

XIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)

Madrid, 11-14 de mayo de 2008

Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos

0

LA DISEMINACIÓN DE BLA_{CTX-M-14} EN ESPAÑA ESTÁ ASOCIADA A UN PLÁSMIDO EPIDÉMICO DEL COMPLEJO INCI Y A DIFERENTES ENTORNOS GENÉTICOS

A. Valverde, R. Cantón, A. Novais, J.C. Galán, F. Baquero y T.M. Coque

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivo: CTX-M-14 es una de BLEE más prevalentes en España, también descrita en otros países de nuestro entorno. El objetivo fue la caracterización molecular de diferentes aislados españoles productores de CTX-M-14 para comprender su reciente diseminación.

Métodos: Se analizaron 63 aislados de: pacientes (16 hospitalizados/17 no hospitalizados), voluntarios sanos (n = 24) y muestras de alimentos (n = 2) (2000-2005). La clonalidad se estableció por XbaI-PFGE, MLST y asignación de los grupos filogenéticos de *E. coli*. La transferencia de bla_{CTX-M-14} se realizó por conjugación y su localización se determinó por hibridación del ADN genómico digerido con I-CeuI con sondas específicas (rep, bla_{CTX-M-14}, 16S rRNA). La caracterización plasmídica incluyó la determinación del número y tamaño (S1 nucleasa), grupos de incompatibilidad (rep y rep-cop PCR) y comparación de patrones de restricción (RFLP). El entorno genético de bla_{CTX-M-14} se caracterizó mediante búsqueda de secuencias específicas (ISEcp1, ISCR1) y por PCRs solapantes basadas en secuencias conocidas.

Resultados: Los mayoría de aislados fueron de origen comunitario (74,6%), asociados a infecciones urinarias (60,3%). Un 98% de los mismos se identificaron como *E. coli* (no relacionados clonalmente por PFGE), distribuidos en los grupos filogenéticos: A (37%), D (34%), y B1 (29%). Se encontró gran diversidad de ST dentro del filogrupo D, mientras que los aislados del grupo A pertenecían principalmente al complejo clonal ST10 y los del grupo B1 en su mayoría presentaban el alelo fucm41 (complejo clonal ST101). bla_{CTX-M-14} se localizó en plásmidos de 45-330Kb y se transfirió en un 75% de los aislados, siendo mayoritario un plásmido de 80kb del complejo IncI (IncII-K-B/O; secuencia cop-rep idéntica a pR387, prototipo de IncK). bla_{CTX-M-14} se asoció a la estructural-ISEcp1-bla_{CTX-M-14}-delta IS903 (n = 58; 2000-2005) y a un integron de clase 1 (similar a In60) que contenía ISCR1 y

dfrA16-aadA2 en la región 5'cs-3'cs (n = 5; 2000-03), describiéndose en uno de estos último la variante bla_{CTX-M-14}^b recientemente descrita en España y asociada a ISCR1.

Conclusiones: CTX-M-14 se detecta mayoritariamente en *E. coli* causante de infecciones urinarias en la comunidad. Su notable aumento en nuestro entorno se asocia principalmente a la diseminación de un plásmido epidémico del complejo IncI en el que bla_{CTX-M-14} está asociada a ISEcp1 en determinados complejos clonales. La aparición de otros entornos genéticos similares al descrito en bla_{CTX-M-9}, ampliamente diseminados en nuestro país, podrían contribuir a su diseminación y persistencia en el futuro, así como explicar una reciente evolución de bla_{CTX-M-9} a bla_{CTX-M-14}.

1

EFFECTO DE LA AZITROMICINA EN LOS BIOFILMS DE *P. AERUGINOSA*: ACTIVIDAD BACTERICIDA Y DAÑO COLATERAL

M. D. Maciá, X. Mulet, A. Mena, N. Borrell, J. L. Pérez y A. Oliver.

Servicio de Microbiología y Unidad de Investigación. Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, España.

Objetivo: Estudiar el efecto de la hipermutación y la hiperproducción de alginato sobre la actividad bactericida y el desarrollo de resistencia a azitromicina (AZ) en biofilms de *P. aeruginosa*.

Métodos: Se emplearon las cepas PAO1, su mutante mucA (PAOMA) y sus respectivas derivadas hipermutadoras deficientes en mutS (PAOMS y PAOMSA). Los biofilms se formaron incubando las tapas con pinchos en placas microtiter con 2x10⁸ UFC/ml en caldo Müller-Hinton (MHB). Posteriormente, los biofilms se incubaron en MHB con 0, 1, 2, 8, 32, 128, o 512 µg/ml de AZ, durante 0, 1, 2, 4, ó 7 días. A continuación, los biofilms se lavaron, se transfirieron a MHB por centrifugación y se sembraron en agar MH para recuento de viables. Se congelaron 2 colonias por experimento (6 réplicas), cepa, y concentración de AZ procedentes de los biofilms de 7 días. En estas colonias se volvió a evaluar la actividad bactericida de la AZ en los biofilms, se investigó la resistencia cruzada determinando las CMI (Etest) de ciprofloxacino, ceftazidima, cefepima, tobramicina, y colistina, se cuantificó la expresión de bombas de expulsión y se estudiaron las posibles mutaciones en sus genes reguladores.

Resultados: Durante los 2 primeros días AZ mostró actividad bactericida incluso a la concentración más baja (1 µg/ml), en todas las cepas. Sin embargo, al 4º y 7º día de incubación en AZ, en la cepa PAOMS, y especialmente en PAOMSA, se observó un marcado aumento en el número de viables, particularmente a 8 µg/ml, sugiriendo la selección de mutantes resistentes. Se caracterizaron 12 colonias por cepa (PAOMS y PAOMSA) de los experimentos de 7 días-AZ 8 µg/ml. La acti-

vidad bactericida de AZ fue significativamente inferior en la mayoría de estas colonias; tras 24 h de incubación en AZ 8 µg/ml, la carga bacteriana en el biofilm aumentó 1-2 log respecto a las cepas parentales. Diez de 12 y 6 de 12 colonias de PAOMS y PAOMSA, respectivamente, fueron resistentes a ciprofloxacino y cefepima, mostrando todas ellas hiperexpresión de MexCD-OprJ y mutaciones en el gen *nfxB*.

Conclusión: Aunque AZ muestra actividad bactericida frente a los biofilms de *P. aeruginosa*, selecciona mutantes resistentes, especialmente en las cepas hipermutadoras. Más aún, los mutantes seleccionados presentan, frecuentemente, resistencia cruzada a otros antibióticos importantes no relacionados. Por lo tanto, se debería monitorizar el impacto del tratamiento de mantenimiento con AZ en la fibrosis quística.

2

PAPEL DE LA MULTIPLICIDAD DE GENES AMPD EN LA PREVENCIÓN DEL COSTE BIOLÓGICO MEDIADO POR LA HIPERPRODUCCIÓN DE AMPC EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

B. Moya¹, C. Juan¹, S. Alberti², J.L. Pérez¹ y A. Oliver¹

¹Servicio de Microbiología y Unidad de Investigación,

²Área de Microbiología. Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca. ³Área de Microbiología, Universidad de las Islas Baleares. Palma de Mallorca.

Introducción: *P. aeruginosa*, al contrario que *Enterobacteriaceae*, tiene 2 genes *ampD* adicionales (*ampDh2* y *ampDh3*). Estos genes actúan como represores de la β-lactamasa AmpC y participan en el reciclaje del peptidoglicano. La presencia de los genes *ampD* adicionales determina el fenotipo de desrepresión parcial de AmpC con resistencia moderada a β-lactámicos, que es característico de *P. aeruginosa* y está producido por la inactivación de AmpD. Por otro lado, la inactivación simultánea de los tres genes *ampD* conduce a la desrepresión total de AmpC, con niveles de expresión de *ampC* >1.000 veces superiores a la cepa wild-type y alto nivel de resistencia a β-lactámicos. El objetivo de este trabajo fue determinar el sentido biológico de la multiplicidad de genes *ampD* en *P. aeruginosa*, mediante experimentos de competición in vivo e in vitro.

Métodos: Se utilizaron las cepas PAO1, los 3 mutantes simples en los genes *ampD* (PAAD, PAADh2 y PAADDh3), los mutantes dobles PAADDh2 y PAADDh3 y el mutante triple PAADDh2Dh3. Así mismo, se construyeron en este trabajo los correspondientes mutantes en *ampC*. Se realizaron 8 experimentos de competición in vitro (caldo LB, 20 generaciones) e in vivo (recuentos en bazo 24 h después de inoculación intraperitoneal) para cada uno de los mutantes. Los experimentos se iniciaron con mezclas 1:1, determinándose después los índices de competición (IC), definidos como el recuento de la cepa mutante/ recuento cepa wild-type.

Resultados: Ninguno de los 3 mutantes simples en los genes *ampD* presentó coste biológico alguno ni in vitro ni in vivo. Por el contrario, el mutante triple presentó una competitividad reducida in vitro (IC = 0,25), debido exclusivamente a la desrepresión de *ampC*, ya que la inactivación de este gen revertió completamente el efecto. Así mismo, el mutante triple (en menor medida también los dobles) presentó un marcado coste biológico in vivo (IC ≤ 0,01). En este caso, el coste biológico sólo dependió parcialmente de la desrepresión de *ampC*, siendo directamente la inactivación de los tres genes *ampD* (y por tanto presumiblemente el bloqueo del reciclaje del péptidoglicano y la acumulación de muropeptidos) el principal responsable de la reducida competitividad in vivo.

Conclusión: La presencia de múltiples genes *ampD* le confiere a *P. aeruginosa* la capacidad de adquirir resistencia moderada a β-lactámicos y evitar a la vez el marcado coste biológico de la desrepresión total de AmpC y el bloqueo del reciclaje del peptidoglicano.

