

CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LA RESISTENCIA A LOS β-LACTAMICOS EN *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp

Pseudomonas aeruginosa

Ubicación estratégica de los discos

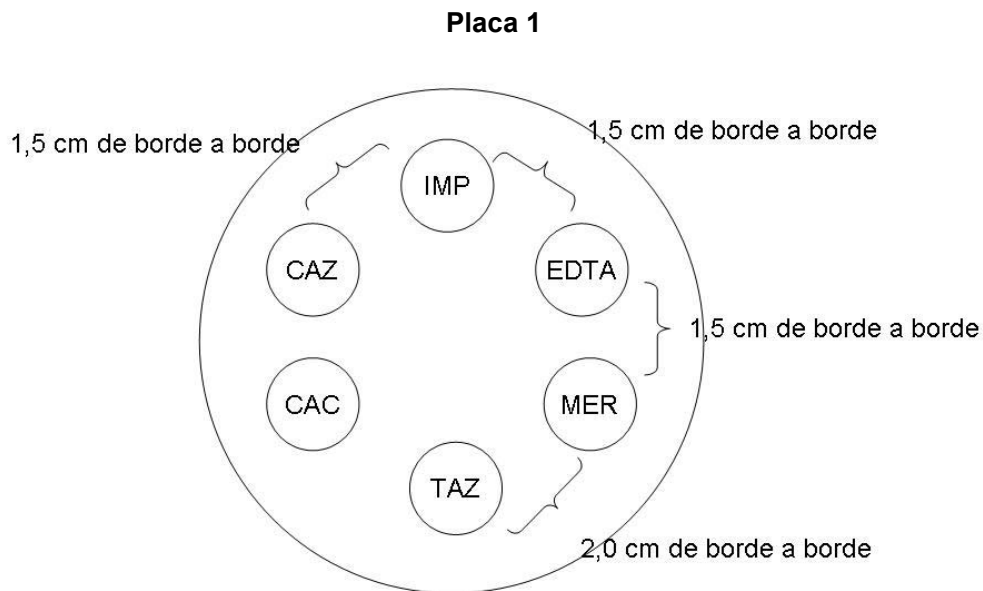
Se recomienda la siguiente ubicación de los discos y la incorporación de discos con quelantes de Zn (ej: EDTA, EDTA/Mercaptoacético de sodio) y de ceftacidima/clavulánico para maximizar la información obtenida del antibiograma:

Placa 1: imipenem (IMP), Quelante de Zn⁽¹⁾, meropenem (MER), ceftacidima (CAZ), ceftacidima/clavulánico (CAC) y piperacilina/tazobactam (TAZ) (Figura 1).

Placa 2: amicacina (AMK), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), aztreonam (AZT), piperacilina (PIP) y cefepima (FEP).

- (1) Podrían utilizarse discos de EDTA (1 mmol o 375 µg y/o 5 mmoles o 1875µg), y/o EDTA/Mercaptoacético de sodio (750 µg/2000 µg, respectivamente).
Ver preparación de los discos de EDTA en el Anexo

Figura 1: Ubicación estratégica de los discos en el antibiograma.



Métodos de “screening” para detectar BLEE y carbapenemasas

I. Investigación de Carbapenemasas

Se debe sospechar con halos de IMP y/o MER \leq 21 mm.

Ia. Carbapenemasas MBL- metalo β -lactamasa - (tipo IMP, tipo VIM, SPM-1, GIM-1, SIM-1)

Observar la presencia de sinergia entre IMP y/o MER con el agente quelante empleado (Fotos 1.A, 1.B.). Su hallazgo se debe confirmar con otras metodologías, según lo que se indica en Tabla 1.

Dado que las MBLs no hidrolizan eficientemente AZT, la sensibilidad a este antimicrobiano podría ser un buen predictor de la presencia de estas enzimas en microorganismos resistentes a imipenem y meropenem. Por el contrario, la resistencia a AZT en microorganismos resistentes a carbapenemas no descarta la presencia de metaloenzimas.

Ib. Otras carbapenemasas (no MBLs, como variantes de GES)

Observar sinergia CAZ-IMP (Foto 2) y/o TAZ-MER.

