

períodos del 1991-1995 y del 1996 al 2000. Se analizan criterios epidemiológicos, inmunológicos y de supervivencia.

Resultados: Durante el período de 1991 al 1995 se diagnosticaron 42 linfomas no Hodgking, mientras que de 1996 al 2000 fueron 28 ($p < 0,011$). El 60% de los sujetos eran varones. Durante el primer período se obtuvieron los siguientes datos: el 47% de los sujetos eran ADVP; la edad media fue de 36 años; el recuento de linfocitos CD4+ en el momento del diagnóstico del linfoma de 197 ± 164 cells/mm³. Durante el segundo período estudiado: el 61% de los pacientes eran ADVP; la edad media fue de 38 años; el recuento de linfocitos CD4 al diagnóstico fue de 195 ± 168 cells/mm³. De entre éstos, 16 estaban en tratamiento con HAART (57%), 4 no HAART (14%) y 8 no recibían tratamiento antirretroviral (29%). En el primer período observamos una mortalidad del 69,04% y en el segundo 57,14% ($p = 0,30$).

Conclusiones: El tratamiento antirretroviral de alta eficacia ha provocado una mejoría inmunológica en los pacientes VIH+, lo cual ha provocado una disminución de la morbi-mortalidad. En nuestra experiencia esto ha provocado una disminución en el número de casos de linfomas, pero no una disminución significativa de la mortalidad por esta causa en los pacientes diagnosticados. El estado inmunológico, cuantificado en número de linfocitos CD4+, es similar en los pacientes diagnosticados de linfoma en ambos períodos de tiempo.

Sesión 13

Infección de la comunidad

266

VALORACIÓN DE DOS ANTÍGENOS DE ALTO PESO MOLECULAR EN LA RESPUESTA BACTERICIDA FRENTE A CEPAS DE *N. MENINGITIDIS*

S. Sánchez, G. Troncoso, M.T. Criado y C.M. Ferreirós
Dep. Microbiología. F. Farmacia. Universidad de Santiago.

Objetivo: Analizar dos antígenos de alto peso molecular como responsables de la generación de anticuerpos son capacidad bactericida frente a cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B para su valoración como candidatos a una vacuna proteica efectiva.

Material y métodos: La detección de los anticuerpos contra dos antígenos de alto peso molecular (HMWPs), presentes en 8 sueros humanos (tanto de pacientes convalecientes de meningitis meningocócica como de voluntarios sanos) y en 22 sueros de ratón, fue realizada mediante Western-blotting. Las HMWPs fueron purificadas por elución desde geles de poliacrilamida del 7,5%. El suero de ratón anti-HMWPs se obtuvo mediante la inmunización de ratones con 3 dosis consistentes en 10 µg de proteína purificada. La capacidad bactericida del suero anti-HMWPs contra la cepa test B16B6 fue evaluada en ensayos empleando como fuente de complemento un suero humano adsorbido con la propia cepa.

Resultados: En el estudio de los perfiles antígenicos se observó una relación estadísticamente significativa entre la capacidad bactericida de los sueros y la presencia de anticuerpos frente a dos antígenos de alto peso molecular (HMWPs). La existencia de esta correlación concuerda con la elevada tasa de mortalidad que presenta el suero de ratón anti-HMWPs ($77\% \pm 17\%$). Además, la capacidad bactericida de los diferentes sueros humanos es independiente de la presencia o del grado de intensidad de la respuesta frente a otros antígenos de la membrana externa (PorA o PorB).

Conclusiones: Los epitopos responsables de la respuesta bactericida de los diferentes sueros ensayados contra la cepa test B16B6 parecen corresponder con dos proteínas de alto

peso molecular (155 kDa y 132 kDa) que generan respuesta de anticuerpos *in vivo*. La presencia de estos anticuerpos en sueros de voluntarios sanos indica que se trata de antígenos implicados en el desarrollo de la inmunidad natural.

267

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE SUEROS HUMANOS FRENTE A TRES CEPAS INVASIVAS DE *N. MENINGITIDIS*

S. Sánchez, G. Troncoso, M.T. Criado y C.M. Ferreirós
Dep. Microbiología. F. Farmacia. Universidad de Santiago.

Objetivo: Evaluar la actividad bactericida de sueros obtenidos de voluntarios sanos y de pacientes convalecientes de meningitis frente a tres cepas de *Neisseria meningitidis* y relacionar las diferencias en su capacidad bactericida con la existencia de antígenos de membrana externa con reactividad cruzada.

Material y métodos: Ocho sueros humanos, 4 de voluntarios sanos y 4 de pacientes convalecientes de meningitis, se probaron en ensayos de actividad bactericida frente a las cepas tipo *N. meningitidis* M982 (B9:P1.2) y B16B6 (B2a:P1.2) y frente a la cepa *N. meningitidis* Nm30 (C2b:P1.2). Se utilizó como fuente de complemento suero humano adsorbido con cada una de las cepas. La detección de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de membrana externa fue realizada por Western blotting.

Resultados: Todos los sueros fueron bactericidas contra las cepas Nm30 y M982 con tasas de muerte cercanas al 100% para la primera y algo menores para la segunda. Con la cepa B16B6, tres de los ocho sueros presentaron actividad nula. La presencia de dos antígenos de alto peso molecular en la cepa B16B6 se relaciona estadísticamente con la capacidad bactericida.