3

UN NUEVO GEN QNR CROMOSÓMICO, QNRM, DE *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*, PROPORCIONA RESISTENCIA A QUINOLONAS EN *ESCHERICHIA COLI*

M.B. Sánchez¹, A. Hernández¹, J.M. Rodríguez-Martínez², L. Martínez-Martínez³ y J.L. Martínez¹

¹Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. ²Departamento de Microbiología (Universidad de Sevilla) y Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena.

³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

Stenotrophomonas maltophilia es un patógeno oportunista intrínsecamente resistente a una gran cantidad de antibióticos. El número de aislados hospitalarios de *S. maltophilia* resistentes a quinolonas, ha aumentado en los últimos años. Dicha resistencia no está asociada a mutaciones en los genes codificantes de topoisomerasas, y aunque se ha sugerido que se podría deber a la sobreexpresión de sistemas de bombeo múltiple de drogas, es posible que haya otros elementos implicados en la misma. El descubrimiento de un nuevo determinante de resistencia a quinolonas, *qnr*, nos impulsó a analizar si el genoma de *S. maltophilia* contiene genes de dicha familia.

Objetivo: Identificar la presencia de genes *qnr* en *S. maltophilia* y analizar su capacidad de proporcionar resistencia a quinolonas en un organismo heterólogo (*E. coli* KZM120). Materiales y Métodos: Se buscó la presencia de genes homólogos a las *qnr* conocidas en los genomas secuenciados de *S. maltophilia* y se amplificaron por PCR las secuencias correspondientes en cepas clínicas y ambientales de esta especie bacteriana. Las diferentes variantes de *qnr* así obtenidas, se clonaron en el vector pGEM-T. Tras secuenciarlas, se analizó el efecto sobre la sensibilidad a quinolonas de dichas variantes. Para ello, se expresaron en la cepa *E. coli* KZM120 (Δ*acrAB*) y se determinaron las CMI de quinolonas por el método de doble dilución. Resultados: Se identificó una secuencia homóloga a genes *qnr* en el genoma de dos cepas de *S. maltophilia* secuenciadas (K279a y R551-3). Mediante PCR, se aisló un gen *qnr*, que denominamos *qnrM*, en *S. maltophilia*. Todas las cepas analizadas, independientemente de su origen, clínico o ambiental, contienen el gen *qnrM*. El estudio de las CMI a quinolonas de la cepa *E. coli* KZM120 conteniendo variantes de *qnrM* muestra que *QnrM* confiere resistencia a distintas fluoroquinolonas. Los niveles de resistencia varían, desde 2 a 8 veces la CMI del control, en función de la secuencia de aminoácidos, y los niveles de expresión de *QnrM*. Esto nos ha permitido sugerir qué aminoácidos son esenciales para su función.

Conclusiones: Se ha identificado un nuevo gen *qnr*, *qnrM*, en *S. maltophilia*. El gen está en todas las estirpes analizadas, indicando que no ha sido adquirido recientemente. La proteína *QnrM* posee una homología del 38%, 57%, 37% y 41% respectivamente con las proteínas *QnrA*, *QnrB*, *QnrS* y *QnrVV* y confiere resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* KZM120. Dado que *QnrM* es funcional en un organismo heterólogo, su integración en un plásmido, podría contribuir a diseminar este nuevo determinante de resistencia entre las bacterias patógenas.

4

DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LA SENSIBILIDAD A AMPICILINA EN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* SEGÚN TRES GENOTIPOS DE RESISTENCIA: PRODUCCIÓN DE BETA-LACTAMASA, MODIFICACIONES EN LA PBP3 Y AMBOS

S. García-Cobos, J. Campos, F. Román, M. Pérez-Vázquez, B. Aracil y J. Oteo

Laboratorio de Antibióticos, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

Objetivos: 1) describir la distribución poblacional de *H. influenzae* según 3 genotipos de resistencia (gBLNAR, gBL-

PAR y doble mecanismo) a ampicilina, por microdilución y E-test en comparación con cepas sensibles; 2) evaluar la ampicilina, amoxicilina y amoxicilina-clavulánico para distinguir la población gBLNAR y gBLPAR de la población sensible; 3) determinar la utilidad de los discos de baja carga de ampicilina y amoxicilina-clavulánico para el screening de cepas gBLNAR.

Material y métodos: Se seleccionaron 94 cepas de *H. influenzae* representativas de cuatro genotipos de sensibilidad a ampicilina: cepas sin mecanismos de resistencia (población sensible) (gBLNAS, n=25); cepas con modificaciones en el gen *ftsI* (que codifica la proteína fijadora de penicilina PBP3) (gBLNAR, n=34); cepas productoras de β -lactamasa (gBLPAR, n=20); y cepas con ambos mecanismos de resistencia (gBLPARC, n=15). La sensibilidad antimicrobiana fue estudiada por microdilución, Epsilon test (E-test) y difusión en disco.

Resultados: Según los puntos de corte del CLSI, el 76,5% de la población gBLNAR fue sensible a ampicilina por microdilución, el 20,6% intermedia y el 2,9% resistente. Con ampicilina, el 100% de las cepas gBLPAR fueron resistentes por microdilución y el 85% (15% intermedias o sensibles) por E-test. La población gBLNAR mostró un rango de CMI's a ampicilina de 0,5 a 4 μ g/ml (con un pico en 1 μ g/ml) por microdilución, y de 0,5 a 2 μ g/ml (con picos en 0,5 y 1 μ g/ml) por E-test. La población gBLPAR tuvo un rango de CMI's a ampicilina de 8 a ≥ 32 μ g/ml (con un pico en ≥ 32 μ g/ml) por microdilución, y de 1 a 32 μ g/ml (con un pico en 8 μ g/ml) por E-test. Entre ambos métodos, la concordancia para la ampicilina en el genotipo gBLPAR fue del 25%. Mediante el análisis de la distribución de los halos de inhibición de los discos de ampicilina (10 y 2 μ g) y amoxicilina-clavulánico (30 y 3 μ g), se observó que la población gBLNAR se distribuía en un rango muy próximo a la población gBLNAS.

Conclusiones: La distribución poblacional de las cepas gBLPAR y gBLNAR en *H. influenzae* varía según el método de estudio (microdilución y E-test). La mayor parte de las cepas gBLNAR en España muestra bajo nivel de resistencia a ampicilina; los puntos de corte actuales del CLSI para ampicilina no separan la población gBLNAR emergente, por lo que es necesario desarrollar nuevos criterios de interpretación.

5

MOX-3, NUEVA AMPC EN AEROMONAS

E. Miró¹, F.J. Castillo³, C. Seral³, A. Arias³, B. Mirelis^{1,2} y F. Navarro^{1,2}

¹Servicio de Microbiología, Hospital de Sant Pau. Barcelona.

²Departamento de Genética y Microbiología, Universitat Autònoma de Barcelona. ³Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario. Zaragoza.

Objetivo: Caracterización del mecanismo de resistencia presente en un aislado de *Aeromonas* sp. que confiere un patrón de resistencia compatible con la adquisición de una betalactamasa AmpC plasmídica.

Material y métodos: Estudio de la sensibilidad mediante la técnica de disco difusión a betalactámicos, aminoglicósidos, quinolonas, sulfamidas, tetraciclina y cloranfenicol. Caracterización del gen de resistencia mediante multiplex PCR para la detección de AmpC derivadas de CMY-1, CMY-2, DHA-1, ACC, MIR y FOX y su posterior secuenciación. Conjugación en medio sólido con la cepa receptora *E. coli* Hb101 Nal^R Az^R, y repitiendo el proceso con las cepas "helpers" *E. coli* T643 Rif^R y *E. coli* pBK Km^R.

Resultados: La cepa de *Aeromonas* sp. procede de un coproductivo de un varón de 59 años con episodio diarreico, febrícula y dolor abdominal, procedente de consultas externas de Digestivo, donde es controlado por padecer una cirrosis hepática no alcohólica con varices esofágicas. No recibió tratamiento antibiótico, pero llevaba 40 días de profilaxis con cotrimoxazol. La cepa presentaba resistencia a

ampicilina, cefazolina, cefoxitina, cefuroxima, amoxicilina/ác. clavulánico (AMC) y ticarcilina / ácido clavulánico, siendo sensible a cefalosporinas de tercera (C3G) y cuarta generación. En el antibiograma por disco difusión pudo observarse antagonismo entre C3G y AMC, así como colonias dentro de los halos de inhibición de ceftazidima, cefotaxima y aztreonam. Por otro lado, la cepa también resultó ser resistente al resto de antimicrobianos estudiados. En la multiplex PCR se obtuvo un amplificado de 520 pb, correspondiente a las cefamicinas derivadas de CMY-1, cuya secuenciación mostró que el fragmento presentaba una homología del 99% (381/382) con la secuencia nucleotídica de la betalactamasa MOX-2, descrita en *Klebsiella pneumoniae* [AJ276453; Raskine et al. (AAC. 2002; 46:2262-2265)]. La amplificación utilizando iniciadores específicos para MOX-2 y posterior secuenciación del gen (1055pb) mostró una homología del 99% (1048/1053) con la secuencia nucleotídica de la betalactamasa MOX-2 anteriormente citada. La secuencia aminoacídica derivada muestra un 98% de homología con MOX-2 (4 aminoácidos de diferencia). Para determinar si se trataba de una cefamicina adquirida, se realizaron trabajos de conjugación bi y triparentales (con plásmidos mobilizables), sin embargo en ningún caso se han obtenido transconjugantes.

Conclusiones: Se describe una nueva betalactamasa de tipo AmpC, MOX-3, en un aislado de *Aeromonas* sp.

6

MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENEMS EN AISLADOS CLÍNICOS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA NO PRODUCTORES DE METALO-B-LACTAMASAS

M.C. Rodríguez, C. Rodríguez-Mirones y L. Martínez-Martínez
Servicio de Microbiología. Hosp. Univ. Marqués Valdecilla, Santander.

