



**Universidad De Oriente
Nucleo Bolivar
Escuela De Ciencias De La Salud
"Dr. Francisco Battistini Casalta"
Dpto. Parasitologia Y Microbiologia**

**EFFECTIVIDAD DEL ACIDO ETILENDIAMINOTETRACETICO
(EDTA) Y DEL MERCAPTOACETICO DE SODIO (SMA) EN LA
DETECCIÓN DE METALO β -LACTAMASAS EN *Pseudomonas
aeruginosa*.**

Prof. (es) Asesor (es):
Dr. Armando Guevara
Lcda. Ana Gamboa

Trabajo de Grado presentado por:
Br (es): Machado Martínez
María Fernanda.
C.I. 18.238.926
Vera Ortega
Mariangel José
C.I. 17.747.746

Como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Bioanálisis

Ciudad Bolívar, Febrero 2010



ÍNDICE

ÍNDICE	ii
DEDICATORIA	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS	14
Objetivo General	14
Objetivos Especificos.....	14
METODOLOGÍA	15
Diseño de la Investigación	15
Muestra.....	15
MÉTODOS	18
1.- Elaboración de los discos de EDTA/SMA: (Apéndice A)	18
2.-Método de Sinergismo de Doble Disco	18
3.-Método de Discos Combinados	20
Análisis e Interpretación de Resultados	23
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÉNDICE	57



DEDICATORIA

A mi Dios, por darme la vida y salud y permitirme emprender todos mis propósitos y poder llegar a la meta.

A mis padres, Fernando y Damelys, porque siempre han sido y serán lo mejor de mi vida, mi mejor apoyo, las personas que siempre han estado cuando más lo necesito, para darme la fortaleza de no caer y poder seguir adelante, dándome ese amor y cariño incondicional que siempre me han dado. Este logro es de ustedes.

A mis hermanas Damelys del Carmen, Dannys, Dayana y Desiree por siempre creer en mí y darme su apoyo incondicional, ustedes también son partes de este logro.

María. F. Machado. M



DEDICATORIA

A mis amados y respetados padres, Freddy y Josefina, por estar siempre a mi lado e inculcar en mí deseos de superación, y ganas de ser cada día una mejor persona, por brindarme toda la educación y principios para no rendirme ante los obstáculos y luchar por alcanzar mis sueños. Este logro es de ustedes.

A mis abuelitos Angel y Josefa, que a pesar de no haber compartido mucho con ellos, se que desde el cielo se sienten muy orgullosos de mi por el logro alcanzado.

A mis abuelitos Indalecio y Luisa por todo su cariño y consejos.

A mis hermanos Freddy A. y Marisabel A. que esto les sirva como ejemplo para que sigan luchando por alcanzar sus deseos y metas.

A mis tíos y primos por estar en todo momento.

Mariangel J. Vera O.



AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, por regalarme sus bendiciones y darme la salud, sabiduría, voluntad y las ganas de superarme cada día.

A mis padres, Fernando y Damelys, por su amor, apoyo y comprensión, y siempre guiarme por el buen camino, estando siempre a mi lado a pesar de las adversidades, gracias por ser como son.

A mis hermanas Damelys del Carmen, Dannys, Dayana y Desiree por siempre brindarme su cariño y apoyo incondicional, sirviéndome como ejemplo a seguir en el camino de la vida.

A la Universidad de Oriente, Núcleo Bolívar, nuestra casa de estudio, por brindarme su espacio físico y personal docente para mi formación como profesional de la salud.

Al Dr. Armando Guevara y a la Lcda. Ana Claudia Gamboa, por aceptar gentilmente ser nuestros tutores y por su apoyo y dedicación, brindándonos las herramientas necesarias para el desarrollo y culminación de este trabajo.

Al Sr. Domingo Mata, auxiliar del Laboratorio Bacteriológico “Dr. Sócrates Medina” por brindarme todo su conocimiento y asistencia técnica.

A mis amigos y familiares que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este estudio.

María. F. Machado. M



AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos cinco años de carrera universitaria he encontrado personas que de una u otra forma han contribuido a mi formación como profesional y también como persona, y que sin su ayuda no hubiese sido posible llegar a esta meta que hoy felizmente alcanzo.

A Dios Todopoderoso, por tener siempre mi camino iluminado y por todas las bendiciones que has derramado sobre mí, por darme la voluntad y las ganas de tratar de ser mejor cada día.

A mis queridos padres, Josefina y Freddy, por su inmenso amor, por comprenderme, guiarme y apoyarme en todas mis decisiones (buenas o malas), por dar lo mejor de ustedes cada día y permanecer siempre unidos a pesar de las adversidades, por ser como son, por dejarme ser y regalarme esta hermosa familia.

A mis hermanos Freddy y Marisabel, por estar a mi lado, entenderme y compartir las mejores cosas de mi vida. Quien mejor que ustedes para entender lo que otros no entienden de mí. Le doy gracias a Dios por permitirme nacer y crecer con ustedes.

A mi tía Ana, por el apoyo que siempre me ha brindado.

A mis amigos y compañeros de estudio por compartir cada semestre conmigo, y en ellos los buenos y malos momentos de esta carrera, por enseñarme que el trabajo en equipo da excelentes resultados cuando se cuenta con estudiantes como ustedes.

Mariangel J. Vera O.



Universidad De Oriente
Nucleo Bolivar
Escuela De Ciencias De La Salud
“Dr. Francisco Battistini Casalta”
Dpto. Parasitologia Y Microbiologia

**Efectividad Del Ácido Etilenaminotetraacético (Edta) Y Del
Mercaptoacético De Sodio (Sma), En La Detección De Metalo B-
Lactamasas En Cepas De *Pseudomonas Aeruginosa*.**

Machado M. Maria F., Vera O. Mariangel J.

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa se encuentra dentro de las especies de bacilos Gram negativos no fermentadores más relevantes clínicamente. Es capaz de adquirir genes que codifican para la producción de metalo β -lactamasas (MBLs), las cuales son activas contra carbapenémicos e inhibidas por agentes quelantes, como el EDTA. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la efectividad del EDTA y del SMA (750 μ g y 2 μ g) o la mezcla de ambos, en la detección de MBLs en 25 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes hospitales y centros de investigación, empleando métodos fenotípicos como la sinergia de doble disco y el método de discos combinados. En el primero, se utilizaron discos en blanco con la mezcla de EDTA/SMA y discos de Imipenem (IMP) y Meropenem (MEM), y en el segundo, se evaluó el efecto de los antibióticos solos y combinados con las soluciones de EDTA, SMA o ambas. El primer método, permitió diferenciar, cepas productoras de las no productoras de MBLs, y el segundo, evidenció la efectividad del EDTA, estableciendo como punto de corte una diferencia de halo de ≥ 5 mm entre los antibióticos solos y combinados con el agente quelante, lo que no se logró con el SMA donde el punto de corte encontrado fue ≥ 2 mm, lo que lo hace difícil de poner en práctica, demostrando que, en el caso de *P. aeruginosa*, el EDTA es el agente quelante más efectivo al realizar esta prueba.

Palabras Clave: ácido etilenaminotetraacético, carbapenémicos, metalo β -lactamasas, mercaptoacético de sodio, *Pseudomonas aeruginosa*.



INTRODUCCIÓN

Las infecciones producidas por bacilos Gram negativos con múltiples mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, constituyen un grave problema al cual se deben enfrentar a diario tanto médicos como el personal de laboratorio. El manejo de los pacientes gravemente enfermos, inmunocomprometidos, sometidos a procedimientos diagnósticos y terapéuticos invasivos y/o aquellos dependientes de asistencia respiratoria mecánica, hace necesario una serie de medidas profilácticas entre las que se incluye el uso empírico de antibióticos. La utilización de estos antibacterianos, muchas veces indiscriminada, trae consigo la selección de mutantes resistentes como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y el surgimiento de patógenos emergentes con resistencia intrínseca a la mayoría de los antibacterianos de uso clínico (Rodríguez *et al.*, 2003).

El aumento de la resistencia a los antibióticos entre bacterias Gram negativas, es un ejemplo notable de cómo las bacterias pueden adquirir, mantener y expresar información genética nueva que puede conferir resistencia a uno o varios antibióticos (Walsh *et al.*, 2005). La resistencia antimicrobiana constituye un problema de implicaciones clínicas, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes antimicrobianos, algunos más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados habitualmente en el tratamiento de las infecciones; además, ha obligado a abandonar y eliminar del arsenal terapéutico, muchas drogas que anteriormente fueron muy útiles (Chirinos, 2000).

Las infecciones producidas por bacilos Gram negativos con múltiples mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, constituyen un grave problema al cual se deben enfrentar a diario tanto médicos como el personal de laboratorio. El manejo de los pacientes gravemente enfermos, inmunocomprometidos, sometidos a



procedimientos diagnósticos y terapéuticos invasivos y/o aquellos dependientes de asistencia respiratoria mecánica, hace necesario una serie de medidas profilácticas entre las que se incluye el uso empírico de antibióticos. La utilización de estos antibacterianos, muchas veces indiscriminada, trae consigo la selección de mutantes resistentes como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y el surgimiento de patógenos emergentes con resistencia intrínseca a la mayoría de los antibacterianos de uso clínico (Rodríguez *et al.*, 2003).

El aumento de la resistencia a los antibióticos entre bacterias Gram negativas, es un ejemplo notable de cómo las bacterias pueden adquirir, mantener y expresar información genética nueva que puede conferir resistencia a uno o varios antibióticos (Walsh *et al.*, 2005). La resistencia antimicrobiana constituye un problema de implicaciones clínicas, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes antimicrobianos, algunos más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados habitualmente en el tratamiento de las infecciones; además, ha obligado a abandonar y eliminar del arsenal terapéutico, muchas drogas que anteriormente fueron muy útiles (Chirinos, 2000).

P. aeruginosa se encuentra dentro de las especies de bacilos Gram negativos no fermentadores más relevantes clínicamente (Vila *et al.*, 2002). Se trata de un bacilo que mide de 2 - 4 μm de longitud, no formador de esporas y con un flagelo polar que le permite su motilidad. Puede cultivarse fácilmente en medios nutritivos



sencillos. En medios de cultivo sólidos suelen presentarse colonias planas, grises grandes y a menudo, de aspecto mucoso, cuya superficie frecuentemente muestra un brillo metálico (Anzueto *et al.*, 2008). No fermentan los carbohidratos presentes en el Agar Triple Azúcar (TSI) o Agar Hierro de Kligler (KIA), se desarrollan a 42 °C y convierten los nitratos a nitritos. Son citocromo oxidasa positivas y las colonias desprenden un olor a uva; la mayor parte de las cepas producen piocianina, un pigmento fenazínico hidrosoluble verde que imparte un tono azul verdoso en los medios de aislamiento primario. Algunas especies de *P. aeruginosa* pueden producir toxinas citotóxicas y líticas que hacen que las infecciones que ella produce sean graves y potencialmente amenazantes para la vida (Koneman *et al.*, 2001).

P. aeruginosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas contaminadas, así como de plantas y animales; siendo potencialmente patógenas para el hombre (Hardalo y Edberg, 1997). En implementos como los equipos de anestesia, fórceps, termómetros, soluciones desinfectantes, trapos de piso, esponjas y toallas también suelen encontrarse (Koneman *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002).

Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos requieran asimilar para su desarrollo. Se ha descrito el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes inhóspitos como el combustible de aviones, soluciones de clorhexidina y el jabón. Contrariamente a lo que parece, los seres humanos que están en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. De hecho, se obtienen aislamientos de esta bacteria entre el 2% y el 8% de las heces de personas sanas, lo que demuestra que el contacto con esta bacteria es



cotidiano y sólo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales de inmunosupresión (Hardalo y Edberg, 1997).

Entre las condiciones y enfermedades específicas que predisponen a los pacientes a la infección por bacilos no fermentadores como *P. aeruginosa* se pueden incluir: tumores malignos, cateterizaciones, traqueotomías, diálisis, colocación de derivaciones y prótesis, tratamientos prolongados con corticoesteroides, antibióticos de amplio espectro y anticancerosos, fibrosis quística, quemaduras, heridas abiertas y diversas lesiones exudativas (Koneman *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2008). Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino que adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune y es por ello que representan un importante problema de salud en centros hospitalarios (Döring *et al.*, 1987; Singh *et al.*, 2002).

