K. *Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Chemother. 47(2):81–97, 2015.
- Li, D., Yang, M., Hu, J.Y., Zhang, J., Liu, R.Y., Gu, X., Zhang, Y., y Wang, Z.Y. *Antibiotic resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river*. Environ. Microbiol. 11:1506–1517, 2009.
- Martinez, J.L. *Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants*. Environ. Pollut. 157:2893–2902, 2009.
- Galloso, P.C., Lezcano, M.T., y Quiroga, M. *Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de Pseudomonas aeruginosa productoras de metalo- β -lactamasas*. Rev. Cienc. Tecnol. 14:8–13, 2010.
- Quiroga, M., Cáceres, M.G., Stefañuk, R., Villalba, V., Rodríguez, M.M., Radice, M., Gutkind, G., y Vergara, M. *Characterization of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli from Posadas, Misiones, Argentina*. J. Chemother. 20(1):130–133, 2008.
- Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-four informational supplement*. CLSI document M100-S24. Vol. 34, N°1, Wayne, Pennsylvania, USA, 2014.
- Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement*. CLSI document M100-S25. Vol. 35, N°3, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.
- Pires, J., Novais, A., y Peixe, L. *Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures*. J. Clin. Microbiol. 51:4281–4283, 2013.
- Pasteran, F., Veliz, O., Ceriana, P., Lucero, C., Rapoport, M., Albornoz, E., Gomez, S., y Corso, A. *Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram negative bacilli*. J. Clin. Microbiol. 53:1996–1998, 2015.
- Dortet, L., Poirel, L., y Nordmann, P. *Rapid detection of carbapenemase-producing Pseudomonas spp.* J. Clin. Microbiol. 50:3773–3776, 2012.
- Pasteran, F., Tijet, N., Melano, R., y Corso, A. *Simplified protocol for Carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures*. J. Clin. Microbiol. 53(12):3908–3911, 2015.
- Lucena, A., Dalla Costa, L.M., Nogueira Kda, S., Matos, A.P., Gales, A.C., y Raboni, S.M. *Comparison of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 32(10):625–630, 2014.
- Ellington, M.J., Kistler, J., Livermore, D.M., y Woodford, N. *Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases*. J. Antimicrob. Chemother. 59:321–322, 2007.
- Akpaka, P.E., Swanston, W.H., Ithemere, H.N., Correa, A., Torres, J.A., Tafur, J.D., Montealegre, M.C., Quinn, J.P., y Villegas, M.V. *Emergence of KPC-producing Pseudomonas aeruginosa in Trinidad and Tobago*. J. Clin. Microbiol. 47(8):2670–2671, 2009.
- Pasteran, F., Albornoz, E., Faccione, D., Gomez, S., Valenzuela, C.,

