

Artículo original

Evaluación del ácido etilendiaminetetraacético y del mercaptoacético de sodio en la detección de metalo β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* mediante la técnica del disco combinado

Armando Guevara^{a,b*}, Ana Gamboa^a, María Machado^a, Mariangel Vera^a

^aDepartamento de Parasitología y Microbiología. Escuela de Ciencias de la Salud "Dr. Francisco Batistini". Universidad de Oriente. Núcleo Bolívar. ^bUnidad de Infectología y Microbiología Médica. Laboratorio de Microbiología. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez". Ciudad Bolívar, Venezuela.

Recibido 6 de marzo de 2010; aceptado 10 de junio de 2010

Resumen: *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gramnegativo capaz de adquirir genes que codifican para la producción de metalo β -lactamasas (MBLs), las cuales son activas contra carbapenemos e inhibidas por agentes quelantes, como el ácido etilendiaminetetraacético (EDTA). Se determinó la efectividad del EDTA y del ácido mercaptoacético de sodio (SMA) en la detección de MBLs en 25 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes hospitales y centros de investigación, empleando el método de discos combinados. Se evaluó el efecto de los antibióticos solos y combinados con EDTA, SMA o ambos. Se encontró que, mediante el aumento del diámetro de los halos de inhibición de los carbapenemos combinados con la mezcla EDTA/SMA (0,5 M/300 mg/mL) o sólo con EDTA (0,5 M), se pudieron 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 sólo y combinado con el o los agentes quelantes.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, disco combinado, metalo β -lactamasas, EDTA, ácido mercaptoacético de sodio

Evaluation of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium mercaptoacetic acid in the detection of metallo β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* by the combined disk technique

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is a gram negative bacillus capable of acquiring genes which code for metallo β -lactamase production (MBLs) which are active against carbapenems and inhibited by chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). We determined the effectiveness of EDTA and sodium mercaptoacetic acid (SMA) in the detection of MBLs on 25 *P. aeruginosa* strains from different hospitals and research centers, using the combined disk technique. We evaluated the effect of the antibiotics alone and combined with EDTA, SMA, or both. We found that through the increase of the diameter of the inhibition halos of the carbapenems combined with an EDTA/SMA mixture (0.5 M/300 mg/mL) or with EDTA alone (0.5 M), we could differentiate in a clear and reliable way the MBLs producing from the non producing strains, establishing as cutoff point a difference of 5 mm or more between the antibiotic alone and the antibiotic combined with the chelating agent(s).

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, combined disk, metallo β -lactamase, EDTA, sodium mercaptoacetic acid

* Correspondencia:
E-mail: agvillefort@yahoo.com

Introducción

El aumento de la resistencia a los antibióticos entre las bacterias gramnegativas es un ejemplo notable de cómo estos microorganismos pueden adquirir, mantener y expresar información genética nueva que puede conferir resistencia a uno o varios antibióticos [1]. *Pseudomonas*

aeruginosa es una de las especies de bacilos gramnegativos no fermentadores más relevantes clínicamente, debido entre otras cosas, a su capacidad de expresar mecanismos de resistencia que pueden afectar a varios grupos de antimicrobianos simultáneamente.

P. aeruginosa, es capaz de adquirir genes que codifican para la producción de metalo β -lactamasas (MBLs). Estas

enzimas, presentes de forma natural en algunas especies de bacilos gramnegativos ambientales, tienen la capacidad de hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos sin afectar a los monobactámicos [1,2].

Otras de las características fundamentales de las MBLs son: ser inhibidas por agentes quelantes de iones metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y compuestos tiólicos como el ácido dipicolínico (DPA) y el mercaptoacético de sodio (SMA), no ser inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam, y presentar 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 [1,3,4]. A nivel molecular, las MBLs son un grupo heterogéneo de proteínas que hacen que la clasificación y estandarización de su estructura sea prácticamente imposible [3].

En *P. aeruginosa* se han detectado las MBLs transferibles de tipo IMP, VIM, SPM, GIM y AIM, siendo las IMP y VIM, las más diseminadas en el mundo, ya que, a pesar de su baja similitud en secuencia de aminoácidos, comparten características hidrolíticas muy afines [1,5-7]. 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), que usualmente transportan otros determinantes de resistencia [1,8].