Los antimicrobianos ejercen una elevada presión selectiva sobre las poblaciones microbianas y favorecen a aquellos microorganismos que son capaces de resistirlas. Dicha resistencia puede ser natural o intrínseca, cuando todos los integrantes de una determinada especie son resistentes a una familia de antimicrobianos o a representantes de esta; pero también se puede presentar una resistencia de tipo adquirida, la cual es transmisible y afecta a algunos integrantes de una especie pero no a la totalidad; ésta a su vez, puede darse de manera cromosómica o extracromosómica (Wachsman y Degrossi, 2007). *P. aeruginosa* puede presentar ambos tipos de resistencia, en la resistencia cromosómica durante una primera etapa, aparecen pocas bacterias resistentes pero a medida que el antibiótico selecciona los microorganismos, se desarrollan células resistentes hasta transformarse en un grupo bacteriano resistente. Por otro lado, la resistencia extracromosómica se produce por incorporación del material genético por fuera del cromosoma bacteriano y es llamada también resistencia mediada por plásmidos o transposones. La expresión de la resistencia en una bacteria puede ser de manera constitutiva la cual se produce con o



sin exposición al estímulo o inducible donde sólo se produce después de la exposición a un antibiótico inductor (Rodríguez *et al.*, 2003).

P. aeruginosa es intrínsecamente resistente a diversos antibióticos, como betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas, trimetoprima/sulfametoxazol y la mayoría de las fluoroquinolonas, pero no tiene resistencia intrínseca a carboxipenicilinas (ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina), betalactámicos combinados con inhibidores de las betalactamasas (piperacilina/tazobactam y ticarcilina/ácido clavulánico), cefalosporinas de cuarta generación y algunas de tercera generación (ceftazidima y cefoperazona), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), monobactámicos (aztreonam), algunas fluoroquinolonas (levofloxacin y ciprofloxacina), carbapenémicos (imipinem y meropenem) y las polimixinas (colistina). Sin embargo, es capaz de desarrollar resistencia a cualquiera de estos agentes, bajo la influencia de la exposición antibacteriana previa (Rossolini, 2005).

El riesgo de aparición de resistencia antimicrobiana como consecuencia de la exposición a antibióticos varía según el fármaco empleado, pero en especial se asocia con ciprofloxacina y con imipenem. Los mecanismos generales de resistencia antibacteriana comprenden el bloqueo del ingreso, la salida activa del antibiótico desde el interior de la célula bacteriana, la alteración del sitio blanco o sitio de acción del antimicrobiano y la degradación enzimática del mismo (Driscoll *et al.*, 2007).

El bloqueo del ingreso del antibiótico se da por cambios en la permeabilidad de la membrana, principalmente por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua ubicados en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes hacia el espacio periplásmico (Vila *et al.*, 2007).



La penetración de imipenem y otros carbapenemos hacia el interior de *P. aeruginosa* ocurre a través de la porina D (OprD), específica para el transporte de aminoácidos dibásicos y de glutamato. OprD es una porina de membrana externa, la cual puede disminuir su cantidad o cambiar su conformación durante la terapia con carbapenémicos, lo que conlleva a la resistencia a imipenem y una disminución de la sensibilidad al meropenem sin afectarse otros betalactámicos. En cambio el meropenem puede ser expulsado por bombas de eflujo, las cuales son sistemas que captan al antibiótico en el citoplasma o en el espacio periplasmático llevándolo hacia el exterior de la bacteria (Köler y Pechére, 2001; Livermore, 2001; Vila *et al.*, 2002). Usualmente, estas bombas causan pequeños aumentos en la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM); sin embargo cuando aparecen simultáneamente varios mecanismos de resistencia, se produce una resistencia clínica evidente. De esta manera, las bombas de eflujo, la pérdida de porinas, las mutaciones en los sitios de acción y las enzimas hidrolíticas trabajan armónicamente para defender a la bacteria del antibiótico y, por lo tanto, de su muerte (Tafur *et al.*, 2008).

La producción de enzimas degradantes o inactivantes de los antimicrobianos es uno de los mecanismos de resistencia más importantes contra los betalactámicos y son conocidas, de forma general, como β -lactamasas. Existen dos familias diferentes de β -lactamasas, no relacionadas entre si, las serino β -lactamasas y las metalo β -lactamasas (MBLs). Las primeras poseen una molécula del aminoácido serina en su sitio activo mientras que las segundas poseen una o dos moléculas de zinc (Bush *et al.*, 1995; Queenan y Bush, 2007).

P. aeruginosa produce una β -lactamasa de tipo AmpC (o clase C) cromosómica, una serino β -lactamasa, cuya expresión puede ser inducida por la exposición a los betalactámicos. La inducción de la β -lactamasa AmpC puede provocar la resistencia tanto al agente inductor como a otros betalactámicos. No todos los betalactámicos son inductores igualmente eficaces de la β -lactamasa AmpC



cromosómica. El imipenem es un inductor conocido, mientras que las cefalosporinas de tercera y cuarta generación son inductores débiles (Driscoll *et al.*, 2007).

En algunas oportunidades y por procesos de mutación, *P. aeruginosa* se convierte en productoras de grandes cantidades de la enzima AmpC, que es capaz de hidrolizar a prácticamente todos los betalactámicos (Chirinos, 2000). Algunas cepas de *P. aeruginosa*, producen, además de AmpC, otras β -lactamasas (adquiridas o secundarias) que interfieren directamente con la actividad de los betalactámicos. De esta forma, la producción de oxacilinasas y penicilinasas de clase A, β -lactamasas de espectro extendido (muy poco frecuentes) y carbapenemasas, pueden afectar el fenotipo de resistencia a los betalactámicos de una cepa concreta de *P. aeruginosa* (Martínez y Hernández, 2003).

P. aeruginosa es capaz de adquirir genes que codifican para la producción de MBLs. Estas enzimas, presentes de forma natural en algunas especies de bacilos Gram negativos ambientales, tienen la capacidad de hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos sin afectar a los monobactámicos (Rossolini, 2005; Walsh *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2008).

Las MBLs tienen como características fundamentales ser activas contra los carbapenemos, no hidrolizan a los monobactámicos, son inhibidas por agentes quelantes de iones metálicos como el ácido etilenaminotetraacético (EDTA) y el ácido dipicolínico (DPA), no son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam y presentan uno o dos iones de zinc en su sitio activo, los cuales se unen a moléculas de agua que sirven como nucleófilas, e hidrolizan el enlace cíclico de la amida del anillo betalactámico, convirtiendo a este anillo en biológicamente inactivo. A nivel molecular, las MBLs son un grupo heterogéneo de proteínas que hacen que la clasificación y estandarización de su estructura sean prácticamente imposible (Murphy *et al.*, 2003; Peleg *et al.*, 2005; Sader *et al.*, 2005; Toleman *et al.*, 2005).



Los genes que codifican para las MBLs, se encuentran asociados a transposones e integrones, los cuales están frecuentemente localizados en plásmidos grandes (80-120 kb), donde usualmente se transportan otros determinantes de resistencia (Poirel y Nordmann, 2002; Kimura *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2005).

Las MBLs fueron primero formalmente clasificadas en serino β -lactamasas en 1980, en el esquema de clasificación propuesto por Ambler (Ambler *et al.*, 1980). Actualmente, de acuerdo a la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las β -lactamasas y las características estructurales de cada enzima, estas han sido clasificadas dentro de la clase B de la clasificación molecular de Ambler y en el grupo 3 de la clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros (Walsh *et al.*, 2005). Este grupo de enzimas a su vez ha sido dividida en tres subclases (B1, B2 y B3) en el grupo B de la clasificación molecular de Ambler. La subclase B1 agrupa las enzimas inducibles o asociadas a plásmidos; en este grupo se encuentran las de tipo IMP, VIM, SPM, GIM, SIM. En *P. aeruginosa* se han detectado los tipos IMP, VIM, SPM, GIM; siendo las IMP, VIM, los tipos de MBLs más diseminadas en el mundo las cuales a pesar de su baja similitud en secuencia de aminoácidos, comparten características hidrolíticas muy afines (Cornaglia *et al.*, 2000; Crespo *et al.*, 2004; Villegas *et al.*, 2006; Guevara *et al.*, 2009).

En 1989, Bush clasificó las MBLs en un grupo aparte (grupo 3) de acuerdo a sus propiedades funcionales y sigue siendo el sistema de referencia recomendado para β -lactamasas en general. Este esquema se basa principalmente en los perfiles del sustrato (en particular hidrólisis de imipenem), su sensibilidad al EDTA, y su falta de inhibición por los inhibidores de las serino β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Dicho esquema se actualizó en 1995 y además fue modificado nuevamente en 1997 para dar cabida al creciente número de enzimas del grupo 3 continuamente clasificadas. En aquel momento sólo dos tipos de MBLs



transferibles habían sido estudiadas, CCRA de *Bacteroides fragilis* e IMP-1 de *P. aeruginosa* (Bush, 1989; Bush *et al.*, 1995; Vila *et al.*, 2002; Marchiaro *et al.*, 2005).

Todas las MBLs hidrolizan imipenem, pero su capacidad para lograr esto, varía considerablemente y la tasa de hidrólisis puede o no correlacionarse con el nivel de resistencia a la bacteria a carbapenémicos. Sin embargo, estas enzimas tienen la característica de ser universalmente inhibidas por el EDTA, así como otros agentes quelantes de cationes divalentes (Massida *et al.*, 1991; Rasmussen y Bush, 1997).

Las MBLs del tipo VIM son las más frecuentes en el continente americano, siendo la más diseminada a nivel mundial el tipo VIM-2. Esta enzima relacionada con la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* y otros no fermentadores, ha sido encontrada en los países de Europa y la Cuenca Mediterránea, como en los países del extremo Lejano Oriente y América (Sardelic *et al.*, 2003; Cornaglia *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2007).

En Venezuela, la MBL VIM-2 fue descrita en el año 2004 entre cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico en un hospital de Caracas, en el marco del Programa Internacional de Vigilancia SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program). Desde entonces en varios hospitales venezolanos se han aislado cepas de *P. aeruginosa* con un perfil fenotípico compatible con la producción de MBL, pero en la mayoría de los casos no se ha comprobado el mecanismo genético involucrado (Guevara *et al.*, 2009).

Un estudio realizado recientemente en Venezuela, describe la detección de MBLs tipo VIM mediante ensayos fenotípicos y moleculares en nueve cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas de muestras clínicas de cuatro hospitales de este país. Por métodos fenotípicos se evidenció que 100% eran



productoras de MBLs y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) todas las MBLs resultaron ser del tipo VIM (Sánchez *et al.*, 2008)

En Ciudad Bolívar, estado Bolívar, se logró aislar cepas de *P. aeruginosa* de pacientes con diagnóstico diferente que posteriormente se complicaron con infecciones nosocomiales en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez” ubicado en esta localidad. Al realizar las pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se observó que todos los aislamientos mostraron un perfil de sensibilidad compatible con la producción de una MBLs. La detección de este tipo de enzima mediante las técnicas de sinergismo de doble disco (DDST), PCR y secuenciación permitió confirmar que todas las cepas de *P. aeruginosa* aisladas producían una MBL de tipo VIM 2 (Guevara *et al.*, 2009).

Dado el hecho de que todas la MBLs se ven afectadas por la supresión del zinc en el sitio activo, en principio, su detección debe ser sencilla y en diferentes estudios se han utilizado sustancias quelantes de iones metálicos combinados o no con antibióticos betalactámicos para detectar las cepas que poseen estas enzimas clínicamente importantes. Sin embargo, las MBLs varían en su nivel de inhibición con ciertos compuestos así como también en su capacidad de conferir resistencia a la ceftazidima o imipenem, dos sustratos comúnmente utilizados en la detección de MBLs (Yan *et al.*, 2004).

Varias metodologías han sido propuestas para la detección de *P. aeruginosa* productoras de MBLs. Sin embargo, los documentos del NCCLS actualmente CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), aun no contienen un método para la detección de aislamientos productores de MBLs (Lee *et al.*, 2003; Jesudason *et al.*, 2005), pero se han desarrollado diferentes métodos fenotípicos basados en la utilización de inhibidores de estas enzimas, como el EDTA, el DPA, ácido 2-



mercaptopropiónico (MPA) y el mercaptoacético de sodio (SMA) (Queenan y Bush, 2007).

Uno de los métodos empleados en la detección fenotípica de MBLs es el de aproximación con discos o método del sinergismo de doble disco (DDST, por sus siglas en inglés), el cual consiste en colocar, sobre una placa de agar Mueller-Hinton inoculada con el microorganismo problema, un disco que contiene un agente quelante (EDTA, SMA, ácido dipicolínico o ácido 2-mercaptopropiónico) rodeado por un disco de imipenem (10 μ g) y otro de meropenem (10 μ g). Esta prueba es positiva (presencia de MBL) si se observa un aumento del halo de inhibición o la presencia de una zona de inhibición entre el imipenem y/o el meropenem y el agente quelante. Otro método consiste en colocar discos de imipenem y meropenem suplementados con sustancias quelantes y discos de imipenem y meropenem solos, considerándose una prueba positiva si se observa un aumento del halo de inhibición de los discos suplementados en comparación con los halos producidos alrededor de los discos que contienen antibiótico solo (Mansilla, 2008). Estas pruebas detectan y diferencian la producción de MBLs de otras β -lactamasas (Lee *et al.*, 2001), pero estos métodos que usan el EDTA para la inactivación de las MBLs, tienen tendencia a tener resultados falsos positivos, ya que el agente quelante por sí mismo, tiende a aumentar la permeabilidad de la membrana, aumentando así la oportunidad de un efecto bactericida (Chu *et al.*, 2005).

