

Sesión 35

Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos (III)

556

DIFERENCIAS EN LA PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA A TETRACICLINA ENTRE *S. SONNEI* Y *S. FLEXNERI*

L. Mensa¹, E. Pisos^{2,3}, S. Capilla⁴, J. Vila⁵, J. Gascón¹ y J. Ruiz¹

¹Centro de Salud Internacional, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona. ²Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Insular, Las Palmas de Gran Canaria. ³Servei de Malalties Infeccioses, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona. ⁴Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. ⁵Servei de Microbiologia, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona.

Objetivos: Analizar la presencia de los principales mecanismos moleculares de resistencia a tetraciclina (Tc) en *Shigella* spp. y evaluar las posibles diferencias entre especies.

Material y métodos: Se analizaron 111 cepas de *Shigella* spp. resistentes a Tc: 67 *S. sonnei* y 44 *S. flexneri* (6 autóctonas y 105 causantes de Diarrea del Viajero). La resistencia a Tc se estableció mediante el método de Kirby-Bauer. La presencia de los genes *tetA*, *tetB* y *tetG* se estableció por PCR, corroborándose su fiabilidad mediante secuenciación. Los análisis estadísticos se hicieron con el test de Maentel-Haenszel.

Resultados: El gen *tetA* se detectó en 35 cepas (31,5% del total): 8 *S. flexneri* y 27 *S. sonnei* ($p < 0,05$). Se identificó *tetB* en 52 cepas (46,8% del total): 33 *S. flexneri* y 19 *S. sonnei* ($p < 0,001$). El gen *tetG* se encontró en 10 cepas (9% del total): 4 *S. flexneri* y 6 *S. sonnei*, usualmente en concomitancia con *tetA* o *tetB* (80% de los casos). La presencia de más de un determinante de resistencia se dio en 11 casos (10% del total): 7 *S. flexneri* y 4 *S. sonnei*. El 22,5% de las cepas analizadas (un total de 25: 6 *S. flexneri* y 19 *S. sonnei*, $p = 0,07$) no presentó ninguno de los determinantes de resistencia analizados.

Conclusiones: Han sido demostradas diferencias especie-específicas en la distribución de los genes *tetA* y *tetB*. La presencia simultánea de más de un determinante es un evento extraño. Se constata la presencia de mecanismos de resistencia a Tc diferentes a los analizados.

557

POSIBLE TRANSMISIÓN *IN VIVO* DEL GEN CTX-M-32 ENTRE DOS ESPECIES DISTINTAS DE ENTEROBACTERIACEAE

A. Fernández¹, M. Cartelle¹, E. Gil², E. Torres¹, R. Villanueva¹, y G. Bou¹

¹S. Microbiología, CHU Juan Canalejo, ²H. S. Rafael. La Coruña.

Introducción: Paciente que ingresa por cólico renal e ITU en la que se aíslan tras varios ciclos de amoxicilina-clavulánico un *Escherichia coli* productor de BLEE. Dos meses más tarde en un nuevo episodio de ITU se aísla un *Proteus mirabilis* también productor de BLEE.

Objetivos: Estudio de una posible transmisión de un gen BLEE "in vivo" y análisis de su entorno genético.

Material y métodos: 1) Cepas aisladas del paciente: *E. coli* productor de BLEE (EC1), causante de un episodio de ITU; *P. mirabilis* productor de BLEE aislado a los dos meses (PM1), causa de un segundo episodio; *E. coli* productor de BLEE de origen perineal (control colonización) (EC2) y *P. mirabilis* BLEE negativo (PM2) ambos aislados posteriormente. 2) Cepas identificadas con Api20E (Biomérieux). 3) Tipación

de las cepas mediante REP-PCR y RAPD. 4) Conjugación de EC1, EC2 y PM1 con *E. coli* XL1Blue (R a kanamicina), consiguiéndose los transconjugantes de EC1 (TC1), de EC2 (TC2) y de *Proteus* (TCP1). 5) Transformación del plásmido de TCP1 en *E. coli* TG1 (TF1). 6) PCRs de plásmidos con iniciadores de CTX-M grupos 1, 2, 8, y 9. 7) RFLPs plasmídicos. 8) CMIs para β -lactámicos con E-test. 9) Clonación del gen BLEE a partir de TF1 mediante restricción con *AccI*. 10) Secuenciación de un fragmento del plásmido del TF1.

Resultados: Mediante tipación se vio que EC1/EC2 no estaban relacionadas epidemiológicamente mientras que PM1/PM2 sí. Las PCR resultaron positivas para CTX-M del grupo I. Los RFLPs plasmídicos mostraron patrones idénticos en todos los transconjugantes. La secuenciación de aproximadamente 5 Kpb del fragmento clonado (a partir de TF1) dió como resultado la identificación del gen CTX-M-32 con un nuevo entorno genético. En la región 5' de CTX-M-32 se detectó la tnpA de ISEcp-1 (truncada) seguida de dos secuencias de inserción, IS5 e IS1 (completas). En la región 3' del gen CTX-M-32 apareció un fragmento de la ORF477 descrita previamente en entornos genéticos de enzimas del tipo CTX-M.

