

Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas

Evaluation of phenotypic methods for the detection of strains of Pseudomonas aeruginosa producing metallo- β -lactamases

Patricia C. Galloso, María Teresa Lezcano, Marina Quiroga

Resumen

A fin de comparar métodos fenotípicos sencillos para detectar metalo- β -lactamasas en laboratorios de poca complejidad, estudiamos 15 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes o con susceptibilidad disminuida a carbapenemes, recuperadas de pacientes hospitalizados en centros de salud de Posadas entre abril 2007 y marzo 2008.

Los métodos ensayados fueron el test de Hodge modificado, el ensayo de sinergia con doble disco (imipenem/EDTA e IMP/ ácido dipicolínico), el ensayo combinado con discos imipenem-EDTA, el ensayo microbiológico EDTA/imipenem, y la CIM a imipenem vs imipenem /EDTA.

La reducción de la CIM a imipenem al adicionar EDTA se observó en 1/15 cepas estudiadas. Solo el método de Hodge y el ensayo microbiológico dieron resultados comparables a los obtenidos con la CIM.

Considerando nuestros resultados, sugerimos implementar al menos dos métodos, seleccionados según las capacidades técnicas del laboratorio, para investigar metalo- β -lactamasas, tanto en la práctica clínica como con fines de vigilancia.

Palabras clave: Métodos fenotípicos; *Pseudomonas aeruginosa*; metalo- β -lactamasas.

Abstract

With the aim to compare simple phenotypic methods for detecting metallo- β -lactamases in low complexity laboratories, we studied 15 *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant or with decreased susceptibility to carbapenems, collected from in-patients at health centers of Posadas between April 2007 and March 2008.

The methods tested were the modified Hodge test, the double disk synergy test (imipenem/EDTA and imipenem/dipicolinic acid), the imipenem-EDTA combined disk test, the modified Hodge test, and the MIC of imipenem vs imipenem/EDTA.

MIC reduction with imipenem/EDTA combination was observed in 1/15 strains studied. Only the modified Hodge test and the modified Hodge test gave results comparable to the ones obtained with the MIC.

Considering our results, we suggest the implementation of at least two methods, selected according to the technical capabilities of the laboratory, in order to investigate metallo- β -lactamases, both in clinical practice and for surveillance purposes.

Key words: Phenotypic methods; *Pseudomonas aeruginosa*; metallo- β -lactamases.

Introducción

Uno de los mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos que presentan las bacterias, es la capacidad de producir enzimas denominadas β -lactamasas [1].

Entre los β -lactámicos, los carbapenemes (imipenem, meropenem, ertapenem, diapenem, entre otros) son antibióticos de amplio espectro de actividad y se caracterizan por su estabilidad frente a la hidrólisis de la mayoría de las β -lactamasas [2].

Las primeras enzimas capaces de degradarlos, llamadas carbapenemasas y codificadas cromosómicamente, fueron

descriptas inicialmente en microorganismos de escasa importancia clínica [3].

Las carbapenemasas pueden ser serino enzimas o metalo- β -lactamasas (MBL), así denominadas por requerir la unión a un ión metálico, usualmente zinc, para su actividad catalítica.

Las primeras, al igual que otras serino enzimas, pueden ser inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas clínicamente útiles, como sulbactama, ácido clavulánico o tazobactama [4]. Mientras que las MBL, tienen la particularidad de no ser inhibidas por dichos inhibidores, por lo que constituyen, en la actualidad, las carbapenemasas de mayor

significación clínica dada su capacidad de hidrolizar todos los antibióticos β -lactámicos, a excepción de aztreonam.

Mundialmente las MBL con mayor prevalencia y diseminación son las carbapenemasas plasmídicas denominadas IMP y VIM [5].

Existen, además, cepas regionales como las productoras de MBL denominada SPM-1 descrita en América del Sur [6].

En nuestro país las primeras cepas productoras de MBL fueron detectadas en el año 2002 [7].