Dado que las MBLs son enzimas que inactivan a los principales grupos de antimicrobianos usados para el tratamiento de las infecciones graves producidas por *P. aeruginosa*, es recomendable realizar la detección de estas enzimas mediante pruebas fenotípicas utilizando el EDTA como agente quelante, así como también el uso de otros agentes como el SMA en combinación con imipenem y meropenem, ya que de este modo se aumenta la sensibilidad y especificidad para la detección de las mismas, por tal motivo surge la necesidad de comparar la efectividad del EDTA y del



SMA en la detección de MBLs en una colección de cepas de *P. aeruginosa*, productoras de MBLs.



JUSTIFICACIÓN

El aumento de la resistencia a los antibióticos entre las bacterias Gram negativas es un ejemplo notable de cómo las bacterias pueden adquirir, mantener y expresar información genética nueva que puede conferir resistencia a uno o varios antibióticos (Walsh *et al.*, 2005).

Cada vez es más frecuente el aumento de la morbilidad y mortalidad debido a las infecciones por bacilos Gram negativos productores de MBLs adquiridas (Rodríguez *et al.*, 2003). Las bacterias productoras de este tipo de enzimas usualmente causan infecciones que son difíciles de tratar debido a la ineffectividad de los betalactámicos, en especial de los carbapenémicos que son los antibióticos más usados en este tipo de patologías, sin embargo, existen otras opciones terapéuticas que podrían ser utilizadas de manera precoz si se conoce que la infección es producida por un microorganismo productor de MBL, aumentando así las posibilidades de supervivencia de los pacientes afectados. De allí la importancia de su detección rápida y eficiente, lo que amerita la implementación de técnicas de laboratorio para su identificación rutinaria.



OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la efectividad del ácido etilenaminotetraacético (EDTA) y del mercaptoacético de sodio (SMA), en la detección de MBLs en cepas de *P. aeruginosa*.

Objetivos Especificos

- Determinar la presencia de MBLs, empleando el método de sinergia de doble disco usando discos de EDTA/SMA, meropenem e imipenem.
- Evaluar la presencia de MBLs, empleando el método de los discos combinados usando discos de imipenem, meropenem, imipenem/EDTA/SMA y meropenem/EDTA/SMA.
- Demostrar la presencia de MBLs, empleando el método de los discos combinados usando discos de imipenem, meropenem, imipenem/EDTA y meropenem/EDTA.
- Identificar la presencia de MBLs, empleando el método de los discos combinados usando discos de imipenem, meropenem, imipenem/SMA y meropenem/SMA.
- Comparar la eficiencia de los diferentes métodos y sustancias quelantes empleados en la detección de las MBLs.



METODOLOGÍA

Diseño de la Investigación

Se realizó una investigación con diseño experimental de tipo descriptivo y comparativo. Este estudio fue realizado en el Laboratorio Bacteriológico “Dr. Sócrates Medina” entre los meses de Octubre a Noviembre del 2009.

Muestra

La muestra estuvo constituida por 25 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes hospitales y centros de investigación, de las cuales 20 eran productoras de MBLs de diferentes tipos, caracterizadas por PCR y conservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez”. Las cepas, su procedencia y el tipo de MBL que poseen así como las cepas para control negativo que fueron usadas en el estudio se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente.



Tabla 1. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas en el estudio según su centro de procedencia y la metalo β -lactamasa producida.

Nº Cepa	Centro de Procedencia	Tipo de MBL
77923	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"	VIM-2
77297	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"	IMP-1
7525 M	Inst. Nac. Enf. Infec. "Carlos Malbran" (Argentina).	SPM-1
863 B	Clinica Santa Ana	VIM
865 A	Hospital Industrial de San Tomé	VIM
788 A	Hospital "Raul Leoni"	VIM
952 M	Hospital "Raul Leoni"	VIM
944 M	Hospital "Raul Leoni"	VIM
925 M	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
333 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
1525	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
15 H	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
476 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
270 B	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
1100 M	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
3304 O	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
9 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
1143 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
1272 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
50 B	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM
807 B	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM

Tabla 2. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas como controles negativos en el estudio según el mecanismo de resistencia que presentan.



N° Cepa	Centro de Procedencia	Mecanismos de Resistencia
ATCC 27853	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel".	Ninguno.
77926	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel".	Bomba de eflujo MexAB-OprM.
77301	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel".	Deficit de porinas OprD.
77924	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel".	Carbapenemasa GES-1.
77725	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel".	β -lactamasa de Espectro Expandido.



MÉTODOS

1.- Elaboración de los discos de EDTA/SMA: (Apéndice A)

Se preparó una solución de SMA a una concentración de 300 mg/ml, para lo cual se pesó 1,8 gr de SMA, que fueron diluidos en 6 ml de agua destilada estéril. Así mismo se preparó una solución de EDTA 0,5 M, pesando 0,75 g de EDTA (PM: 372,24) que fueron disueltos en 4 ml de agua destilada estéril; para facilitar su disolución, se agregaron poco a poco gotas de NaOH 0,1 N, hasta alcanzar un pH final de 8 (Lee *et al.*, 2003).

Para la preparación de los discos, se procedió a mezclar 4 ml de SMA (300 mg/ml) y 6 ml de EDTA (0,5 M) en un beaker, posteriormente se procedió a dispensar 10 μ l de la solución preparada en discos de papel de filtro estériles, obteniéndose una concentración aproximada de 750 μ g de EDTA y 2 mg de SMA en cada disco. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas en capsulas de petri estériles, y posteriormente se guardaron en refrigeración hasta el momento de su utilización (Lee *et al.*, 2003).

A cada lote de discos se le realizó el control de calidad utilizando las cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 como control negativo y *P. aeruginosa* 77923 productora de MBL de tipo VIM-2 como control positivo.

2.-Método de Sinergismo de Doble Disco

Para la realización de esta prueba, se procedió a realizar una suspensión en solución salina fisiológica estéril ajustándola a 0,5 en la escala Mc Farland, de cada una de las cepas empleadas para este estudio. Posteriormente cada cepa fue inoculada



en una placa de agar Müller Hinton, para luego colocar un disco de EDTA/SMA previamente preparado y a ambos lados de éste, los discos de imipenem y meropenem a una distancia de 15 mm entre los antibióticos y el disco con la suspensión de EDTA/SMA. Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas en aerobiosis para posteriormente observar la presencia o ausencia en la deformidad de los halos de inhibición (figura 1).

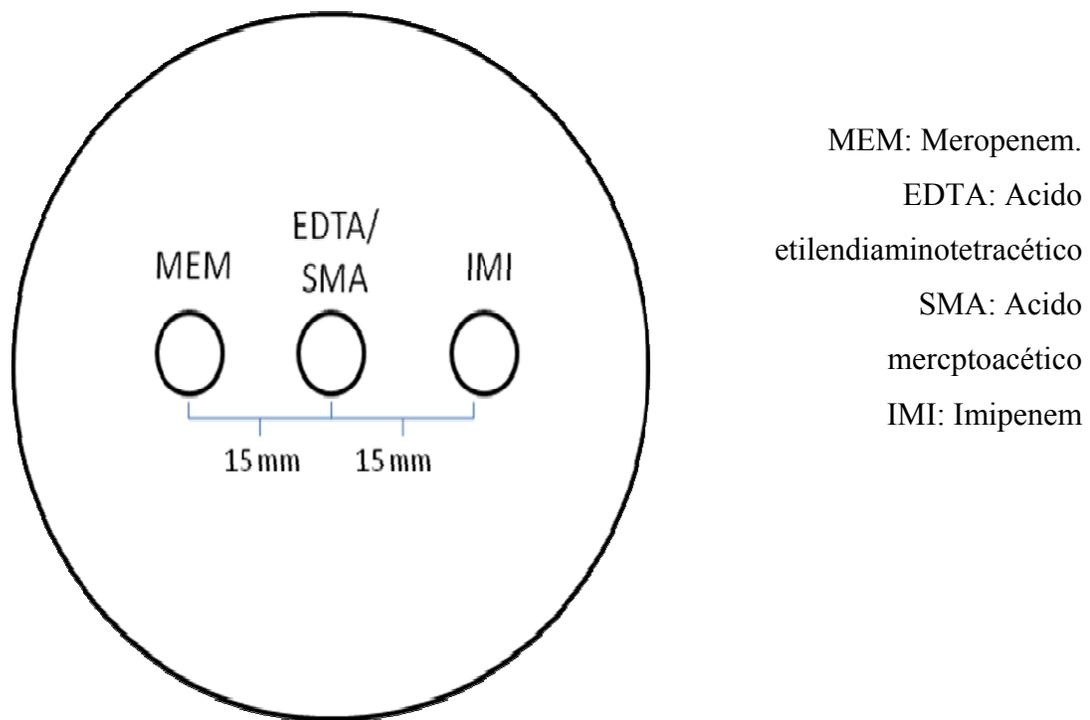


FIGURA 1:

Representación esquemática de la prueba de sinergismo de doble discos de imipenem, meropenem y EDTA/SMA.

Se consideró como un resultado positivo para la detección de MBLs, la deformidad o ampliación del halo de inhibición del crecimiento bacteriano formado



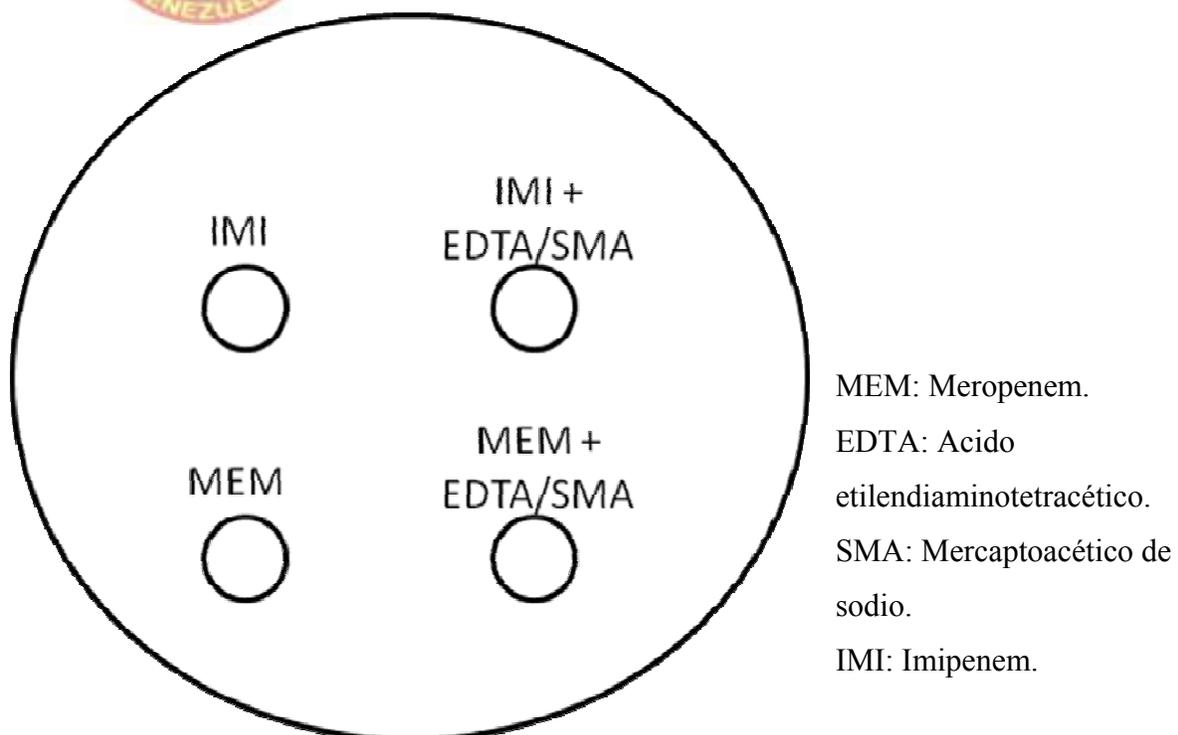
indistintamente entre los discos de meropenem y el de EDTA/SMA o de imipenem y el de EDTA/SMA, de acuerdo a lo descrito por Lee *et al.*, 2003.