Conclusiones: La alta actividad bactericida contra la cepa Nm30 (serogrupo C) puede deberse a anticuerpos frente al polisacárido capsular, mientras que, en las cepas M982 y B16B6 (serogrupo B), la menor tasa de mortalidad quizás se debe a que la protección es ejercida por anticuerpos dirigidos contra OMPs y LOS, menos bactericidas. La capacidad bactericida de los sueros de voluntarios sanos sugiere que el estado de portador es un mecanismo eficaz para la adquisición de inmunidad frente a *N. meningitidis*.

268

ESTUDIO DE LA ADHERENCIA BACTERIANA DE *E. COLI* SENSIBLE O RESISTENTE A QUINOLONAS EN PACIENTES CIRRÓTICOS

I. Gascón, J. Plazas, J. Such, S. Pascual, L. Navarro, E. Leutschen, P. Mas, J. Sánchez, L. Gimeno, A. Sánchez y M. Pérez-Mateo
Hospital General Universitario, Alicante.

Introducción: El uso prolongado de norfloxacino (NOR) en pacientes con cirrosis hepática (CH) da lugar a la aparición a corto plazo de cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas (RQ).

Objetivo: Estudiar *in vitro* la CAB a células epiteliales como factor de virulencia de cepas de *E. coli* procedentes de pacientes con CH en relación con el factor de RQ y de la presencia de NOR en el medio.

Materiales y métodos: Obtuvimos 59 cepas de *E. coli* a partir de escobillonados rectales de 53 pacientes con CH y se determinó su sensibilidad a NOR mediante tiras de E-test. Las cepas aisladas se pusieron en contacto con células epiteliales de la boca de los pacientes, con y sin concentraciones subinhibidoras de NOR en el medio. La CAB se midió mediante fluorescencia indirecta contabilizando el número de células que presentaron bacterias adheridas (% AD), así como la media de bacterias adheridas por célula (MBAC). El

estudio estadístico se realizó mediante el test de la t de Student y la U de Mann Whitney.

Resultados: Se obtuvieron 22 cepas resistentes y 37 sensibles a NOR. El % AD a células epiteliales en cepas SQ fue: sin NOR 78,2% con una MBAC de 8; cuando añadimos NOR: 48,5% con una MBAC de 3. En el caso de las cepas RQ: sin NOR 80,6% con una MBAC de 8; al añadir NOR: 45,9% de adherencia y MBAC de 4. Los %AD y la MBAC de cepas SQ respecto a RQ no presentan diferencias significativas. La disminución en el %AD al añadir NOR sub-CMI fue estadísticamente significativo, tanto en el caso de cepas SQ como en RQ. En el caso de la MBAC, sólo las RQ fueron diferentes al añadir NOR.

Conclusiones: Las cepas de *E. coli* tanto SQ como RQ presentan una CAB similar. La presencia de NOR en el medio disminuye la CAB en las cepas obtenidas independientemente del factor de resistencia a NOR. Estos datos explicarían, en parte, la baja incidencia de infecciones por cepas de *E. coli* RQ en pacientes con tratamiento continuado con NOR, y apoyan el uso continuado del mismo a pesar del desarrollo de cepas RQ.

269

PREVALENCIA DE VAGINOSIS BACTERIANA EN POBLACIÓN GESTANTE DEL BAJO ARAGÓN

C. Navarro, C. Aspiroz, P. Egido, T. Nebreda, A. Almeida, L. Alós, D. de Pablo, J. Domínguez, D. Jiménez y M. Romero
Hospital de Alcañiz. Teruel.

Objetivos: Estudiar la prevalencia de vaginosis bacteriana (VB) en la población gestante atendida en las consultas de Obstetricia del Hospital de Alcañiz (Teruel).

Material y métodos: Se incluyeron en el estudio 605 gestantes controladas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital de Alcañiz durante el periodo de tiempo comprendido entre abril de 2000 y octubre de 2001. El ginecólogo obtenía las muestras de pacientes en el control correspondiente al tercer trimestre de gestación mediante hisopado de vagina y se enviaban al Laboratorio de Microbiología para la detección de portadoras de *Estreptococo* del Grupo B (EGB). De la misma muestra se realizaba -tras el procesamiento en medio de Granada para la detección de EGB- una extensión para tinción Gram, llevando a cabo el diagnóstico de VB siguiendo los criterios de Nugent et al, con puntuaciones de 0 a 10.

Resultados: Se evidenció la presencia de VB (puntuación ≥ 7) en 13 gestantes (2,2%), presentando un patrón intermedio (flora vaginal intermedia: puntuación 4-6) 68 de las pacientes estudiadas (11,2%). El número de portadoras de EGB fue de 70 (11,6%) y en ellas se encontró un patrón de VB en el 2,9% y patrón intermedio en el 14,3%.

Conclusiones: La prevalencia de VB en la población obstétrica del Bajo Aragón es del 2,2% cifra inferior a la publicada en otros estudios españoles y notablemente inferior a la encontrada en gestantes norteamericanas, especialmente en aquellas de raza negra. No encontramos diferencias en el patrón de flora vaginal entre pacientes portadoras y no portadoras de EGB.

270

PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN MUJERES DEL ÁREA 2 DE MADRID Y ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

M.A. Blanco-Galán, I. Sánchez-Romero, F. Hernández, F. Salazar y M.A. Barriga
Hospital Universitario Santa Cristina. Madrid.

Objetivo: Conocer la tasa de infección por *C. trachomatis* en el área 2 de Madrid, en los últimos 7 años (1995-2001) y valorar si existen diferencias en relación a la nacionalidad de las pacientes estudiadas.

