

Utilidad del Sistema Automatizado Vitek 2® Compact y los Métodos Fenotípicos para la Detección de Carbapenemasas Tipo KPC

Olga de J. Ornelas P.,¹ Cesar A. Carvallo R.,² Luis A. Castillo M.,³ María M. Ledezma M.,⁴ Milena B. Ríos S.,⁵ Yaimir D. Salazar M.,⁶ Luis C. Torres C.,⁷

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud – Universidad de Carabobo, Venezuela. ^{2,3,4,5,6}Laboratorio Clínico Galeno – Hospital Metropolitano del Norte, Naguanagua, Edo. Carabobo, Venezuela. ⁷Catedra de Microbiología, Escuela de Bioanálisis – Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Correspondencia: oornelas800@hotmail.com, oornelas@uc.edu.ve

Resumen

El aislamiento de enterobacterias productoras de carbapenemasas KPC se ha incrementado desde la década pasada. Hace más de 15 años se describieron las primeras enterobacterias productoras de carbapenemasas y actualmente son endémicas en Estados Unidos, Europa, Asia y América Latina. Como alternativa para la detección temprana y efectiva de este mecanismo de resistencia se describió el desempeño del sistema automatizado Vitek 2® Compact en conjunción con el método de sinergia de ácido aminofenilborónico (APB) y el Método Comercial de Discos Combinados MASTDISKS ID para la identificación fenotípica de este tipo de β - lactamasas en 23 aislamientos con susceptibilidad disminuida a carbapenemo obtenidos de muestras referidas al Laboratorio Clínico Galeno; cada aislamiento fue confirmado genotípicamente empleando PCR de punto final para la detección del gen blaKPC. El método de difusión con discos de 3- aminofenilborónico y Método Comercial de Discos Combinados MASTDISKS ID mostró concordancia con los resultados emitidos por el Advanced Expert System (AES) y la verificación genotípica de KPC. La utilización del Vitek 2® compact combinada con la confirmación fenotípica de los aislados sospechosos, constituye una alternativa para la agilización de la respuesta de los laboratorios de microbiología para hacer frente a la emergencia de Enterobacterias productoras de carbapenemasas KPC.

PALABRAS CLAVE: Carbapenemasas, KPC, Ácido aminofenilborónico, Vitek.

Abstract

UTILITY OF VITEK 2® COMPACT SYSTEM AND PHENOTYPIC METHODS FOR DETECTION OF KPC TYPE CARBAPENEMASES

The isolation of KPC-producing Enterobacteriaceae has increased over the past decade, more than 15 years ago the first carbapenemase-producing Enterobacteriaceae have been described and are currently endemic in regions of America, Europe, Asia and Latin America. Alternatively, for early and effective detection of this resistance mechanism we evaluated the performance of automated Vitek 2® Compact in conjunction with the method of synergy aminophenylboronic acid (APB) and the Commercial Combined Disk method MASTDISKS ID for phenotypic identification, we described this type of β - lactamase in 23 isolates with decreased susceptibility to carbapenem, obtained from samples referred to Galeno Clinical Laboratory; each isolate was confirmed by genotyping using PCR for detecting blaKPC gene. The disk diffusion method of 3-aminophenyl and Commercial Combined Disk method MASTDISKS ID showed concordance with the results issued by the Advanced Expert System (AES) and genotypic verification of KPC. The use of compact Vitek 2® combined with the phenotypic confirmation of suspect isolates is an alternative for speeding up the response of microbiology laboratories to address the emergence of KPC-producing Enterobacteriaceae.

KEY WORDS: Carbapenemases, KPC, Aminophenylboronic Acid, Vitek.

Introducción

En el transcurso de las últimas décadas se han descrito varias enzimas que han contribuido a incrementar la resistencia a los betalactámicos en diferentes especies de la familia Enterobacteriaceae. Los carbapenemos son β -lactámicos de amplio espectro con actividad bactericida frente a este grupo de bacterias y otras de interés clínico. Hace algo más de 15 años se describieron las primeras enterobacterias productoras de carbapenemasas y hoy en día suelen ser endémicas en algunas regiones de Estados Unidos, así

como también se encuentran distribuidas en países de Europa, Asia y América Latina.¹