La MBL de tipo VIM-2 es la más frecuentemente reportada [4, 9,10]. En Venezuela, fue descrita por primera vez en el año 2004 [11] y posteriormente en el 2009 [12] en cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico.

La importancia de los bacilos gramnegativos productores de MBLs adquiridas radica en que usualmente causan infecciones difíciles de tratar, debido a la inefectividad de los β -lactámicos, en especial de los carbapenemos que son los antibióticos más usados en infecciones graves. 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 MBLs, aumentando así las posibilidades de supervivencia de los pacientes infectados. De allí la importancia de su detección rápida y eficiente, lo que amerita la implementación de técnicas de laboratorio para su identificación rutinaria.

Dado el hecho de que todas las 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 los aislamientos que poseen estas enzimas. Sin embargo, las MBLs varían en su nivel de inhibición con estos compuestos quelantes, así como también en su capacidad de conferir resistencia a los sustratos comúnmente utilizados en su detección [1,4,10].

Varios métodos fenotípicos han sido propuestos para la detección de MBLs en *P. aeruginosa*, basados en la utilización de discos impregnados con inhibidores de estas enzimas, como el EDTA, el DPA, el ácido 2-mercaptopropiónico,

(MPA) y el SMA [4,7], pero estos métodos pueden 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 por parte del antibiótico empleado [13,14]. En nuestro medio, la detección de MBLs se realiza principalmente a través del método del sinergismo del doble disco (DDST, por sus siglas en inglés) usando el EDTA y el SMA como agentes quelantes, con muy buenos resultados [12,15]. Sin embargo, se desconoce la eficiencia de la combinación de estas sustancias en la detección de MBLs mediante la técnica del disco combinado. Por tal motivo, nos propusimos comparar la efectividad del EDTA y del SMA en la detección de MBLs en una colección de cepas de *P. aeruginosa* mediante la técnica del disco combinado.

Materiales y métodos

Diseño de la investigación: Se realizó una investigación experimental.

Muestra: La muestra estuvo constituida por 25 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes hospitales y centros de investigación, 20 de las cuales eran productoras de MBLs de diferentes tipos, caracterizadas por técnicas de biología molecular. Todas las cepas pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar, Venezuela. Las cepas, su procedencia y el tipo de mecanismo de resistencia que poseen se muestran en la tabla 1.

Detección de MBLs y eficiencia de los agentes quelantes: La detección de las MBLs se realizó mediante el método de los discos combinados, utilizando EDTA (0,5M), SMA (300 mg/mL) o una mezcla de ambas sustancias que fueron preparadas según lo descrito por Lee *et al*[16].

1.- *Discos combinados con EDTA/SMA (0,5 M/300 mg/mL):* Se realizó una suspensión de cada una de las cepas en estudio, ajustadas al patrón 0,5 de McFarland. Cada cepa fue inoculada en una placa de agar Müeller Hinton (HiMedia®), para luego colocar en su superficie, dos discos de imipenem y dos discos de meropenem. A un disco de cada carbapenemo se le agregó 10 μ L de la solución de EDTA/SMA, de manera tal que la concentración de cada sustancia quelante en cada disco de antibiótico fue de 750 μ g y 2 mg respectivamente. Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas en aerobiosis para posteriormente medir y comparar los halos de inhibición formados.

2.- *Discos combinados con EDTA (0,5 M):* Para este ensayo se empleó una solución de EDTA (0,5 M). El procedimiento seguido es similar al realizado en el punto 1, solo que a un disco de cada carbapenemo se le adicionó 4 μ L de la solución EDTA (0,5 M) (750 μ g).

3.- *Discos combinados con SMA (300 mg/mL):* En esta prueba se empleó una solución de SMA (300 mg/mL). El procedimiento a seguir es similar al del punto 1, sólo que a un disco de cada carbapenemo se le adicionó 6 μ L de SMA

Tabla 1. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas en el estudio según su centro de procedencia y mecanismo de resistencia.