Introducción: La resistencia a carbapenems en aislados clínicos de *P. aeruginosa* no productores de metalo- β -lactamasas tiene un origen multifactorial, incluyendo producción de β -lactamasa AmpC, baja expresión de la porina oprD, sobreexpresión de las bombas de expulsión activa. Con objeto de caracterizar los mecanismos de resistencia en los aislados clínicos de *P. aeruginosa* durante el periodo Enero 2004-Diciembre 2006 del Servicio de Microbiología del HUMV se han seleccionado aquellas cepas con sensibilidad intermedia/resistentes (I/R) a imipenem (IMP) y/o meropenem (MPM).

Materiales y métodos: En el periodo de estudio se identificaron 163 aislados con las características indicadas. La identificación y determinación de la sensibilidad de los aislados se realizó con el sistema MicroScan. La CMI de IMP y MPM se determinó también por E-test. Tras estudiar la relación clonal mediante REP-PCR se han seleccionado trece aislados de *P. aeruginosa*, de diferentes pacientes, no productores de metalo- β -lactamasas (multiplex PCR) e incapaces de hidrolizar IMP (espectrofotometría). Los extractos de membrana externa se han separado mediante SDS-PAGE para visualizar OprD. Se ha utilizado PCR en tiempo real para analizar la expresión de las bombas de expulsión MexAB-oprM y MexEF-oprN. Se ha considerado que hay sobreexpresión cuando el nivel de mRNA de mexB o mexF era cuatro veces mayor que en la cepa PAO-1. En las 13 cepas se ha estudiado la presencia de mutaciones en los genes reguladores mexR, nalC, nalD, mexT y mexZ, y en el gen estructural oprD. La actividad β -lactamasa se ha analizado determinando la hidrólisis de cefalotina.

Resultados: El gen oprD ha sido amplificado mediante PCR en nueve de los aislados; en los cuatro restantes no se obtuvo amplicón. Ocho aislados presentaron mutaciones en el marco de lectura, que daban lugar a proteínas truncadas. Otro aislado codificaba un transcrito completo con una mutación en el asa 7 de OprD. En cinco de las cepas se observó hipereexpresión de AmpC. En dos aislados con CMI para

MPM > IMP se observó sobreexpresión de la bomba MexAB-oprM (13 y 44 veces más que en PAO1) y una mutación en el represor mexR.

Conclusiones: La resistencia a carbapenems en los aislados estudiados se relaciona en todos ellos con la pérdida o la alteración estructural de OprD, asociada a la expresión basal o a la hiperproducción de AmpC. La mayor resistencia a MPM que a IMP se relaciona con una sobreexpresión de MexAB-OprM. No se ha detectado hiperexpresión de MexEF-oprN.

7

DESARROLLO DE RESISTENCIA A CARBAPENEMAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *ESCHERICHIA COLI* DURANTE EL TRATAMIENTO

J. Oteo¹, A. Delgado-Iribarren², D. Vega³, V. Bautista¹, M.C. Rodríguez⁴, M. Velasco², J.M. Saavedra³, M. Pérez-Vázquez¹, S. García-Cobos¹, L. Martínez-Martínez⁴ y J. Campos¹

¹Laboratorio de antibióticos, Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. ²Servicio de Microbiología, Fundación Hospital de Alorcón, Alorcón, Madrid. ³Servicio de Microbiología, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva. ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Marqués de Valdecilla, Santander.

Objetivos: Estudiar la epidemiología molecular y los mecanismos de resistencia implicados en la resistencia a carbapenemas (CBP) desarrollada por dos cepas clínicas de *Escherichia coli* durante el tratamiento con esta familia de antibióticos.

Material y métodos: Se aislaron tres cepas consecutivas de un mismo paciente, la primera fue sensible a CBP, la segunda, aislada durante tratamiento con ertapenem, fue resistente a CBP, y la tercera fue de nuevo sensible. Otro aislamiento clínico resistente a CBP se aisló de un paciente tratado con imipenem. La epidemiología molecular se estudió por electroforesis en campo pulsado (PFGE) tras digestión con XbaI. Se evaluó la presencia de genes que codifican carbapenemasas, β -lactamasas de espectro extendido y β -lactamasas plasmídicas del tipo AmpC mediante la amplificación y, en su caso, secuenciación con iniciadores específicos. También se amplificaron y secuenciaron los genes ompF y ompC que codifican las correspondientes porinas. Los perfiles de las OMPs se estudiaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con docecil sulfato de sodio.

Resultados: De los tres aislamientos pertenecientes al mismo paciente, el análisis mediante PFGE mostró que los dos sensibles a CBP eran idénticos mientras que la cepa resistente sólo presentaba una banda de diferencia. En las dos cepas resistentes a CBP se observó la ausencia de las dos principales proteínas de membrana OmpF y OmpC, tanto genotípica como fenotípicamente. Además, una de las cepas expresaba una AmpC plasmídica, la CMY-2, y la otra una BLEE del tipo CTX-M no descrita hasta la fecha, CTX-M-67.

Conclusiones: La resistencia a CBP en este estudio se asoció a la pérdida de la expresión de las porinas OmpC y OmpF asociada a la producción de la AmpC plasmídica CMY-2 o de la BLEE CTX-M-67.

8

MECANISMOS ASOCIADOS A LA REDUCCIÓN EN LA SENSIBILIDAD A TIGECICLINA (TGC) EN UNA CEPA CLÍNICA DE *ESCHERICHIA COLI* PORTADORA DE UNA BETA-LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

A. Pérez*, M.J. Barba, A. Fernández, M. Poza, A. Beceiro, C. Gayoso, M.D. Sousa, R. Villanueva y G. Bou
Servicio de Microbiología-Unidad Enfermedades Infecciosas, Hospital Juan Canalejo, La Coruña.

Introducción: La TGC presenta una alta actividad frente a bacterias gram negativas independientemente de la presen-

cia de BLEE. En nuestro hospital, se aisló una cepa de *E. coli* (Ec#3) de un exudado de herida, de un paciente previamente tratado con antibióticos de amplio espectro, que presenta una sensibilidad reducida a la TGC (CMI=1,5 mg/L). Nos planteamos como objetivo estudiar el mecanismo implicado en la reducción a la sensibilidad a TGC, hecho por otro lado, muy poco frecuente en los microorganismos aislados en la práctica clínica diaria.

Material y métodos: Se realizó un análisis de sensibilidad a diferentes antibióticos en presencia y ausencia de phenylalanine arginine β -naphthylamide (PA β N) 30 μ g/ml mediante E-test y difusión en disco (DD). Se analizó la presencia de BLEE mediante isoelectroenfoque y técnicas de PCR. El nivel de expresión de ompC, ompF y acrA de Ec#3 se ha medido por triplicado mediante RT-PCR a tiempo real con oligonucleótidos específicos. Se normalizaron los valores de expresión frente al gen de referencia gap.

Resultados: La cepa Ec#3 presentó los siguientes valores de CMI (mg/L) frente a distintos antibióticos: Amoxicilina-clavulánico 64; cefotaxima > 256; ceftazidima 1,5; aztreonam > 256; imipenem 0,38; cloranfenicol > 256; tetraciclina > 256; ciprofloxacino > 32; tobramicina 16; amikacina 1; trimetropin-sulfametoxazol > 32 y TGC 1,5. Mediante PCR se observó que Ec#3 expresaba una BLEE del tipo CTX-M grupo 9. CMIs (mg/L) de Ec#3 (-/+PA β N) fueron las siguientes: eritromicina > 256/ 24; clindamicina > 256/32; tetraciclina > 256/96 y TGC 1,5/0,38 respectivamente. Mediante DD, rifampicina 0/25 mm y telitromicina 0/19 mm, respectivamente. El nivel de expresión relativa de los genes acrA, ompC y ompF de Ec#3 respecto a un *E. coli* (C1) con CMI a TGC de 0,19 mg/L, fueron las siguientes: 3,14 $\pm$ 0,08; 0,066 $\pm$ 0,032 y 0,21 $\pm$ 0,07 para acrA, ompC y ompF, respectivamente.

Conclusiones: La cepa clínica Ec#3 con sensibilidad reducida a TGC presenta una expresión elevada de acrAB, así como una reducción en la expresión de las porinas OmpC y OmpF. Estos resultados sugieren que la hiperexpresión de la bomba de expulsión AcrAB-TolC asociada con una reducción en la permeabilidad podrían estar implicados en la reducción en la sensibilidad a TGC en *E. coli*.

9

ESCHERICHIA COLI RESISTENTES A QUINOLONAS Y COTRIMOXAZOL NO PRODUCTORES DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN UNA UNIDAD NEONATAL

B. Ruiz del Castillo¹, C. García De la fuente¹, J. Agüero¹, J. Oteo², J. Gómez-Ullate¹, C. Carrera² y L. Martínez-Martínez¹
¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Santander, Cantabria. ²Servicio de Microbiología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

Objetivos: Caracterizar genéticamente los *E. coli* multiresistentes no productores de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aislados en pacientes de una unidad Neonatal.

Material y métodos: Se han estudiado los aislamientos de *E. coli* (uno por paciente) de la Unidad de Neonatología de nuestro centro aislados entre Enero 05 y Mayo 06), resistentes a al menos tres de los siguientes antimicrobianos: amoxicilina (AMX), amoxicilina-clavulánico (AMC), gentamicina/tobramicina, ácido nalidixico y cotrimoxazol (STX). Estos dos últimos se incluyeron como marcadores de resistencia, aunque no se usan en la unidad considerada. La identificación de los aislados se realizó con el sistema MicroScan WalkAway. La sensibilidad a los antimicrobianos y la no producción de BLEE se determinaron por microdilución estandarizada (CLSI). La relación clonal fue evaluada por REP-PCR. Los grupos filogenéticos fueron determinados por triplex PCR. En los 18 aislados se realizó análisis plasmídico y detección de los genes de integrasas intI1 e in-

tI2. En 11 aislados, representativos de los patrones de PCR y de sensibilidad a los antimicrobianos, se estudiaron las mutaciones en los genes de las topoisomerasas (*gyrA*, *parC*) y se detectaron 18 determinantes genéticos de virulencia: *traT*, *ibeA*, *cnf1*, *fyuA*, *iutA*, *focG*, *sfaS*, operon *sfa/foc*, *bma*, *gaf*, *afa/dra*, *fimH*, *iroN*, *PAI*, *kpsMTII*, *kpsMTIII*, *kpsMTK1* y *kpsMTK5*.