El esquema de clasificación de Ambler establece 4 clases principales de estas β - lactamasas, agrupadas en base a la homología de su secuencia de aminoácidos, las clases A, C y D poseen residuos de serina en su centro activo, mientras que las que comprenden la clase B poseen Zinc y se les suele llamar metalocarbapenemasas (M β L). Las carbapenemasas tipo KPC pertenecen a la Clase A de Ambler y al grupo funcional 2f de Bush - Medeiros, que las distingue de otras carbapenemasas por ser capa-

ces de hidrolizar al cefotaxime y ser fácilmente transmisibles mediante plásmidos, lo cual hace muy rápida su diseminación. Las carbapenemasas tipo KPC pueden ser parcialmente inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, más recientemente se ha descrito que el ácido borónico y sus derivados son capaces de mermar su actividad.²

Las técnicas espectrofotométricas para detectar hidrólisis de carbapenem en conjunto con la detección del gen blaKPC constituyen los métodos de referencia para detectar aislamientos productores de KPC,¹ sin embargo, son de aplicación limitada en la práctica clínica debido a que no se encuentran disponibles en la mayoría de los centros de salud, aunado a los altos costos que representan para los laboratorios de diagnóstico; esto hace imperante la aplicación de metodologías alternativas que agilicen el proceso para así contribuir a detener la diseminación de este tipo de fenómenos de resistencia que potencian el fallo clínico en los pacientes afectados y que poseen un limitado arsenal farmacológico para su erradicación.

El extendido uso de analizadores automatizados en microbiología clínica como el Vitek 2® compact permite facilitar el manejo de elevados volúmenes de pacientes y reducir significativamente el tiempo de respuesta de los aislamientos en estudio. El equipo cuenta con el Advanced Expert System (AES), el cual compara la MIC obtenida en cada aislamiento con la distribución modal de los mecanismos de resistencia incluidos en una base de datos para la especie bacteriana aislada.³ Se han propuesto algunos algoritmos útiles que permiten orientar al microbiólogo a partir de las MIC arrojadas por el equipo y las alarmas que proporciona el AES, para obtener una mayor aproximación en la interpretación del antibiograma de aquellos aislamientos productores de KPC, permitiendo complementar el proceso con la utilización de métodos fenotípicos que han sido desarrollados y probados para tal fin.³

Este trabajo fue realizado con el objetivo de destacar la utilidad del sistema automatizado Vitek 2® compact y de los ensayos fenotípicos para detectar la presencia de Carbapenemasas tipo KPC en Enterobacterias aisladas en el Laboratorio Clínico Galeno desde Enero a Agosto de 2013.

Pacientes, Materiales y Métodos

Recolección de los Aislamientos

Se analizaron un total de 23 aislamientos de Enterobacterias obtenidas de muestras clínicas de distintas procedencias referidas al Laboratorio Clínico Galeno para la realización de cultivo y antibiograma. Se inclu-

yeron en el estudio aquellas cepas con susceptibilidades disminuidas a Cefalosporinas de 3era y 4ta generación así como a Carbapenem por las tarjetas AST- N87 del Sistema Vitek 2® compact (Biomerieux) utilizadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La identificación de cada uno de los aislamientos se realizó empleando la Tarjeta GN del sistema Vitek 2® compact.

Pruebas de Sensibilidad

- Método Epsilométrico ETest: Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima para Imipenem (0,002 – 32 ug/mL) y Meropenem (0,002 – 32 ug/mL) empleando el sistema de tiras plásticas calibradas ETest de Biomerieux®; este se utilizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante y los resultados obtenidos se compararon con los puntos de corte del documento CLSI 2013.

Ensayos Fenotípicos

- Método de difusión de Doble Disco: Se determinó la existencia de sinergia entre los Carbapenem empleados (IMI, MER y ETP) y el ácido aminofenilborónico; para ello se hisoparon placas de agar Mueller – Hinton (BBL®) con una suspensión de cada aislamiento en estudio a una turbidez de 0.5 Mc Farland, posteriormente se colocaron discos de ácido 3- aminofenilborónico 300 µg (APB) (Bioanalyse ®) a una distancia no mayor a 1,2 cm centro a centro frente a los discos de cada carbapenem, las placas se incubaron de 35°C a 37°C por 24 horas. Se interpretó como positivo el efecto sinérgico entre el carbapenem estudiado frente al disco de ácido borónico.

- Método Comercial de Discos Combinados MASTD- ISKS ID: Para la realización de este ensayo se emplearon 4 cartuchos identificados como "A" (compuesto por 10 µg de carbapenem), B (combinado con 10 µg de carbapenem y un inhibidor de mβL), C (10 µg de carbapenem + inhibidor de KPC) y D (disco de 10 µg de carbapenem + inhibidor de AmpC). Se preparó una solución 0,5 Mc Farland de cada aislamiento y se extendió en placas de agar Mueller – Hinton (BBL®), posteriormente se colocó un disco de cada denominación guardando la distancia suficiente para que se pudieran observar las zonas de inhibición. Luego de 24 horas de incubación de las placas a 37° C se midió el diámetro de inhibición de cada disco y se compararon diferencias entre las medidas del disco A con las medidas de las zonas de inhibición obtenidas con los discos B, C y D respectivamente.