Nº Cepa	Centro de procedencia	Mecanismo de resistencia
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-like
865 A	Hospital Industrial de San Tomé	VIM-like
788 A	Hospital "Raul Leoni"	VIM-like
952 M	Hospital "Raul Leoni"	VIM-like
944 M	Hospital "Raul Leoni"	VIM-like
925 M	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
333 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
1525	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
15 H	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
476 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
270 B	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
1100 H	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-2
3304 O	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
9 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-2
1143 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
1272 A	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
50 B	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-like
807 B	Comp. Hosp. "Ruiz y Paez"	VIM-2
ATCC 27853	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"	Ninguno
77926	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"	Bomba de flujo MexAB-OprM
77301	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"	Deficit de porinas OprD
77924	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"	GES-1
77925	Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"	OXA-31

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

Interpretación de resultados y análisis estadístico: Se compararon los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con los antibióticos solos y con cada sustancia quelante (EDTA, SMA, EDTA/SMA), así como la diferencia entre los halos, en las cepas productoras y no productoras de MBLs. Se determinó su significancia estadística mediante la aplicación del test t de Student y se propusieron los posibles puntos de corte.

Con el fin de seleccionar el punto de corte óptimo para cada prueba, se calculó la sensibilidad (SN), la especificidad (SP), el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), utilizando las siguientes formulas: SN: $a/(a+c)$; SP: $d/(b+d)$; VPP: $a/(a+b)$; 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.

Para verificar la escogencia de los puntos de corte óptimos (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), utilizando el Programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados EPIDAT versión 3.1 (Xunta de Galicia/OPS). 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 una prueba es más eficiente a medida que el área bajo la curva ROC se aproxima a 1. Se consideró como un punto de corte óptimo aquel que permitiera distinguir entre todas las cepas productoras y no productoras de MBLs de forma inequívoca.

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.

Al realizar la prueba usando el imipenem o el meropenem con la mezcla de EDTA/SMA o sólo con EDTA, 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 esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$) (Tabla 2), no así en las cepas no productoras de la enzima, donde el máximo incremento del promedio de los halos de inhibición fue de 1,74 mm. Cuando los carbapenemos se combinaron sólo con el SMA, el incremento promedio de los halos de inhibición en las cepas productoras de MBLs fue de aproximadamente 4 mm mientras que en las no productoras no hubo ningún incremento (Tabla 2).

Cuando se calcularon las diferencias promedio de los halos de inhibición obtenidos al probar un carbapenemo solo y el mismo combinado con un agente quelante, y se comparó el resultado de las cepas productoras de MBLs

Tabla 2. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición del imipenem y meropenem solos y combinados con los inhibidores de metalo β -lactamasas.

Prueba del disco combinado	MBL+		MBL-	
	Halo promedio (mm)	<i>p</i>	Halo promedio (mm)	<i>p</i>
IMP	9,5		16,8	
IMP/EDTA/SMA	22,4	<0,0001	17,8	0,7835
MEM	11,5		17,1	
MEM/EDTA/SMA	24,3	<0,0001	18,8	0,8235
IMP	9,7		17,2	
IMP/EDTA	23,2	<0,0001	18,8	0,6626
MEM	12,0		18	
MEM/EDTA	23,5	<0,0001	19,4	0,7856
IMP	9,2		15,6	
IMP/SMA	13,1	<0,0008	15,6	1,000
MEM	11,4		17	
MEM/SMA	15,6	0,0117	17	1,000

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

Tabla 3. 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

Prueba del disco combinado	Diferencia de halos (mm)		<i>p</i>
	MBL+	MBL-	
(IMP/EDTA/SMA) – IMP	12,9	1	<0,0001
(MEM/EDTA/SMA) – MEM	12,7	1,2	<0,0001
(IMP/EDTA) – IMP	13,6	1,6	<0,0001
(MEM/EDTA) – MEM	11,5	1,4	<0,0001
(IMP/SMA) – IMP	3,9	0,4	<0,0001
(MEM/SMA) – MEM	4,2	0	<0,0002

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

con lo obtenido en las no productoras, se confirmó que el uso de los agentes quelantes, en especial el EDTA y la combinación EDTA/SMA, produce una ampliación de los halos de inhibición que permite diferenciar entre las cepas productoras y no productoras de la enzima (Tabla 3).

Las figuras 1 y 2 muestran que al comparar la diferencia entre los diámetros de los halos de inhibición del imipenem y el meropenem solos y en combinación con EDTA/SMA y EDTA, fue posible diferenciar claramente las cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de MBLs. En la figura 3A se puede apreciar que con el uso del imipenem sólo y combinado con el SMA también es posible distinguir entre los dos tipos de cepas evaluadas, mientras que el uso del meropenem sólo y combinado con SMA no permitió establecer de manera clara esta diferencia, debido a que la zona de inhibición de las cepas MBLs negativas fue igual a la de algunas cepas MBLs positivas (Figura 3B).