Métodos: Desde enero de 1995 hasta el 31 de octubre de 2001, ambos inclusive, se estudiaron 12.429 muestras de exudados endocervicales realizados como control de gestación y/o en pacientes de riesgo para ETS, que correspondían a mujeres pertenecientes al área 2 de Madrid. Tanto la toma de muestra como la técnica empleada para el diagnóstico (Pace 2 Gen Probe) se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados: El número total de pacientes estudiadas fue de 808, 1.250, 1.643, 1.736, 2.219, 2.207 y 2.566 en 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000 y 2001. El número global de *C. trachomatis* en estos años fue de 14, 10, 27, 39, 33, 45 y 48 respectivamente. Las tasas de prevalencia fueron de 1,7% en 1995, 0,8% en 1996, 1,6% en 1997, 2,2% en 1998, 1,4% en 1999, 2% en 2000 y 1,9% hasta 31 de octubre del 2001. En 4773 pacientes se estudió su procedencia, siendo 3.769 españolas y 1.004 no españolas, de éstas últimas 970 provenientes de países en vías de desarrollo (PVD) y 34 de UE. Nuestra prevalencia en españolas fue del 1,5%, de la UE fue 0%, y en mujeres de PVD fue 3,6%; en éste último grupo tuvimos 35 pacientes positivas, más del 80% de origen sudamericano.

Conclusiones: 1) La tasa interanual de *C. trachomatis* en mujeres de nuestra área ha sido 1,6%, observándose un ligero aumento en los dos últimos años (2%). 2) Las mujeres procedentes de países en vías de desarrollo, tienen una prevalencia más del doble que las mujeres españolas, por lo que consideramos que deben ser incluidas en grupos de riesgo para screening.

271

APROVECHAMIENTO DE LOS MEDIOS DE MICOBACTERIAS PARA EL AISLAMIENTO DE *NOCARDIA* SPP. EN MUESTRAS RESPIRATORIAS

P. Idigoras, J. Larruskain, J.M. Marimón, M. Montes y X. Beristain

Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián, Gipuzkoa.

Objetivo: Valorar la utilidad de los medios de cultivo específicos para micobacterias en el aislamiento de *Nocardia* spp. y otros actinomicetos en muestras respiratorias.

Material y métodos: Revisión de los aislamientos de actinomicetos no pertenecientes al género *Mycobacterium* en muestras respiratorias procesadas para el cultivo de micobacterias entre diciembre de 1997 y noviembre de 2001. Las muestras fueron descontaminadas con N-acetilcisteína/NaOH y sembradas en medio líquido MGIT (BACTEC 960), placas de agar Middlebrook 7H11 y tubos de Löwenstein-Jensen y Coletsos. Los microorganismos aislados se identificaron mediante métodos fenotípicos y PCR-RFLP.

Resultados: En el periodo de estudio se aisló *Nocardia* spp. en 116 muestras respiratorias (53 pacientes).

En medios de cultivo de micobacterias se aisló *Nocardia* spp. en 47 muestras (34 pacientes: 10 *N. asteroides*, 13 *N. farcinica* y 11 *N. nova*). Se aislaron 41 cepas en MGIT (87,2%), 25 en Middlebrook 7H11 (53,2%), 18 en Löwenstein-Jensen (38,3%) y 19 en Coletsos (40,4%). En 12 muestras se aisló *Nocardia* spp. en los 4 medios, en 6 en 3 medios, en 7 en 2 medios y en 22 en 1 medio.

Además, se aisló *Gordonia sputi* en 26 cultivos (22 pacientes), *Streptomyces* spp. en 5 cultivos (3 pacientes), *Tsukamurella* spp. en 2 cultivos (2 pacientes) y *Rhodococcus equi* en 1 cultivo.

Conclusiones: 1) Los medios de cultivo para micobacterias, especialmente el medio líquido MGIT, son útiles para el aislamiento de *Nocardia* spp. 2) Debido a la similitud del cuadro clínico de la nocardiosis respiratoria con la tuberculosis es importante el aprovechamiento de las siembras en medios de cultivo para micobacterias, independientemente de la necesidad de emplear métodos específicos para el aislamiento de *Nocardia* spp.

272

INFECCIÓN POR *NOCARDIA* EN GIPUZKOA. ESTUDIO DE 64 CASOS

X. Beristain, J. Larruskain, P. Idigoras, G. Cilla y E. Pérez-Trallero

Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián, Gipuzkoa.

Objetivo: Analizar la evolución de los aislamientos de *Nocardia* spp. en muestras clínicas en los últimos 10 años y estudiar algunos factores de valor epidemiológico (tipo de paciente, lugar de residencia y estacionalidad).

Material: Se estudiaron todos los aislamientos de *Nocardia* spp. entre enero de 1992 y noviembre de 2001. Todas las cepas fueron identificadas mediante métodos fenotípicos y PCR-RFLP.

Resultados: Se aisló *Nocardia* spp. en 64 pacientes (14 *N. asteroides*, 33 *N. farcinica*, 13 *N. nova* y 4 *Nocardia* spp.). El número de aislamientos anual fue: 1992 (0), 1993 (1), 1994 (3), 1995 (3), 1996 (2), 1997 (3), 1998 (19), 1999 (12), 2000 (12), 2001 (9). Entre diciembre de 1997 y julio de 1998 (8 meses) se produjeron 16 casos (28,1% del total): 15 *N. farcinica* y 1 *N. asteroides*. La distribución estacional de los casos fue: primavera (12), verano (17), otoño (13) e invierno (22). La edad media de los pacientes fue 63,8 años (rango 21-90), 71,9% varones y 28,1% mujeres. La mayoría de los aislamientos (98,4%) se realizaron en muestras respiratorias. Los casos se distribuyeron de manera desigual por todo el territorio, con un agrupamiento en la comarca de Donostialdea (56,3%), y especialmente en la zona oeste de San Sebastián (31,3% del total).