Los resultados de la prueba se interpretaron siguiendo las especificaciones del fabricante:

- a. Una Diferencia mayor o igual a 5 mm del disco B al disco A, demuestra actividad mβL.
- b. Una diferencia Mayor o igual a 4 mm del disco C al disco A demuestra actividad KPC.
- c. Si los discos C y D muestran una diferencia (mayor

a 4 mm y mayor a 5 mm respectivamente) respecto al disco A, se demuestra que el microorganismo demuestra actividad AmpC acoplada con pérdida de porinas (impermeabilidad).

Caracterización Molecular

Se confirmó la presencia del gen blaKPC mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final, los iniciadores específicos utilizados se describen a continuación:

Tabla 1

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CARBAPENEMASAS			
Serino- Carbapenemasas (genes)	Iniciadores	Secuencia 5'—3'	Producto de amplificación
blaKPC	blaKPC F	TCGCTAAACTTGAACAGG	
	blaKPC R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAAT	893 pb

GOPOOSGEG

dejó enfriar la suspensión bacteriana durante 5 minutos y se centrifugó a 12.000 rpm por un tiempo de 2 minutos. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un tubo Eppendorf estéril y se conservó -20°C hasta la realización de la PCR (Tablas 1 y 2).

Los reactivos utilizados se enumeran a continuación:

- Agua estéril destilada: 12,35 µL.
- Tampón de PCR 10x: 2,5 µL.
- MgCl₂: 2 µL.
- dNTP mix (40 mM): 1 µL.
- Iniciador 1 blakpc-f: 1 µL.
- Iniciador 2 blakpc-r: 1 µL.
- Taq ADN polimerasa: 0.15 µL.
- Muestra problema: 5 µL.

VOLUMEN FINAL 25 µL.

A continuación se señalan las condiciones empleadas para la reacción:

Tabla 2

Análisis de la PCR			
Etapas	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Ciclos
Iniciación	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineación	1	58	30
Extensión	1	72	30
Extensión final	7	72	-

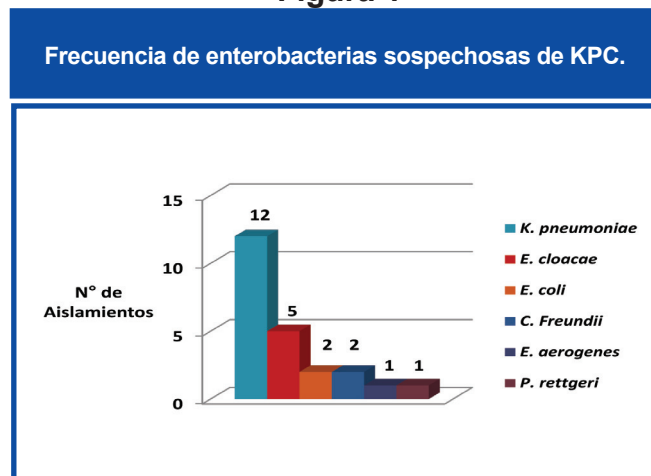
La revelación de los productos de amplificación del PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8%.

A todos los resultados obtenidos se les aplicó estadística descriptiva, determinando la frecuencia de aislamientos positivos para KPC mediante cada una de las técnicas descritas, dichas frecuencias se organizaron en gráficos para su posterior análisis.