Resultados: Se han identificado 18 aislamientos resistentes a AMX, NAL, EN y (excepto en un caso) SXT. Se observaron tres patrones de REP-PCR: I, II y III que incluían 4, 9 y 5 aislados, respectivamente. Los aislados correspondientes a los patrones I y III pertenecían al grupo filogenético D y los del patrón II al grupo B2. La CMI (mg/L) de ciprofloxacino fue de 8-64 (patrones I y II) y de 1-2 (patrón III). Se detectaron los siguientes cambios en las topoisomerasas: patrón REP-PCR I: S83L y D87N (*GyrA*) y S80I (*ParC*); patrón REP-PCR II: S83L y D87N (*GyrA*) y S80I mas E84V (*ParC*); patrón REP-PCR III: S83L (*GyrA*) y G78C (*ParC*). Los 18 aislados contenían plásmidos de gran tamaño (> 60kb). En los aislados con patrones de REP-PCR I y III se detectaron respectivamente *intI1* e *intI2*. Los 11 aislados estudiados expresaban los genes de virulencia *iutA* y *fimH*. En 2 de los 3 aislados del patrón I estudiados se detectó *ibeA*. En los 4 aislados del patrón II analizados se detectaron *fyuA*, *PAI*, *kpsMTII*, *kpsMTK5* y en 2 de ellos, además, *traT*. En los 4 aislados del patrón III estudiados se detectaron *traT*, *iroN* y *fyuA*.

Conclusiones: Hemos detectado *E. coli* de los grupos filogenéticos B2 y D resistentes a quinolonas y cotrimoxazol en neonatos de una unidad en la que no se usan estos dos antimicrobianos. Las cepas corresponden a tres grupos clonales con variabilidad en su contenido de genes de virulencia.

10

DESARROLLO DE RESISTENCIA A LINEZOLID IN-VITRO EN AISLADOS CLÍNICOS DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* RESISTENTES A VANCOMICINA

M. Romo, P. Goicoechea, L. Martínez- Martínez y M.V. Francia

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Cantabria.

Introducción/Objetivo: Los enterococos resistentes a glucopéptidos (ERG) son un problema emergente en Europa como causa importante de infecciones nosocomiales. Uno de los antimicrobianos activos frente a ERG es el linezolid; sin embargo se han descrito ocasionalmente resistencias en pacientes durante el tratamiento con este antimicrobiano. El objetivo de este estudio es evaluar la capacidad de desarrollo de resistencia a linezolid in-vitro en aislados clínicos de *Enterococcus faecium* resistentes a glucopéptidos procedentes de un brote nosocomial ocurrido en nuestro hospital, y determinar las causas genéticas de esa resistencia.

Material y métodos: Se seleccionaron ocho aislados clínicos de *E. faecium* resistentes a vancomicina pertenecientes a los tres clones epidémicos que formaron parte del brote nosocomial, inicialmente sensibles a linezolid (CMI ≤ 2 mg/l), y se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de linezolid de 2 mg/l a 64 mg/l. Se seleccionó un mutante resistente a linezolid por placa, y la resistencia a linezolid de los mutantes de confirmó por Etest. De estos mutantes se extrajo el ADN total y se amplificó un fragmento de 671 pb de la región V del gen que codifica el ARN ribosómico 23S. Los productos amplificados se secuenciaron para determinar la presencia de mutaciones que pudieran causar la resistencia a linezolid.

Resultados: Todos los aislados examinados desarrollaron resistencia a linezolid, mostrando crecimiento a concentraciones de linezolid de hasta 64 mg/l. El valor de la CMI de los mutantes determinado por Etest varió entre 64 y 256 mg/l. La comparación de las secuencias de las regiones V del 23S

ADNr indicó la presencia de una mutación puntual de G a T en la posición 2576. Mediante el cromatograma de los productos secuenciados se observó una relación entre el número de copias mutadas del gen 23S y el aumento de la CMI de linezolid.

Conclusión: En todos los aislados clínicos de ERG examinados pudimos observar la selección de mutantes resistentes a linezolid en presencia de concentraciones crecientes de este antimicrobiano. Como causa genética de la resistencia a linezolid en nuestros aislados se identificó la mutación puntual G2576T.

11

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, GENOTÍPICA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS Y TETRACICLINA DE CEPAS INVASIVAS Y NO INVASIVAS DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* AISLADAS EN ESPAÑA (1994-2006)

V. Rubio, D. Álvarez, S. Valdezate, A.M. Navarro, M.J. Medina y J.A. Sáez-Nieto

Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología (CNM). Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda (Madrid).

Introducción: En los últimos 30 años se ha producido un aumento de las infecciones producidas por *S. pyogenes*, incrementándose la incidencia de infecciones invasivas graves y cuadros clínicos reemergentes como la escarlatina y fiebre reumática. También se ha detectado una elevada tasa de resistencia a macrólidos.

Objetivos:

- Analizar fenotípica y genotípicamente cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina y/o tetraciclina aisladas en España entre 1994 y 2006 procedentes de 75 laboratorios.
- Estudiar los principales mecanismos de resistencia y los genes implicados, así como su posible clonalidad mediante PFGE.

Material y métodos: Se analizaron 900 cepas de *S. pyogenes* recibidas en el CNM y se seleccionaron las resistentes a eritromicina y/o tetraciclina mediante E-test. Se estudió la distribución de serotipos (tipo T), genes *emm* (proteína M), perfiles de PFGE y la susceptibilidad (E-test) frente a otros antibióticos: penicilina, vancomicina, clindamicina y rifampicina.

Se estudió el fenotipo de resistencia a macrólidos: M, MLSb c o MLSb i, por el método de difusión en disco. Los genes de resistencia a macrólidos: *erm*(B), *erm*(TR), *mef*(A/E) y *msr*(D) y tetraciclina: *tet*(M) y *tet*(O), se detectaron mediante PCR.

Resultados: De las 900 cepas estudiadas, 274 fueron resistentes a eritromicina, 43 a tetraciclina y 18 a eritromicina+tetraciclina. Por tanto, el 32,4% de *S. pyogenes* fueron resistentes a macrólidos, destacando los serotipos *emm*4T4, *emm*75T25, *emm*28T28, *emm*6T6 y *emm*12T12. El 100% de las cepas *emm*75T25 fueron resistentes a eritromicina y el 83,3% de los *emm*4T4.

El 77,8% de las cepas resistentes a eritromicina fueron no digeribles con SmaI. El fenotipo M (77,7%) fue mayoritario frente a MLSb c (19,6%) y MLSb i (2,7%). Los genes *msr*(D) y *mef*(A/E) se detectaron con mayor frecuencia, siendo la combinación de genes *msr*(D)+*mef*(A/E) mayoritaria.

En el caso de tetraciclina, el 6,8% de *S. pyogenes* fueron resistentes, destacando los serotipos *emm*77T28 y *emm*11T11. El 100% de las cepas *emm*77T28 fueron resistentes a tetraciclina y el 50% de *emm*11T11. El 42,6% de las cepas presentaron *tet*(M)+*tet*(O), el 37,7% *tet*(M) y el 18% *tet*(O).

Conclusiones: Las cepas *S. pyogenes* españolas presentan una elevada resistencia a macrólidos mediada principalmente por bomba de flujo (fenotipo M). Se pueden asociar determinados clones con la resistencia a macrólidos y tetraciclina, individual o conjuntamente.

12

ASOCIACIÓN ENTRE HETERORRESISTENCIA A CARBAPENEMS EN ACINETOBACTER BAUMANNII, PRODUCCIÓN DE BETA-LACTAMASAS (AMP C Y OXACILINASAS) Y SECUENCIAS DE INSERCIÓN TIPO ISABA

F. Fernández¹, M. Gómez¹, P. Egea¹, J. Vila² y A. Pascual¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena y Facultad de Medicina. Sevilla ²Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

Objetivos: Determinar si la heterorresistencia (HR) a carbapenems (CP) en A. baumannii (Ab) se asocia con algún perfil particular de producción de beta-lactamasas (AmpC y oxacilinasas) y secuencias de inserción de tipo ISAb.