Se establecieron 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 las figuras 1, 2 y 3. Así, para las combinaciones de carbapenemos con EDTA y EDTA/SMA se escogieron como posibles puntos de corte una diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre un antibiótico solo y combinado con quelantes de 4, 5 y 6 mm, mientras que para las combinaciones de carbapenemos con SMA las

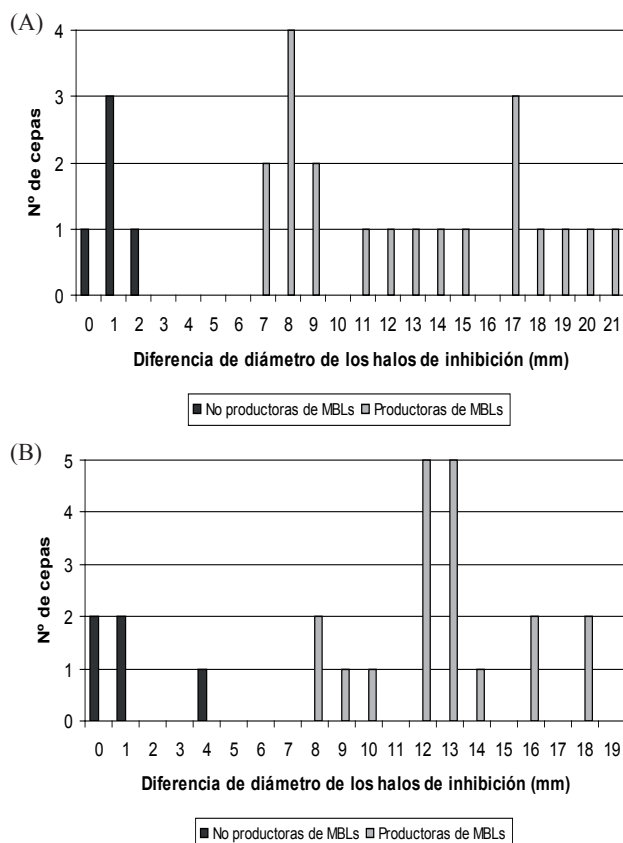


Figura 1. Diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el imipenem (A) y meropenem (B) solos y combinados con EDTA/SMA en cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas.

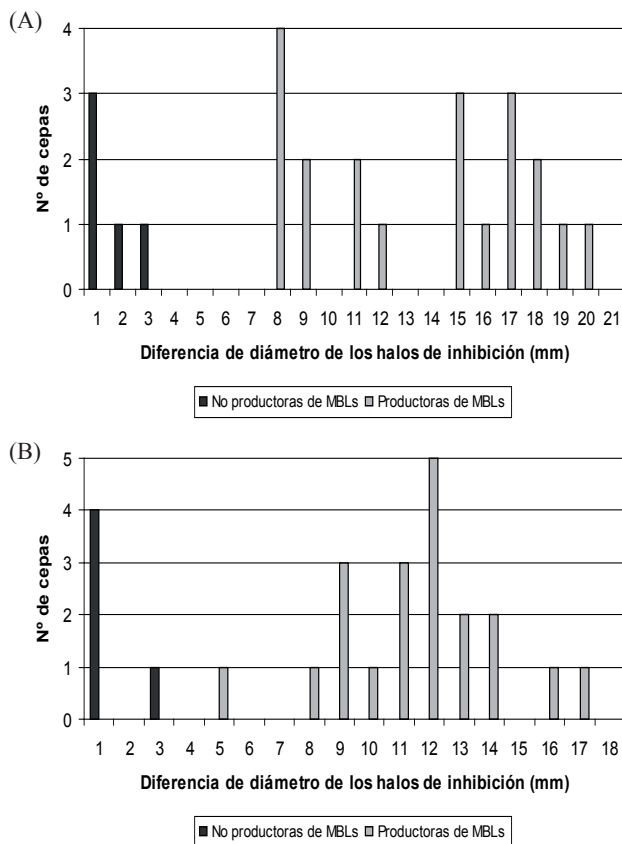


Figura 2. Diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el imipenem (A) y meropenem (B) solos y combinados con EDTA en cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas.

diferencias de halo propuestas fueron de 1, 2 y 3 mm (Tabla 4).