En la tabla 2 se detalla la caracterización e interpretación de la resistencia a carbapenemas y el criterio de informe para cada fenotipo

II. Investigación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Ila. Ceftacidimasas

Se debe sospechar con halos de CAZ $<$ 18 mm. Observar sinergia IMP-CAZ (Foto 2) y/o agrandamiento ($>$ 5mm) de ceftacidima/ceftacidima+clavulánico (Foto 3) y/o CAZ^{R/I} y PIP^S.

Ilb. Cefepimasas se debe sospechar con halos de FEP $<$ 18 mm. Observar marcada disociación en cefalosporinas de espectro extendido: alto nivel de R a FEP con sensibilidad a CAZ.

En la tabla 3 se detalla la caracterización fenotípica e interpretación de resistencia beta-lactamasas de espectro extendido

Acinetobacter spp

Ubicación estratégica de los discos

Se recomienda la misma ubicación de discos y la incorporación de discos con quelantes de Zn, planteada para *P. aeruginosa*.

Placa 1: imipenem (IMP), Quelante de Zn⁽¹⁾, meropenem (MER), ceftacidima (CAZ), ceftacidima/clavulánico (CAC) y piperacilina/tazobactam (TAZ) (Figura 1).

Placa 2: amicacina (AMK), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), ampicilina/sulbactam (AMS), cotrimoxazol (TMS) y minociclina (MIN).

⁽¹⁾ Podrían utilizarse discos de EDTA (1 \square mol o 375 μ g y/o 5 \square moles o 1875 μ g), y/o EDTA/Mercaptoacético de sodio (750 μ g/2000 μ g, respectivamente).

Se propone igual metodología de “screening” para detectar BLEE y carbapenemasas que en *P. aeruginosa*.

Tabla 1. Caracterización fenotípica de la resistencia a los carbapenemes

Método	Complejidad de uso	Sensibilidad	Facilidad de interpretación	Principales desventajas	Foto
Modificación de Método de Hodge (“Hodsuda”)¹	Baja a nula	Media	Moderada/Elevada	Interpretación del resultado subjetiva, operador dependiente.	Nro 4.
Macrodilución con y sin EDTA	Moderada	Elevada	Elevada	1. Es manualmente demandante. 2. Ocasionalmente pueden obtenerse resultados borderline y/o requiere el ensayo de los dos carbapenemes	
E-test para MBL	Baja a nula	Elevada	Moderada	1. Elevado costo. 2. No puede ser usado para cepas que presentan CIM Imp <4µg/ml	Nro 5
Ensayo Microbiológico EDTA/Beta-lactámicos	Moderada	Elevada/Muy elevada	Moderada/Elevada	1. Emplea extractos obtenidos mediante ciclos de congelamiento/descongelamiento de la suspensión bacteriana, por lo que insume tiempo.	Nro 6

¹ Detecta carbapenemasas, sin diferenciar MBLs de serín- beta-lactamasas.

Tabla 2. Caracterización fenotípica de la resistencia a carbapenemes.

IMP	MER	Sinergia con Quelantes de Zn	Mecanismo probable	Método confirmatorio de MBL	Comentarios	Informe IMP	Informe MER
R	S	-	Alteración o disminución o ausencia de OprD	Negativo		R	S
S	I/R	-	Eflujo (hiper expresión MexAB OprM)	Negativo	Resistencias acompañantes: FQ, TIC, CFP, AZT > MER, FEP > PIP, CAZ	S	I/R
R	R	-	Alteración, o disminución o ausencia de OprD + eflujo	Negativo		R	R
R/I/S	R/I/S	+ ¹	Carbapenemasas MBL (tipo IMP, tipo VIM, SPM-1, GIM-1, SIM-1)	Positivo	Habitualmente sensible a AZT (excepto que coexista con otros mecanismos de resistencia: eflujo y/o BLEE)	R	R
I/R ²	R/I/S	-	Carbapenemasas de clase A (tipo GES)	Negativo	Actividad de BLEE.	R	S/I/R (se sugiere comentario de vigilar la evolución clínica si se trata con MER)

¹Se pueden observar resultados falsos positivos. Debe confirmarse según tabla 1.

²Presenta sinergia IMP-CAZ.

Tabla 3. Caracterización fenotípica de la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido.