Material y métodos: Se incluyen 30 aislados clínicos de A. baumannii (Febrero de 2006 hasta Febrero de 2007) con las siguientes CMI (mg/L) de imipenem (IMP) determinadas con el sistema Wider I: <=1 (n=4), 2 (n=6), 4 (n=16) ó >=8 (n=4). La identificación se realizó con el sistema Wider I y el crecimiento a 44°C. Las CMI de IMP se confirmaron mediante microdilución (MD; CLSI). La HR a CP se determinó en agar Mueller-Hinton usando discos de IMP. Los aislados se definieron HR a CP por la presencia de colonias dentro de los halos de inhibición de los discos de IMP. La relación clonal de los aislados se determinó mediante REP-PCR. La detección de b-lactamasas de tipo AmpC (bla_{AmpC}), oxacilinasas de los subgrupos 1 (tipo bla_{OXA-23}), 2 (tipo bla_{OXA-24}), 3 (tipo bla_{OXA-51}) y 4 (tipo bla_{OXA-58}) y de las secuencias de inserción ISAb1 e ISAb3 se realizó mediante PCR usando cebadores específicos de cada gen. La posición relativa de ISAb1 e ISAb3 corriente arriba de los genes bla_{AmpC}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-51} y bla_{OXA-58} se determinó mediante PCR usando el cebador directo de ISAb1 o ISAb3 y el cebador reverso de uno de los genes bla_{AmpC}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-51} o bla_{OXA-58}. Los productos de PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa. **Resultados:** de los 30 Ab estudiados, 7 no presentaron HR ("Ab no HR"; CMI 0,5-2 mg/L), 23 fueron HR ("Ab HR"; CMI 4-16 mg/L), y 2 fueron resistentes a IMP ("Ab R"; CMI 128 mg/L). Se diferenciaron 6 clones: 2 (n = 4), 3 (n = 1), 4 (n = 1), 6 (n = 21), 9A (n = 2) y 9B (n = 1). La relación entre HR y clonalidad fue: Ab no HR (clones 2, 4, 6, 9A y 9B), Ab HR (clones 2, 4, 6 y 9A) y Ab R (clones 2 y 3). Se diferenciaron 3 perfiles de beta-lactamasas: bla_{AmpC}+ bla_{OXA-51} (Ab no HR),

bla_{AmpC}+ bla_{OXA-51} + bla_{OXA-24} (Ab R) y bla_{AmpC}+ bla_{OXA-51} + bla_{OXA-58} (Ab HR). En ningún Ab se detectó bla_{AmpC}. En todos los Ab se detectó ISAb1 mientras que ISAb3 sólo se detectó en los Ab HR. La localización de ISAb1 y ISAb3 corriente arriba de los genes bla se determinó en 12 Ab representativos. Los perfiles obtenidos fueron: ISAb1-bla_{AmpC} (n=12; 4 Ab HR, 6 Ab no HR y 2 Ab R), ISAb1-bla_{OXA-51} (4 Ab no HR), ISAb3-bla_{OXA-58} (4 Ab HR).

Conclusión: La HR a CP en Ab se asoció con CMI de IMP de 4-16 mg/L, con la presencia de bla_{OXA-58} y con ISAb3 localizada corriente arriba de bla_{OXA-58}. La presencia de ISAb1 corriente arriba de bla_{OXA-51} se asoció con valores de CMI de IMP de 1-2 mg/L y con la ausencia de HR a CP. La presencia de bla_{OXA-24} se asoció con alto nivel de resistencia a CP (CMI de IMP 128 mg/L. No puede descartarse que bla_{OXA-24} se asocie con HR a CP dado que en los Ab que tienen esta oxacilinasas no se observa ningún halo de inhibición. La HR a CP no se relacionó con la clonalidad ni con la presencia de los genes bla_{AmpC}, bla_{OXA-23} ni ISAb1.

13

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE TRES NUEVAS BETA-LACTAMASAS AMP C EN ACINETOBACTER GENOESPECIE 3

A. Beceiro¹, A. Pérez¹, F. Fernández-Cuenca², A. Pascual², J. Vila³, J. Rodríguez-Baño⁴, J. M. Cisneros⁵, J. Pachón⁵, L. Martínez-Martínez⁶, G. Bou¹ y GEIH

¹Servicio de Microbiología-Unidad de Investigación; ²Servicios de Microbiología y de ⁴Enfermedades Infecciosas; ³Servei de Microbiologia; ⁵Servicio de Enfermedades Infecciosas y ⁶Servicio de Microbiología. ¹Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, La Coruña; ²y ⁴Hospital Virgen Macarena, Sevilla; ³Hospital Clínic, Barcelona; ⁵Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla y ⁶Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Introducción: El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos β-lactámicos en Acinetobacter spp. es la producción de enzimas β-lactamasas cromosómicas AmpC. Las β-lactamasas cromosómicas derivadas de Acinetobacter spp. se encuentran incluidas en una clasificación denominada ADC. Junto a A. baumannii, A. genoespecie 3 (AG3) es probablemente la genoespecie más relevante en clínica. Es este trabajo se presenta la caracterización bioquímica y molecular de 3 enzimas AmpC de tres cepas clínicas de AG3.

			AM	CE	FX	CT	TZ	IP		
CMIs (mg/L)	Cepas clínicas de AG3	ADC-18	32	>256	>256	4	24	0,19	IC ₅₀ (μM)	SB
		ADC-16	> 256	> 256	192	4	16	0,75		
		ADC-14	32	> 256	128	4	12	0,19		
	E. coli transformantes con AmpC de AG3	ADC-18	96	>256	24	0,50	0,75	0,25		
		ADC-16	128	> 256	32	0,50	0,75	0,125		
		ADC-14	16	192	3	0,25	0,25	0,19		
Parámetros cinéticos	ADC-18	K _m	2,07	163,66	0,310	0,593	64,09	67,63	2356	11,48
		k _{cat}	4,548	1804,75	0,271	0,058	0,004	0,027		
		k _{cat} /K _m	2197,28	11027,46	873,157	98,6586	0,0633	0,398		
	ADC-16	K _m	1,499	129,31	0,194	0,207	114,94	1,87	1490	8,44
		k _{cat}	3,404	1641,01	0,333	0,062	0,005	0,001		
		k _{cat} /K _m	2271,17	12690,49	1713,11	299,698	0,045	0,461		
	ADC-14	K _m	0,481	9,5	0,021	0,109	31,89	2,07	362	1,48
		k _{cat}	0,385	41,33	0,019	0,005	0,002	0,002		
		k _{cat} /K _m	786,54	4350,72	899,229	42,954	0,059	0,047		

Materiales y métodos: Las cepas fueron identificadas mediante ARDRA. Se realizó REP-PCR para descartar clonalidad genética. Clonación de los genes bla_{ampC} de AG3 en *E. coli* DH5 α . CMIs de las cepas clínicas y de los transformantes de *E. coli*. Purificación de las proteínas AmpC por cromatografía de afinidad. Cálculo de los parámetros cinéticos K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m , así como las constante de inhibición IC_{50} . Se utilizaron los siguientes antibióticos: Ampicilina (AM), cefalotina (CE), cefoxitina (FX), ceftazidima (TZ), cefotaxima (CT), imipenem (IP), ácido clavulánico (CL) y sulbactam (SB). Estudio de la similitud aminoacídica entre las diferentes enzimas.

Resultados: Las tres β -lactamasas caracterizadas se han denominado ADC-14, ADC-16 y ADC-18; su similitud aminoacídica fue de un 95-96%. Los resultados obtenidos en el estudio de las CMIs y de los parámetros cinéticos de estas β -lactamasas se encuentran reflejados en la Tabla. Véase en página anterior.

Conclusiones: El incremento en las CMIs de los transformantes de *E. coli* confirma la implicación de las enzimas AmpC en la resistencia de las cepas clínicas de AG3. Presentan un perfil típico de cefalosporinasas con elevada eficacia catalítica (k_{cat}/K_m) frente a cefalotina, seguido de ampicilina; destacando también la hidrólisis sobre cefoxitina. Las diferencias aminoacídicas existentes entre las tres proteínas se traducen en una variación de los parámetros cinéticos de hidrólisis, afectando especialmente a la afinidad de los enzimas (K_m) por los antibióticos β -lactámicos.

14

CARACTERIZACIÓN DEL ENTORNO GENÉTICO DE GENES BLABLEE Y PLÁSMIDOS ASOCIADOS EN CEPAS CIRCULANTES DE *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* EN ESPAÑA

K. Diestra¹, C. Juan⁴, T. Curiao³, B. Moyá⁴, E. Miró¹, J. Oteo², T.M. Coque³, M. Pérez-Vázquez², J. Campos², R. Cantón³, 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. ²Laboratorio de Antibióticos, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid. ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca.

Caracterizar los plásmidos que vehiculan los genes bla de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y sus correspondientes entornos genéticos en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas en distintos hospitales de España.

De una colección de 124 aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* recogidos en el primer trimestre del 2004 y estudiados previamente en el contexto de la Red Española en Patología Infecciosa, se seleccionaron 60 cepas representativas portadoras de diferentes BLEE de las familias CTX-M (n = 46), SHV (n = 13) y TEM (n = 1). La caracterización de los entornos de los genes bla se realizó mediante PCR y secuenciación. La caracterización del grupo plasmídico de incompatibilidad se realizó mediante REP-typing PCR, digestión con la enzima S1, PFGE, Southern Blot e hibridación con sondas específicas para los diferentes grupos.

Resultados: La caracterización del grupo de incompatibilidad reveló que: el 71,4% de los plásmidos con el gen $bla_{CTX-M-1}$ pertenecían al grupo N (5 de 7 cepas); el 50% con el gen $bla_{CTX-M-9}$ al grupo I1/Ig (7 de 14 cepas) y el 28,6% al grupo HI2 (4 de 14 cepas); el 100% con el gen $bla_{CTX-M-14}$ al grupo K (13 cepas); el 50% con el gen $bla_{CTX-M-15}$ al grupo FIA (2 de 4 cepas); el 100% con el gen $bla_{CTX-M-32}$ al grupo N (3 cepas); y el 46,2% con el gen bla_{SHV-12} al grupo I1 (6 de 13 cepas). Los plásmidos con el gen $bla_{CTX-M-3}$ pertenecieron a diferentes

grupos; un plásmido con el gen $bla_{CTX-M-10}$, al grupo K y el plásmido con el gen bla_{TEM} no perteneció a ninguno de los grupos estudiados.

La estructura génica del entorno de $bla_{CTX-M-9}$ se relacionó con el integrón In60 en todas las cepas, aunque se observó una gran diversidad. En las 13 cepas con $bla_{CTX-M-14}$ se encontraron en las regiones 5' y 3' de éste, las secuencias de inserción ISEcp1 e IS903, respectivamente. El gen $bla_{CTX-M-10}$ se localizó dentro de la estructura fágica característica previamente descrita. Los genes $bla_{CTX-M-1}$ y $bla_{CTX-M-32}$ presentaron el mismo entorno genético, en el que se detectó la secuencia ISEcp1 truncada por la IS26 o IS5, respectivamente. En el entorno genético de las 13 cepas con bla_{SHV-12} se encontró la secuencia IS26 en el extremo 5' y el fragmento DEOR en el extremo 3' excepto en dos cepas.