Al comparar los puntos de corte propuestos 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, una diferencia del diámetro del halo de inhibición ≥ 5 mm fue el más eficiente ya que con el mismo se pudo obtener 100% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo en todas las combinaciones (Tabla 4).

En el caso del imipenem combinado con SMA se estableció como punto de corte una diferencia del diámetro del halo de inhibición ≥ 2 mm, ya que permitió obtener 100% en cada uno de los parámetros estudiados. En el caso del meropenem combinado con SMA no se pudo establecer un punto de corte que permitiera obtener 100% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y del valor predictivo negativo, observándose que el punto de corte que más se aproxima es una diferencia de halo de ≥ 1 mm (Tabla 4).

Mediante las curvas ROC se pudo verificar que el uso de los agentes quelantes EDTA y SMA así como su combinación, a las concentraciones empleadas, produjo una correcta diferenciación entre las cepas productoras y no productoras de MBLs ya que el área bajo las curvas ROC fue de 1 para casi todas las pruebas, confirmando los puntos de corte propuestos anteriormente. En el caso de la combinación MEM/SMA el área bajo la curva ROC fue

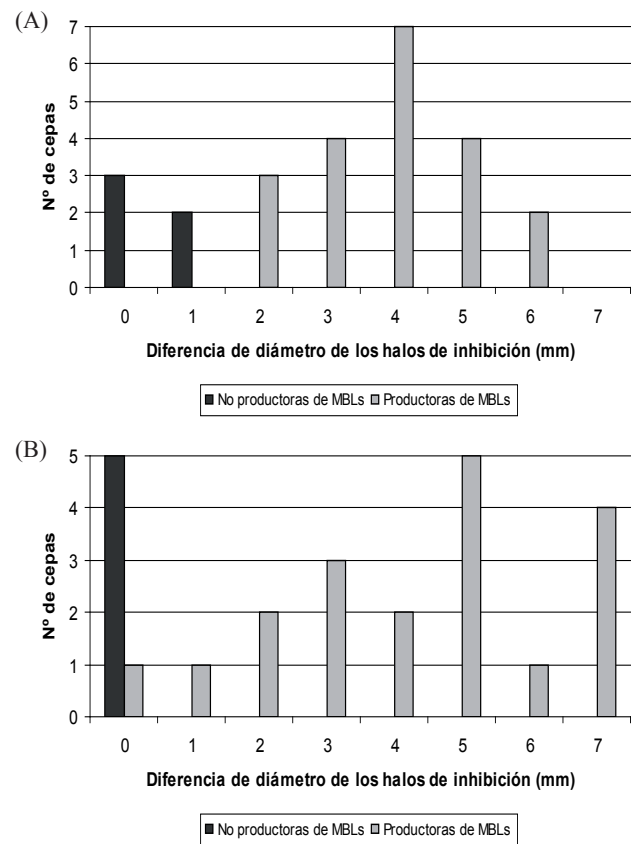


Figura 3. Diferencia del diámetro de los halos de inhibición entre el imipenem (A) y meropenem (B) solos y combinados con SMA en cepas de *P. aeruginosa* productoras y no productoras de metalo β -lactamasas.

de 0,9750 y se pudo confirmar como punto de corte una diferencia de halo ≥ 1 mm (datos no mostrados).

Discusión

Las MBLs están particularmente asociadas a infecciones difíciles de tratar producidas por patógenos gramnegativos 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 la supervivencia 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 [7,9,10].

La aplicación de la prueba de discos de carbapenems combinados con agentes quelantes a las cepas en estudio, permitió claramente diferenciar las cepas de *P. aeruginosa* productoras de las no productoras de MBLs. 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 esta técnica usando imipenem y meropenem combinados con una mezcla de EDTA/SMA para la detección de MBLs en

Tabla 4. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método del disco combinado entre imipenem y meropenem, solos y combinados con los inhibidores de metalo- β -lactamasas según los puntos de corte propuestos. Ciudad Bolívar, Venezuela.

Combinaciones y puntos de corte	SN(%)	SP(%)	VPP(%)	VPN(%)
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	95,2	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	84
IMP/SMA				
≥ 1 mm	100	60	91	100
≥ 2 mm	100	100	100	100
≥ 3 mm	85	100	100	62,5
MEM/SMA				
≥ 1 mm	95	100	100	83,3
≥ 2 mm	90	100	100	71,4
≥ 3 mm	80	100	100	55,6

IMP: imipenem; MEM: meropenem; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; SMA: ácido mercaptoacético de sodio; SN: sensibilidad; SP: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

este microorganismo.