3.-Método de Discos Combinados

Para la realización del método de discos combinados, se procedió a realizar tres (3) ensayos experimentales en los cuales se comparó el efecto del antibiótico solo y de éstos combinados con las soluciones de EDTA, SMA o ambas.

a.- Imipenem y meropenem solos y combinados con una solución de EDTA/SMA (0,5 M/300 mg/ml): para la realización de este experimento se utilizó la solución de EDTA y SMA preparada como se explicó anteriormente. Posteriormente se realizó una suspensión en solución salina fisiológica estéril ajustandolas a 0,5 en la escala Mc Farland, de cada una de las cepas empleadas para este estudio. Cada cepa fue inoculada en una placa de agar Müller Hinton, para luego colocar dos discos de imipenem y dos discos de meropenem, a un disco de cada carbapenem se le agregó 10 μ l de la solución EDTA/SMA (figura 2). Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas en aerobiosis para posteriormente medir los halos de inhibición formados.

b.- Imipenem y meropenem solos y combinados con EDTA (0,5 M): para la realización de este ensayo se empleó la solución de EDTA (0,5 M) previamente preparada. Luego se inocularon las placas de agar Müller Hinton como se explicó anteriormente, para colocar dos discos de imipenem y dos discos de meropenem, a un disco de cada carbapenémico se le adicionó 4 μ l de la solución EDTA (0,5 M) (750 μ g aproximadamente) (figura 3). Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas en aerobiosis para posteriormente medir los halos de inhibición formados.

**FIGURA 2:**

Representación esquemática de la prueba de discos combinados usando discos de imipenem, meropenem, imipenem EDTA/SMA y meropenem EDTA/SMA.



MEM: Meropenem.

EDTA: Acido
etilendiaminotetracético.

IMI: Imipenem.

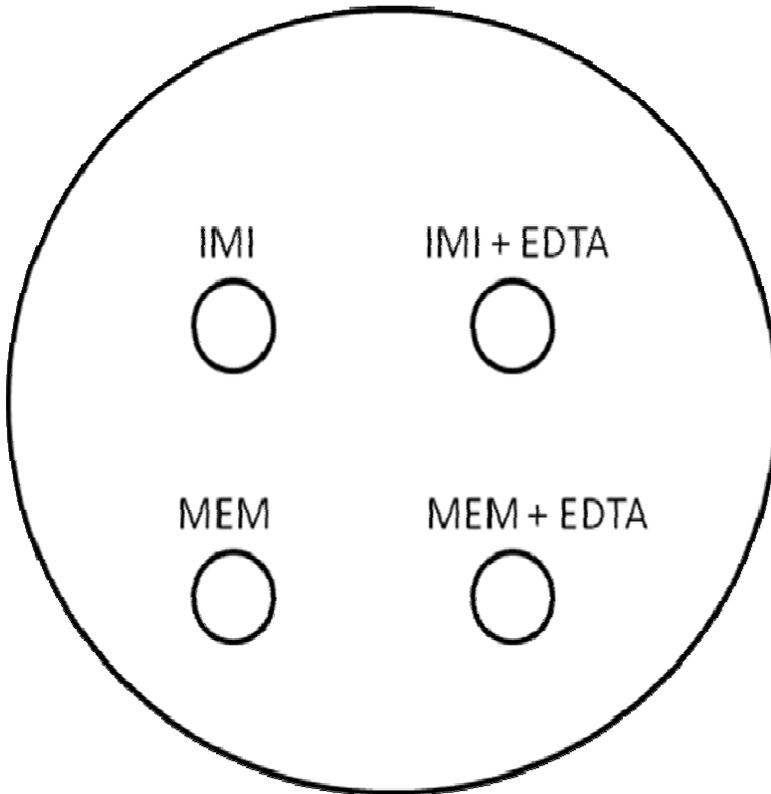


FIGURA 3:

Representación esquemática de la prueba de discos combinados usando discos de imipenem, meropenem, imipenem/ EDTA y meropenem /EDTA



c.- *Imipenem y meropenem solos y combinados con SMA (300 mg/ml)*: para la realización de este ensayo se empleó la solución de SMA (300 mg/ml) previamente preparada. Luego se inoculó las placas de agar Müller Hinton como se explicó anteriormente, para colocar dos discos de imipenem y dos discos de meropenem, a un disco de cada carbapenémico se le adicionó 6 μ l de SMA (300 mg/ml) (2 mg aproximadamente) (figura 4). Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas en aerobiosis para posteriormente medir los halos de inhibición formados.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se tomó como diámetro definitivo de los halos de inhibición, el promedio de lo obtenido de ambos experimentos.

Análisis e Interpretación de Resultados

En las pruebas de discos combinados, se compararon los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con cada sustancia quelante (EDTA, SMA, EDTA/SMA) en las cepas positivas y negativas, mediante la aplicación del test t de Student para determinar su significancia estadística y proponer un punto de corte óptimo.

En todos los ensayos se calculó la sensibilidad (SN), la especificidad (SP), el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), utilizando las siguientes formulas:

$$\text{SN: } a / (a + c)$$

$$\text{SP: } d / (b + d)$$

$$\text{VPP: } a / (a + b)$$

$$\text{VPN: } d / (c + d)$$



Donde:

$a = N^{\circ}$ de cepas productoras de MBLs catalogadas como productoras de MBLs.

$c = N^{\circ}$ de cepas productoras de MBLs catalogadas erróneamente como no productoras de MBLs.

$d = N^{\circ}$ de cepas no productoras de MBLs catalogadas como no productoras de MBLs.

$b = N^{\circ}$ de cepas no productoras de MBLs catalogadas como productoras de MBLs.

Todos los resultados serán expresados en tablas y gráficos.

En las pruebas de discos combinados donde no fue posible obtener un punto de corte óptimo, mediante el cálculo de la especificidad, la sensibilidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, se elaboraron curvas de características operacionales (curvas ROC) para establecer el punto de corte más conveniente, utilizando el programa Epidat versión 3.3. Una curva ROC consiste en un gráfico que contiene la relación entre la sensibilidad y la especificidad de una prueba, que se calculan para todos los valores de corte posible. Se considera que un punto de corte es más eficiente a medida que el área bajo la curva ROC se aproxima a 1.



MEM: Meropenem.
IMI: Imipenem.

SMA: Mercaptoacético de sodio.

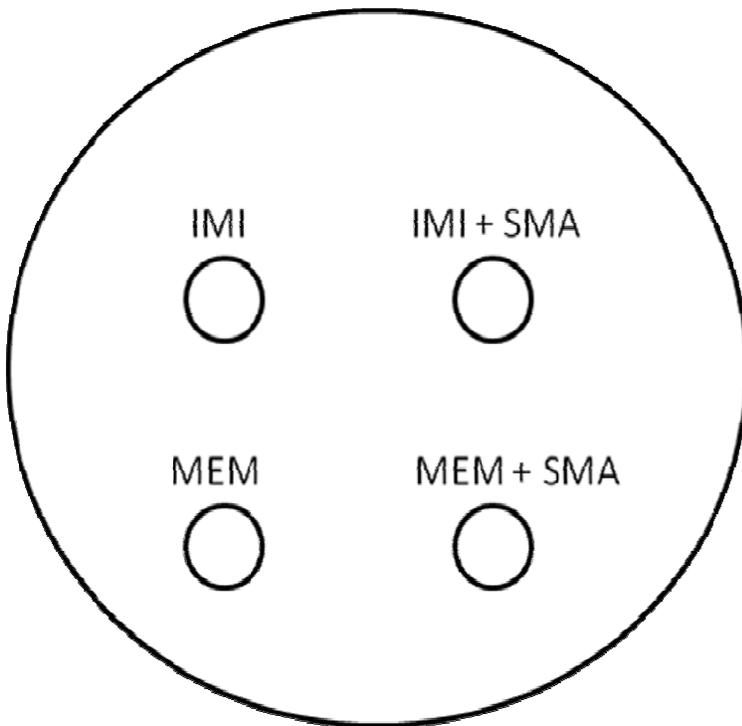


Figura 4:

Representación esquemática de la prueba de discos combinados usando discos de imipenem, meropenem, imipenem/ SMA y meropenem /SMA.



RESULTADOS

Se evaluaron un total de 25 cepas de *P. aeruginosa*, 20 de las cuales eran productoras de metalo β -lactamasas (MBLs), caracterizadas por técnicas de biología molecular.

La aplicación del método de sinergia de doble disco a las cepas en estudio, permitió diferenciar de manera correcta aquellas cepas no productoras de MBLs de las cepas productoras de esta enzima, mediante la visualización de la deformación del halo de inhibición formado en el caso de las cepas MBLs positivas (Figura 5).

Al realizar el método de los discos combinados, se evidenció que al probar el imipenem o el meropenem con la mezcla de EDTA/SMA o con EDTA solo, el promedio de los diámetros de los halos de inhibición se incrementó en más del doble con relación al promedio de los halos de inhibición de los antibióticos solos en las cepas productoras de MBLs, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (Tabla 3), no así en las cepas no productoras de la enzima, donde el máximo incremento del promedio de los halos de inhibición se ubicó en 1,74 mm. Cuando los carbapenemos se combinaron con el SMA solo, el incremento promedio de los halos de inhibición en las cepas productoras de metalo β -lactamasas fue de aproximadamente de 4 mm mientras que en las no productoras no hubo ningún incremento (Tabla 3) (Figura 6).

Cuando se calculan las diferencias promedio de los halos de inhibición obtenidos al probar un carbapenemo solo y el mismo combinado con un agente quelante, y se compara el resultado de las cepas productoras de MBLs con lo obtenido en las no productoras, se evidencia que a través de este método se pudo diferenciar entre las cepas productoras y no productoras de la enzima (Tabla 4).



Las gráficas 1, 2, 3 y 4 muestran que al obtener y comparar la diferencia entre los diámetros de los halos de inhibición del imipenem y el meropenem solos y en combinación con sustancias quelantes de iones metálicos como el EDTA y el uso de una mezcla de EDTA y SMA, fue posible diferenciar claramente las cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de MBLs. En la gráfica 5 se puede apreciar que con el uso del imipenem solo y combinado con el SMA también es posible distinguir entre los dos tipos de cepas evaluadas, mientras que el uso del meropenem solo y combinado con SMA no permitió establecer de manera clara la diferencia entre las cepas productoras o no de metalo β -lactamasas, debido a que la zona de inhibición de las cepas MBLs negativas fue igual a la de algunas cepas MBLs positivas (Gráfica 6).

Al analizar la eficiencia de los métodos fenotípicos empleados para la detección de las MBLs mediante el cálculo de la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, se evidenció que el método del sinergismo del doble disco (DDST) obtuvo un valor de 100% en los cuatro indicadores evaluados (Tabla 5). En el caso del método del disco combinado, fue necesario establecer puntos de corte para cada una de las combinaciones de antibióticos y quelantes utilizados basados en las diferencias entre los diámetros de los halos de inhibición mostrados en los gráficos 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Así, para las combinaciones de carbapenemos con EDTA y EDTA/SMA se escogieron como posibles puntos de corte una diferencia del diámetro de inhibición entre en antibiótico solo y combinado con quelantes de 4, 5 y 6 mm, mientras que para las combinaciones de carbapenemos con SMA las diferencias de halo propuestas fueron de 1, 2 y 3 mm (Tabla 4).

Al comparar los puntos de corte propuestos para la prueba del disco combinado usando diferentes quelantes de iones metálicos, se encontró que para el caso del imipenem y el meropenem combinados con EDTA/SMA o combinados únicamente



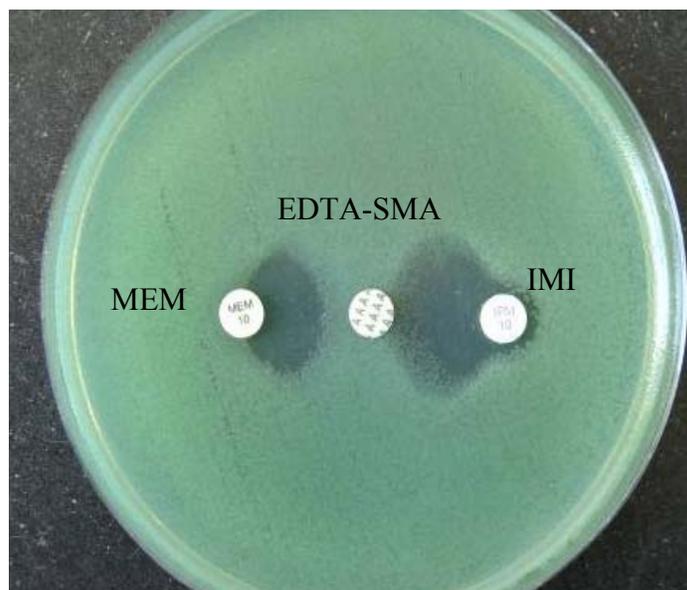
con EDTA, el punto de corte ≥ 5 mm fue el más eficiente ya que con el mismo se pudo obtener un 100% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo en todas las combinaciones (Tabla 5).