En la actualidad, se han informado nuevas MBL y su diseminación entre microorganismos relacionados e incluso no relacionados [8, 9].

El aumento de la resistencia mediada por MBL se ha observado particularmente en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* [10], importante patógeno intrahospitalario oportunista, que puede presentar multiresistencia a los antibióticos.

La producción de MBL está incluida, actualmente, entre los determinantes de resistencia de importancia clínica creciente. Esto es, no solo por su amplia actividad frente a los sustratos β -lactámicos sino también por que los genes que las codifican pueden residir en integrones móviles favoreciendo su diseminación y convirtiéndolas en un problema de salud pública.

Es por ello que su monitoreo ha llegado a ser un objetivo importante en la microbiología clínica.

La rápida detección de bacterias productoras de MBL es necesaria no solo para aumentar nuestro conocimiento de la resistencia y así poder controlar su diseminación, sino que, además, su reconocimiento temprano es crítico para un riguroso control de las infecciones.

Para la búsqueda en el laboratorio de las enzimas MBL han sido propuestos ensayos fenotípicos [8] basados principalmente en la acción de agentes quelantes como el etilendiaminotetracético (EDTA), el ácido dipicolínico (ADP) o derivados del ácido succínico, capaces de interaccionar con el zinc necesario para la acción catalítica de dichas enzimas.

Este estudio fue realizado con la finalidad de comparar métodos fenotípicos, ya descriptos en la literatura, que puedan ser aplicados en laboratorios de poca complejidad para detectar la producción de MBL en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, permitiendo el monitoreo en gran escala de estos determinantes de resistencia emergentes y colaborando así con el control de la diseminación de la resistencia bacteriana.

Materiales y métodos

Cepas estudiadas

Aislamientos clínicos consecutivos y no repetitivos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes hospitalizados

en centros de salud de la ciudad de Posadas, recuperados durante el período abril 2007–marzo 2008.

Se incluyeron todos los aislamientos en los que se observaba en el antibiograma por difusión, utilizando los criterios de sensibilidad del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [11], resistencia a MER y/o IMP, y/o halos de inhibición menores o iguales a 21 mm en uno o ambos carbapenemes, según propuesta de la Sub-Comisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC) [12].

Las cepas remitidas, identificadas bioquímicamente por métodos convencionales [13], fueron conservadas en agua estéril a 4 °C, en la oscuridad, hasta su procesamiento.

Detección fenotípica de MBL

En todas las técnicas se trabajó con discos de papel, excepto en el ensayo de sinergia con ADP donde se utilizaron tabletas tanto del antibiótico como del inhibidor.

Se seleccionó a IMP como representante de los carbapenemes.

Los discos de IMP utilizados en los distintos métodos ensayados fueron provistos por OXOID, Argentina. Las tabletas de IMP y de ADP utilizados en el ensayo de sinergia IMP/ADP fueron provistos por ROSCO, Medica-Tec, Argentina.

La droga pura de potencia valorada, utilizada para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) fue obtenida Merck Sharp & Dohme, Research Laboratories, Rahway, NJ, USA.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se incluyeron como control positivo una cepa de *P. aeruginosa* productora de VIM y como control negativo la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Método de Hodge modificado [14]

Se realizó una suspensión en solución fisiológica (SF) de una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 cuya turbidez se ajustó al 0,5 de Mac Farland.

La suspensión se inoculó, según el método de difusión con discos [15] en placas de agar Mueller–Hinton (MH, Laboratorios Britania).

En el centro de cada placa se ubicó, con pinza estéril, un disco de IMP (10 μ g), el que se suplementó con 10 μ l de una solución de $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mM.

Posteriormente, se realizaron estrías de los microorganismos en estudio desde el disco hacia el borde de las placas. Las placas se incubaron a 35 °C durante 18 hs.