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.

Otros investigadores han empleado el método del disco combinado utilizando imipenem y EDTA a concentraciones de 290, 750, 930 y 1000 μ g de EDTA, obteniendo los mejores resultados para identificar cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs al emplear 750 μ g de EDTA,

estableciendo como punto de corte una diferencia de ≥ 6 mm [17] y ≥ 7 mm [18]. La sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de estos ensayos fueron de 100%, lo cual coincide con nuestro estudio. En contraste, otras investigaciones encontraron que el uso de 292 μ g de EDTA con un punto de corte de > 4 mm [19] y de 518 μ g de EDTA con un punto de corte de ≥ 8 mm [20] resultaron ser más eficientes para distinguir entre cepas productoras y no productoras de MBLs. La variabilidad encontrada en los puntos de corte propuestos y en las concentraciones de EDTA usadas en los diferentes estudios, podría deberse a características propias de la colección de cepas evaluada y a las variantes alélicas de las MBLs incluidas en cada estudio.

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 corte son muy 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, a la actividad intrínseca de agente quelante, 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 encontraron 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 halos de inhibición de los carbapenemos combinados con la mezcla EDTA/SMA (750 μ g/2 mg) o sólo con EDTA (750 μ g) se pueden diferenciar de manera clara y confiable las cepas de *P. aeruginosa* 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. Así mismo, se pudo establecer que en el caso de la detección de MBLs en *P. aeruginosa*, el EDTA es más efectivo que el SMA a las concentraciones probadas.

Referencias

- Walsh T, Toleman M, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamasas: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005; 18:306-25.
- Rossolini G. Acquired metallo- β -lactamasas: an increasing clinical threat. Clin Infect Dis. 2005; 41:1557-8.
- Murphy T, Simm A, Toleman M, Jones R, Walsh T. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamasas SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47:582-7.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamasas. Clin Microbiol Rev. 2007; 20:440-58.
- Cornaglia, G., Mazzariol, A., Lauretti, L., Rossolini, G., Fontana, R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel

- transferable metallo-beta-lactamase. Clin Infect Dis. 2000; 31:1119-25.
6. Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel subgroup metallo- β -lactamase (MBL) AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. [Abstract] Memories of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA Septiembre 2007.
 7. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske GC, Gniadkowski M, *et al.* Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect. 2010; 16:112–22.
 8. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. Curr Pharm Biotechnol. 2002; 3:117-27.
 9. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Doquier J, *et al.* Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29:380-8.
 10. Poirel L, Pitout J, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol. 2007; 2:501-12.
 11. Mendes R, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman M, Walsh T, *et al.* First isolation of *bla*_{VIM-2} in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:1433-4.
 12. Guevara A, Waard J, Araque M. Detección del gen *bla*_{VIM-2} en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas aisladas en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela. Rev Chil Infect. 2009; 26:336-41.
 13. Chu T, Cheung T, Ngan J, Kam K. 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. 2005; 26:340–1
 14. Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, Monteiro N, Nagy E, Peixe L. Controlling for false positives: interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo- β -lactamases. J Antimicrob Chemother. 2009; 64 :657-8
 15. Sánchez D, Marcano D, Spadola E, Leon L, Payares D, Ugarte C, *et al.* Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clinicos de *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales de Venezuela. Rev Inst Nac Hig “Rafael Rangel”. 2008; 39(2):17-22.
 16. Lee K, Lim S, Yong D, Yum H, Chong Y. Evaluation of the hodge test and the imipenem-EDTA-double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2003; 41:4623-9.
 17. Yong D, Lee K, Yum J, Shin H, Rossolini G, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2002; 40:3798-801.
 18. Qu T, Zhang J, Wang J, Tào J, Yu Y, Chen Y. Evaluation of phenotypic tests for detection of Metallo- β -Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. J Clin Microbiol. 2009; 47:1136-42.
 19. Franklin C, Liolios L, Peleg A. Phenotypic detection of carbapenem susceptible metallo- β -lactamase producing Gram negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2006; 44:3139-44.
 20. Samuelsen 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. 2008; 61:827-30.