En el caso del imipenem combinado con SMA el punto de corte ideal se establece como ≥ 2 mm, ya que permitió obtener 100% en cada uno de los parámetros estudiados, al contrario de los resultados obtenidos con el uso de meropenem combinado con SMA donde no se pudo establecer un punto de corte ideal que permitiera obtener 100% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y del valor predictivo negativo, observándose que el punto de corte que se aproxima más al valor ideal de cada parámetro es de ≥ 1 mm (Tabla 5).

Con la finalidad de facilitar y verificar la escogencia de un punto de corte óptimo, se elaboraron curvas de características operacionales (curvas ROC) para las pruebas de disco combinado en las cuales no se obtuvo 100% de sensibilidad ni de especificidad en alguno de los puntos de corte propuestos (MEM/EDTA/SMA, MEM/EDTA, IMP/SMA y MEM/SMA).

En la gráfica 7 se puede observar que el punto de corte ≥ 4 mm tiene un área bajo la curva de 0,9 mientras que el área para los valores de ≥ 5 mm y ≥ 6 mm es de 1, esto indica que los puntos de corte de ≥ 5 mm o ≥ 6 mm son los más adecuados para la prueba del disco combinado de MEM/EDTA/SMA, sin embargo no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los tres puntos de corte considerados ($p > 0,05$). En el caso del uso del meropenem combinado solamente con EDTA (MEM/EDTA), se logró establecer como puntos de cortes ideales ≥ 4 mm y ≥ 5 mm, con los cuales se pueden obtener resultados satisfactorios para la diferenciación de cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de MBLs. Sin embargo, tampoco en este caso existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres puntos de corte propuestos ($p > 0,05$) (Gráfica 8).

Las curvas ROC correspondientes a los puntos de corte propuestos para la prueba del disco combinado de IMP/SMA reflejan que el punto de corte de ≥ 2 mm es el más adecuado, cuando se comparan los tres puntos propuestos (Gráfica 9) mientras que el caso del meropenem combinado con SMA fue difícil establecer un punto de corte ideal que permita separar las cepas de *P. aeruginosa* productoras y no de MBLs, ya que de los 3 puntos de corte analizados tuvieron valores similares de área bajo la curva, cercanos a 1 (Gráfica 10).



EDTA: ácido etilendiaminotetraacético SMA: Mercaptoacético de sodio;
IMP: imipenem; MEM: meropenem

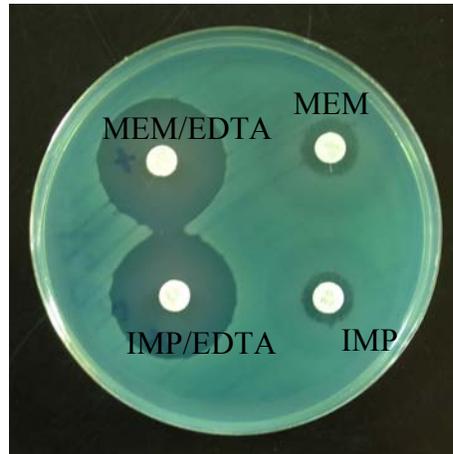
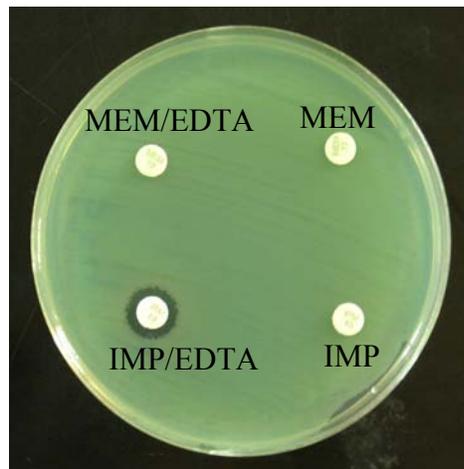
Figura 5. Detección de MBLs mediante el método de sinergia de doble disco en una cepa de *P. aeruginosa*.



Tabla 3. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición del imipenem y meropenem solos y combinados con los inhibidores de metalo β -lactamasas en cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas.

Prueba de discos combinados	MBL+		MBL-	
	Halo promedio (mm)	P	Halo promedio (mm)	P
IMP	9,45	<0,0001	16,8	0,7835
IMP/EDTA/SMA	22,35		17,8	
MEM	11,45	<0,0001	17,06	0,8235
MEM/EDTA/SMA	24,25		18,8	
IMP	9,65	<0,0001	17,20	0,6626
IMP/EDTA	23,20		18,8	
MEM	11,95	<0,0001	18	0,7856
MEM/EDTA	23,45		19,4	
IMP	9,15	<0,0008	15,6	1,000
IMP/SMA	13,05		15,6	
MEM	11,35	0.0117	17	1,000
MEM/SMA	15,55		17	

IMP: imipenem; MEM: meropenEDTA: ácido etilendiaminotetracético; SMA: mercaptoacético de sódio; MBL+: cepas productoras de metalo β -lactamasas; MBL-: cepas no productoras de metalo β -lactamasas; p: significancia estadística.

A.- Prueba positiva**B.- Prueba negativa**

IMP: imipenem; MEM: meropenem;
EDTA: ácido etilendiaminotetracético

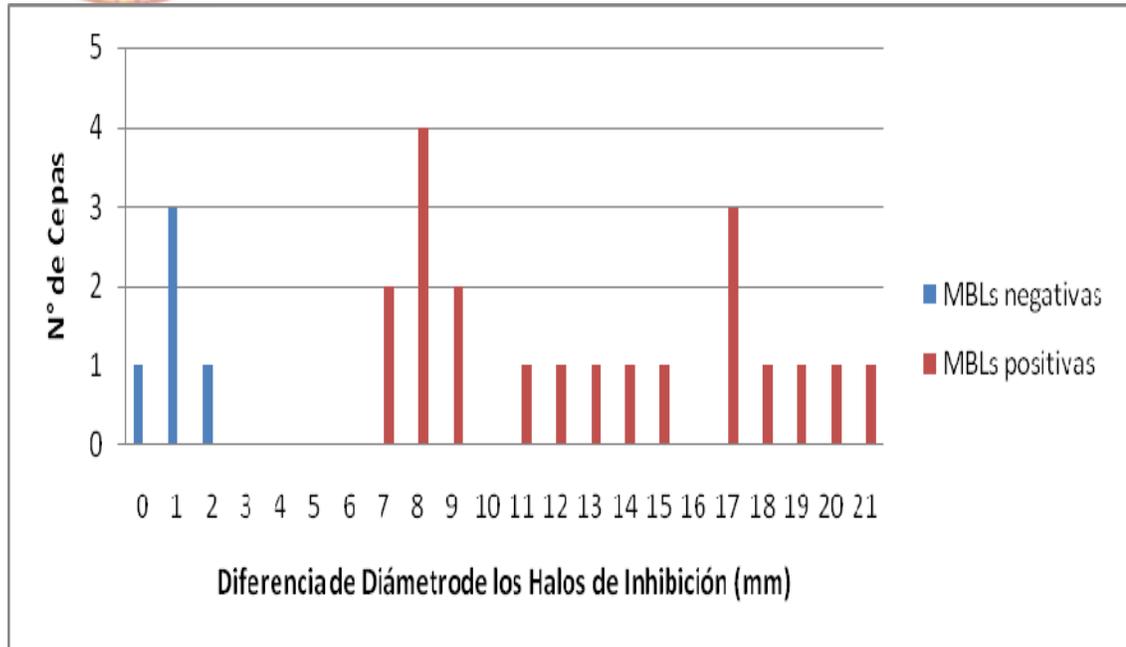
Figura 6. Detección de MBLs mediante el método del disco combinado en cepas de *P. aeruginosa*.



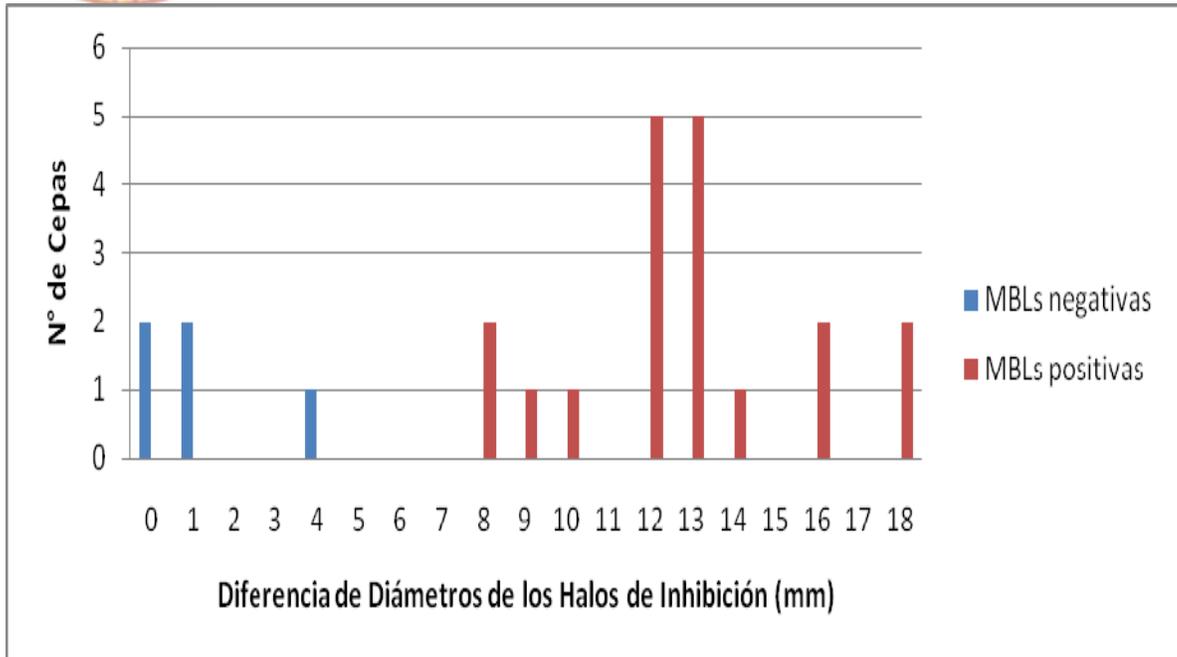
Tabla 4. Diferencia promedio de los diámetros de los halos de inhibición entre el imipenem y el meropenem solos y combinados con los inhibidores de metalo β -lactamasas en cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas.

Prueba del disco combinado	Diferencia de halos (mm)		P
	MBL+	MBL-	
IMP - IMP/EDTA/SMA	12,9	1	<0,0001
MEM - MEM/EDTA/SMA	12,7	1,2	<0,0001
IMP - IMP/EDTA	13,55	1,6	<0,0001
MEM - MEM/EDTA	11,50	1,4	<0,0001
IMP - IMP/SMA	3,9	0,4	<0,0001
MEM - MEM/SMA	4,2	0	<0,0002

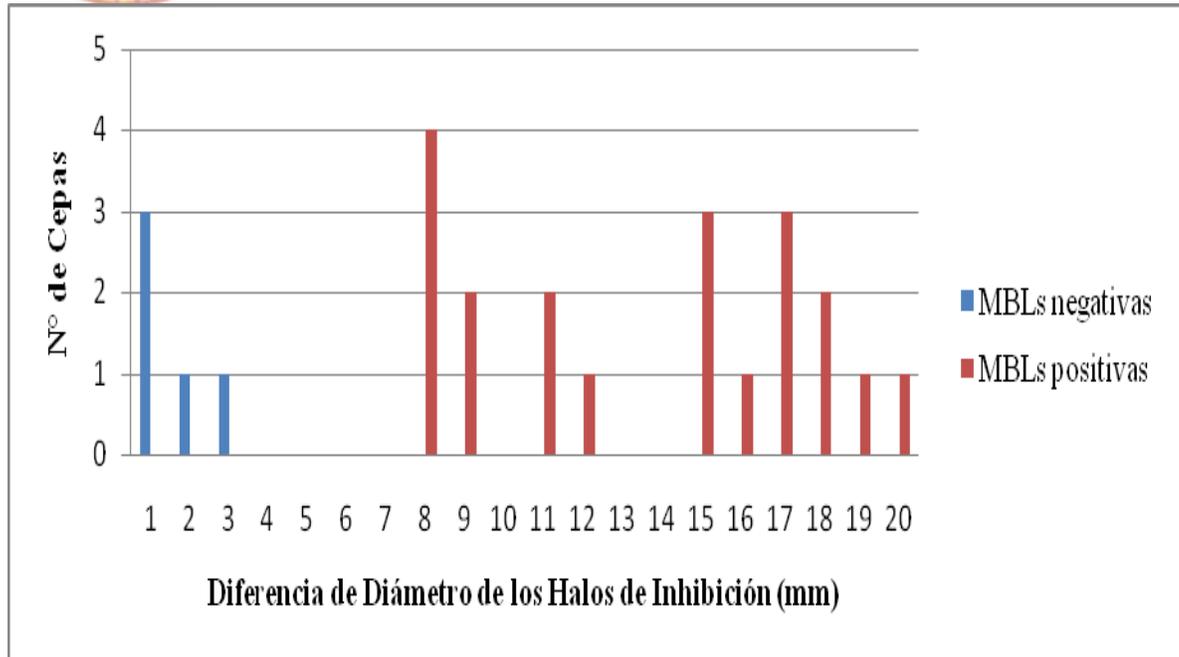
IMP: imipenem; MEM: meropenem; EDTA: ácido etilendiaminotetracético;
SMA: mercaptoacético de sodio; MBL+: cepas productoras de metalo β -lactamasas;
MBL-: cepas no productoras de metalo β -lactamasas; p: significancia estadística.