Conclusiones: 1) A partir de diciembre de 1997 se produjo un importante incremento en el número de aislamientos de *Nocardia* spp., con un agrupamiento de casos por *N. farcinica* entre diciembre de 1997 y julio de 1998. 2) La distribución geográfica de los aislamientos no fue homogénea, con un acúmulo de casos en la comarca de Donostialdea, fundamentalmente en los barrios de la zona oeste de San Sebastián.

273

EPIDEMIOLOGÍA DE LA BACTERIEMIA EN PACIENTES DADOS DE ALTA DESDE EL SERVICIO DE URGENCIAS. ESTUDIO DE 46 CASOS

J.M. Ramos, M. Elía, A. Ayelo, C. Escolano, M. Masiá, F. Gutiérrez, G. Royo y A. Martín

Hospital General Universitario de Elche.

Objetivo: Conocer la epidemiología y evolución de los pacientes adultos (> 16 a) atendidos en urgencias con bacteriemia que se conoce tras el alta (BTA).

Método: Estudio prospectivo de casos de BTA de urgencias desde 1-1-01 al 31-10-01 en un hospital de II nivel (420 camas).

Resultados: Se detectaron 46 BTA (13,4% (46/342) de las bacteriemias y 0,05% de los adultos atendidos en urgencias). La edad media era 62,3 años y 25 (54,3%) eran varones. La media de estancia en urgencia: 20,6 horas, 41 (89,1%) paciente recibieron tratamiento antibióticos en urgencias con una media de 2,6 dosis. El 87,8% el antibiótico empleado en urgencias fue correcto. Se aislaron 49 microorganismos (3 bacteriemias polimicrobianas), 32 (69,7%) fueron bacilos gramnegativos, la mayor parte *E. coli* (20, 43,5%), le sigue *Bacterioides* spp (6, 13%). 40 (87%) pacientes recibieron antibiótico al alta: 28 (70%) el antibiótico y duración fue correcto, 7 (17,5%) el antibiótico era correcto pero no figuraba la duración y 5 (12,5%) era incorrecto. 32 pacientes acudieron a la consulta, 9 se contactaron por teléfono, 3 fueron a urgencias (de los que 2 (4,3%) ingresaron) y 2 no se localizaron. En 28 (60,9%) el origen de la BTA era urinario (el 83,9% correctamente diagnosticados en urgencias), en 7 (12,5%) desconocido (el 57% diagnosticados como síndrome febril sin foco).

Existía enfermedad de base en el 57,1% de la BTA de origen urinario y en el 83% de la BTA de otro origen ($p = 0,06$). En tratamiento fue incorrecto o no se trató en el 55,6% de la BTA de origen no urinario y el 3,6% de las BTA de origen urinario ($p < 0,001$). 2 (4,5%) pacientes fallecieron de forma previsible (con BTA de origen no urinario).

Conclusión: El número de pacientes con BTA no es despreciable, con una tasa reingresos y mortalidad es baja. El tratamiento de la BTA de origen no urinario es con más frecuencia incorrecto.

274

LA INCIDENCIA DE TOS FERINA EN NAVARRA ES 500 VECES MAYOR QUE LA NOTIFICADA: UN ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO

A. Chávarri, A. Medarde, R. Díaz, J. Domingo, M.L. Ayape y G. Martínez de Tejada

Departamento de Microbiología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Objetivos: La tos ferina es una enfermedad respiratoria aguda causada por *Bordetella pertussis*. Aunque es en la población infantil donde cursa con mayor gravedad, también los adultos contraen una forma más leve de tos ferina, que raramente se diagnostica. Por ello, los adultos contribuyen eficazmente a la transmisión de la tos ferina a la población infantil. La incidencia oficial de esta enfermedad en Navarra fue de 4,33 en el año 2000 pero es muy probable que esta cifra subestime la incidencia real. Si esto fuera así sería necesario tomar medidas para prevenir la aparición de epidemias como las que se han producido en países desarrollados con elevadas tasas de vacunación y para poder erradicar esta enfermedad en el futuro.

Métodos: Para determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* se empleó un ensayo serológico tipo ELISA indirecto. Como antígenos se emplearon toxina pertúsica purificada (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA). Se analizaron 1069 sueros representativos de la población navarra adulta (18-65 años) en busca de anticuerpos IgG anti-PT. Los valores de absorbancia se tradujeron a Unidades de Elisa por ml. (UE/ml).

Resultados: El 2,4% de los sueros contenían más de 100 UE/ml lo que, según un reciente estudio, indica que esos individuos han padecido tos ferina en los últimos 12 meses. Nuestros resultados sugieren, por tanto, que la incidencia de tos ferina en Navarra es unas 500 veces más elevada que la notificada en el año 2000. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ni entre sexos ni entre grupos de edad. Sin embargo, la incidencia en Navarra Media fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que la detectada en el resto de zonas geográficas. La seropositividad para FHA se correlacionó significativamente ($p < 0,01$) con la seropositividad para PT, lo que confirma la especificidad de la detección serológica.

Conclusiones: Se demuestra la necesidad de administrar dosis de refuerzo de la vacuna acelular contra la tos ferina a la población adulta para prevenir la infección, evitar la transmisión a la población susceptible y la aparición de epidemias.

275

TOS FERINA: ESTUDIO DE DIECIOCHO AÑOS EN ZARAGOZA

M.C. Villuendas, A.I. López, B. Moles y M.L. Marco

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza.

Objetivo: Revisión de los casos de tos ferina diagnosticados por cultivo en nuestro laboratorio en un período de dieciocho años (1984-2001).