Conclusiones: 1) Los antecedentes personales de la paciente y los múltiples ciclos de antibiótico pudieron favorecer la transmisión *in vivo* del plásmido con el gen CTX-M-32 entre diferentes cepas de *E. coli* y un *P. mirabilis*. 2) Las secuencias de inserción encontradas (IS5 e IS1) puede intervenir movilizándolo el gen CTX-M-32.

558

IDENTIFICACIÓN DE *bla*_{CTX-M-9} EN DIFERENTES VARIANTES DE Tn402 Y Tn21 ASOCIADAS A PLÁSMIDOS DE INCOMPATIBILIDAD CLÁSICOS (INCH12, INCP-1ALFA)

A. Novais¹, R. Cantón¹, A. Valverde¹, J.C. Galán¹, E. Machado², L. Peixe², A. Carattoli³, F. Baquero¹ y T.M. Coque¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España. ²Facultad de Farmacia, Universidad de Oporto, Portugal. ³Instituto Superior de Sanidad, Roma, Italia.

Objetivos: Analizar la diversidad del entorno genético asociado al gen *bla*_{CTX-M-9} entre los aislados productores de CTX-M-9 recogidos en nuestro hospital desde su descripción inicial.

Métodos: Se analizaron 45 aislados con diferentes pulso-tipos (41 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *S. enterica* y 1 *E. cloacae*) de 45 pacientes (1996-2003). La diversidad del entorno genético de *bla*_{CTX-M-9} se analizó por PCR-overlapping basada en la estructura de In60 (Sabaté et al, AAC 2002;46:2656). La asociación de In60 con Tn402 y Tn21 fue investigada por análisis de la presencia de secuencias específicas por hibridación y/o PCR: orf5, IS1326, IS1353, IS6100 (Tn402) y tnpA-tnpR, merA (Tn21). Un subgrupo de aislados con distintos perfiles de In60/Tn402/Tn21 fue caracterizado por PCR-overlapping basada en las secuencias de Tn21 y Tn1696. La transferencia de *bla*_{CTX-M-9} fue establecida por conjugación y la localización plasmídica/cromosómica del gen por hibridación de DNA genómico digerido con I-CeuI con sondas intragénicas de *bla*_{CTX-M-9} y 23S rDNA. La caracterización del contenido y tamaño de los plásmidos fue realizada por el método de Barton y su grupo de incompatibilidad identificado por el método de Carattoli et al.

Resultados: Se identificaron 6 variantes de In60: A) idéntica a In60 (n = 35), B) con diferencias en la secuencia posterior a *bla*_{CTX-M-9} (n = 4); C) y D) con diferencias en la región 5'CS-3'CS (aadA1 ó dfrA12-orfX-aadA8 vs dhfrA16-aadA2) (n = 4); E) y F) con ausencia de 5'CS-3'CS (n = 2). In60 de los grupos A-D se asoció a diferentes variantes del transposon defectivo Tn402 (módulo tni truncado por orf5+IS1326, orf5+IS1326 + IS1353 ó ausencia de inserciones). La mayoría de los aislados de los tipos A-C estaban localizados en estructuras derivadas de Tn21. Las secuencias adyacentes a las regiones 5'CS y 3'CS de los tipos D, E y F no fueron identificadas. *bla*_{CTX-M-9} se localizó en

plásmidos de 100-320Kb, identificados principalmente como IncHI2 e IncP-1alfa. Los plásmidos pertenecientes a estos grupos presentaron perfiles de restricción similares.

Conclusiones: La diseminación de *bla*_{CTX-M-9} en nuestro entorno es debida a su localización en plásmidos conjugativos de amplio espectro globalmente diseminados. La diversidad de perfiles In60/Tn402/Tn21 asociados a plásmidos del mismo grupo con patrones de restricción similares indican la evolución de plásmidos específicos por adquisición y/o recombinación de diferentes módulos genéticos.

559

COMPARACIÓN DE *PARC* ENTRE AISLADOS CLÍNICOS DE *SALMONELLA SPP.* Y OTRAS ESPECIES BACTERIANAS

I. Escribano, E. Flores, J.C. Rodríguez, L. Soler, J.M. Álvarez, P. López y G. Royo

S. Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Elche. Alicante.

Objetivo: Estudio comparativo de la secuencia de nucleótidos del gen *parC* entre aislados de *Salmonella spp.* de varios serotipos, con el de otras especies bacterianas.

Material y métodos: *Aislados clínicos:* 61 aislados clínicos de *Salmonella*, sensibles y resistentes a ácido nalidíxico, de los serotipos más prevalentes en nuestro Área: 21 Enteritidis, 8 Typhimurium, 13 Virchow, 19 Hadar. *Secuenciación de parC:* Se realiza una PCR con los cebadores STPARC1 (5'-ATGAGCGATATGGCAGAGCG) y STPARC2 (5'-TGACCGAGTTCGCTTAACAG). El producto obtenido se purifica y se realiza una segunda amplificación con el kit comercial Big Dye[®] Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) utilizando los cebadores STPARC1 o STPARC2. *Análisis filogenético:* Se realiza mediante el programa MEGA versión 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004) utilizando el modelo Jukes-Cantor y el método de reconstrucción filogenética Neighbor-Joining, comparando la secuencia de *parC* obtenida entre los aislados de los diferentes serotipos de *Salmonella* con la secuencia de otras especies bacterianas descritas en Gen Bank.