Resultados y Discusión

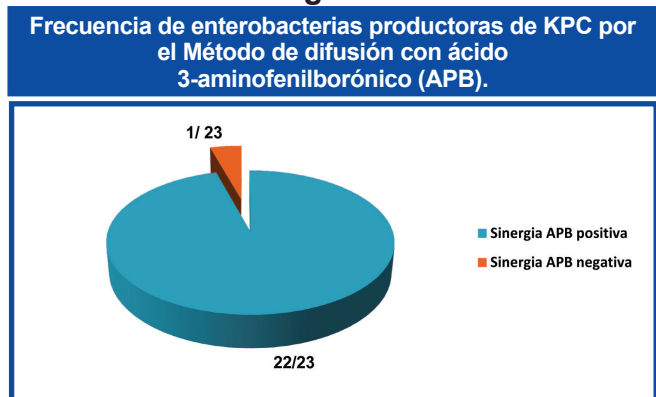
Del total de 23 aislamientos sospechosos de KPC identificados por el sistema Vitek 2® compact, 12 se tratan de *Klebsiella pneumoniae*, seguidos por otras especies bacterianas como *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* y *Providencia rettgeri* (Figura 1). Este hallazgo es consistente, dado que la presencia de KPC es predominante en *K. pneumoniae*, sin embargo el carácter plasmídico de este tipo de enzimas favorece la acelerada diseminación del fenómeno entre otras especies bacterianas entre las cuales se ha documentado *E. coli*, *Salmonella entérica*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii*, inclusive se ha reportado producción de KPC en bacilos gramnegativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* aunque con mucha menor frecuencia respecto a las especies de enterobacterias.⁴ El tipo de muestra en la cual predominan los aislamientos sospechosos de KPC son las secreciones de tejidos blandos con 12/23 aislamientos, seguida de muestras respiratorias 6/23.

Figura 1



Respecto a los resultados obtenidos al realizar la prueba de difusión con APB, se obtuvo que 22/23 aislamientos estudiados resultaron positivos para esta metodología, si se comparan estos valores con los obtenidos por confirmación molecular en la cual 21/23 aislamientos expresaron el gen bla KPC, puede deducirse que solamente 1 de los aislamientos con sinergia positiva con APB, resultó ser un falso positivo para esta metodología (Figura 2); lo aquí expresado coincide con las opiniones de varios autores, los cuales destacan que los métodos de detección fenotípica de KPC como el Método de Hodge Modificado (MHT) y los métodos que involucran APB son altamente sensibles para detectar aislamientos productores de KPC, sin embargo se prefiere la utilización de APB, dado que el MHT puede presentar mayor cantidad de falsos positivos, en aquellos aislamientos de enterobacterias en las cuales el mecanismo involucrado sea la combinación de Beta lactamasa de Espectro Expandido más impermeabilidad. Los resultados mostrados en la presente investigación sugieren que existe una alta correspondencia entre los aislamientos positivos para KPC según sinergia con APB y la confirmación molecular para detectar la presencia del gen blaKPC, lo cual es coincidente con varios autores que han evaluado el desempeño de esta técnica.² El aislamiento falso positivo es un *Citrobacter freundii* que se caracteriza por ser productor natural de AmpC y se sabe el APB es un inhibidor importante tanto de KPC como de AmpC y puede producirse sinergia en estos casos.²

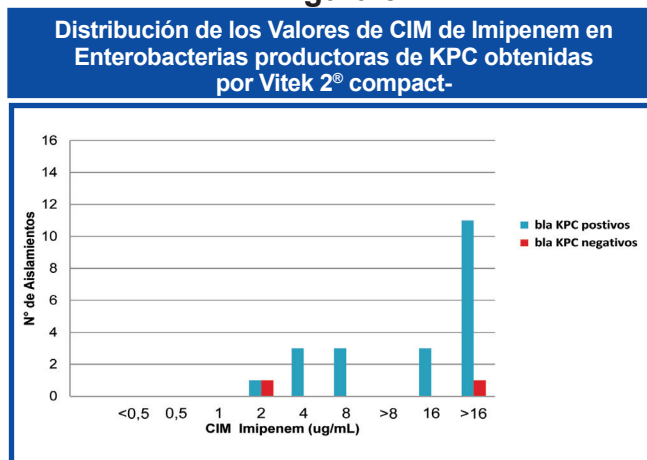
Figura 2



En cuanto a las pruebas de susceptibilidad efectuadas con la tarjeta AST -N87 del Vitek 2® compact se puede observar gráficamente la distribución de las CIM de Imipenem obtenidas con la utilización de este sistema en los aislamientos estudiados (Figura 3). Es evidente que los valores se distribuyen en su mayoría por encima de la CIM de 4 µg/mL; debe recordarse que el documento 2013 del CLSI destaca una CIM de 4 µg/mL como punto de corte para declarar "resistente" al Imipenem tal como se aprecia en la gráfica anterior, 21 de los 23 aislamientos

estudiados son resistentes, de estos solo 1 aislamiento resultó ser negativo para el gen bla KPC, sin embargo, se obtuvieron 2 aislamientos calificados con susceptibilidad intermedia a carbapenem, de los cuales 1 expresó el gen bla KPC y el otro fue negativo en la confirmación molecular. Es importante destacar que el AES del Vitek 2® compact declara como "posible productor de Carbapenemasa" a aquel aislamiento que posea por lo menos una CIM "resistente" de entre los 3 carbapenems estudiados por la tarjeta (Imipenem, Meropenem y Ertapenem) de acuerdo con la distribución modal de los puntos de corte que posea en su base de datos,³ por lo tanto no es posible detectar específicamente la presencia o ausencia del fenómeno en base al análisis aislado de solo una de las CIM reportadas por el equipo.