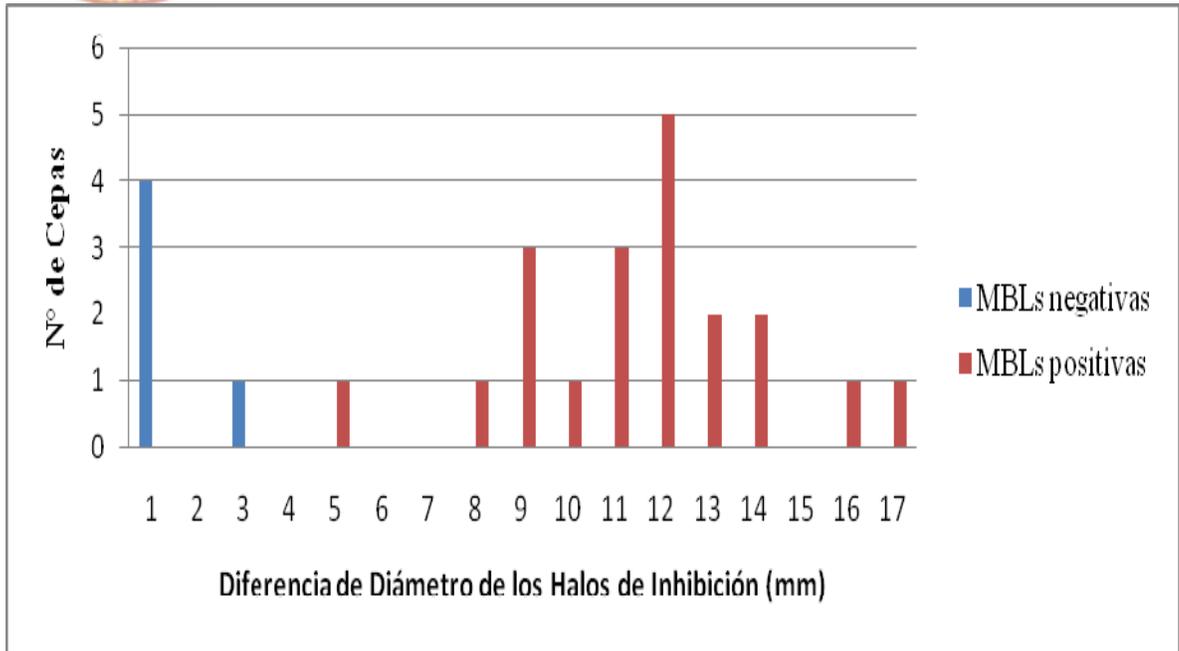
Gráfica 1. *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas según la diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el imipenem solo y combinado con EDTA/SMA.



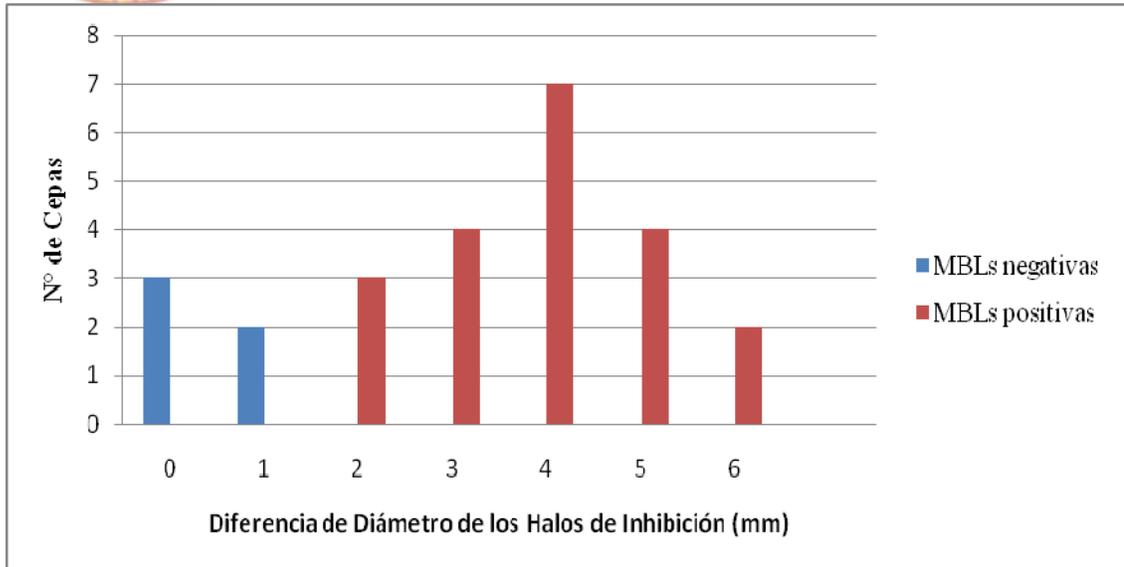
Gráfica 2. *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas según la diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el meropenem solo y combinado con EDTA/SMA.



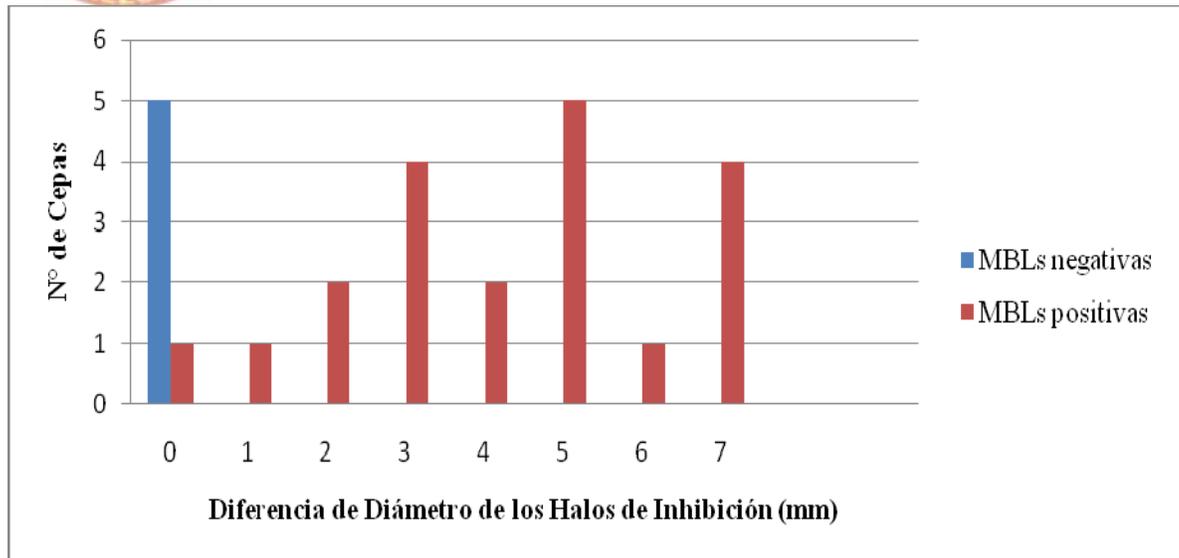
Gráfica 3. *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas según la diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el imipenem solo y combinado con EDTA.



Gráfica 4. *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas según la diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el meropenem solo y combinado con EDTA.



Gráfica 5. *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas según la diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el imipenem solo y combinado con SMA.



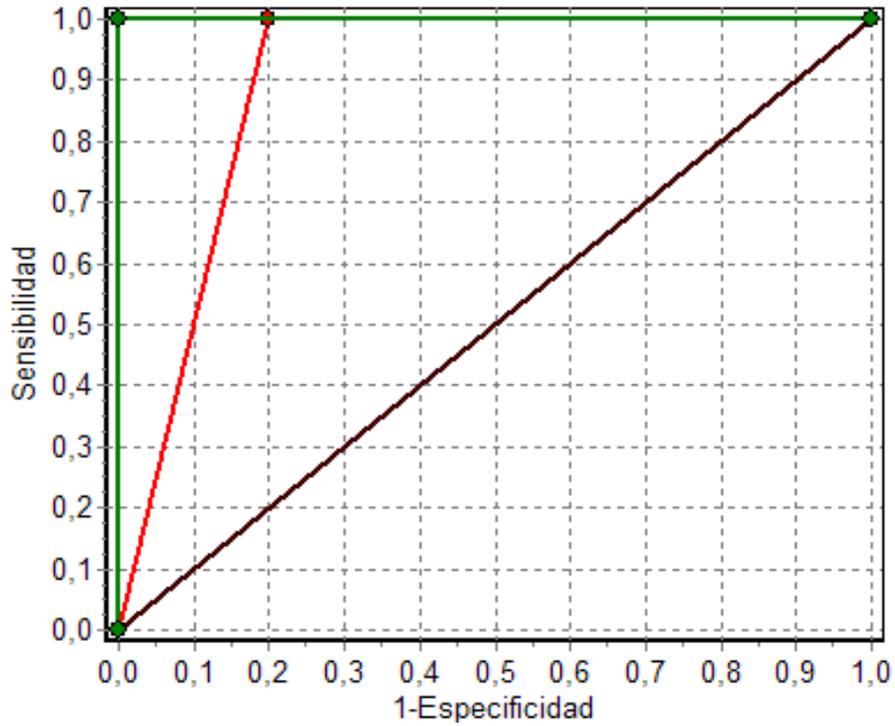
Gráfica 6.

P. aeruginosa productoras y no productoras de metalo β -lactamasas según la diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el meropenem solo y combinado con SMA.



Tabla 5. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los métodos de sinergia de doble disco y del disco combinado entre los antibióticos usados (imipenem y meropenem) solos y combinados con los inhibidores de metalo β -lactamasas según los puntos de corte propuestos.

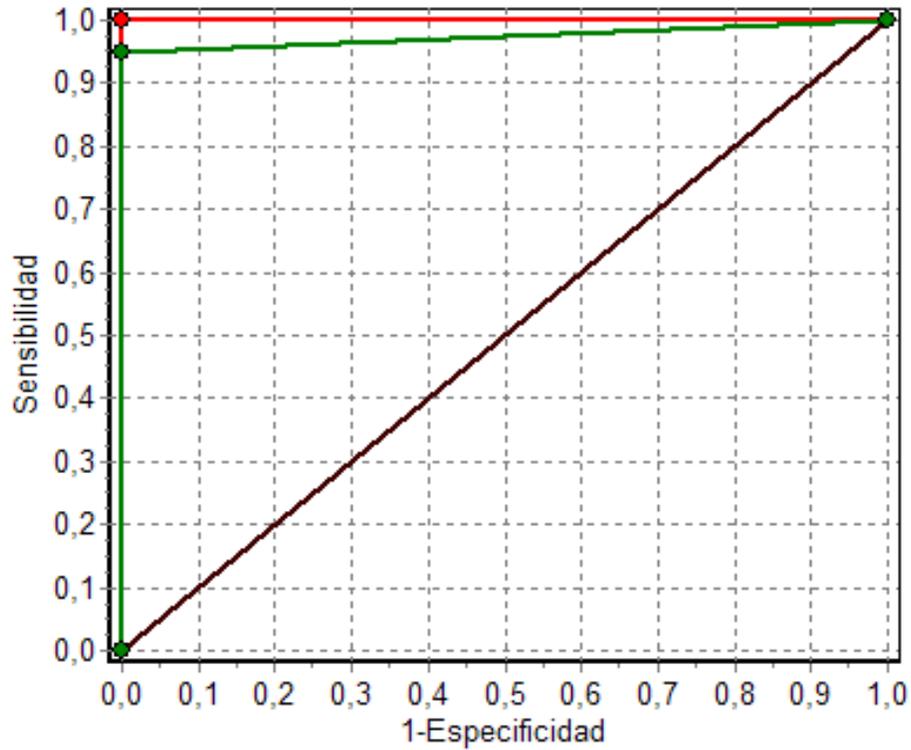
Métodos, agente (s)	SN (%)	SP (%)	VPP (%)	VPN (%)
DDST	100	100	100	100
Método del disco combinado				
IMP/EDTA/SMA				
≥ 4 mm	100	100	100	100
≥ 5 mm	100	100	100	100
≥ 6 mm	100	100	100	100
MEM/EDTA/SMA				
≥ 4 mm	100	80	95,24	100
≥ 5 mm	100	100	100	100
≥ 6 mm	100	100	100	100
IMP/EDTA				
≥ 4 mm	100	100	100	100
≥ 5 mm	100	100	100	100
≥ 6 mm	100	100	100	100
MEM/EDTA				
≥ 4 mm	100	100	100	100
≥ 5 mm	100	100	100	100
≥ 6 mm	95	100	100	83,83
IMP/SMA				
≥ 1 mm	100	60	90,91	100
≥ 2 mm	100	100	100	100
≥ 3 mm	85	100	100	62,5
MEM/SMA				
≥ 1 mm	95	100	100	83,33
≥ 2 mm	90	100	100	71,43
≥ 3 mm	75	100	100	50