La observación de una deformación del halo de inhibición de IMP se interpretó como un ensayo positivo: cepa probable productora de MBL (activación de la enzima por el agregado del cofactor).

Ensayo combinado con discos imipenem-EDTA [16]

Placas de MH se inocularon con las cepas en estudio según el procedimiento estándar del método de difusión con discos [15]. En cada placa se colocó, con pinza estéril, dos discos de IMP (10 µg). Uno de ellos se suplementó con 5 µl de una solución de EDTA 0,5 M (concentración final aproximada: 750 µg/disco). Las placas se incubaron a 35 °C durante 18 horas.

La lectura de los halos de inhibición se realizó con regla milimetrada.

Un incremento \geq a 7 mm del diámetro del halo de inhibición de IMP en combinación con EDTA respecto a IMP sin el agregado del inhibidor se consideró como indicador de la presencia de MBL.

Ensayo de sinergia con doble disco IMP/EDTA [14]

Se inocularon placas de MH con las cepas en estudio según el procedimiento estándar del método de difusión con discos [15].

En cada placa se colocó un disco de IMP (10 µg) y a 10 mm (borde a borde) se ubicó un disco de papel de filtro estéril conteniendo 10 µl de EDTA 0,5 M (concentración final aproximada: 1,5 mg/disco). Las placas se incubaron a 35 °C durante 18 hs.

Ensayo de sinergia con doble disco IMP/ADP [17]

Placas de MH se inocularon con las cepas en estudio según el procedimiento estándar del método de difusión con discos [15].

En cada placa se colocó una tableta de IMP (10 µg) y a 5 mm (borde a borde) se ubicó una tableta de ADP (300 µg). Las placas se incubaron a 35 °C durante 18 hs.

En ambos ensayos de sinergia, la observación de una deformación del halo de inhibición de IMP en la cercanía del agente quelante (EDTA ó ADP) se consideró como un resultado positivo, indicativo de la presencia de MBL.

Ensayo Microbiológico EDTA/ IMP (EMEI) [18]

Para preparar el extracto enzimático, 100 mg de un cultivo de 24 hs de cada cepa en estudio, se transfirieron tubos eppendorf.

El inóculo bacteriano se resuspendió en 1 ml de buffer (Tris HCl 50mM pH 8), y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. La ruptura celular se realizó con el procedimiento de congelación (-20 °C)/ descongelación (-37 °C), 10 veces. El extracto obtenido se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, y se prosiguió trabajando con el sobrenadante.

Se prepararon discos de papel de filtro Wathman N° 3 estériles conteniendo: Disco 1: 20 µl de extracto enzimático; Disco 2: 20 µl de extracto enzimático mas sulfato de

zinc (concentración final 0,1 mM); Disco 3: 20 µl de extracto enzimático más EDTA (concentración final 20 mM); y Disco 4: 20 µl de buffer como control negativo.

Se realizó una suspensión en SF de una cepa de *E. coli* ATCC 25922 cuya turbidez se ajustó al 0,5 de Mac Farland. La suspensión se inoculó, según el método de difusión con discos [15], en placas de MH.

En el centro de cada una de las placas previamente inoculadas, se ubico un disco de IMP (10 µg) y a 0,8 cm. (centro a centro) de este se colocaron los cuatro discos de papel con los diferentes sustratos.

La deformación del halo de inhibición de IMP alrededor de los discos que contienen el extracto enzimático con y sin zinc, junto a la inhibición del desarrollo de *E. coli* alrededor del disco que contiene EDTA se interpretó como un resultado positivo de la producción de MBL.

Determinación de la CIM a IMP sin y con el agregado de EDTA

Se determinó la CIM a IMP por el método de dilución en medio sólido [19] con y sin el agregado de EDTA en concentración final 0,4 mM según propuesta de Quinteros y col. [12, 20]. Los resultados obtenidos se valoraron según normas y puntos de corte del CLSI [11]. Se consideró como indicativo de la producción de MBL, una disminución de 4 ó más diluciones de la CIM a IMP en combinación con EDTA respecto a la CIM de IMP sin el agregado del inhibidor.