Figura 3

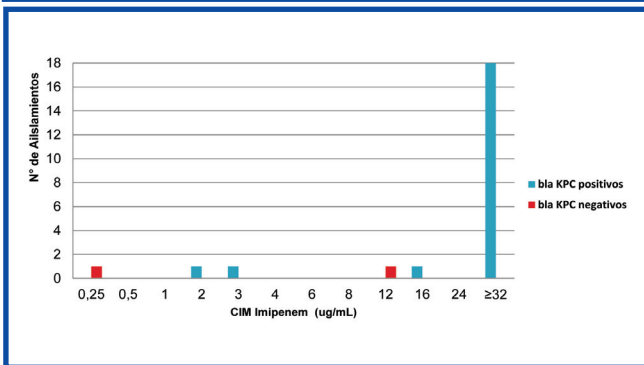


En la Figura 4 se observa la distribución de los valores de las CIM obtenidas empleando el método epsilométrico ETest de Biomereux®, el cual consiste en determinar Concentración Inhibitoria Mínima por difusión en agar. Si se compara las distribuciones obtenidas por esta técnica con las arrojadas por el Vitek 2® compact puede observarse que 1 aislamiento KPC negativo del total analizados, presenta una CIM para imipenem que de acuerdo con los puntos de corte empleados puede interpretarse como "sensible", si se analiza este valor de forma aislada, pudiera decirse sesgadamente que se está en presencia de una cepa que no presenta ningún fenómeno importante de resistencia a carbapenem, sin embargo al analizar este aislamiento en particular se observa que el resto de los carbapenem estudiados (meropenem y ertapenem, véase en las siguientes gráficas) presentan susceptibilidades reducidas y coincidiendo con algunos autores, es importante destacar que esta metodología es afectada por el efecto inóculo lo que puede producir inconsistencias en los resultados de las CIM que se obtengan con ella, sub dimensionandolos o sobre dimensionandolos.^{4,5,6,8} En

esta distribución de aislamientos es importante observar cuidadosamente las distribuciones de CIM obtenidas con el ya que 7/23 aislamientos considerados para la presente investigación se ubican en rangos de CIM que van de 1 µg/mL a 2 µg/mL, de estos aislamientos 6/23 pueden ser calificados como aislamientos de KPC “de bajo rango” dado que poseen CIM que coinciden con puntos de corte calificados como “sensibles” por el documento 2013 del CLSI, esto soporta diversas investigaciones en las cuales se sugieren terapias combinadas de carbapenem con CIM por debajo de 4 µg/mL con diferentes antibióticos como aminoglicósidos o tygecilina como alternativa para tratar pacientes con infecciones por enterobacterias productoras de KPC.⁷

Figura 4

Distribución de los Valores de CIM de Imipenem en Enterobacterias productoras de KPC obtenidas por ETest®



Si se aprecian en conjunto los resultados obtenidos con meropenem, de la distribución de las CIM entre el Vitek 2® compact y el ETest de Biomereux® (Figuras 5 y 6) se pueden tomar en cuenta las mismas consideraciones realizadas en las gráficas de distribución de CIM de imipenem.

Figura 5

Distribución de los Valores de CIM de Meropenem en Enterobacterias productoras de KPC obtenidas por Vitek 2® compact.

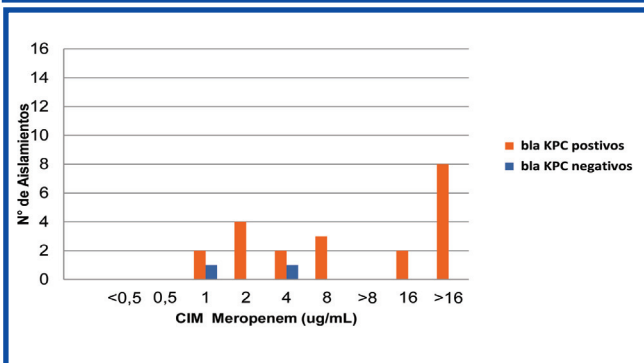
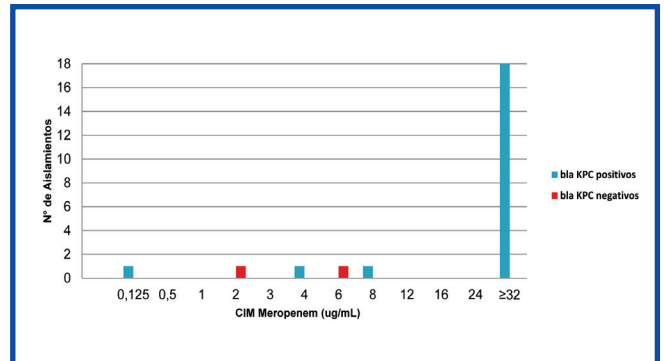