Resultados: No se observan diferencias en las secuencias de *parC* de los aislados de *Salmonella* estudiados salvo en el Hadar, que mostró un cambio de aminoácido en Thr57-Ser y 7 mutaciones silentes. La comparación de la secuencia del gen de nuestros aislados con la descrita para otras especies bacterianas (*S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *E. coli* K12, *S. dysenteriae*, *P. fluorescens*, *H. influenzae*, *L. pneumophilla*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *B. melitensis*, *B. pertussis*, *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *S. aureus*, *C. freundii* y *N. meningitidis*), indica que el gen *parC* de *S. Hadar* presenta más proximidad filogenética al de *E. coli*. Con menor proximidad filogenética se sitúan las otras enterobacterias. Los genomas más diferentes corresponden a *S. aureus* y *B. melitensis*.

Conclusión: En nuestros aislados clínicos de *Salmonella*, el gen *parC* no se modifica en función de la sensibilidad a ácido nalidíxico, pero sí en función del serotipo. Este hecho debe ser estudiado en profundidad para conocer su verdadera importancia. Encontramos diferencias de las secuencias entre diversas especies bacterianas, lo que puede estar relacionado con la distinta capacidad de generar mutantes resistentes a estos compuestos.

560

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS EN BETALACTAMASAS DEL GRUPO CTX-M

M. Cartelle, F.J. Pérez-Llarena, S. Mallo, R. Villanueva y G. Bou C.H.U. Juan Canalejo. La Coruña.

Introducción: Las β -lactamasas tipo CTX-M están incrementando en incidencia desde que apareció la primera en 1992 (MEN-1). Se caracterizan por poseer alta capacidad hidrolítica

sobre cefotaxima (CTX). El mecanismo bioquímico implicado en la hidrólisis de CTX permanece desconocido, aunque se han descrito cambios en este grupo, implicados en la hidrólisis de cefotaxima como S130G; R276N y dentro del dominio ¹⁰³VNYN¹⁰⁶.

Objetivos: Estudios cinéticos en β -lactamasas del grupo CTX-M empleando la CTX-M-14 como modelo. Modelizar los residuos implicados en la estructura 3D de la CTX-M-14.

Material y métodos: Se ha clonado el gen de la CTX-M-14 y CTX-M-1 en el vector pBGS18-. Se realizó mutagénesis aleatoria de estos genes (Kit Genemorph®II Random Mutagenesis, Stratagene) para obtener una tasa de mutación 7-12 nt/1 Kb. La librería se clonó en pBGS18- en la diana *BamHI* y *EcoRI*. Los transformantes, fueron seleccionados mediante estudios de CMI (mg/L) a CTX (Etest), siguiendo los criterios de la CL-SI. Se realizó mutagénesis dirigida de los cambios obtenidos. Para estudios bioquímicos se clonaron los mutantes CTX-M-14 seleccionados en el vector comercial pGEX-6P-1 en las dianas *BamHI* y *EcoRI*, y se purificaron todas las enzimas.

Resultados: Se obtuvieron 700 clones recombinantes en la librería de CTX-M-14 y CTX-M-1; de ellos 50 clones mostraron disminución en la CMI a CTX. Tras realizar 81 mutagénesis dirigida, seleccionamos 22 mutantes (en ambos grupos) que disminuían la CMI (mg/L) de CTX desde > 256 a < 16 mientras que la ampicilina se mantenía > 256 . Los valores de K_{cat}/K_m (mM^{-1}) a CTX y CE (cefalotina) respectivamente muestran: CTX-M-14 = 401/1197; A51T = 374/2351; D57E = 14/722; L62H = 22/482; T74I = 11/437; V83A = 6/478; V106D = 50/649; N107D = 30/3600; N109K = 19/180; P110S = 4/501; S133G = $< 1/17$; N135S = ND/13; M138I = ND/50; R167H = 82/1961,5; R194C = ND/15; S205N = 2/52; D216G = ND/25; A222V = 96/1279; V234A = 47/160; T238A = 195/20; N247D = 65/501; A250S = 570/4125; V263L = ND/218, (ND = no determinado). Las CMI de CE en la mayoría de los mutantes siguen siendo elevada; pero disminuye en T238A, V234A y S133G (16, 24 y 16 respectivamente). Estos datos se correlacionarán con la estructura obtenida por nosotros de la CTX-M-14.

Conclusión: 1. Se han calculado las constantes cinéticas (K_m , K_{cat} y K_{cat}/K_m) en todos los clones que mostraron disminución en las CMI a CTX. 2. Los resultados obtenidos para V106D, S133G, V234A ó T238A están referenciados como importantes en la bibliografía; otros como N107D, N109K, P110S o N135S, pertenecen o están próximos a dominios activos. 3. El resto de los cambios, parece que influyen en el plegamiento de la enzima, alterando de este modo la afinidad de la misma por el sustrato y cambiando su perfil hidrolítico.

561

DIFUSIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* EN 11 HOSPITALES ESPAÑOLES (2004)

E. Miró¹, K. Diestra¹, C. García², C. Juan⁴, S. Miguelañez², B. Moyá⁴, A. Novais³, M. Pérez-Vázquez², R. Cantón³, T.M. Coque³, A. Oliver⁴, F. Navarro¹ y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI)

¹Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. ²Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. ³Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca.