Material y métodos: *Técnica de cultivo:* toma nasofaríngea, por cada fosa nasal, con hisopo pernasal y siembra inmediata en placas de agar charcoal con 40 mg/l de cefalexina y 10% de sangre de cordero recientemente preparadas. Incubación en aerobiosis en ambiente húmedo a 37 °C durante una semana, con revisión diaria de las placas.

Datos analizados: resultados microbiológicos y aspectos epidemiológicos (edad, sexo, distribución anual y período estacional).

Resultados: Se analizaron 1.784 muestras procedentes de pacientes hospitalizados y ambulatorios, de las que resultaron positivas 230 (13%). 210 cultivos correspondieron a *B. pertussis*, 18 a *B. parapertussis* y en dos ocasiones se aisló *B. bronchiseptica*. Respecto al sexo, el 58% de los aislamientos se obtuvo en niñas, frente al 42% en niños.

Los positivos se distribuyeron en 3 grupos de edad: < 7 meses, 39%; de 7 meses a 6 años, 40% y mayores de 6 años, 21%. Considerando sólo pacientes ingresados, la distribución etaria fue la siguiente: < 7 meses, 74,5%; de 7 meses a 6 años, 19,6% y mayores de 6 años, 5,9%.

El mayor número de aislamientos se dio en los años 1986, 1989, 1992 y 2000, con un claro predominio en los meses de verano, de junio a septiembre.

Conclusiones: 1) A pesar de la vacunación universal en la infancia se siguen dando brotes epidémicos cada 2-3 años. 2) El grupo de niños correctamente vacunados e inmunizados (7 meses a 6 años) es, paradójicamente, el más afectado. 3) Creemos que sería conveniente una revisión del tipo de vacuna así como del calendario vacunal para conseguir una disminución del número de casos de tos ferina.

276

ANÁLISIS DE LA SEROPREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *BARTONELLA* SPP. EN UNA POBLACIÓN SANA DEL ÁREA SUR DE SEVILLA

A.J. Ramos, J. Vargas, J.A. Mira, J. Fernández-Rivera, J.A. García-García, J. Macías, E. León, I. Salas, R. Baquerizo y J.A. Pineda

Hospital Universitario de Valme. Sevilla.

Introducción: *Bartonella* spp. es un género de patógenos causante de múltiples procesos patológicos. La serología es una herramienta útil en el diagnóstico de las infecciones por *Bartonella* spp. en pacientes inmunocompetentes y en inmunodeprimidos. Actualmente existen pocos datos sobre la seroprevalencia de infección por estas bacterias en la población general. Se ha comunicado seroprevalencias del 6% y 9% en regiones del norte de España, pero no hay información en nuestra área.

Objetivo: Determinar la prevalencia de seropositividad frente a *Bartonella* spp. en individuos sanos del área Sur de Sevilla.

Pacientes y métodos: Se llevó a cabo un estudio seroepidemiológico transversal en 146 individuos, obtenidos de forma aleatoria, que habían acudido por problemas traumáticos menores al área de Urgencias del H. de Valme, durante un año. Todos los pacientes incluidos fueron sometidos a una encuesta epidemiológica y se les realizó una determinación Ig G frente a *Bartonella* spp. mediante una técnica comercial de IFI. Igualmente, todos los pacientes fueron testados para anticuerpos frente a *C. burnetti*, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*.

Resultados: La edad mediana de los sujetos incluidos fue de 32 años (17-54), 78 (53%) eran mujeres, 14 (10%) alcoholicos y 26 (18%) eran propietarios de gatos. Sólo un individuo era consumidor de drogas por vía parenteral. Un total de 36 (24,7%) individuos presentaron serología positiva frente a *Bartonella* spp. Todos los pacientes incluidos fueron seronegativos para *Chlamydia* y *Coxiella*. La frecuencia de seropositividad frente a *Bartonella* spp. en varones fue del 31% y en mujeres del 19% ($p = 0,1$). Un 43% de los alcoholicos fue-

ron seropositivos frente a estas bacterias, en contraste con el 23% de los no alcoholicos ($p = 0,1$). No hubo relación entre la presencia de anticuerpos frente a *Bartonella* spp. y el resto de parámetros analizados.

Conclusiones: Existe una elevada prevalencia de infección por *Bartonella* spp. en individuos sanos en nuestra área, por encima de la que se ha observado en otras regiones de España.

277

LISTERIOSIS PERINATAL: ESTUDIO MULTICÉNTRICO EN LA CIUDAD DE BARCELONA (1990-2000)

J. Bosch¹, J. Nolla-Salas², I. Gasser³, C. Latorre⁴, L. Viñas⁵, M. Sierra⁶, P. Coll⁷ y M. Almela⁸

¹H.C. Maternitat, ²H. Mar, ³H.V. Hebrón, ⁴H.S. Joan de Deu, ⁵I. Dexeus, ⁶H. Barcelona, ⁷H.S. Pau, ⁸H. Clínic. Barcelona.

El objetivo del trabajo ha sido estudiar las características de la listeriosis perinatal mediante el análisis de los casos diagnosticados en 8 hospitales de la ciudad de Barcelona.