Se confirma una gran variabilidad tanto en el entorno genético de los genes bla_{BLEE} estudiados, fruto de inserciones y deleciones, como en el grupo de incompatibilidad del plásmido que los vehicula, excepto para el gen $bla_{CTX-M-14}$.

15

LA DELECCIÓN DEL TRIPLETE GLY-ASN-SER (GNS) 306-308 EN LA β -LACTAMASA PLASMÍDICA DE CLASE C FOX-4, SE ASOCIA A UN LIGERO AUMENTO EN LA SENSIBILIDAD AL ÁCIDO CLAVULÁNICO Y SULBACTAM

S. Mallo*, F.J. Perez-LLarena, N.C. Soares, E. Fernández-Moreira y G.Bou

Servicio Microbiología, Unidad de Investigación. Hospital Juan Canalejo, La Coruña

Introducción: Se aisló una cepa de *Escherichia coli* con una deleción de un triplete aminoacídico (GSD) en la AmpC cromosómica (AAC.2004.48:2652-8) que causaba un discreto aumento a la sensibilidad a los inhibidores de betalactamasas. La existencia de un residuo aminoacídico (Gly) dentro del triplete, conservado en FOX-4 (AAC.2000.44:2549-53) nos hizo plantear una similitud estructural en este dominio entre una AmpC cromosómica y otra plasmídica. La búsqueda de inhibidores de las β -lactamasas de clase C sigue siendo un reto en microbiología clínica. La identificación de mutantes sensibles a los mismos puede ayudar a conseguir este objetivo.

Objetivos: Comprobar si un mutante delecionado en un triplete aminoacídico en FOX-4 en las posiciones similares a las descritas en la Amp C de *E. coli* confieren sensibilidad a los inhibidores de β -lactamasas usados en clínica.

Material y métodos: Se clonó el gen fox-4 en pBGs18 bajo un promotor externo. Se realizó la deleción del triplete aminoacídico mediante mutagénesis dirigida. Las CMIs se detectaron mediante E-test y microdilución. Se clonó el gen fox-4 wt y el delecionado en pGEX 6P-1 y se purificaron ambos enzimas mediante cromatografía de afinidad. Se realizaron las IC_{50} al clavulánico y al sulbactam en ambas cepas.

Resultados: Las CMIs de FOX-4 y FOX-4 (Δ GNS) fueron los siguientes: amoxicilina (AC): > 256/256, AC-clavulánico: > 256/64, ampicilina (AM): 256/256, AM-clavulánico: 256/128, AM-sulbactam: 256/128, ceftazidima (TZ): 256/256, TZ-clavulánico: 256/128, TZ-sulbactam: 256/128, cefotaxima (CT): 256/256, CT-clavulánico: 256/128, CT-sulbactam: 256/128, cefoxitina: > 256/16, y aztreonam: 4/2.

Los resultados de IC_{50} obtenidos a partir de experimentos realizados por triplicado frente a clavulánico y sulbactam de FOX-4wt fueron 2373 μ M $\pm$ 336,08 y de 300,6 μ M $\pm$ 17,97, respectivamente y para FOX-4 (Δ GNS) fueron 1298,6 μ M $\pm$ 58,58 y 285,4 μ M $\pm$ 31,57.

Conclusiones: La deleción del triplete aminoacídico GNS 308-308 en FOX-4 provoca un ligero incremento en la sensibilidad a clavulánico y a sulbactam confirmado mediante datos microbiológicos y bioquímicos. Es también destacable la pérdida de actividad sobre cefoxitina.

16

FRECUENCIA Y MULTIRRESISTENCIA DE ACINETOBACTER BAUMANNII EN EL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE

D. Rodríguez, O. Miranda, M. Andreu, C. Llopis y J. Plazas

Microbiología y Parasitología. Hospital General Universitario de Alicante.

Objetivo: Conocer la frecuencia de aislamientos y patrón de resistencias de un patógeno multirresistente como *Acinetobacter baumannii*, en un hospital general durante un período un año

Introducción: *Acinetobacter baumannii*, patógeno nosocomial de difícil control y tratamiento, presenta una extraordinaria rapidez y capacidad para desarrollar resistencias a los antimicrobianos. En la actualidad, *Acinetobacter baumannii* es resistente a la mayoría de betalactámicos, en especial penicilinas y cefalosporinas, en particular en pacientes que se encuentran en áreas de cuidados intensivos.

Material y métodos: Se estudió la sensibilidad antibiótica de todos los aislamientos de *Acinetobacter baumannii*, teniendo en cuenta aislamientos por paciente y por servicio, realizados durante un período de un año (mayo 2006-mayo 2007) mediante el sistema automatizado WIDER® de microdilución en caldo. Para evitar un efecto distorsionante, se excluyeron del análisis todos los aislamientos correspondientes a estudios del servicio de Medicina Preventiva.

Resultados: *Acinetobacter baumannii* supone el 2.4% de las bacterias aisladas en el hospital.

Se analizaron un total de 320 aislamientos, hospitalarios y extrahospitalarios, correspondientes a 102 pacientes, distribuidos: Medicina Intensiva (UCI) 51%; Neurocirugía 16%; Anestesia y Reanimación 8%; Cirugía Plástica 6%; Medicina Interna 5%; Neumología 5%; UCI Pediátrica 3%; Cirugía General 3%; Quemados 2%; Cirugía Plástica Infantil 1%

El patrón de sensibilidad (TOTAL) de esta bacteria en el hospital fue el siguiente:

Antibiótico	% Sensibilidad
Amikacina	14
Amoxicilina/Clavulánico	5
Cefepima	15
Cefotaxima	2
Ceftazidima	20
Ciprofloxacino	8
Colistina	96
Gentamicina	10
Imipenem	14
Meropenem	12
Piperazilina	5
Piperazilina/Tazobactam	7
Cotrimoxazol	11
Tobramicina	17

Conclusiones: Se ha producido un aumento del 1.6% en los últimos dos años

La UCI es el lugar del hospital donde se aísla con mayor frecuencia esta bacteria

El antimicrobiano para el que la cepas de *Acinetobacter baumannii* del hospital presentan mayor sensibilidad es Colistina

17

LA DISEMINACIÓN Y PERSISTENCIA DE TEM-4 EN ESPAÑA SE ASOCIA A CLONES PERSISTENTES DE E. COLI Y K. PNEUMONIAE Y PLÁSMIDOS EPIDÉMICOS DE LA FAMILIA REPFIIA

A. Novais, R. Cantón, A. Valverde, F. Baquero y T.M. Coque

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Objetivos: TEM-4 es una de las BLEE más frecuentemente detectadas en España, aislándose ocasionalmente en otros

países. El objetivo de este estudio fue caracterizar a nivel molecular los aislados de *Enterobacteriaceae* productores de TEM-4 en nuestro hospital desde su descripción inicial en 1989.

Métodos: Se estudiaron 50 aislados productores de TEM-4 [32 *K. pneumoniae* (KP) 17 *E. coli* (EC) y 1 *C. freundii*] de 50 pacientes (1989-2004). El gen bla fue identificado por PCR y secuenciación. La relación clonal entre aislados se estableció por XbaI-PFGE y los aislados de *E. coli* asignados a grupos filogenéticos. La sensibilidad a 12 antibióticos no beta-lactámicos fue estudiada por métodos estándar. La transferencia del gen bla_{TEM-4} se hizo por conjugación y su localización plasmídica/cromosómica fue investigada por hibridación de ADN genómico digerido con I-CeuI con sondas intragénicas (bla_{TEM-4} y 16S rARN). La caracterización plasmídica incluyó la determinación del tamaño (S1-nucleasa) y grupo de incompatibilidad (PCR, secuenciación e hibridación), el análisis de la presencia de colicinas (cbi, cma y cvaC), integrones de clase 1 y sistemas toxina-antitoxina (TA, mazEF y relBE) por PCR y la comparación de los perfiles de ADN plasmídico digerido con HpaI.

Resultados: Se identificaron 17 pulsotipos de EC (n=9), KP (n=7) y *C. freundii* (n=1). Los aislados de *E. coli* se distribuyeron en los filogrupos A (33%), D (44%) y B2 (22%). El gen bla_{TEM-4} fue transferible en el 94% de los casos, frecuentemente con la resistencia a gentamicina y tobramicina. El gen bla_{TEM-4} fue identificado en plásmidos (35-120kb) conteniendo mazEF y relBE: i) pRYC106 (IncFII-80kb) identificado en el primer clon epidémico de EC (1989-1997); ii) pRYCE11 (80-90kb), plásmido epidémico no tipable diseminado en 7 clones KP en la UVI de cardiopediatría (1995-2004) y en 2 clones de B2-EC (1991-1999); iii) pRYC107, plásmido no-tipable (35kb) asociado a 3 clones de EC (1991-1999), iv) pRYC108 (80kb), plásmido IncI1 detectado en 2 clones de EC (2000-01) y v) 3 plásmidos derivados de IncI1 de tamaño variable (50-120kb). La presencia de integrones de clase 1 y de colicinas fue esporádica.

Conclusiones: La diseminación de bla_{TEM-4} en nuestra institución se asocia a clones y/o plásmidos epidémicos. La diversidad de plásmidos de la familia RepFIIA con el mismo fenotipo de resistencia refleja la influencia de procesos de recombinación entre plásmidos, lo cual parece haber contribuido para la persistencia de TEM-4 en nuestro entorno.