Objetivos: Conocer el tipo de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) presentes en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en una muestra de cepas aisladas en 11 centros hospitalarios españoles y descartar, mediante estudios moleculares, la expansión clonal de los microorganismos con estas enzimas.

Material y métodos: Se incluyeron un total de 143 cepas obtenidas, de un proyecto de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), durante el primer trimestre del 2004 en los 11 centros participantes que incluían las diez primeras cepas de *E. coli* y las cinco primeras de *K. pneumoniae* aisladas en cada centro y sospechosas de ser portadoras de BLEE. Los estudios de clonalidad se realiza-

ron mediante PFGE. El estudio de sensibilidad incluyó β -lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas, sulfamidas, tetraciclinas y cloranfenicol. La caracterización de las BLEE se realizó mediante IEF, PCR y secuenciación.

Resultados: Se han estudiado un total de 102 cepas de *E. coli* y 41 de *K. pneumoniae*, en las cuales se ha observado una gran diversidad genética, aunque se encontraron pequeños brotes en distintos hospitales en los que sólo se vieron implicadas de dos a cuatro cepas. Tras analizar la sensibilidad de las 143 cepas se descartaron 17 (10 *E. coli* y 7 *K. pneumoniae*) por presentar un fenotipo compatible con hiperproducción de su β -lactamasa cromosómica. De las 92 cepas de *E. coli* restantes, 72 (78,2%) presentaron una BLEE tipo CTX-M [42 CTX-M-14, 18 CTX-M-9, 3 CTX-M-1 más 1 CTX-M-1 tipo, 3 CTX-M-15, 2 CTX-M-3, 2 CTX-M-32, y una CTX-M-10] y 18 SHV-12 (19,5%). Dos cepas expresaron una SHV-12 y una CTX-M-9, conjuntamente. De las 34 cepas de *K. pneumoniae*, 22 (64,7%) presentaron una BLEE tipo CTX-M [6 CTX-M-9, 4 CTX-M-14, 11 CTX-M-1, 1 CTX-M-15], 10 (29,4%) de tipo SHV [9 SHV-12, una SHV-5], una TEM-4 (0,8%) y una pendiente de clonación. En función de la BLEE las cepas mostraron una multiresistencia a antibióticos no β -lactámicos de entre un 85% y un 100%. Se obtuvieron transconjugantes, con una frecuencia de conjugación de entre 8×10^{-7} y $> 10^{-1}$ en el 71% de las cepas en las que se realizaron los ensayos de transferencia.

Conclusiones: En la colección de cepas estudiada no se demostró clonalidad en las de *E. coli* ni en las de *K. pneumoniae* portadoras de BLEE entre los diferentes centros. Cabe destacar, respecto a estudios multicéntricos anteriores, un incremento de la diversidad del tipo de BLEE, la presencia de cepas con dos BLEE y un elevado porcentaje de cepas multiresistentes sin un patrón de resistencia común.

562

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CEFAMICINASA *DHA-1* EN *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AISLADOS A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS

M.N. Larrosa, J.J. González-López, R.M. Bartolomé, M. Sabaté, I. Planells, S. Lavilla y G. Prats

Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona.

Introducción: Las cefamicinas plasmídicas se subdividen en dos grupos según el tipo de expresión: constitutiva e inducible, aislándose estas últimas en muy baja frecuencia, habiéndose descrito hasta el momento sólo tres tipos (*DHA-1*, 2 y 3) detectados principalmente en *Salmonella* y *Klebsiella*.

Objetivo: Caracterizar el mecanismo molecular de resistencia (R) a los β -lactámicos en una cepa de *E. coli* (*Ec*) y otra de *K. pneumoniae* (*Kp*) que presentaban un fenotipo de resistencia inusual compatible con la presencia de una cefalosporinasa inducible.

Material y métodos: Durante el año 2005, se aislaron de dos urino cultivos, una cepa de *Ec* y otra de *Kp* con un patrón de R compatible con una cefamicinasa inducible. El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos se hizo por técnica de disco-difusión. El cribado de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y de cefamicinas se efectuó mediante pruebas de sinergia. La caracterización de la β -lactamasa responsable se llevó a cabo mediante técnica de isoelectroenfoque (IEF), PCR múltiple (M-PCR) con iniciadores específicos de cefamicinas plasmídicas y secuenciación del fragmento amplificado.

Resultados: Las dos cepas eran resistentes a ampicilina, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación incluida la cefoxitina (FOX) y ceftazidima, mientras que se conservaban sensibles frente a la piperacilina-tazobactam, el aztreonam, el cefepime y el imipenem (IMI) presentando una sensibilidad disminuida a amoxicilina-clavulánico. En el antibiograma destacaba la presencia de inducción de R por parte de FOX e IMI que recordaba el perfil habitual de las cepas con AmpC cro-

mosómica inducible. Los test diferenciales descartaron la presencia de una BLEE. La M-PCR para cefamicinas amplificaba un fragmento compatible con la familia DHA. El IEF y la secuenciación del fragmento amplificado confirmaron que se trataba de *bla*_{DHA-1} en ambos casos.