Figura 6

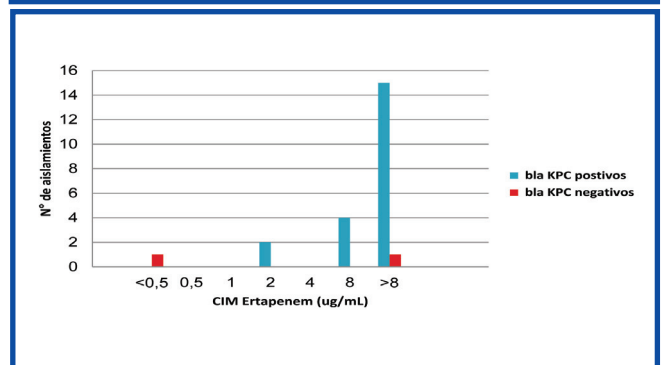
Distribución de los Valores de CIM de Meropenem en Enterobacterias productoras de KPC obtenidas por ETest®



En la Figura 7 puede visualizar la distribución de las CIM de Ertapenem obtenidas con el Vitek 2® compact, en este caso 21/23 aislamientos analizados son productores de KPC y 1/23 no es productor de KPC, recientemente se ha sugerido que el ertapenem pudiera ser un marcador sensible para detectar la presencia de KPC, sin embargo, se presentan algunas dudas sobre la especificidad de este antibiótico, dado que los valores de sus CIM pueden verse afectados por la presencia de Beta – Lactamasas de Espectro Expandido tipo CTX – M (cefotaximasas) y otros fenómenos como la modificación de porinas.⁷

Figura 7

Distribución de los Valores de CIM de Ertapenem en Enterobacterias productoras de KPC obtenidas por Vitek 2® compact.

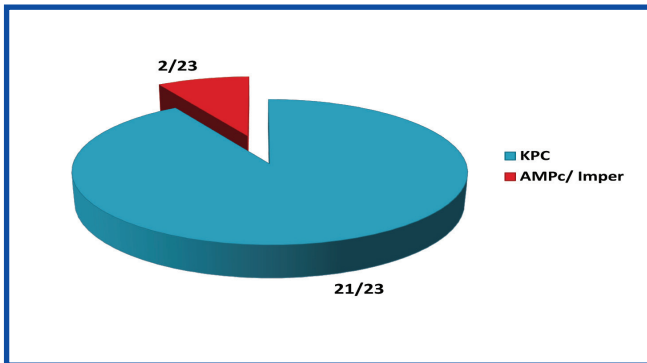


Al aplicar el Método Comercial de Discos Combinados MASTDISKS ID para detectar la presencia de carbapenemasas, se obtuvo que de 23 muestras incluidas en el presente trabajo; 21 aislamientos resultaron positivos para detectar la presencia de carbapenemasas tipo KPC contra un total de 2 aislamientos con los que se obtuvo una diferencia de halos coincidente con la presencia de

aislamientos sugestivos de presentar impermeabilidad con Hiperproducción de AmpC (**Figura 8**). Este hallazgo coincide con varios autores que han destacado la utilidad y sencilla aplicación de los métodos fenotípicos basados en el uso de inhibidores para la detección de KPC e hiperproducción de AmpC como herramienta de apoyo a la hora de dar una respuesta oportuna y lo más acertada posible en aislamientos de Enterobacterias con susceptibilidad disminuida a los carbapenemos.⁴ Sin embargo el instructivo de este ensayo no hace referencia al tipo de inhibidores utilizados para desarrollar la técnica, por tanto, los autores de este trabajo sugieren hacer referencia a los tipos de inhibidores usados en este kit a fin de realizar una evaluación más profunda del fenómeno que ocurre in vitro. No obstante, se observará que existe una correspondencia excelente entre esta metodología comercial y los resultados de la confirmación molecular que se muestran a seguir aunados a la respuesta del AES del Vitek 2 Compact en los aislamientos estudiados.