18

DETECCIÓN DE LA ISLA GENÓMICA DE SALMONELLA (SGI1) EN CEPAS DE SALMONELLA SEROTIPO TYPHIMURIUM NO DT104 Y SUS VARIANTES MONOFÁSICAS 4,[5]12:I:- ENTRE LOS AÑOS 2002-2005

S. Herrera-León, H.K. Basí, R. González-Sanz, A.M. Aladueña y A. Echeita

Servicio de Bacteriología. Laboratorio Nacional de Referencia de Salmonella. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología.

Introducción: La isla genómica de Salmonella (SGI1) fue descrita por primera vez en el año 2000 en una cepa de Salmonella serotipo Typhimurium fagotipo DT104. En 2001 fue completamente secuenciada y se determinó su localización cromosómica y entre otros genes, los determinantes responsables del fenotipo pentaresistente típico de este sero-fagotipo: ASCTSu. En años posteriores, SGI1 o variantes de esta isla, han sido detectados en otros serotipos como por ejemplo Agona, Newport, Albany o Kentucky. Algunos autores postulan una posible asociación entre la virulencia / multiresistencia de cepas epidémicas y la presencia de esta isla. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia / prevalencia de esta isla en cepas de *S. Typhimurium* no DT104.

Material y métodos: El Laboratorio Nacional de Referencia de Salmonella (LNRS) realiza de manera rutinaria

el antibiograma de una de cada tres cepas de *Salmonella* que recibe y la fagotipificación de todas aquellas cepas para las que existe un esquema de fagotipificación internacionalmente reconocido. *S. Typhimurium* es el segundo serotipo más importante en cuanto a prevalencia en nuestro país, por lo que se dispone de numerosa información en cuanto a sus niveles de resistencias a antimicrobianos y fagotipos circulantes. Para este estudio se seleccionaron 98 cepas de *S. Typhimurium* (no DT104) y 33 cepas de su variante monofásica 4,[5],12:i:- pertenecientes a 16 y 5 fagotipos distintos respectivamente aisladas del 2002 al 2005. Para la selección se tuvo en cuenta la presencia de al menos la pentaresistencia ASCTSu, típica de DT104. SGI1 fue detectada mediante 2 PCRs con diana en los extremos de la isla utilizando primers previamente descritos en la literatura. Las cepas positivas fueron analizadas con el fin de determinar la presencia de los determinantes de resistencia, utilizando primers con diana en: dos integrones de clase 1 (gen *sul1*, responsable de la resistencia a sulfonamidas, *aadA2* responsable de la resistencia a estreptomicina/espectinomicina y *bla_{psa}* responsable de la resistencia a ampicilina) que fueron posteriormente secuenciados, *flo* (responsable de la resistencia a cloranfenicol/florfenicol) y *tet(G)* (responsable de la resistencia a tetraciclina).

Resultados: De las 98 cepas de *S. Typhimurium* seleccionadas, 48 fueron positivas. De ellas, la mayoría (25) pertenecían al fagotipo U302, 5 al fagotipo U310, 1 al fagotipo DT120 y el resto o eran no tipificables, es decir no eran lisadas por ningún fago del esquema de fagotipificación de este serotipo (10), o presentaban un patrón de lisis no reconocido (7). Entre estas cepas aparecían 7 patrones de resistencia distintos. Todas ellas presentaban el patrón de genes típico de la isla SGI1 excepto dos cepas con fagotipo PNR que presentaron una de ellas, tres integrones (dos con el tamaño típico de 1000 y 1200 pb y uno adicional de 2000 pb) y otra un integrón de 1000 pb. En cuanto a las variantes monofásicas (4,[5],12:i:-), resultaron positivas 8 cepas de los siguientes fagotipos: DT104 (3), no tipables (3) y dos U302. Todas presentaban el patrón pentaresistente tanto fenotípica como genotípicamente excepto dos de ellas con resistencia a ácido nalidixico y una con un solo integrón de 1800 pb codificando para el gen *bla_{oxa-1}*. Las resistencias adicionales así como los patrones de isla atípicos están actualmente en investigación.

Conclusiones: Este estudio representa el primero en España acerca de la prevalencia de SGI1 en cepas de *S. Typhimurium* y sus variantes monofásicas con un fagotipo distinto al previamente descrito (DT104). Describir la prevalencia de SGI1 en diferentes zonas geográficas es esencial para entender la naturaleza y movilidad de este elemento genético. Este estudio representa la base para el estudio de las variantes encontradas, e incluso de la presencia de la isla en serotipos distintos de *S. Typhimurium*.

19

INFECCIONES RESPIRATORIAS CRÓNICAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MUCOIDE PRODUCTORA DE CARBAPENEMASA

C. Juan¹, O. Gutiérrez², F. Renom³, M. Garau², C. Gallegos², S. Alberti⁴, J.L. Pérez¹ y A. Oliver¹

¹Servicio de Microbiología y Unidad de Investigación, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Hospital Son Dureta Palma de Mallorca. ²Área de Microbiología, Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca.

³Hospital Joan March, Hospital Joan March, Palma de Mallorca. ⁴Área de Microbiología, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca.

Introducción: La infección respiratoria crónica (IRC) por cepas mucoides de *P. aeruginosa* es una de las principales

causas de morbilidad en pacientes con fibrosis quística, bronquiectasias o EPOC. Aunque la resistencia a antibióticos en este contexto es frecuente, hasta la fecha se ha debido a la selección de mutaciones cromosómicas y no a la adquisición horizontal de determinantes de resistencia. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de los primeros casos de IRC por *P. aeruginosa* mucóide productora de carbapenemasas de clase B (Metallo- β -lactamasas, MBL).

Métodos: Las CMI de piperacilina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, ciprofloxacino, gentamicina, tobramicina, amikacina y colistina se determinaron mediante Etest. Se utilizó el Etest MBL para el cribado de producción de MBL. La presencia de genes de MBL se estudió por PCR seguida de secuenciación. Se utilizaron protocolos previamente descritos para obtener las secuencias completas de los integrones portadores. La relación epidemiológica de las cepas se determinó mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE).

Resultados: Entre Abril y diciembre de 2007 se obtuvieron 8 aislados de *P. aeruginosa* con Etest MBL +, procedentes de 3 pacientes con EPOC y/o bronquiectasias ingresados en un Hospital de crónicos. El patrón de sensibilidad fue idéntico, mostrando resistencia a todos los antibióticos excepto amikacina (intermedia) y aztreonam y colistina (sensible). Mediante PCR y secuenciación se detectó la presencia de *bla_{VIM-2}*, demostrándose en todos los casos su localización en el mismo integrón de clase I, portador además de un enzima modificante de aminoglucósidos (AAC(6')-Ib). Mediante PFGE se demostró que todos los aislados pertenecían a un único clon. En dos de los pacientes se documentó el desarrollo de IRC (3 aislados obtenidos en un intervalo de al menos 6 meses) a pesar del tratamiento con colistina. En ambos pacientes, a diferencia del tercero, todos los aislados estudiados presentaron el fenotipo mucóide característico de las IRC.

Conclusiones: Describimos la confluencia de las dos facetas más amenazadoras de las infecciones por *P. aeruginosa*: IRC por cepas mucoides (prácticamente imposibles de erradicar) y la adquisición horizontal de determinantes de multiresistencia. Puesto que estos pacientes se convierten en reservorios crónicos de MBL, es necesario mantener una vigilancia activa para evitar su diseminación en los hospitales.

20

PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA A ALTOS NIVELES DE MUPIROCINA: HETEROGENEIDAD EN LAS REGIONES ESPACIADORAS IS257-ILES2

E. Pérez-Roth¹, J. Alcoba-Florez^{1,2}, F. Laich¹ y S. Méndez-Álvarez^{1,3}

¹Unidad de Investigación (Asociada al CIB, CSIC, Madrid).

²Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria. ³Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria.

³Departamento de Microbiología y Biología Celular. Universidad de La Laguna. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria.

Introducción: La mupirocina es un antibiótico de gran importancia para evitar el estado de portador por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y prevenir la infección. Sin embargo, su efectividad se ha visto disminuida por la aparición de resistencia, siendo preocupante la dispersión de la resistencia a altos niveles de mupirocina (Hi-Mup[®]), la cual se ha asociado al fracaso terapéutico. En un trabajo previo describimos que la aparición de la Hi-Mup[®] en SARM pandémicos se debió a la dispersión de nueve tipos plasmídicos pertenecientes a cuatro grupos estructurales (denominados S1-S4) portadores del gen *ileS2*.

Objetivos: Caracterizar las regiones espaciadoras IS257-ileS2 en los diferentes plásmidos portadores del gen *ileS2* y evaluar la utilidad de la amplificación mediante PCR de dichas regiones para monitorizar la diseminación de la Hi-Mup[®].

Materiales y métodos: En el estudio se incluyeron un total de 48 aislados clínicos SARM, cada uno portador de alguno

de los tipos plasmídicos de resistencia a altos niveles de mupirocina. Para la optimización de las condiciones de amplificación por PCR se emplearon aislados portadores de los tipos plasmídicos pPR1 a pPR9. Se utilizaron cebadores específicos para la amplificación de las regiones espaciadoras IS257-ileS2. Empleando idénticas condiciones de amplificación, se realizaron 4 PCRs sencillas para cada aislado con el fin de detectar las copias situadas corriente arriba (IS-L) y corriente abajo (IS-R) del gen ileS2.