Conclusiones: En la actualidad DHA-1 ha sido descrita en *Salmonella* y *Klebsiella* y recientemente en una cepa de *P. mirabilis* en Corea y otra de *E. coli* en China. Sólo tenemos conocimiento de la detección previa en España de una cepa de *K. pneumoniae* con DHA-1 (B. Mirelis, F. Navarro y E. Miró; comunicación personal) Aunque en la actualidad estas cepas parecen ser excepcionales cabe estar atentos a la posible difusión de este tipo de resistencia en nuestro país.

563

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD IN VITRO DE ERTAPENEM FRENTE A OTROS ANTIMICROBIANOS EN AISLADOS PROCEDENTES DE INFECCIONES ABDOMINALES ADQUIRIDAS EN LA COMUNIDAD

M. Linares, T. Marco, J. Sanz, C. López, A. Cabanas, A. Cuadrado, M. Muñoz y P. Mendaza

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid.

Introducción: Aproximadamente el 80% de las infecciones intraabdominales son origen comunitario. Los patógenos más frecuentes proceden de la flora endógena intestinal o del tracto genitourinario. Las bases del tratamiento de la infección abdominal son la cirugía combinada con medidas de soporte y un inicio precoz de la terapia antiinfecciosa. La elección de un tratamiento antibiótico empírico adecuado condicionará en gran medida el pronóstico del paciente y debe realizarse de acuerdo a un amplio espectro bactericida que incluya tanto microorganismos aerobios como anaerobios y a una baja toxicidad.

Objetivos: Se estudió la actividad in vitro de ertapenem frente a microorganismos aislados procedentes de infecciones abdominales comunitarias comparándolo con los principales antibióticos empleados empíricamente (amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefotaxima, cefoxitina, ceftriaxona e imipenem).

Material y métodos: Se incluyeron muestras abdominales de 56 pacientes procedentes del Servicio de Cirugía con criterios de infección abdominal de adquisición comunitaria (Peritonitis bacteriana secundaria sin factores de riesgo asociados ni tratamiento antibiótico previo) El diagnóstico microbiológico se basó en el cultivo del exudado peritoneal o del pus de las colecciones supuradas obtenidas en la laparotomía o por punción percutánea siguiendo procedimientos estandarizados.

Resultados: Se aislaron 66 microorganismos aerobios (64 pertenecían a la familia *enterobacteriaceae*; que incluían 29 *E. coli*, 10 *Klebsiella* spp, 5 *Enterobacter* spp, 9 *Proteus* spp, 6 *Morganella morganii*, 2 *Citrobacter* spp, 2 *Serratia marcescens*, 1 *Providencia stuartii*; 1 *enterococcus faecalis* y 1 *staphylococcus epidermidis*) y 6 microorganismos anaerobios (1 *Clostridium* spp y 5 *Bacteroides* del grupo *fragilis*). El ertapenem fue el antibiótico más activo frente a enterobacterias (CMI90 \leq 0,5 μ g/ml), particularmente frente a cepas productoras de betalactamasas de amplio espectro y cromosómicas de tipo AmpC. Mostró igualmente un amplio espectro de actividad frente anaerobios aunque frente a enterococos y estafilococos metilicín resistentes fue poco efectivo (CMI90 \geq 16 μ g/ml).

Conclusiones: La gran actividad in vitro del ertapenem frente a la mayoría de los patógenos bacterianos aislados en infecciones abdominales comunitarias apoyaría su utilidad. Además ha demostrado tener una potente actividad in vitro frente a microorganismos entéricos productores de BLEA y/o betalactamasas de tipo AmpC. Si la incidencia en la comunidad de microorganismos entéricos gramnegativos productores de BLEA y/o betalactamasas del tipo AmpC sigue aumentando ertapenem puede ser una opción adecuada para evitar la combinación de antibióticos o el fracaso terapéutico.

564

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE SISTEMAS DE EXPULSIÓN ACTIVA Y PORINAS ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A QUINOLONAS EN DOS CEPAS ISOGÉNICAS DE *ESCHERICHIA COLI*

J. Sánchez Céspedes¹, A. Fabregas¹, M. M. Tavio², D. Bellido³, E. Oliveira³ y J. Vila¹

¹Departamento de Microbiología, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona. ²Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas. ³Parc Científic, Universidad de Barcelona, Barcelona.

Introducción y objetivos: Los mecanismos de expulsión activa se han convertido en elementos clave para entender la resistencia a quinolonas en *E. coli*. El objetivo de este trabajo fue investigar los cambios en la expresión de sistemas de expulsión activa y porinas asociados con resistencia a fluoroquinolonas en dos cepas isogénicas de *E. coli*.

Materiales y métodos: Se utilizó una cepa clínica de *E. coli* susceptible a fluoroquinolonas (cepa PS5), con una CMI a norfloxacin de 0,5 μ g/mL. Esta cepa fue sometida a concentraciones crecientes de norfloxacin hasta obtener un aislado (NorE5) con una CMI a norfloxacin de 32 μ g/mL. Se estudiaron las mutaciones en la región RDRQ de los genes *gyrA* y *parC*. La expresión génica de las dos cepas fue analizada mediante la utilización de microarrays de ADN para *E. coli* así como mediante comparación de extractos proteicos tanto totales como de membrana externa utilizando electroforesis en geles bidimensionales. Además se comprobó la sobreexpresión de los genes *acrA*, *acrB* y *yceE* mediante RT-PCR.