Durante un periodo de 11 años (1990-2000) se detectaron 32 episodios de listeriosis perinatal. En todos los casos el diagnóstico se realizó por el aislamiento de *Listeria monocytogenes* en muestras de gestantes y/o de recién nacidos. La infección adoptó cinco formas clínicas definidas: 1) aborto febril (entre las 10 y las 20 semanas de gestación) en 7 episodios, 2) bacteriemia materna (en el segundo trimestre de gestación, con respuesta favorable al tratamiento antibiótico y recién nacido sano a término) en 2 episodios, 3) muerte fetal intrauterina (entre las 22 y 27 semanas de gestación, con fiebre materna) en 4 episodios, 4) listeriosis pretérmino (entre las 24 y 35 semanas de gestación) en 9 episodios: con fiebre materna en 7 casos y muerte de 2 recién nacidos prematuros extremos, 5) listeriosis a término (a partir de las 37 semanas de gestación) en 10 episodios: con fiebre materna en 7 casos y una meningitis neonatal tardía. Se aisló *L. monocytogenes* en 27 de las gestantes (7 hemocultivo, 13 líquido amniótico, 12 placenta y 4 vagina), en 15 de los 19 recién nacidos vivos (14 hemocultivo, 2 LCR, 15 muestras diversas y 2 muestras de necropsia) y en 3 de los 11 abortos o fetos muertos (muestras de necropsia). El serotipo se estudió en 24 cepas: 20 eran del serotipo 4 y 4 del serotipo 1/2. La mortalidad fetal/neonatal fue del 81% en gestaciones de menos de 28 sem.

La listeriosis perinatal se presenta como un cuadro febril en la embarazada y suele provocar la muerte del feto o del recién nacido cuando se presenta antes de las 28 semanas de gestación.

278

PATRÓN DE USO DE ANTIBIÓTICOS EN 5 ÁREAS DE SALUD DE ATENCIÓN PRIMARIA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA (CV)

M. Tarazona, P. Campillos, M. González, J. Aznar, C. Borrell, M. Alós y J.M. López

Área 20, H. Vega Baja, H. Elche, H. Clínico V, H.G. Castellón, H. Magdalena.

Introducción: Se presenta la evolución mensual del uso de antibióticos en 5 Áreas de Salud. Los datos proceden de las recetas financiadas por el sistema nacional de Sanidad. El trabajo se enmarca en el Proyecto ViResIST de vigilancia de la resistencia bacteriana y el uso de antibióticos. El análisis de Series Temporales permite estudiar la evolución en el tiempo del uso de antibióticos y captar tendencia, estacionalidad, etc...

Objetivo: Comparar el uso de antibióticos en Atención Primaria entre diversas Áreas de Salud de la CV y analizar su composición relativa.

Material y métodos: *Ámbito:* Áreas de Salud 2, 4, 9, 19 y 20 de la CCVV. *Serie temporales* (desde enero de 1996 a agosto de 2000 en las Áreas 2 a 19, y de enero 1994 a agosto 2000 en el Área 20) de la cifra mensual de Dosis Diaria Definida por 1.000 habitantes-día (DDH) de todos los antibióticos financiados con cargo a la Seguridad Social en dichas Áreas. *Metodología estadística:* análisis de Series Temporales por medio del ajuste de modelos ARIMA (Autoregressive Integrated Moving Average) para la detección de tendencias y componentes estacionales.

Resultados: La cifra media anual de uso de antibióticos se sitúa en 20,2 DDH para los años 96 a 99. Se observa una fuerte variación estacional alcanzándose el máximo en los meses invernales (ene-96: 29,4, ene-97: 33,3, ene-98: 30,4, feb-99: 32,9 y ene-00: 26,9, doblando las cifras de uso de los meses estivales). No se observan variaciones significativas en las cifras globales ni en los patrones relativos en las distintas Áreas. El mayor uso en DDH corresponde a Penicilinas con Inhibidor de β -lactamasas (4,7), seguidas de Penicilinas de Espectro Ampliado (3,7), Macrólidos (3,3), Cefalosporinas de 2ª generación (2,1) y Fluorquinolonas (1,7).

Discusión: Se observa variación estacional, quizás relacionado con la presentación invernal de procesos de vías respiratorias altas. Discordancia entre las cifras globales observadas y las publicadas, tal vez debido a la automedicación o el uso para fines de sanidad veterinaria. Financiación FIS.

279

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE *M. KANSASII* MEDIANTE EL SISTEMA BACTEC 460. EVALUACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO

F. Alcaide, C. Borraz, V. Quintana, M.A. Benítez, M. Santín y R. Martín

Microbiología. Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge.

Objetivos: 1) Estudiar la sensibilidad *in vitro* de *Mycobacterium kansasii* (MK) frente a los antimicobacterianos de 1ª línea mediante el sistema radiométrico BACTEC 460. 2) Evaluar un nuevo protocolo de inoculación.

Materiales y métodos: 1) Microorganismos: se estudiaron un total de 60 aislamientos clínicos consecutivos de MK (1 por paciente), entre enero de 1997 y septiembre de 2001; 2) Fármacos: Isoniazida (INH), Rifampicina (RMP), Etambutol (EMB) y Estreptomina (SM); 3) Pruebas de sensibilidad *in vitro* mediante el sistema BACTEC 460. Se utilizaron en paralelo dos protocolos de inoculación. El convencional, propugnado por los fabricantes, y uno nuevo en el que la inoculación se realizó directamente de un vial 12B con un índice de crecimiento entre 250 y 500.

Resultados: Todos los aislamientos de MK mostraron una CIM a la INH $> 0,4$ $\mu\text{g/ml}$. El 81,7% de estos ($n = 49$), fueron sensibles a 1 $\mu\text{g/ml}$ de INH. De las 5 cepas, cuya CIM fue > 5 $\mu\text{g/ml}$, en 2 (3,4%) se observó una elevada resistencia a la INH (> 10 $\mu\text{g/ml}$). Sólo un aislamiento fue resistente a la RMP (CIM > 2 $\mu\text{g/ml}$). Todas las cepas fueron sensibles al EMB y SM a las concentraciones de 7,5 $\mu\text{g/ml}$ y 6 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Las pruebas de sensibilidad, con ambos protocolos de inoculación, tuvieron una correlación del 100%. La interpretación y emisión de los resultados, con el nuevo protocolo, se obtuvo entre 5 y 8 días, con una media de 2 días de antelación respecto al protocolo convencional.