Resultados

Durante el período abril 2007-marzo 2008 se recuperaron, en los centros participantes, 167 aislamientos de *P. aeruginosa* de muestras clínicas. En el laboratorio se recibieron 15 de estas cepas que cumplían con el criterio de inclusión, presentando resistencia a carbapenemes ó halos de inhibición de IMP y/o MER \leq 21 mm en uno o ambos carbapenemes (susceptibilidad disminuida).

Seis aislamientos eran resistentes a ambos carbapenemes. Nueve aislamientos mostraban susceptibilidad disminuida a MER, siendo 2 de ellos resistentes y 7 susceptibles a IMP. No se recibieron cepas con susceptibilidad disminuida a IMP.

Con el método de Hodge modificado, solo 1 de las 15 cepas de *P. aeruginosa* estudiadas dio un resultado positivo débil.

En el ensayo combinado con discos IMP-EDTA, solo un aislamiento de *Pseudomonas* mostró un incremento \geq 7 mm del halo de inhibición de IMP/EDTA respecto al halo de inhibición de IMP solo. En una segunda cepa se observó un resultado "border-line" (incremento de 6 mm) que fue considerado un resultado dudoso. Mientras que en 13 cepas no se observaron diferencias en los diámetros de

los halos de inhibición.

En ambos test de sinergia se obtuvieron resultados similares. La deformación del halo de inhibición de IMP en la cercanía del disco/tableta fue observada en un aislamiento. Dos cepas mostraron una ligera deformación (resultado dudoso) y 12 no exhibieron ninguna distorsión del halo de inhibición de IMP.

Solo en el ensayo microbiológico no se obtuvo ningún resultado dudoso ni débilmente positivo, 1 aislamiento dio un resultado claramente positivo y 14 aislamientos un resultado negativo (Figura 1).

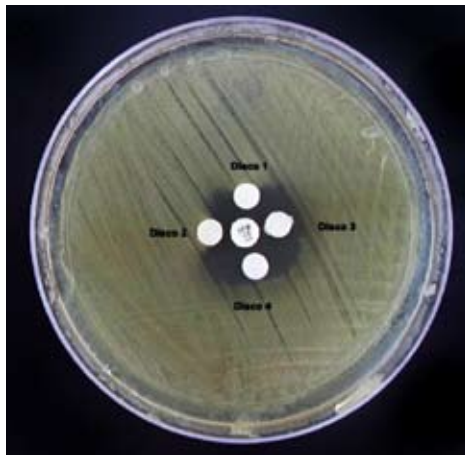


Figura 1. Búsqueda fenotípica de metalo-β-lactamasas en cepas de *P. aeruginosa*: Ensayo microbiológico EDTA/Imipenem

Cepa *P. aeruginosa* N° 43 (ensayo positivo). Discos conteniendo: 1) extracto enzimático, 2) extracto enzimático mas sulfato de zinc, 3) extracto enzimático más EDTA, 4) buffer.

La reducción de la CIM a IMP al adicionar EDTA solo se observó en 1 de las 15 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta cepa presentaba una CIM a IMP de 64 µg/ml en ausencia de EDTA y una CIM de 8 µg/ml para IMP en presencia del agente quelante.

Solo el método de Hodge y el ensayo microbiológico dieron resultados comparables a los obtenidos con la CIM (Tabla 1).

Tabla 1: Comparación de métodos fenotípicos para la detección de metalo-β-lactamasas en 15 cepas de *P. aeruginosa* resistentes o con sensibilidad disminuida a imipenem y/o meropenem.