Resultados: Ambas cepas presentaban una mutación en el codón de la Ser-83 del gen *gyrA* (Ser-83 a Leu), pero además, la cepa NorE5 presentaba una segunda mutación en el codón de la Ser-80 del gen *parC* (Ser-80 a Arg). Mediante microarrays de ADN se encontraron 28 genes que presentaba una expresión incrementada y 7 genes con una expresión disminuida en NorE5 con respecto a PS5. Entre los genes con expresión incrementada se encontraban *acrA*, *acrB* y *yceE* (homólogo al gen *pmrA*, sistema de expulsión activa descrito en *Streptococcus pneumoniae*). Entre los genes con una expresión disminuida encontramos *ompF*. Por otro lado, la comparación de extractos proteicos mediante electroforesis en geles bidimensionales puso de manifiesto múltiples diferencias en cuanto al grado de expresión de diferentes proteínas. Entre estas proteínas se identificaron la porina OmpF (disminuye su expresión en NorE5) y TolC (aumenta su expresión en NorE5), proteína constituyente de la bomba de expulsión AcrAB-TolC. La sobreexpresión de *acrA*, *acrB* y *yceE* en NorE5 fue corroborada mediante RT-PCR.

Conclusión: Las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* juegan un papel determinante en la resistencia a quinolonas, pero además otras proteínas como OmpF, disminuyendo la permeabilidad celular a los antibióticos, o los sistemas de expulsión activa AcrAB-TolC y YceE, expulsando del interior celular al agente antibacteriano, pueden influir en el nivel final de esta resistencia.

565

FRECUENCIAS DE MUTACIÓN DE *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* AISLADAS DE PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA

M.C. Turrientes¹, M.R. Baquero², J.C. Galán¹, S. Valdezate³, R. Cantón¹, E. Escudero¹, J.L. Martínez⁴ y F. Baquero¹

¹Hospital Universitario Ramón y Cajal, ²Universidad Alfonso X el Sabio, ³Instituto de Salud Carlos III, ⁴Centro Nacional de Biotecnología. Madrid.

Objetivo: Determinar si la terapia antibiótica intensiva de los pacientes con fibrosis quística (FQ) puede inducir la selección de cepas hipermutadoras de *Stenotrophomonas maltophilia*. Analizar y comparar las frecuencias de mutación (*f*)

de cepas clínicas de *S. maltophilia* procedentes de pacientes con FQ, sin FQ y cepas ambientales.

Material y métodos: Se estudiaron 180 cepas de *S. maltophilia*: 52 cepas de 13 pacientes con FQ, 68 cepas de pacientes sin FQ, y 60 cepas ambientales. La clonalidad de las cepas se determinó por PFGE. Las *f* se obtuvieron al determinar la proporción de colonias resistentes a rifampicina (300 µg/ml) a las 48 horas respecto al recuento total de células viables.

Resultados: Las frecuencias de mutación se agruparon en cuatro categorías: baja ($f \leq 8 \times 10^{-9}$), media ($8 \times 10^{-9} \leq f \leq 4 \times 10^{-8}$), incrementada ($4 \times 10^{-8} \leq f \leq 4 \times 10^{-7}$) y alta ($f \geq 4 \times 10^{-7}$). La distribución fue la siguiente: a) Cepas ambientales: 58% con *f* baja, 37% con *f* media y 5% con *f* incrementada; b) Cepas clínicas: 35% con *f* baja, 42% con *f* media y 17% con *f* incrementada. No se encontró ningún aislado con *f* alta en las cepas ambientales pero sí fueron detectados 8 aislados hipermutadores (6 de un mismo paciente con FQ, todos pertenecientes al mismo pulsotipo) en las cepas clínicas.

Conclusiones: Las cepas ambientales tienen valores menores de *f* que las cepas clínicas, pero no se encuentran diferencias significativas entre las cepas clínicas de pacientes con FQ y sin FQ. La adaptación de *S. maltophilia* desde el ambiente al epitelio humano podría favorecer la aparición de organismos con mayores frecuencias de mutación, aunque la naturaleza transitoria y la baja densidad de colonización de *S. maltophilia* en pacientes con FQ dificultaría el aumento de estas poblaciones hipermutadoras a pesar del uso masivo de antibióticos. Por otro lado *S. maltophilia* es intrínsecamente resistente a muchos antibióticos por mecanismos que no implican mutación. Si la adaptación no es debida a mutación entonces no existe ninguna ventaja selectiva para las cepas hipermutadoras.

566

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *PSEUDOMONAS* PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS EN DOS HOSPITALES DE MALLORCA: DESCRIPCIÓN DE LA NUEVA ENZIMA VIM-13

O. Gutiérrez¹, M. Garau², C. Gallegos², J.L. Pérez¹ y A. Oliver¹
Servicios de Microbiología, ¹H. Son Dureta, ²H. Son Llatzer, Palma de Mallorca.

Objetivo: Caracterizar las cepas de *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas detectadas en dos hospitales de Mallorca [Son Dureta (HSD) y Son Llatzer (HSL)] entre julio de 2004 y diciembre de 2005.

Métodos: La identificación y estudio preliminar de la sensibilidad se realizó con los sistemas WIDER o VITEK. Se utilizó el Etest MBL (imipenem ± EDTA) como técnica de cribado para la detección de metalo-β-lactamasas. Se determinaron las CMI a ticarcilina, piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, amikacina y ciprofloxacino por Etest. La relación clonal se determinó por electroforesis de campo pulsado (PFGE). La caracterización de los genes implicados se realizó mediante PCR usando cebadores específicos para IMP-1, IMP-2, VIM-1 y VIM-2, seguida de secuenciación.