Conclusiones: Todos los aislamientos de MK estudiados mostraron una disminución de sensibilidad a la INH, aunque sólo una quinta parte podría representar un problema terapéutico al mostrar una resistencia elevada. La RMP, EMB y SM, fármacos de elección en el tratamiento de las infecciones por MK, tuvieron una buena actividad *in vitro*. Ambos protocolos de inoculación son reproducibles y de fácil interpretación, consiguiendo con el nuevo protocolo una mayor rapidez en la obtención de los resultados.

280

UTILIDAD DEL UMBRAL DE POSITIVIDAD DEL SISTEMA ACCUPROBE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *M. AVIUM* COMPLEX EN MEDIOS MGIT

L. Alcalá, M.J. Ruiz-Serrano, O. Cuevas, D. García de Viedma, M. Marín y E. Bouza

Servicio de Microbiología. Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

El sistema de sondas de ADN AccuProbe (GenProbe®) para la identificación de *M. avium* complex (MAC) a partir de cultivos positivos posee valores de especificidad cercanos al 100%. Sin embargo, en medios líquidos, como los tubos MGIT, su sensibilidad puede ser bastante baja.

Objetivos: Evaluar el umbral de positividad del sistema AccuProbe para la identificación de MAC a partir de cultivos líquidos MGIT.

Métodos: Se analizaron todos los resultados obtenidos en cultivos MGIT por este sistema de identificación desde septiembre de 1999 a agosto de 2001. Las sondas se realizaron siguiendo los procedimientos estándares. La identificación final de la micobacteria se realizó a partir de sondas positivas (> 30.000 unidades) o mediante pruebas bioquímicas. Se excluyeron del estudio todos los cultivos micobacterianos mixtos y los cultivos sanguíneos.

Resultados: De las 451 sondas incluidas en el estudio, 255 (56,5%) dieron resultados mayores de 30.000 URL (mediana: 115.705, rango: 31.425-1.712.487). El resto de las sondas (196, 43,5%) tuvieron valores negativos comprendidos entre 1.129 y 29.854 URL, 128 de ellos con aislados de MAC. Por tanto, un 33,3% de los cultivos con MAC no se identificaron a partir de la primera sonda realizada. Tras desglosar estos valores negativos por rangos, se obtuvieron los siguientes resultados: < 4.000 : 69 cultivos (10 MAC, 14,5%), $4.000 \leq 10.000$: 42 cultivos (34 MAC, 81,0%), $10.000-30.000$: 85 cultivos (85 MAC, 100%). Todos los cultivos con valores de sonda mayores de 7.500 URL fueron identificados finalmente como MAC.

Conclusiones: El sistema de identificación AccuProbe para aislados de MAC mostró ser un método poco sensible en cultivos positivos MGIT. El descenso del umbral de positividad de 30.000 a 10.000 URL aumentó la sensibilidad en nuestro estudio de un 66,6% a un 88,8% sin producir ningún falso positivo. Los valores comprendidos entre 4.000 y 10.000 URL fueron altamente sugestivos de MAC.

281

MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (MNT): SU INCIDENCIA A LO LARGO DE DOCE AÑOS

M. Martín, C. Avellaneda, E. Ordax, S.M. Jiménez, P.P. Pascual y A. Alberte

Sección de Microbiología, H.U. Río Hortega, Valladolid.

Objetivo: Se revisa la incidencia de MNT a lo largo de 12 años (1990-2001), comparándola con la de *M. tuberculosis* complex (MTB) y la frecuencia de las distintas especies.

Años	90-91	92-93	94-95	96-97	98-99	00-01	Total
Muestras procesadas	6.248	5.991	6.652	7.153	8.110	5.403	39.560
Micobacterias aisladas	452	415	455	456	375	331	2.484
% Micobacterias aisladas	7,2	6,9	5,6	6,4	4,6	6,1	6,3
Aislamientos MTB	375	338	375	411	334	289	2.122
% Aislamientos MTB	82,9	81,4	82,4	90,1	89,1	87,3	85,4
Aislamientos MNT	77	77	80	45	41	42	362
% Aislamientos MNT	17,1	18,6	17,6	9,9	10,9	12,7	14,6
% <i>M. gordonae</i>	19,5	39,0	38,8	4,4	29,3	11,9	26,2
% <i>M. fortuitum</i>	9,1	11,6	11,3	24,4	24,4	57,1	19,3
% <i>M. avium</i> complex	9,1	9,1	16,3	15,5	19,5	11,9	13,0
% <i>M. kansasii</i>	10,4	6,5	0	2,2	12,2	2,4	5,5
% <i>M. aurum</i>	7,8	5,2	3,8	0	0	0	3,6
% <i>M. chelonae</i>	5,2	0	1,3	6,7	2,4	2,4	2,8
% <i>M. xenopi</i>	6,5	3,9	5,0	0	7,3	2,4	1,9

Material y métodos: Los métodos de procesamiento de las muestras fueron los convencionales (1990-1995) y a partir de

1995 se incorporó el sistema MB/BacT™ (BioMérieux). La identificación de las micobacterias se realizó con sondas genéticas (Accuprobe™, BioMérieux) y/o técnicas manuales bioquímicas.

Resultados: Véase tabla.

