

cepa de tipo silvestre (MB5919) y una isogénica en la que múltiples bombas de flujo de salida se habían interrumpido genéticamente. La MBL imipenem beta-lactamasa-1 (IMP-1), obtenida a partir de un aislado clínico se introdujo en el par de cepas mediante el siguiente proceso:

Se extrajo ADN plasmidico (que codificaba IMP-1) de CL 5673 (IMP-1, cepa clínica de *P. aeruginosa*) mediante técnicas convencionales. El ADN plasmidico 5 se transformó en cepas isogénicas MB5919 (oprD+, flujo de salida+, AmpC inducible) y MB5890 (oprD+, flujo de salida-, AmpC inducible) parentales mediante electroporación. Estas cepas transformadas se sembraron en placas de agar Muller-Hinton con ajuste de cationes que contenían ceftazidima a 32 µg/ml (MB5919) y 16 µg/ml (MB5890) para seleccionar las células 10 en las que el plásmido que expresaba IMP-1 se introdujo satisfactoriamente, dando como resultado la resistencia a la ceftazidima. Se usó electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR para la IMP-1 de los transformantes satisfactorios para comparar con el control y con la cepa original de la que se obtuvo el plásmido, confirmando la transferencia del gen de IMP-1 (no se muestran datos).

Se realizaron concentraciones mínimas inhibitorias de antibióticos centinela para controlar la calidad de las nuevas cepas. La MIC (concentración mínima inhibitoria) del imipenem subió drásticamente, como se esperaba, debido a la presencia de la IMP-1, también la del meropenem (MEM) y la ceftazidima (CAZ). El conjunto de flujo de salida+/- se comportó de forma similar con antibióticos no BL a cómo debe hacerlo con la cepa de flujo de salida- que 20 presenta una sensibilidad aumentada al cloranfenicol (CAM) y el ciprofloxacino (Cipro).

MIC[ug/ml]								
		plasmido CL 5673 (IMP-1)		plásmido pFlp-Vim1		plásmido pFlp-Vim2		
	MB 5919	MB 5890	MB 9798	MB 9799	MB 9861	MB 9862		
OprD	OprD+	OprD+	OprD+	OprD+	OprD+	OprD+	OprD+	OprD+
flujo de salida	flujo de salida+	flujo de salida-	flujo de salida+	flujo de salida-	flujo de salida+	flujo de salida-	flujo de salida+	flujo de salida-
	MB 5919 tipo silvestre	MB 5890	Plásmido MB 5919 isogénica Trans IMP1	plásmido MB 5890 Trans IMP1	Plásmido MB 5919 isogénica Trans pFlp-Vim1	MB 5890 Trans pFlp-Vim1	Plásmido MB 5919 isogénica Trans pFlp-Vim2	plásmido MB 5890 Trans pFlp-Vim2
Imipenem	4	2	64	32	>64	64	>64	32
Meropenem	2	0,5	>64	64	>64	64	>64	32
Pipercilina	2	1	4	4	>256	128	>256	128
Cloranfenicol	>64	1	>64	1	>64	2	>64	1
Ciprofloxacino	0,5	0,008	0,5	0,008	1	0,008	1	0,008
CAZ	1	0,5	256	256	>256	>256	128	64
Azitromicina	16	1	16	2	32	1	32	1

Después, el conjunto de cepas se usó como un par para determinar el efecto de los inhibidores de metalo-β-lactamasas de Formula I sobre la MIC del imipenem y/o la ceftazidima. Una concentración fija de antibiótico se incluyó en ensayos de MIC de 25 microdilución en caldo convencionales, por lo general a la concentración del valor crítico del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). También se incluyó una cantidad fija de