Resultados: En julio de 2004 se detectó el primer caso de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasa en HSL. En el 2005 se documentaron cinco casos más, otro en el HSL y 4 en el HSD. Tres de los casos se detectaron en pacientes ingresados en Hematología, dos en UCI y uno en Nefrología. Dos de las cepas se aislaron de úlceras dérmicas, dos de líquidos peritoneales y dos de secreciones respiratorias. Cinco de las cepas se identificaron como *P. aeruginosa* y una como *P. putida*. Todas presentaron resistencia cruzada a gentamicina y tobramicina y todas las *P. aeruginosa*, además, a ciprofloxacino. La sensibilidad fue más variable a amikacina (rango CMI 3- > 256 µg/ml) y a aztreonam (rango CMI 3-24 µg/ml). La PCR fue positiva para VIM-2 en cinco cepas, confirmando por secuenciación la producción de esta β-lactamasa. En la sexta, la PCR fue positiva para VIM-1, pero mediante se-

cuenciación se identificó una nueva carbapenemasa (VIM-13). Los porcentajes de identidad de VIM-13 respecto a VIM-1 y VIM-2 fueron del 93 y 88%, respectivamente. Mediante PFGE se determinó que 2 de los 6 aislamientos pertenecían al mismo clon, ambos detectados en pacientes del Servicio de Hematología de HSD.

Conclusiones: El aislamiento de cepas de *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas es un problema emergente. Las implicaciones terapéuticas y epidemiológicas asociadas con estas cepas multirresistentes hace recomendable establecer medidas de vigilancia activa para su detección y posterior aislamiento de los pacientes afectados.

567

ESTUDIO DE LOS AMINOÁCIDOS IMPLICADOS EN LA HIDRÓLISIS DE CEFOXITINA (FX) Y CEFTAZIDIMA (TZ) EN LA β-LACTAMASA DE CLASE C, FOX-4

S. Mallo*, M. Cartelle, F.J. Pérez-Llarena, R. Villanueva y G. Bou

Servicio Microbiología. C. H. U. Juan Canalejo, La Coruña.

Introducción: Las β-lactamasas plasmídicas clase C han sido principalmente descritas en varias especies de enterobacterias. Estas enzimas confieren un patrón de resistencia antibiótica similar a las AmpC cromosómicas. A partir del enzima FOX-4 (Bou G y col. AAC 2000) aislado en una cepa clínica de *Escherichia coli* nos planteamos como objetivo estudiar los aminoácidos implicados en la hidrólisis de FX y TZ en un enzima de clase C.

Material y métodos: Se realizó mutagénesis aleatoria de este gen siguiendo las instrucciones del kit GeneMorph® II Random Mutagenesis, Stratagene para obtener una tasa de mutación 7-12 nt/1 Kb. La librería obtenida se clonó en pBGS18- de manera dirigida bajo el promotor de la CTX-M-14. Los transformantes obtenidos en *E. coli* TG1 fueron seleccionados por su pérdida de capacidad hidrolítica a determinados antibióticos mediante estudios de sensibilidad con disco-difusión y E-test.

Resultados: Se obtuvieron 392 clones recombinantes en la librería de FOX-4 a partir de mutagénesis aleatorias diferentes. De ellos 2 mostraron disminución en la CMI a diversos antibióticos; 1 clon resultante de 3 experimentos diferentes llamado C1 (con el reemplazamiento respecto a FOX-4, E82K); y otro clon C2 (que mostró las dos mutaciones simultáneas A50V y H207R). Las CMI (mg/L) para *E. coli* TG1 con los plásmidos FOX-4 (control positivo) /C1/ C2 y pBGS18-pCTXM14 (control negativo) fueron respectivamente: amoxicilina > 256/32/8/4; cefuroxima > 256/ > 256/24/4; FX > 256/16/12/4; TZ > 256/32/4/0,125; aztreonam 64/2/0,25/0,03; cefotaxime 64/4/0,38/0,03; y cefepima 2/0,094/0,047/0,03.

Conclusiones: 1) Las mutaciones obtenidas disminuyen las CMIs a FX y TZ aunque el efecto es más aparente en el clon C2. 2) Las mutaciones no son específicas ya que se afectan otros antibióticos además de FX y TZ. 3) E82 se encuentra ubicada junto a la hélice H2 de P99 en *Enterobacter cloacae*. 4) Las mutaciones A50V y H207R del clon C2 están situadas entre B2-B2a y formando un lazo entre B2b-H7, respectivamente (referidas a P99). Estudios catalíticos y estructurales se están realizando para confirmar su posición crítica en el funcionamiento de la β-lactamasa FOX-4

568

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA NUEVA β-LACTAMASA AMPC EN *ACINETOBACTER* SPP

A. Beceiro, A. Pérez, F.J. Pérez-Llarena, R. Villanueva y G. Bou
Servicio de Microbiología. CHU Juan Canalejo. La Coruña.

Introducción: Recientemente el genoma de *Acinetobacter* ADP1 ha sido liberado. Mediante análisis informático, la existencia de un gen con posible función cefalosporinasa

(ampC) fue identificado. El objetivo de este trabajo fue caracterizar funcionalmente este gen.