Figura 8

Frecuencia de Enterobacterias sospechosas de KPC por el Método de Discos Combinados MastDisk®



Del total de aislamientos incluidos en este trabajo que fueron detectados por el AES del Vitek 2® compact como posibles productores de carbapenemasa, 21 codificaron para el gen blaKPC y únicamente 2 aislamientos no codificaron para este gen (**Figura 9**). Es importante resaltar, que la confirmación molecular constituye el método de referencia para detectar cepas productoras de este tipo de Beta – lactamasas; sin embargo, no todos los centros de salud disponen de estas metodologías, que requieren más tiempo para dar respuesta y un personal adiestrado específicamente en ellas. La utilización de métodos automatizados como el Vitek 2® compact constituye una alternativa para la agilización de esta respuesta; como se observa claramente en la presente investigación, a pesar de que son controvertidas las opiniones del uso de equipos automatizados para la detección de KPC y otras carbapenemasas. Algunos autores han propuesto algunos

algoritmos acertados, los cuales involucran el análisis de las CIM arrojadas por el equipo con métodos fenotípicos como el empleo de ácido 3- aminofenilborónico (APB). Esta combinación de metodologías mejora de manera importante el rendimiento del Vitek 2® compact. En la **Figura 10** se muestran los resultados del análisis molecular, obtenidos con algunos de los aislamientos incluidos en este estudio.

Figura 9

Frecuencia de aislamientos de enterobacterias codificantes para el gen bla

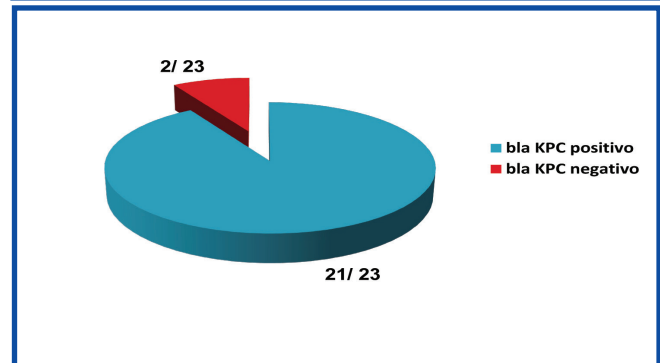
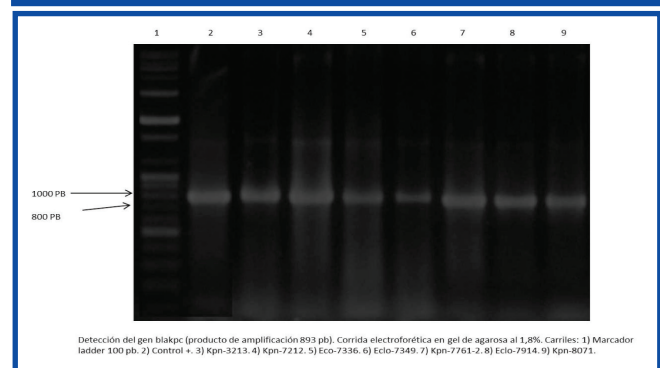


Figura 10

Detección del gen bla_{kpc} (producto de amplificación 893 pb). Corrida electroforética en gel de agarosa al 1,8%.



La utilización del Vitek 2® compact combinada con la confirmación fenotípica de los aislados sospechosos, constituye una alternativa para la agilización de la respuesta de los laboratorios de microbiología para hacer frente de manera oportuna y asertiva a la emergencia de Enterobacterias productoras de KPC.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al aporte del Laboratorio Clínico Galeno C.A y la cátedra de Microbiología de la Escuela de bioanálisis UCV.

Referencias

1. Hirsh E, Tam E. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010 doi:10.1093/jac/dkq108.
2. Nicola F, Nievas J, Smayevsky J. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Argentina de Microbiología* 2012;44:290-302.
3. Pasterán F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can We Use Imipenem and Meropenem Vitek 2 MICs for Detection of Suspected KPC and Other-Carbapenemase Producers among Species of Enterobacteriaceae?. *Journal of Clinical Microbiology* 2011;49:697-701.
4. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1319-1321.
5. Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:375-385.
6. Daikos G, Markogiannakis A. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection* 2011;16:2.
7. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske C, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini G, Tsakris A, Vatopoulos A, Canton R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues, *Clin Microbiol Infect* 2011.