Cepas de <i>P. aeruginosa</i> (n=15)	No. de aislamientos con resultados			
	Claramente positivo	Débilmente positivo	Dudoso	Negativo
Método de Hodge modificado	0	1	0	14
Ensayo de sinergia con doble disco IMP/EDTA	1	0	2	12
Ensayo de sinergia con doble disco IMP/ADP	1	0	2	12
Ensayo combinado con discos IMP-EDTA	1	0	1	13
Ensayo Microbiológico	1	0	0	14
CIM IMP vs IMP/EDTA	1	0	0	14

IMP: imipenem. EDTA: ácido etilendiaminotetracético. ADP: ácido dipicolínico. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

Discusión

La capacidad de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de producir MBL es un hecho relevante, constituyendo, en especial en el ámbito intrahospitalario, un grave problema tanto para el manejo clínico como terapéutico de las infecciones.

Las técnicas moleculares, como la PCR, ó enzimáticas son consideradas las técnicas de referencia para la detección de la producción de MBL. Sin embargo, estas metodologías no son fácilmente aplicables en los ensayos diarios de laboratorios clínicos debido a su alto costo y complejidad.

Por ello, se requiere disponer de métodos de laboratorio que permitan la búsqueda de estas enzimas y que reúnan, en lo posible, condiciones de sencillez, rapidez, confiabilidad y precisión.

Analizando los resultados obtenidos al ensayar algunos de los diversos métodos fenotípicos propuestos para la detección de MBL, observamos que tanto el ensayo de sinergia frente a EDTA [14] o a ADP [17], son convenientes para el uso en los laboratorios clínicos como ensayos de tamizaje de potenciales cepas productoras de MBL ya que son fáciles de realizar, permitiéndonos sugerir a estas técnicas como apropiadas para su uso rutinario debido a su bajo costo y sencillez.

Aun así, la sensibilidad del método depende de la distancia entre discos, siendo necesario en algunos casos repetir la técnica hasta encontrar cual es la distancia adecuada para evitar falsos negativos, en especial en aislamientos sensibles a IMP que aún así pueden ser productores de MBL [21].

También, el test de sinergia requiere experiencia técnica para discriminar entre verdadero sinergismo y la simple intersección de los halos de inhibición de las drogas involucradas.

Además, otros autores [22, 23] han demostrado que el efecto del EDTA de aumentar la permeabilidad de la membrana, puede incrementar la susceptibilidad de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. a varios agentes antimicrobianos, incluyendo IMP.

Es por ello que este ensayo no debería utilizarse como único método de tamizaje, debiendo ir acompañado de otras técnicas para la detección fenotípica de MBL.

El ensayo propuesto por Yong [16] con discos de IMP e IMP/ EDTA mostró ser mejor que el anterior con un solo 1 resultado dudoso, siendo también un método sencillo, rápido, reproducible y de muy bajo costo. Por otro lado, su interpretación es menos subjetiva que los ensayos de sinergia.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que el incremento en el halo de inhibición de los discos de IMP/EDTA respecto a los discos de IMP solo, podría ser debido a la susceptibilidad del microorganismo al EDTA más que a la inhibición de alguna MBL por quelación de los iones zinc.

Este problema parece ser intrínseco a toda técnica que involucre impregnar un mismo disco con dos agente químicos [24]. Si un aislamiento en particular es susceptible a EDTA, el ensayo podría producir resultados falsos positivos.

Esto refuerza la necesidad de implementar al menos dos técnicas para investigar la presencia de probables cepas productoras de MBL, tanto en la práctica clínica como con fines de vigilancia.

En este trabajo se observó que los mejores métodos fenotípicos fueron el método de Hodge suplementado con zinc [14] y el ensayo microbiológico [18].

El primer método, es sencillo de realizar pero los resultados pueden no ser claramente positivos. El segundo método, tiene la dificultad de su relativa complejidad, consumo de tiempo y consecuente demora en el diagnóstico, lo que lo hace un método poco aplicable a laboratorios de baja y mediana complejidad.