Punto de corte	Área bajo la curva
≥4 mm	0,9000
≥5 mm	1,0000
≥6 mm	1,0000

($J_i^2=1,000$; $gl=1$; $p=0,3173$)

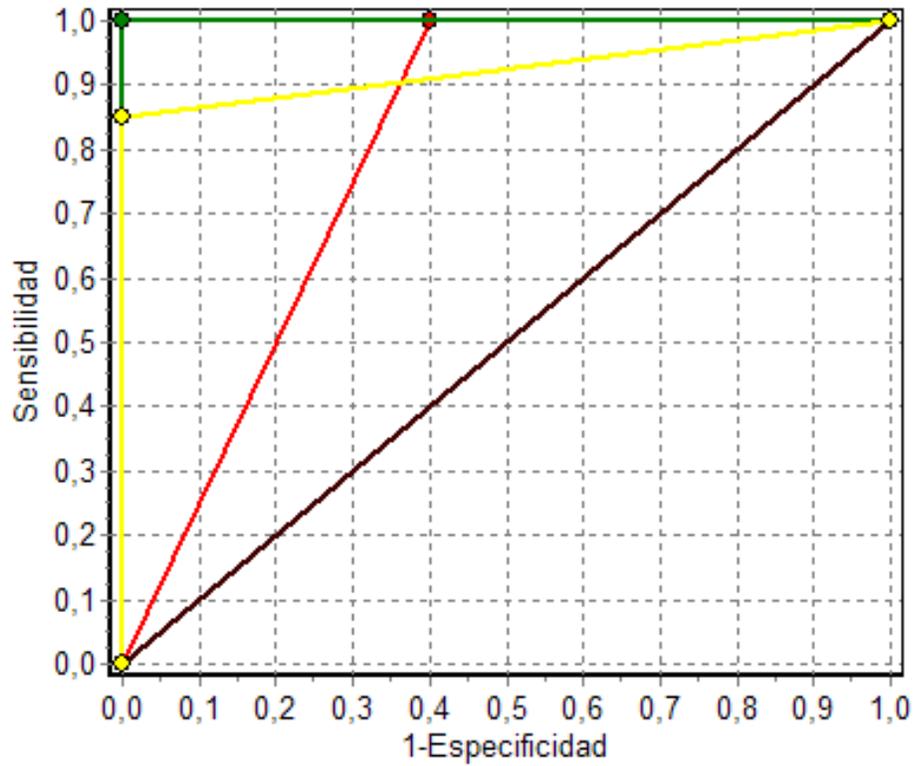
Gráfica 7. Comparación de los puntos de corte para la prueba de discos combinados de Meropenem/ácido etilendiaminotetracético/Mercaptoacético de sodio (MEM/EDTA/SMA) mediante curvas de características operacionales (curvas ROC).



Punto de corte	Área bajo la curva
≥4 mm	1,0000
≥5 mm	1,0000
≥6 mm	0,9750

($J_i^2=1,000$; $gl=1$; $p=0,3173$)

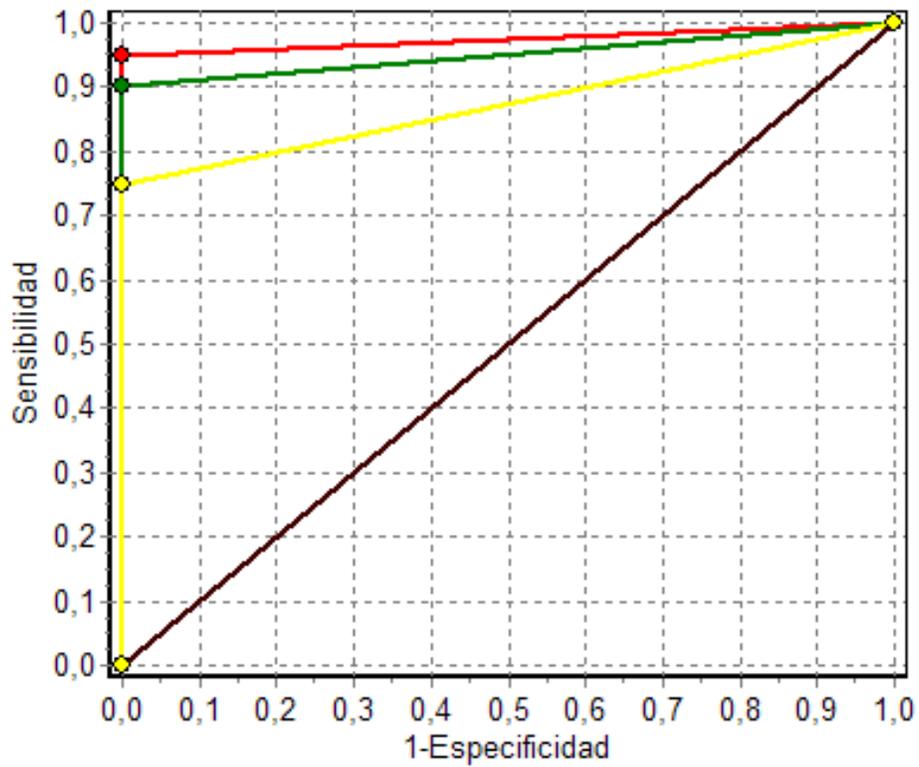
Gráfica 8. Comparación de los puntos de corte para la prueba de discos combinados de meropenem/ácido etilendiaminotetracético (MEM/EDTA) mediante curvas de características operacionales (curvas ROC).



Punto de corte	Área bajo la curva
≥1 mm	0,8000
≥2 mm	1,0000
≥3 mm	0,9250

($J_i^2=6,0196$; $gl=2$; $p=0,0141$)

Gráfica 9. Comparación de los puntos de corte para la prueba de discos combinados de imipenem/mercaptoacético de sodio (IMI/SMA) mediante curvas de características operacionales (curvas ROC).



Punto de corte	Área bajo la curva
≥1 mm	0,9750
≥2 mm	0,9500
≥3 mm	0,8750

($J_i^2=3,2477$; $gl=2$; $p=0,0715$)

Gráfica 10. Comparación de los puntos de corte para la prueba de discos combinados de meropenem/mercaptoacético de sodio (MEM/SMA) mediante curvas de características operacionales (curvas ROC).



DISCUSIÓN

Las metalo β -lactamasas (MBLs) están particularmente asociadas a infecciones difíciles de tratar producidas por patógenos Gram negativos como *P. aeruginosa*. La importancia de estas enzimas radica en que son capaces de inactivar a todos los antibióticos β -lactámicos, por tanto, su presencia requiere de un monitoreo continuo, debido a su impacto potencial en el tratamiento de los pacientes infectados con este tipo de microorganismos y la implicación para el control de las infecciones hospitalarias, de allí la importancia de su detección rápida y eficiente, lo que amerita la implementación de técnicas de laboratorio para su identificación rutinaria.

Mediante la técnica de sinergismo de doble disco fue posible identificar y diferenciar todas las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs de aquellas cepas MBLs negativas evaluadas, utilizando como agentes quelantes el EDTA y el SMA en concentraciones de 750 μ g y 2 mg respectivamente, este resultado coincide con lo obtenido por Lee *et al.*, (2003) quienes usaron como agentes quelantes el EDTA, el SMA y el MPA (ácido mercaptopropiónico) demostrando que mediante los discos que contenían 750 μ g de EDTA y 2 mg de SMA se logra una mejor detección de la metaloenzima y la eliminación de una zona de inhibición no específica, permitiendo así diferenciar entre cepas productoras y no productoras de MBLs. En Venezuela, Sánchez *et al.*, (2008) y Guevara *et al.*, (2009) también utilizaron este método, logrando identificar correctamente a las cepas productoras de MBLs. Cabe destacar que la distancia entre los discos de imipenem y meropenem con respecto al disco que contenía la mezcla de los inhibidores, usada en este estudio, fue de 15 mm, permitiendo observar de manera clara la deformación del halo de inhibición formado, lo cual coincide con estudios realizados por Picao *et al.*, en el año 2008.



La aplicación de la prueba de discos de carbapenemos combinados con agentes quelantes (EDTA/SMA, EDTA) a las cepas en estudio, permitió diferenciar las cepas productoras de las no productoras de MBLs, no logrando obtener este mismo resultado al usar SMA. En la literatura consultada no se encontraron otras investigaciones donde se usara el método de discos combinados con EDTA/SMA para la detección de MBLs en *P. aeruginosa*. A nuestro entender, este es el primer estudio donde se evalúa la técnica de discos combinados usando imipenem y meropenem combinados con una mezcla de EDTA/SMA para la detección de MBLs. Esta técnica es eficiente y comparable al método de sinergia de doble disco utilizando estos mismos agentes quelantes.

Cuando se probaron los agentes quelantes EDTA y SMA por separado, combinados con el imipenem y el meropenem, se obtuvo un mejor resultado con el EDTA, comparable al obtenido cuando se usó la mezcla de las dos sustancias. Esto indica que en el caso de la detección de MBLs en cepas de *P. aeruginosa*, el EDTA es más eficiente que el SMA a las concentraciones probadas.

Yong *et al.*, (2002), utilizaron el método del disco combinado de imipenem y EDTA a concentraciones de 750 y 1000 μg de EDTA, y obtuvieron los mejores resultados para identificar cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs usando 750 μg de EDTA estableciendo como punto de corte una diferencia de ≥ 7 mm. Qu *et al.*, (2009) realizaron un estudio similar pero en este caso usaron diferentes concentraciones de EDTA (290, 750 y 930 μg), estos autores también obtuvieron los mejores resultados usando 750 μg de EDTA con un punto de corte ≥ 6 mm; la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de este ensayo fueron de 100%, lo cual coincide con nuestro estudio.

En contraste con lo descrito anteriormente, algunos autores han obtenido mejores resultados al utilizar otras concentraciones de EDTA. Franklin *et al.*, (2006),



utilizaron el EDTA a una concentración de 292 μg en cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de MBLs, con un punto de corte de > 4 mm. Samuelsen *et al.*, (2008), realizaron la misma prueba pero a distintas concentraciones de EDTA (930, 744, 518 y 292 μg); obteniendo la mejor separación entre cepas productoras y no productoras de MBLs a una concentración de 518 μg con un punto de corte de ≥ 8 mm.

Mediante las diferentes pruebas estadísticas realizadas se obtuvo como punto de corte 2 o más milímetros de diferencia entre los halos de inhibición del imipenem solo y combinado con SMA, y de 1 o más milímetros para el meropenem solo y combinado con esta misma sustancia. Estos puntos de cortes son difíciles de poner en práctica ya que establecer una diferencia de halo de 1 ó 2 mm podría estar sujeta a factores como la pericia y subjetividad del observador, así como a otros factores propios de la técnica de Kirby – Bauer que podrían hacer variar el diámetro de los halos de inhibición. En la literatura consultada no se encontró otras investigaciones donde se usara la técnica de disco combinado con SMA para la detección de MBLs en cepas de *P. aeruginosa*.

El presente estudio logró poner en evidencia que mediante el aumento del diámetro de los halo de inhibición de los carbapenemos combinados con la mezcla EDTA/SMA (750 μg /2 mg) o solo con EDTA (750 μg) se puede diferenciar de manera clara y confiable las cepas productoras de MBLs de las no productoras, estableciéndose como punto de corte una diferencia de 5 mm o más entre los halos de inhibición del antibiótico solo y combinado con el o los agentes quelantes.



CONCLUSIONES

La prueba de sinergia de doble disco usando imipenem y meropenem combinados con EDTA/SMA a 15 mm, demostró ser 100 % efectiva en la detección de cepas productoras y no productoras de MBLs.

La prueba de disco combinado usando EDTA solo y en combinación con SMA fue comparable a la prueba de sinergia de doble disco.

En la prueba de discos combinados, los mejores resultados se observaron usando EDTA/SMA o EDTA solo, por lo cual el EDTA es el agente quelante más efectivo al realizar esta prueba.

Se estableció como punto de corte ≥ 5 mm debido a que fue el más eficiente y con el se pudo obtener un 100% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, al combinar IMP y MEM con EDTA/SMA o únicamente con EDTA.