CAZ	FEP	Sinergia CAZ-IMP	Δ CAC-CAZ	Disociación PIP ^S CAZ ^R	Mecanismo probable	Método/s confirmatorio/s	Comentarios	Informe
I/R	I/R	-	-	-	Eflujo (Hiper expresión de MexAB OprM)		Resistencias acompañantes: FQ, TIC, CFP, AZT > MER, FEP > PIP, CAZ	Según ATB
R	S / I o R	-	-	-	AmpC dereprimido		Generalmente sensible a AZT	Según ATB
I/R	S / I o R	+	+ (10%)	+ (50%)	BLEE ceftacidimasa tipo GES	PCR	Se describen variantes de GES con actividad de carbapenemasa (ver Tabla Nro 2)	R a todas las penicilinas, cefalosporinas y monobactames
I/R	S / I o R	-	+	+ / -	BLEE ceftacidimasa tipo TEM y SHV	PCR		
I/R	S / I o R	- / +	+	+ / -	BLEE ceftacidimasa tipo PER y VEB	PCR		
I/R	S / I o R	- / + (+ en OXA-15, -18, -19, -28, -31, -45)	- / + (+ en OXA-18 y -45)	+	BLEE ceftacidimasa tipo OXA	PCR		
S	R	-	-	-	BLEE cefepimasa tipo OXA-1/31	Ensayo "Hodsuda" o Masuda (usando cefepima) positivo y PCR		
S	I/R	-	-	-	Eflujo MexCD OrpJ o MexVW)	Ensayo "Hodsuda" o Masuda (usando cefepima) negativo y PCR		Según ATB

S / I o R: indica mayor prevalencia de aislamientos sensibles. -/+ : indica mayor prevalencia de resultados negativos. +/- : indica mayor prevalencia de resultados positivos.

ANEXO

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS CONFIRMATORIOS (VER TABLA 1)

1. Método de Hodge modificado por ATB (Hodsuda):

- a. Hisopar una placa de Mueller Hinton de 4 mm de espesor con una suspensión equivalente al 0,5 de Mc Farland de un microorganismo indicador (*E. coli* ATCC 25922). Dejar secar la placa.
- b. Colocar una ansada bien cargada del microorganismo problema dentro de la zona de inhibición esperada para la droga ensayada. Dejar reposar a T ambiente por 15 minutos.
- c. Colocar en el centro de la placa un disco del antibiótico que corresponda según el espectro de la enzima que se quiere evaluar. Incubar toda la noche a 35° C.
- d. Interpretación: una deformación del halo de inhibición se interpreta como un ensayo positivo (efecto D o achatamiento o crecimiento por dentro del halo de inhibición esperado).

2. Macrodilución con y sin EDTA: CIM según CLSI, 2005. Concentración final de EDTA 0.4 mM.

3. E-test para MBL (IMP/IMP+EDTA): según indicaciones del fabricante.

4. Ensayo Microbiológico EDTA/Imipenem (EMEI, Foto Nro 6):

- a. Hisopar una placa de MH con *Escherichia coli* ATCC 25922, siguiendo la técnica de difusión de Kirby-Bauer.
- b. Se preparan 4 discos de papel estériles impregnados con:
 1. 20 µl de extracto enzimático, (S). Para preparar este disco, colocar en un eppendorf 22,5 µl de extracto enzimático* más 2,5 µl de buffer (Tris HCl 50 mM pH 8), homogeneizar y colocar 20 µl en el disco de papel estéril.
 2. 20 µl de extracto enzimático* más sulfato de zinc (concentración final 0,1 mM), (S/Zn). Para ello, preparar una solución de sulfato de zinc 1 mM. Colocar en un eppendorf 22,5 µl de extracto enzimático y 2,5 µl de sulfato de zinc 1 mM, homogeneizar y colocar 20 µl en un disco de papel estéril.
 3. 20 µl de extracto enzimático* más EDTA (concentración final 20mM), (S/E). Para ello, preparar una solución de EDTA 200mM. Colocar en un eppendorf 22,5 µl extracto enzimático y 2,5 µl de EDTA, homogeneizar, dejar 10 minutos a temperatura ambiente y colocar 20 µl en el disco de papel estéril.
 4. 20 µl de buffer (B), como control negativo.
- c. Colocar sobre la placa los discos de los sustratos β-lactámicos empleados en el ensayo (IMP). Esperar 10' hasta que difundan los antibióticos y colocar los 4 discos preparados a 0,8 cm de centro a centro respecto del IMP.