La detección de la actividad MBL en aislamientos que presenten una CIM baja para IMP sería más evidente al trabajar con extractos celulares (ensayo microbiológico) que con células intactas (Hodge suplementado con zinc) ya que se evitaría la presencia de potenciales barreras de permeabilidad que puedan interferir en el acceso de la enzima al sustrato [18].

Lo mencionado anteriormente, nos permitiría explicar la diferencia en la lectura de nuestros resultados.

Por otra parte, el ensayo microbiológico, por su sensibilidad y especificidad, ha demostrado ser comparable a los métodos genotípicos y enzimáticos de detección de las MBL, considerados como *gold standard* [18].

Respecto a la reducción de la CIM a IMP al adicionar EDTA respecto a la CIM sin el inhibidor, al igual que el ensayo microbiológico, es un método laborioso y no usualmente realizado en los laboratorios clínicos.

Conclusiones

En conclusión, teniendo en cuenta las sugerencias y los cuidados antes mencionados, cualquiera de los métodos ensayados podría ser utilizado para la búsqueda de cepas de *P. aeruginosa* productoras MBL, dependiendo de las capacidades técnicas del laboratorio.

Coincidimos con Picao y col. [25], en que la detección de MBL es de crucial importancia no solo en instituciones de alta prevalencia de estas cepas sino también en aquellas donde nunca ha sido detectado el fenotipo de resistencia.

En un escenario de alta frecuencia de aislamiento de cepas productoras de MBL, su detección debería ser importante para el ajuste de las terapias antimicrobianas empíricas a fin de reducir las tasas de mortalidad de los pacientes infectados con tales microorganismos.

Mientras que, la detección temprana de aislamientos productores de MBL en centros de salud donde nunca se

han detectado, sería de importancia para evitar la diseminación de estas cepas.

Por lo que, implementar ensayos accesibles, como los estudiados, que permitan investigar y detectar la presencia de MBL en aislamientos clínicos debería ser prioritario en los laboratorios diagnósticos a fin de colaborar con los clínicos, la salud pública y el control de la diseminación de resistencia.

Agradecimientos

A Marta Vergara (Sanatorio Nosiglia), Viviana Villalba (Hospital Dr. Ramón Madariaga), Eduardo Pegels (IPS) y Graciela Jordá (IPS) por la provisión de las cepas.

Referencias bibliográficas

- Henriques I.S., Fonseca F., Alves A., Saavedra M.J., Correia A. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* 2006; 157(10):938–47.
- Oh E-J, Lee S., Park J., Park Y-J, Kim S., Kang M., Kim B. Prevalence of metallo- β -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamases. *J. Microbiol. Methods.* 2003; 54(3):411–8.
- Franceschini N., Perilli M., Segatore B., Quiroga M., Amicosante G. Metallo- β -lactamases: a new obstacle to the β -lactam antibiotic therapy. *Ital. J. Bioch.* 1999; 48 (4): 243–334.
- Cornaglia G., Akova M., Amicosante A., Cantón R., Cauda R., Docquier J-D, Edelstein M., Frère J-M, Fuzi M., Galleni M., Giamarelou H., Gniadkowski M., Koncan R., Libisch B., Luzzaro F., Miriagou V. Navarro F., Nordmann P., Pagani L., Peixe L., Poirel L., Souli M., Tacconelli E., Vatopoulos A., Rossolini G.M. On behalf of the ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int. J. Antimicrob Agents.* 2007; 29(4):380–8.
- Rossolini G. Acquired metallo- β -lactamase: an increasing clinical threat. *Clin. Infect. Dis.* 2005.; 41(11):1557–8.
- Murphy T., Simm A., Toleman M., Jones R., Walsh T. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamases SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(2):582–7.
- Pagnies G., Radice M., Amoroso A., Famiglietti A., Gutkind G. Class 1 integron containing a new variant of VIM-2 metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. 44 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Abstract C1-p.293. 2004;