- Morales, M., Estrada, P., Valenzuela, L., Matheu, J., Guerriero, L., Arbizú, E., Calderón, Y., Ramon-Pardo, P., y Corso, A. *Emergence of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Guatemala*. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1795–1797, 2012.
18. Wright G.D. *The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:175–186, 2007.
 19. Aminov, R.I., y Mackie, R.I. *Evolution and ecology of antibiotic resistance genes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:147–161, 2007.
 20. Davies, J., Davies, D. *Origins and evolution of antibiotic resistance*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74:417–433, 2010.
 21. Hu, Y., Yang, X., Li, J., Lv, N., Liu, F., Wu, J., Lin, I.Y., Wu, N., Weimer, B.C., Gao, G.F., Liu, Y., y Zhu, B. *The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(22):6672–6681, 2016.
 22. von Wintersdorff, C.J., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H., y Wolffs, P.F. *Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer*. *Front. Microbiol.* 7:173, 2016.
 23. Seyfried, E.E., Newton, R.J., Rubert, K.F., Pedersen, J.A., y Mc Mahon, K.D. *Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline*. *Microb. Ecol.* 59:799–807, 2010.
 24. Quiroga, M., Cáceres, M.G., Stefañuk, R., Villalba, V., Rodríguez, M.M., Radice, M., Gutkind, G., y Vergara, M. *Characterization of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli from Posadas, Misiones, Argentina*. *J. Chemother.* 20(1):130–133, 2008.
 25. Quiroga, M., Villalba, V., Lezcano, M.T., Gerula, P., Valle, M., y Vergara, M. *Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases producing strains isolated from a public hospital in Posadas, Misiones, Argentina*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 20(4):313–314, 2002.
 26. Martín Talavera, B., Benassi, F., von Spetch, M., Quiroga, M., García, M., Pucciarelli, A., Zubreski, E., Laczeski, M., y Gutkind, G. *Susceptibilities to carbapenems and presence of cphA gene on food-borne Aeromonas*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49(4):677–682, 2006.
 27. Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A.J., Farnleitner, A.H., Kirschner, A., y Zarfel, G. *Antibiotic resistance patterns of Pseudomonas spp. isolated from the river Danube*. *Front. Microbiol.* 7:586, 2016.
 28. Zhang, X.X., Zhang, T., y Fang, H.H.P. *Antibiotic resistance genes in water environment*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:397–414, 2009.
 29. Igbinsosa, I.H., Nwodo, U.U., Sosa, A., Tom, M., y Okoh, A.I. *Commensal Pseudomonas species isolated from wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic resistant determinants*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 9(7):2537–2549, 2012.
 30. Igbinsosa, I.H., y Okoh, A.I. *Antibiotic susceptibility profile of Aeromonas species isolated from wastewater treatment plant*. *ScientificWorldJournal.* 2012:764563, 2012.
 31. Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K., y Fudala-Ksiazek, S. *Antimicrobial resistance of Pseudomonas spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22(24):19823–19834, 2015.
 32. Hong, P.Y., Al-Jassim, N., Ansari, M.I., y Mackie, R.I. *Environmental and public health implications of water reuse: antibiotics, antibiotic resistant bacteria, and antibiotic resistance genes*. *Antibiotics (Basel).* 2(3):367–399, 2013.
 33. Chen, C., Li, J., Chen, P., Ding, R., Zhang, P., y Li, X. *Occurrence of antibiotics and antibiotic resistances in soils from wastewater irrigation areas in Beijing and Tianjin, China*. *Environ. Pollut.* 193:94–101, 2014.
 34. Gatica, J., y Cytryn, E. *Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20(6):3529–3538, 2013.
 35. Negreanu, Y., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., y Cytryn, E. *Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils*. *Environ. Sci. Technol.* 46(9):4800–4808, 2012.
 36. Singer, A.C., Shaw, H., Rhodes, V., y Hart, A. *Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators*. *Front. Microbiol.* 7:1728, 2016.
 37. Hong, P.Y., Yannarell, A.C., Dai, Q., Ekizoglu, M., y Mackie, R.I. *Monitoring the perturbation of soil and groundwater microbial communities due to pig production activities*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:2620–2629, 2013.
 38. Borgianni, L., De Luca, F., Thaller, M.C., Chong, Y., Rossolini, G.M., y Docquier, J.D. *Biochemical characterization of the POM-1 metallo- β -lactamase from Pseudomonas otitidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(3):1755–1758, 2015.
 39. Thaller, M.C., Borgianni, L., Di Lallo, G., Chong, Y., Lee, K., Dajcs, J., Stroman, D., y Rossolini, G.M. *Metallo-beta-lactamase production by Pseudomonas otitidis: a species-related trait*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(1):118–123, 2011.
 40. Clark, L.L., Dajc, J.J., McLean, C.H., Bartell, J.G., y Stroman, D.W. *Pseudomonas otitidis sp. nov., isolated from patients with otic infections*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:709–714, 2006.
 41. Lee, K., Kim, C.K., Yong, D., Yum, J.H., Chung, M.H., Chong, Y., Thaller, M.C., y Rossolini, G.M. *POM-1 metallo- β -lactamase-producing Pseudomonas otitidis isolate from a patient with chronic otitis media*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72(3):295–296, 2012.

42. **Picão, R.C., Carrara-Marroni, F.E., Gales, A.C., Venâncio, D.E.X., Bronharo Tognim, M.C., y Pelayo, J.** *Metallo- β -lactamase-production in meropenem-susceptible Pseudomonas aeruginosa isolates: risk for silent spread.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 107(6):747–751, 2012.
43. **Pappa, O., Vantarakis, A., Galani, s A., Vantarakis, G., y Mavri-dou, A.** *Antibiotic resistance profiles of Pseudomonas aeruginosa isolated from various Greek aquatic environments.* FEMS Microbiol. Ecol. 92(6):fiw086, 2016.

Recibido: 09/08/2017

Aprobado: 06/07/2018