Materiales y métodos: La cepa ADP1 fue usada para la clonación del gen. Datos de secuencia nucleotídica se obtuvieron de Genoscope (www.genoscope.cns.fr). CMI's (E-test) a amoxicilina (AM), amoxicilina-clavulánico (XL), piperacilina (PP), cefalotina (CE), cefoxitina (FX), cefuroxima (XM), cefotaxima (CT), ceftazidima (TZ) e imipenem (IP). Clonación mediante PCR del gen codificante y posterior expresión en *E. coli* TG1. Para los ensayos bioquímicos el enzima fue clonado en el vector p-GEX-6p-1, el cual permite la expresión de una proteína de fusión a GST (Amersham Biotech).

Resultados: La secuencia nucleotídica del gen ampC de ADP1 presenta una homología del 59,7 y 59,2% respecto a los homólogos de *A. baumannii* (Ab) y *A. genoespecie 3* (AG3) previamente caracterizados por nuestro grupo. A nivel aminoacídico las homologías son 48,7 y 49,3%, respectivamente. Presenta con las β -lactamasas cromosómicas de *Ralstonia metallidurans* y *Mycobacterium smegmatis* unas similitudes aminoacídicas del 50 y del 51%. Las CMI's (mg/L) en *E. coli* TG1 portador del gen ampC de ADP1 fueron: AM > 256, XL 16, PP 12, CE > 256, FX 3, XM 24, CT 0,5, TZ 0,75, e IP 0,25. Las tasas de hidrólisis relativas respecto a ampicilina (100%) y con una concentración fija de antibiótico de 100 μ M fueron: AM 100, CE 6395, FX 1.8, XM 0,7, CT 3,3 y IP 1.6. Las IC50 (μ M) fueron: ácido clavulánico 843,3 y sulbactam 13,9 μ M.

Conclusiones: 1) Un nuevo gen ampC ha sido caracterizado en un aislamiento de *Acinetobacter* spp.; 2) Igual que en Ab y AG3, este enzima AmpC muestra un patrón típico de cefalosporinasa, aunque es de destacar la poca homología aminoacídica existente con los otros dos enzimas y en general con el resto de AmpC caracterizados hasta el momento en *Acinetobacter* spp. Siguiendo la reciente clasificación, preliminarmente denominamos a este enzima ADC-8.

Resultados: Seleccionamos 133 aislamientos de *E. coli* y 36 de *K. pneumoniae* con una CMI de ciprofloxacino mayor o igual de 0,125. Las familias de BLEE expresadas por éstos se distribuían de la siguiente manera: 20 cepas de *E. coli* productoras de TEM, 40 de SHV y 73 de CTX-M y 29 cepas de *K. pneumoniae* productoras de TEM y 7 de SHV. En ninguna de estas cepas se detectó mediante PCR la presencia de genes *qnr* en el mismo plásmido en el que se encontraba el gen *bla* o en un plásmido adicional, de ninguna de las dos variantes estudiadas, *qnrA* y *qnrS*.

Conclusiones: La resistencia a quinolonas encontrada en las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE recogidas en el Proyecto GEIH-BLEE 2000 no se debe a mecanismos mediados por los determinantes de resistencia QnrA ni QnrS.

569

DETECCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA PLASMÍDICA A QUINOLONAS QNR EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) PERTENECIENTES AL ESTUDIO MULTICÉNTRICO GEIH-BLEE 2000

J.M. Rodríguez¹, J.R. Hernández¹, L. Martínez-Martínez², M.E. Cano² y A. Pascual¹

¹Dpto. Microbiología, Universidad de Sevilla, Hospital Universitario V. Macarena, Sevilla; ²Dpto. Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Introducción: Recientemente se descubrió en nuestro centro un nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. Algunos autores han encontrado una asociación con la expresión de determinadas betalactamasas, y especialmente BLEEs. El objetivo de este estudio fue detectar la posible presencia de este mecanismo de resistencia en una colección de enterobacterias recogidas en el año 2000.

Material y métodos: El estudio se realizó con cepas de enterobacterias pertenecientes al Proyecto GEIH-BLEE 2000, aisladas en 40 hospitales representativos de la geografía española, que incluían a 170 aislamientos de *E. coli* y 70 de *K. pneumoniae* productores de BLEEs de las familias TEM, SHV y CTX-M. Se seleccionaron aquellas cepas para las cuales la CMI de ciprofloxacino fue mayor o igual 0,125 μ g/ml. Para la detección de los genes *qnrA* y *qnrS* realizamos una PCR con cebadores específicos (*qnrA*1: 5'-GGGTATGGA-TATTATTGATAAAG-3', *qnrA*2: 5'-CTAATCCGGCAGCAC-TATTA-3'; *qnrS*1: 5'-CAATCATACATATCGGCACC-3', *qnrS*2: 5'-AGTTCTTGCTGCCAGGCTGC-3') y posterior detección mediante electroforesis y tinción con bromuro de etidio. Como controles positivos se incluyeron un transconjugante derivado de la cepa *E. coli* J53 resistente a azida que contiene el plásmido pMG252 que codifica QnrA y una cepa de *Enterobacter cloacae* que contiene el gen *qnrS*.