- Washington DC; USA.
8. Walsh T., Toleman M., Poirel L., Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):306–25.
 9. Sacha P., Wieczorek P., Hauschild T., Zórawski M., Olszanska D., Tryniszewska E. Metallo- β -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* a novel mechanism resistance to β -lactam antibiotics. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2008; 46(2):137–42.
 10. Gupta V. Metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert. Opin. Investig. Drug.* 2008; 17(2):131–143.
 11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement, vol. 27, no. 1. Approved Standard M100–S17. 2007. CLSI, Wayne, Pa, USA.
 12. Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica. Subcomisión de Antimicrobianos. Actividad Científica 2005. Consenso sobre criterio de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad en los BNNF de importancia clínica. Caracterización fenotípica de la resistencia a los β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (<http://www.aam.org.ar>).
 13. Cátedra de Bacteriología; Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Bacilos Gram Negativos no Fermentadores. *En: Curso Virtual–Presencial Infecciones Bacterianas: el laboratorio y la clínica.* 2006. (<http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/document/document.php>).
 14. Lee K., Chong Y., Shin H B., Kim Y A., Yong D., Yum J H. Modified Hodge and EDTA–disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase–producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001; 7(2):88–102.
 15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk. Approved Standard; M2–A7. 2000. NCCLS, Wayne, Pa, USA.
 16. Yong D., Lee K., Yum J., Shin H., Rossolini G Chong Y. Imipenem–EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamases producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(10):3798–3801.
 17. Shin K S., Son B R., Hong S B., Kim J. Dipicolinic acid based disk methods for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(1): 102–5.
 18. Marchiaro P., Mussi, M A., Ballerini V., Pasteran F., Viale A M., Vila A J., Limansky, A. Sensitive EDTA–based microbiological assays for detection of metallo- β -lactamases in nonfermentative gram–negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(11):5648–52.
 19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed., vol. 26, no. 2. Approved standard M7–A7. 2006. CLSI, Wayne, Pa, USA.
 20. Quinteros M., Famiglietti A., Limansky A., Casellas J M., Vay C., Pasteran F., Incola F; Soloaga R., Centron D., Radice M., Kovensky Pupko J., Marina M., Couto E., Gutkind G., Galas M., Goldberg M., Bantar C. Caracterización fenotípica de la resistencia a los β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. *Actividad Científica SADEBAC.* 2005. (<http://www.aam.org.ar>).
 21. Nordmann P., Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram–negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002; 8(6):321–31.
 22. Ayres HM., Furr JR., Russell AD. Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999; 28:13–6.
 23. Denny B., West P., Panigrahi D. Effects of permeabilizers on antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter* spp. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2003; 36:72–6.
 24. Chu YW., Cheung TK., Ngan JY., Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by E–test and an imipenem–EDTA disk method. *Int. J. Antimicrob Agents* 2005; 26(4):340–1.
 25. Picao RC., Andrade SS., Gianinni Nicoletti A., Campana EH., Moraes GC., Mendes RE; Gales AC. 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.* 2008; 46(6): 2028–37.
- Recibido: 15/09/09.
Aprobado: 21/09/10.
- Patricia C. Galloso¹
Bioquímica. Becaria Investigación CEDIT. Cátedra Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN. UNaM. Sin Categoría.
 - María Teresa Lezcano¹
Bioquímica. Becaria Investigación CEDIT. Cátedra Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN. UNaM. Sin Categoría.
 - Marina Quiroga¹
Bioquímica. Especialista en Microbiología Clínica. Doctor de la Universidad de Buenos Aires, área microbiología. Profesor Adjunto. Cátedra Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN. UNaM. Categoría II.
1. Cátedra de Bacteriología. FCEQyN. UNaM. Av. Mariano Moreno 1375. Posadas, Misiones. cecilia_galloso@hotmail.com. terelezmaciel@yahoo.com.ar. marinaquiroga@fceqyn.unam.edu.ar.