Indicaciones a los Autores

Informe Médico es una revista de educación médica continua que publica artículos de todas las especialidades de la medicina. Pueden considerarse manuscritos relacionados con historia de la medicina y las ciencias básicas vinculadas a la medicina práctica.

- Los trabajos consignados para su consideración no deben haber sido enviados a otra revista en forma simultánea y deberán ser inéditos. Los artículos de revisión podrán ser solicitados por invitación, o enviados por iniciativa del autor.

- Los manuscritos serán remitidos a dos expertos en el área para su arbitraje. Las observaciones de los árbitros se harán del conocimiento de los autores, preservando la identidad de los evaluadores y la confidencialidad del material.

- Los artículos pueden ser enviados por correo electrónico a informed@cantv.net o al editor eduomero44@gmail.com; eromero@informemedico.com.ve o en DVD a la siguiente dirección: Centro Empresarial Los Ruices, piso 5, oficina 514, avenida Principal de Los Ruices, **en Formato Word**.

- El artículo debe constar de las siguientes partes: título, nombre del autor o autores con sus respectivos lugares de trabajo y dirección para el envío de la correspondencia; resumen y palabras clave; cuerpo del artículo; fotografías; si contiene figuras con su respectiva leyenda; agradecimientos, lista de referencias y tablas.

- El título del trabajo debe ser corto y relacionarse estrictamente con el objetivo del estudio.

El artículo debe contener un resumen en español, título en inglés y un abstract en inglés que **no exceda las 150 palabras**. Incluir en el resumen, el objetivo del estudio, pacientes, materiales, métodos, procedimientos, resultados con cifras de promedios \pm error o desviación estándar, porcentajes encontrados y entre paréntesis su significación estadística. Debe contener una conclusión breve de lo hallado en el estudio.

- Incluir un máximo de (5) Palabras Clave y su traducción al inglés como Key Words.

- El artículo debe ser redactado en la secuencia IPMRD: Introducción, Pacientes, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, extensión máxima de 30 páginas tamaño carta a doble espacio, letra Arial tamaño 12.

- Las referencias relevantes al estudio deben ser numeradas como superíndices, en orden de citación en el texto.

- **Casos Clínicos:** deben incluir: Introducción, Enfermedad actual, Antecedentes, Hallazgos del examen físico, Exámenes hematológicos, Bioquímicos, Estudios con imágenes, ECG, Histológicos, Especimen quirúrgico, Fotografías de lesiones relevantes. Discusión, Tratamiento médico o quirúrgico, Evolución del paciente, Agradecimientos y Referencias.

- **Referencias:** Usar el sistema internacional de Vancouver

- **Para artículos de revistas:** apellido de los autores, iniciales del nombre sin punto; título del artículo, nombre de la revista abreviado, (revistas con título de una sola palabra no se abrevian, p. ej. Circulation), año de publicación seguido de punto y coma, volumen seguido de dos puntos, página inicial, guión, página final. Ej. Kaplan GB, Greenblat DJ, Kent MA. Caffeine treatment and withdrawal in mice: relationship between dosage, concentrations, locomotor activity and A1 adenosine receptor binding. J Pharmacol Exp Ther 1993; 266: 1563-1572.

- **Capítulos de libros:** apellido e iniciales de los nombres de los autores, título del capítulo, editor del libro, título del libro, edición, año, editorial, página inicial y final. Ej. Kemp HG. Angina con arterias coronarias angiográficamente normales: pronóstico y tratamiento. Kaski JC, Editor 3ª Ed. 1995. Edika Med, España, pp 17-25.

- Las tablas y figuras se indican con números arábigos. Señalar en negritas y entre paréntesis, un llamado de inserción de la figura o la tabla citada en el texto.

- Las tablas deben tener un título corto y las abreviaturas usadas en las tablas y las figuras deben ser explicadas en la leyenda ubicada en la parte inferior de la misma. Incluir en el manuscrito una hoja de leyendas de cada figura. Si se trata de microfotografías de luz o electrónica citar la magnificación ej. 50X y la técnica de coloración empleada.

- La publicación de fotografías de pacientes identificables no está permitida por razones éticas; enmascarar para que no sean identificables los pacientes.

- En caso de estudios clínicos debe mencionarse en la sección correspondiente a selección de pacientes, si el estudio se realizó en apego a la Convención de Helsinki, Ley de Ejercicio de la Medicina y Normas de Investigación Clínica del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, con el consentimiento informado de los pacientes y la aprobación del comité de ética correspondiente.