Interpretación del EMEI:

1. Cepa no productora de carbapenemasa: no hay deformación del halo de inhibición de los carbapenemes.

2. Cepa productora de carbapenemasa: se demuestra por el crecimiento de *E. coli* alrededor de los discos que tienen extracto enzimático (**S y S/Zn**), alterando el halo de inhibición del imipenem. Puede distinguirse:

a. Serín-carbapenemasa: cuando la carbapenemasa no es inhibida por EDTA. En este caso, se sospecha de carbapenemasa clase A (GES) o clase D (OXA); o alta expresión de AMPc

b. Metallo-Beta-lactamasa: cuando la carbapenemasa es inhibida por EDTA. Se observa inhibición del desarrollo alrededor del disco S/E.

*** Preparación del extracto enzimático**

Mediante congelamiento/descongelamiento

1. A partir de un cultivo en agar MH de 24 hs, se toman con ansa 100 mg y se transfiere a un tubo eppendorf. Para estimar el peso húmedo de inóculo pesar el tubo eppendorf antes y después del agregado del inóculo.
2. El inóculo bacteriano se resuspende en 1ml de buffer (Tris HCl 50 mM pH 8), y se centrifuga a 5000 rpm durante 10'.
3. El pellet es freezado a -20°C durante 15', y luego pasado a 37°C durante 10'. Se repite este procedimiento 10 veces. El extracto obtenido es centrifugado a 10000 rpm durante 10', y se prosigue trabajando con el sobrenadante.

PREPARACIÓN DE LOS DISCOS DE EDTA

EDTA 5 μ mol/disco

Preparar una solución de EDTA 500 mM (0,5 M) pH 8.

Esterilizar discos de papel. Se recomienda papel Whatman 3 mm.

Colocar 10 μ l de la suspensión en los discos.

Dejar secar.

Conservar en heladera los empleados para uso diario.

Mantener en freezer a -20°C el stock.

EDTA 1 μ mol/disco

Preparar una solución de EDTA 500 mM (0,5 M) pH 8 y esterilizar

Esterilizar discos de papel Whatman N° 3

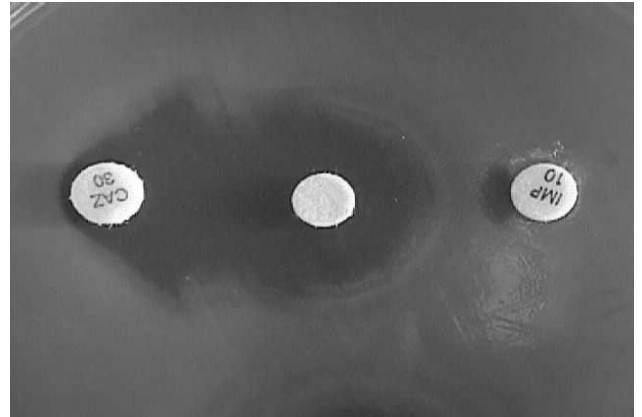
Colocar 2 μ l de la solución de EDTA en los discos.

Dejar secar.

Conservar los discos preparados a temperatura ambiente. La solución de EDTA y los discos son estables a temperatura ambiente indefinidamente.

FOTOS

Foto 1.A. Sinergia EDTA (xxxxxxx μ moles) /IMP-MER-CAZ



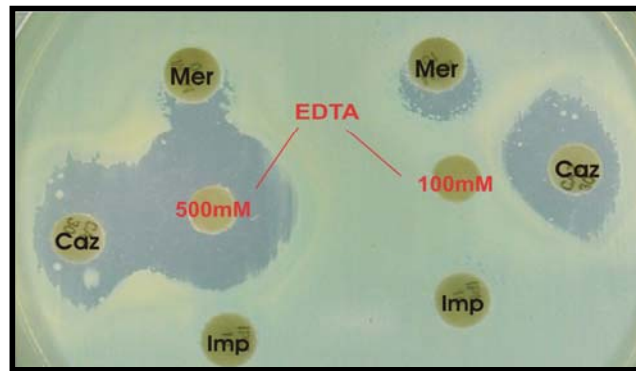
Pseudomonas aeruginosa productora de IMP-13

P. aeruginosa productor de VIM-2

Aclarar distancias, para que todas las fotos de sinergia tengan los mismos datos.

Foto 1.B. Sinergia EDTA (5 μ moles y 1 μ mol) /IMP- MER-CAZ

¡Error!