El uso de SMA en combinación con imipenem y meropenem no resultó efectivo para establecer puntos de corte adecuados que permitieran identificar las cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de MBLs.



RECOMENDACIONES

Realizar la prueba de discos combinados usando SMA a concentraciones distintas a la aplicada en este estudio, con la finalidad de determinar su posible efectividad en la diferenciación de cepas productoras y no productoras de MBLs.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambler, R. 1980. The structure of betalactamases. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289: 321–331.
- Anzueto, A., Torres, A., Lara, B., Gotuzzo, E., Garau, J., Garcia, J., et al. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*. [Serie en línea] vol. 10, no. 3; p 18. Disponible: <http://www.antibioticoterapia.com/modules.php?name=News&file=article&sid=773&num=2008-03-01> [Octubre, 2009].
- Bush, K. 1989. Classification of β -lactamases: group-2c- 2d, -2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother.* 33:271–276.
- Bush, K., Jacoby, M., Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:1211- 1233.
- Chirinos, J. 2000. Los mecanismos de la resistencia microbiana. *Rev Med del C.I.E.M.* 3 (5): 35-41.
- Chu, T., Cheung, T., Ngan, J., Kam, K. 2005. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem–EDTA disk method. *Int J Antimicrob Agents.* 26: 340–341.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. M 100-S19. Pensilvania, USA: autor.



- Cornaglia, G., Mazzariol, A., Lauretti, L., Rossolini, G., Fontana, R. 2000. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis.* 31: 1119-1125.
- Cornaglia, G., Akova, M., Amicosante, G., Cantón, R., Cauda, R., Doquier, J., et al. 2007. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents.* 29: 380-388.
- Crespo, M., Woodford, N., Sinclair, A., Kaufmann, M., Turton, J., Glover, J., et al. 2004. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol.* 42: 5094-5101.
- Döring, G., Maier, M., Müller, E., Zoubair, B., Tümmler, B., and Kharazmi, A. 1987. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother.* 39: 136-148.
- Driscoll, J., Brody, S., Kollef, M. 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 67 (3): 351-368.
- Franklin, C., Liolios, L., Peleg, A. 2006. Phenotypic detection of carbapenem susceptible metallo- β -lactamase producing Gram negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 44 (9): 3139-3144.
- Guevara, A., Waard, J., Araque, M. 2009. Detección del gen blaVIM-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.* 26 (4): 336-341.



- Hardalo, C., Edberg, S. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol.* 23 (1): 47-75.
- Jesudason, M., Kandathil, A., Balaji, V. 2005. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo- β -lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res.* 121: 780-783.
- Kimura, S., Alba, J., Shiroto, K., Sano, R., Niki, Y., Maesaki, S., et al. 2005. Clonal diversity of metallo- β -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol.* 43 (1): 458-461.
- Köhler, T., Pechère, C. 2001. In vitro selection of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 7(suppl 5): 7–10.
- Koneman, E., Allen, S., Davel, V., Janda, W. 2001. *Diagnóstico Microbiológico*. Edit. Panam, 5^a ed. Buenos Aires. pp 286-287.
- Lee, K., Chong, Y., Shin, H., Kim, Y., Yong, D., Yum, J. 2001. Modified Hodge and EDTA -disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 7 (2): 88-91.
- Lee, K., Lim, S., Yong, D., Yum, H., Chong, Y. 2003. Evaluation of the hodge test and the imipenem-EDTA-double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp y *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 41(10): 4623-4629.



- Livermore, D. 2001. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* . 47: 247–250.
- Mansilla, E. 2008. Neumonía asociada a ventilación mecánica por *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalobetalactamasas. Disponible: http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache%3AtfJuxX5f5mIJ%3Awww.f.soria.es%2Fadmfsoria%2Fcasos%2Fimg%2Fcaso_452.pdf+casos+de+microbiologia+clinica+emilia+cercenado+mansilla&hl=es&gl=ve&sig=AFQjCNG1EU6P2H7C9o7hZwQNjCyAVMh00A [Octubre, 2009].
- Marchiaro, P., Mussi, M., Ballerini, V., Pasteran, F., Viale, A., Vila, A., et al. 2005. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- β -lactamases in non-fermentative Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol*. 43 (11): 5648-5652.
- Martínez, L., Hernández, A. 2003. Mecanismos de resistencia a las carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa*. [Serie en línea] Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/psaeru.htm [Octubre, 2009].
- Massidda, O., Rossolini, M., Satta, G. 1991. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. *J Bacteriol*. 173: 4611–4617.
- Murphy, T., Simm, A., Toleman, M., Jones, R., Walsh, T. 2003. Biochemical characterization of the acquired Metallo β -lactamases SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 47 (2): 582-587.



- Peleg, A., Franklin, C., Bell, J., Spelmam, D. 2005. Dissemination of the metallo β -lactamase gene bla IMP-4 among gramnegative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis.* 41: 1549-1556.
- Picao, R., Andrade, S., Nicoletti, A., Campana, E., Moraes, G., Mendes, R. 2008. Metallo- β -Lactamase Detection: Comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP, GIM, SIM, SPM, or VIM-Producing Isolates. *J Clin Microbiol.* 46 (6): 2028-2037.
- Poirel L., Nordmann, P. 2002. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol.* 3: 117-127.
- Poirel L., Pitout J., Nordmann, P. 2007. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* 2 (5): 501-512
- Qu, T., Zhang, J., Wang, J., Tão, J., Yu, Y., Chen, Y. 2009. Evaluation of phenotypic tests for detection of Metallo- β -Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol.* 47 (4): 1136-1142.
- Queenan, A., Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20: 440-458.
- Rasmussen, B., Bush, K. 1997. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 41 (2): 223–232.
- Rodriguez, C., Juarez, J., De Mier, C., Pugliese, L., Blanco, G., Vay, C., et al. 2003. Resistencia a Antibioticos de Bacilos Gram Negativos Aislados en Unidades de Cuidado Intensivo: Analisis comparativo de dos periodos (1998-2001) *Medicina.* 63 (1): 21-27.



- Rossolini, G. 2005. Acquired metallo- β -lactamases: an increasing clinical threat. *Clin Infect Dis.* 41: 1557-1558.
- Sader, H., Castanheira, M., Mendes, R., Toleman, M., Walsh, T., Jones, R. 2005. Dissemination and diversity of metallo β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents.* 25: 57-61.
- Samuelson, O., Buaro, L., Giske, C., Simonsen, G., Aasnaes, B., Sundsfjord, A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother.* 61: 827-830.
- Sánchez, D., Marcano, D., Spadola, E., Leon, L., Payares, D., Ugarte, C., et al. 2008. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales de Venezuela. *Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel".* 39 (2): 17-22.
- Singh, P., Parsek, M., Greenberg, E., Welsh, J. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 417: 552-555.
- Sardelic, S., Pallecchi, L., Punda-Polic, V., Rossolini, G. 2003. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying VIM-2 metallo- β -lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infect Dis.* 9: 1022-1023.
- Tafur, J., Torres, A., Villegas, M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram negativas. *Infection.* 12 (3): 217-226.



- Toleman, M., Biedenbach, D., Bennett, D., Jones, R., Walsh, T. 2005. Italian metallo β -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother.* 25: 57-61.
- Vila, J., Rivera, A., Francesc, M. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gram negativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 20 (6): 304-312.
- Vila, J., Marti, S., Sanchez-Cespedes, J. 2007. Porins, eflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 59: 1210-1215.
- Villegas, M., Lolans, K., Olivera, M., Suarez, C., Correa, A., Queenan, A., et al. 2006. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:226-229.
- Wachsman, M., Degrossi, M. 2007. Problemas en el Desarrollo de Antimicrobianos: Emergencia de Mecanismos de Resistencia. [Serie en linea]. Disponible: http://www.ub.edu.ar/revistas_digitales/Ciencias/Vol6Numero3/articulos.htm [Octubre, 2009].
- Walsh, T., Toleman, M., Poirel, L., Nordmann, P. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 18: 306-325.
- Yan, J., Wu, J., Tsai, H., and Chuang, C. 2004. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 49 (1): 5-11.



Yong, D., Lee, K., Yum, J., Shin, H., Rossolini, G., Chong, Y. 2002. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 40 (10): 3798-3801.



APÉNDICE



Preparación de discos de EDTA/SMA:

EDTA 0,5 M-----2 vol. (4 ml)

SMA (300 mg/ ml)-----3 vol.(6 ml)

Preparación del mercaptoacético de sodio (SMA) 300mg/ml:

1ml-----300 mg.

6ml-----X= 1.800 mg = 1,8 g.

Preparación del EDTA 0,5 M:

$$M = \text{gr} / \text{PM}$$

$$g = M \times \text{PM}$$

PM del EDTA = 372,24

$$g = 0,5 \times 372,24 = 186,12 \text{ g/l}$$

1000 ml-----186,12 g

4 ml----- X = 0,744 g \approx 0,75 g

Concentración Final =

750 μg de EDTA + 2.000 mg de SMA.



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

TÍTULO	Efectividad del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y del mercaptoacético de sodio (SMA) en la detección de metalo β -lactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
SUBTÍTULO	

AUTOR (ES):

APELLIDOS Y NOMBRES	CÓDIGO CULAC / E MAIL
Machado M., Maria F.	CVLAC: 18.238.926 E MAIL: mariafer_314@hotmail.com
Vera O., Mariangel J.	CVLAC: 17.747.746 E MAIL: marimjvo@hotmail.com

PALÁBRAS O FRASES CLAVES:

Acido etilenaminotetracético
Carbapenémicos
Mercaptoacético de sodio
Metallo- β -lactamasas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ÁREA	SUBÁREA
Microbiología	Bacteriología

RESUMEN (ABSTRACT):

Pseudomonas aeruginosa se encuentra dentro de las especies de bacilos Gram negativos no fermentadores más relevantes clínicamente. Es capaz de adquirir genes que codifican para la producción de metalo β -lactamasas, las cuales son activas contra carbapenemos e inhibidas por agentes quelantes, como el EDTA. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la efectividad del EDTA y del SMA (750 μg y 2 μg) o la mezcla de ambos, en la detección de MBLs en 25 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes hospitales y centros de investigación, empleando métodos fenotípicos como la sinergia de doble disco y el método de discos combinados. En el primero, se utilizaron discos en blanco con la mezcla de EDTA/SMA y discos de Imipenem (IMP) y Meropenem (MEM), y en el segundo, se evaluó el efecto de los antibióticos solos y combinados con las soluciones de EDTA, SMA o ambas. El primer método, permitió diferenciar, cepas productoras de las no productoras de MBLs, y el segundo, evidenció la efectividad del EDTA, estableciendo como punto de corte una diferencia de halo de ≥ 5 mm entre los antibióticos solos y combinados con el agente quelante, lo que no se logró con el SMA donde el punto de corte encontrado fue ≥ 2 mm, lo que lo hace difícil de poner en práctica, demostrando que, en el caso de *P. aeruginosa*, el EDTA es el agente quelante más efectivo al realizar esta prueba.



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

CONTRIBUIDORES:

APELLIDOS Y NOMBRES	ROL / CÓDIGO CVLAC / E-MAIL				
Dr. Guevara R., Armando J.	ROL	CA	AS	TU X	JU X
	CVLAC:	9.460.962			
	E_MAIL	agvillefort@yahoo.com			
	E_MAIL				
Lcda. Gamboa Ana Claudia	ROL	CA	AS X	TU	JU
	CVLAC:	14.410.235			
	E_MAIL	gambomar@hotmail.com			
	E_MAIL				
Dr. Parrilla. Pedro.	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	4.771.295			
	E_MAIL	pparrill@hotmail.com			
	E_MAIL				
Dra. Cermeño., Julman R.	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	8.939.807			
	E_MAIL	jcerme30@gmail.com			

FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:

2010	02	17
AÑO	MES	DÍA

LENGUAJE. SPA



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ARCHIVO (S):

NOMBRE DE ARCHIVO	TIPO MIME
TESIS.pseudomonas.doc	MS.word

ALCANCE

ESPACIAL Laboratorio Bacteriologico Dr. Socrates Medina Esc de Cs de la Salud Universidad de Oriente Ciudad Bolivar

TEMPORAL: 5 Años

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Lic. En Bioanálisis.

NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Licenciatura.

ÁREA DE ESTUDIO:

Bacteriología

INSTITUCIÓN:

Universidad de Oriente.



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

DERECHOS.

De acuerdo al artículo 44 del reglamento de trabajo de grado

“Los Trabajos de grado son exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente y solo podrán ser utilizadas a otros fines con el consentimiento del consejo de núcleo respectivo, quien lo participara al Consejo Universitario”


AUTOR


AUTOR


TUTOR


JURADO


JURADO

POR LA SUBCOMISION DE TESIS