Resultados: Se detectaron copias de la IS257 flanqueando al gen ileS2 en cada uno de los nueve tipos plasmídicos. En los plásmidos del grupo S1 (pPR4 y pPR8) y del grupo S2 (pPR3 y pPR7), la copia IS-R se detectó en la misma orientación que el ileS2 pero a diferentes distancias de éste. En los plásmidos del grupo S3 (pPR1 y pPR9) y del grupo S4 (pPR2, pPR5 y pPR6), la copia IS-L se detectó en orientación opuesta al gen ileS2 y también a diferentes distancias. De este modo, amplificando la región espaciadora entre la IS-L y el ileS2 conseguimos distinguir entre los plásmidos pertenecientes a cada uno de los grupos estructurales. También observamos heterogeneidad corriente abajo del gen ileS2. En los plásmidos de los grupos S1, S2 y S3 la copia IS-R se detectó en la misma orientación que el ileS2; de cualquier manera, en los plásmidos de los grupos S1 y S2, la copia IS-R se ubicó a la misma distancia del ileS2. Así, mediante la amplificación de la región espaciadora entre la IS-R y el ileS2 no pudimos distinguir entre los plásmidos de los grupos S1 y S2, los cuales mostraron una organización idéntica de los espaciadores IS257-ileS2 y, por tanto, idénticos patrones de amplificación.

Conclusiones: El estudio indica el valor de la heterogeneidad encontrada en las regiones espaciadoras IS257-ileS2 como marcador epidemiológico para monitorizar la diseminación de la Hi-Mup^r.

21

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y SEROTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS CON FENOTIPO M DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* OBTENIDAS EN EL PERIODO 2002 - 2005 EN EL HCU LOZANO BLES DE ZARAGOZA.

M.E. Llana¹, C. Seral¹, P. Macipe¹, L. Suárez-Luengas², F.J. Castillo², M.C. Rubio-Calvo¹ y R. Gómez Lus²

¹Servicio de Microbiología y Parasitología, ²Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. ²Departamento de Medicina Preventiva, Microbiología y Salud Pública, Facultad de Medicina de Zaragoza.

Introducción: La resistencia a antibióticos MLS_B en *Streptococcus agalactiae* (EGB) está producida principalmente por los genes erm(B) y erm(TR) que codifican metilasas que expresan fenotipos MLS_{Bc} y MLS_{Bi}, y en menor medida por los genes mef(A) y mef(E) que codifican bombas de eflujo que expresan fenotipo M.

Material y métodos: Del total de EGB MLS_B resistentes de frotis vaginales/rectales de mujeres gestantes y no gestantes obtenidos de 2002-2005, se ha estudiado el fenotipo con el test de triple difusión en disco (clindamicina, eritromicina y espiramicina). La serotipificación se ha realizado con el kit "Haemolytic Streptococcus group B typing Sera, Seiken, Oxoid[®]". Se han detectado por PCR los genes mef(A/E), tet(M), tet(O), diferenciándose entre mef(A) y mef(E) por digestión enzimática con BamHI. Se ha detectado por PCR el elemento mega y el Tn2009 portadores del gen mef(E) y los transposones Tn1207.1/Tn1207.3 portadores de mef(A). Los estudios de macrorrestricción se han hecho mediante PFGE utilizando SmaI y su análisis mediante el software "Bionumerics Gel Compar II".

Resultados: En EGB el fenotipo MLS_{Bc} prevalece en los 4 años (2002-2005). Se encuentran 13 cepas con fenotipo M en el periodo 2002-2005 que se corresponden al 1,25% en 2002, el 3,96% en 2003, el 2,04% en 2004 y el 6% en 2005

del total de fenotipos MLS_B resistentes. En nuestro medio prevalece el gen mef(E) (69,2%) sobre el gen mef(A) (30,8%).

De las 9 cepas con el gen mef(E), en 6 se detecta el elemento **mega** completo, siendo negativo el resto. No se encuentra relación entre el gen tet(M) y mef(E) descartándose la presencia del transposón Tn2009. Dos de los cuatro aislamientos con el gen mef(A) no digieren con SmaI amplificándose en uno de ellos el elemento Tn1207.1/Tn1207.3.

Destaca que el 77,78% de las cepas con el gen mef(E) pertenecen al serotipo Ia, seguido de Ib y No Tipificable (11,11% y 11,11%). En las cepas mef(A) prevalece el Ib (50%).

Tras el análisis de los pulsotipos se encuentra que el grupo mayoritario, con una homología del 84,2% está formado por 5 cepas con el gen mef(E) y serotipo Ia donde tres de ellas presentaban el mismo pulsotipo.

Conclusiones: Se observa un aumento del fenotipo M en EGB de 2002 a 2005, prevaleciendo el gen mef(E) sobre el gen mef(A). Se encuentra el elemento genético mega portador del gen mef(E) y el elemento Tn1207.1/Tn1207.3 portador del gen mef(A). Se encuentra relación clonal entre cepas con fenotipo M/mef(E)/serotipo Ia obtenidas en 2005.

22

DISPERSIÓN DE INTEGRONES DE CLASE 1 EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INCLUYENDO DOS AISLADOS PRODUCTORES DE LA METALO-BETA-LACTAMASA VIM-1

M. Tato, M.T. Coque, F. Baquero y R. Cantón

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.

Objetivos: Las presencia de metalo-beta-lactamasas (MBL) en *P. aeruginosa* se asocia con integrones de clase 1. Recientemente, se han descrito aislados de *P. aeruginosa* en los que el gen bla_{VIM-2} está localizado en integrones derivados de Tn402 que carecen de la región conservada 3'CS. El objetivo de este trabajo fue estudiar el entorno genético de dos aislados de *P. aeruginosa* productores de VIM-1 aislados en nuestro hospital en 2006 y 2007 y la frecuencia de integrones de clase 1 y de estructuras relacionadas con Tn402 en aislados coetáneos de nuestro hospital.

Materiales y métodos: Se analizó la presencia de integrones de clase 1 y su entorno genético en 2 aislados de *P. aeruginosa* productoras de VIM-1 de nuestro hospital (PA1 y PA2) aislados en abril de 2006 y enero de 2007 y en aislados de *P. aeruginosa* recogidos de hemocultivos durante este periodo. El estudio se realizó mediante PCR múltiple con cebadores específicos para los genes de la integrasa (intI1) y la región 3'CS (qacED1-sul1) característicos de los integrones de clase 1 y del gen tniC de Tn402. El entorno genético fue caracterizado por ensayos de PCR solapante basados en secuencias previamente conocidas.

Resultados: El gen bla_{VIM-1} se encontró formando parte de un integron de clase 1 carente de la región 3'CS y que corresponde a un derivado de Tn402 con el módulo de transposición truncado (intI1- bla_{VIM-1}-aadB-tniC) en PA1 y en un integron con la estructura característica de los integrones de clase 1 (intI1-bla_{VIM-1}-aadA1- qacED1) en PA2. En el resto de *P. aeruginosa* estudiadas se detectaron los genes intI1 y qacED1-sul1 en el 30% y 48% de los aislados, respectivamente pero no el gen tniC_{Tn402}.

Conclusiones: La diseminación de VIM-1 en *P. aeruginosa* en nuestro hospital está asociada a integrones de clase 1 con diferentes estructuras las cuales han sido descritas en aislados productores de otras MBL pero no con VIM-1. El elevado porcentaje de secuencias de integrones de clase 1 en *P. aeruginosa* podría favorecer la persistencia de bla_{MBL} por fenómenos de recombinación de forma similar a lo ocurrido en nuestra institución para genes bla_{ESBL} localizados en estas estructuras genéticas.

BARTONELLA BACILLIFORMIS, PATÓGENO ENDÉMICO DEL PERÚ, ES INTRÍNSECAMENTE RESISTENTE A QUINOLONAS?

J. Ruiz¹, L. Flores², M. Vargas³, R. García-de-la-Guarda², R. Quispe², Z.B. Ibáñez², D. Alvarado², P. Ramírez² y L.J. del Valle⁴
¹Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona, Hospital Clinic / IDIBAPS, Barcelona, España. ²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. ³Hospital Clinic de Barcelona, Hospital Clinic, Barcelona, España. ⁴Departamento d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Escola Superior de Agricultura de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España.

Objetivos: Caracterizar la resistencia a quinolonas y las secuencias de los genes *gyrA* y *parC* en *Bartonella bacilliformis*, responsable de la enfermedad de Carrión en el Perú.

Métodos: Tres cepas de *B. bacilliformis* fueron incluidas en este estudio. Dos de ellas fueron aisladas antes de 1957 (CIP 57.17 y CIP 57.18, Instituto Pasteur), previamente a la introducción de las quinolonas en la práctica clínica, mientras que la tercera cepa fue aislada en 1996. La especie fue confirmada por amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA. La secuencia QRDR de los genes *gyrA* y *parC* fue caracterizada por amplificación con PCR y posterior secuenciación del DNA. La susceptibilidad a ácido nalidíxico (Nal) y ciprofloxacino (Cip) fue establecida por los métodos de difusión de disco y E-test. En todos los casos las placas fueron incubadas a 28 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% aire. Las placas fueron controladas diariamente para evitar la contaminación.

Resultados: Las tres cepas presentaron resistencia a Nal con las dos metodologías ensayadas, y se determinó un MIC > 256 mg/L por el método de E-test. Las dos cepas más antiguas presentaron MIC de 0,25 mg/L para Cip, y la más reciente tuvo un MIC > 32 mg/L para Cip.

De acuerdo a los datos del Gene Bank, las tres cepas presentan una Ala en posición 85 equivalente a la posición 80 del QRDR del gen *parC* de *Escherichia coli*. Mientras que en el caso de *GyrA*, las dos cepas aisladas antes del uso de las quinolonas presentan una Ala en posición 91, equivalente a la 83 de *E. coli*, mientras en esta posición la cepa restante presenta una Val.

Conclusiones: Las cepas estudiadas tienen una resistencia constitutiva a quinolonas, esta resistencia está relacionada a la presencia de Ala en posición 91 y 85 de las dianas de las quinolonas (*GyrA* y *ParC*). Asimismo, esta resistencia constitutiva se encuentra en cepas aisladas antes de la introducción de las quinolonas en la práctica clínica. Estos resultados cuestionan las guías y recomendaciones clínicas sobre el uso de ciprofloxacino para el tratamiento de la bartonelosis en el Perú.