P. aeruginosa productora de VIM-2 (cc. final EDTA: 5 μ moles, 1.5 cm borde a borde y 1 μ mol, 1 cm borde a borde)

Foto 2. Sinergia CAZ-IMP



P. aeruginosa productor de GES-like.

Foto 3. Δ CAC-CAZ



P. aeruginosa productor de BLEE GES-like.

Foto 4. Hodsuda/IMP (ver Anexo)

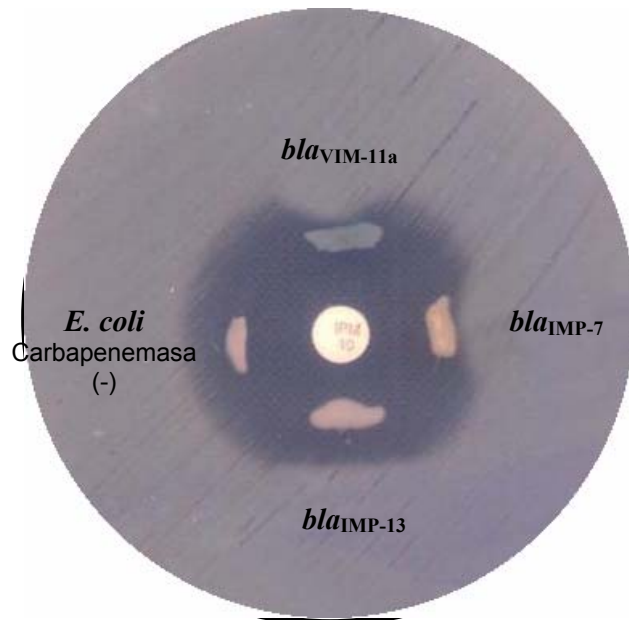
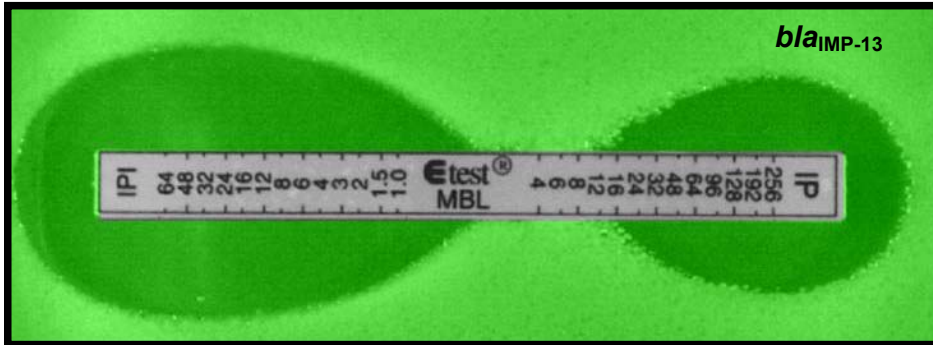
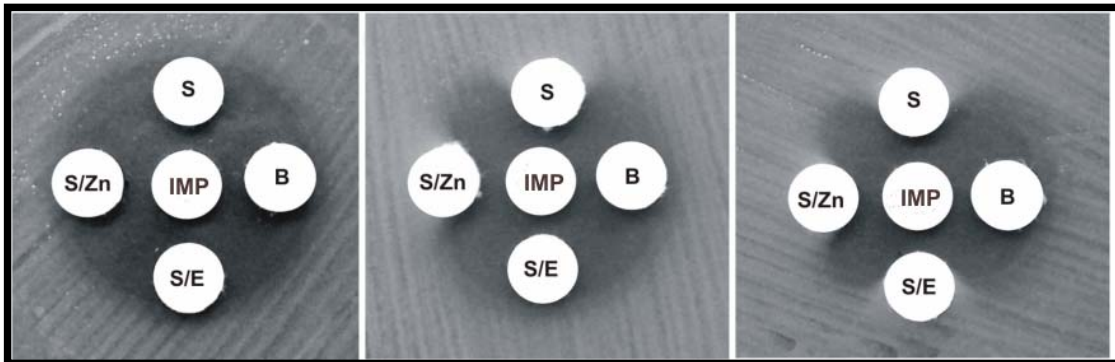


Foto 5: Etest IMP/ IMP-EDTA (ver Anexo)



P. aeruginosa productora de IMP-13.

Foto 6: Ensayo Microbiológico EDTA/IMP (ver Anexo)



a. MBL(-)

b. Carbapenemasa MBL(+)

c. Carbapenemasa no MBL.