Conclusiones: Nuestros resultados, guardan similitud con otras series. Presentan un máximo en 1994 y una tendencia a valores más bajos. Se observa, un aumento de *M. fortuitum*, un estacionamiento de *M. avium complex* y una disminución de *M. aurum*.

282

ENFERMEDAD POR MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN UN PERIODO DE 10 AÑOS

D. García, M.I. Campos-Herrero, P. Suárez, V. Medina y J.A. Caminero

Servicios de Microbiología y Neumología. Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas.

Objetivo: Estudiar las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con enfermedad por micobacterias ambientales (MA) diagnosticados en nuestro hospital en los últimos 10 años.

Métodos: Se revisaron las historias clínicas de los pacientes con aislamientos de MA en muestras no respiratorias y las de respiratorias que cumplieran criterios bacteriológicos de infección (ATS 1997). Para el diagnóstico de enfermedad pulmonar se utilizaron los criterios citados y para el de no pulmonar, una combinación de criterios clínicos y microbiológicos.

Resultados: 1.392 pacientes tuvieron enfermedad por micobacterias, 47 de ellos por MA (3,4%). Eran 32 varones y 15 mujeres (edad media: 43,2 años). Las formas clínicas fueron: 15 diseminadas, 13 pulmonares, 8 bacteriemias relacionadas con catéteres, 7 infecciones de piel y/o tejidos blandos, 1 linfadenitis, 1 osteomielitis, 1 hepatitis y 1 peritonitis en DP-CA. El complejo *M. fortuitum-chelonae* (22) y el complejo *M. avium* (11) fueron las especies más frecuentes. De los 15 pacientes con infección diseminada, 14 cumplían criterio de sida. El 53,8% de los pacientes con infección pulmonar tenía patología pulmonar de base y el 23,1% criterio de sida. La mayoría (87,5%) de los pacientes con bacteriemia portaban catéter central (fuente de infección demostrada en 2 casos). Las infecciones de tejidos blandos se relacionaron con cirugía previa. De 42 pacientes con seguimiento, el 92,8% recibió tratamiento antimicrobiano. En todas las infecciones de tejidos blandos se practicó cirugía y/o drenaje y en el 75% de las bacteriemias se retiró el catéter. La curación en las formas diseminadas y pulmonares (46,2 y 55,6%) fue menor ($p < 0,05$) que en las formas restantes (75-100%).

Conclusiones: 1) En nuestro hospital, las MA causan menos del 5% de las enfermedades por micobacterias. 2) El complejo *M. fortuitum-chelonae* produjo el 46,8% de las infecciones. 3) Las formas diseminadas y pulmonares fueron las más frecuentes y las de peor evolución.

283

MICOBACTERIAS AISLADAS EN UN HOSPITAL UNIVERSITARIO EN UN PERIODO DE DOS AÑOS (1999-2000)

A. Perkins, D. Domingo, M.S. Abanades, R. Carracedo, R. Fillol y M. López-Brea

Servicio de Microbiología, Hospital U. de La Princesa. Madrid.

Objetivo: Describir los aislamientos de micobacterias obtenidas en un hospital universitario durante un periodo de dos años.

Métodos: Se procesaron un total de 11.593 muestras (79% respiratorias) remitidas para el estudio de micobacterias durante los años 2000 y 2001. Las muestras se decontaminaron mediante la técnica de NaOH-N-acetilcisteína y se cultiva-

ron en medio sólido de Lowenstein y Coletso (BioMérieux) y en medio líquido utilizando el sistema MGIT 960 (Becton Dickinson). Los aislamientos se identificaron mediante sondas genéticas Accuprobe (Gen Probe) en el caso de *M. tuberculosis complex* y *M. avium complex* y mediante pruebas bioquímicas. Las restantes micobacterias se enviaron a dos Centros de Referencia para su identificación.

Resultados: La tasa de contaminación fue del 2,5%. Se obtuvieron un total de 345 aislamientos de micobacterias de 162 pacientes (2,9% de las muestras estudiadas). *M. tuberculosis* se aisló en 225 ocasiones (65,2% de las muestras positivas) procedentes de 107 pacientes. El 87% correspondió a muestras respiratorias. Se obtuvieron 120 micobacterias atípicas de 55 pacientes. *M. avium complex* fue la más común (59 aislamientos, 49% de las atípicas). Las restantes fueron: *M. chelonae* (17, 14%), *M. xenopi* (16, 13%), *M. kansasii* (14, 11,6%), *M. fortuitum* (8, 6,5%), *M. simiae* (2, 1,6%) y *M. goodii*, *M. senegalense*, *M. nonchromogenicum* y *Mycobacterium* cromógena de crecimiento rápido (1, 0,8%). El 90% de los aislamientos de atípicas correspondió a muestras respiratorias, considerándose las mismas como contaminante en 26 (47%) de los 55 pacientes.

Conclusiones: *M. tuberculosis* fue la especie más frecuente aislada seguida de *M. avium complex*, obteniéndose en su mayoría de muestras respiratorias. El papel patógeno de las micobacterias atípicas es en ocasiones de difícil interpretación y está en dependencia del número de aislamientos y la localización de los mismos.

284

ANÁLISIS DE UN MODELO DE MICROCOLONIAS EN FIBROBLASTOS PARA EVALUAR LA PATOGENICIDAD DEL COMPLEJO *M. FORTUITUM*

J. Esteban, I. Gadea, F. Santos, J.I. García Cía, F. Cabria, M.V. Torres y E. Rollán

Departamento de Microbiología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Objetivo: Evaluar el modelo de microcolonias en fibroblastos de Byrd et al para determinar la patogenicidad de los aislamientos del complejo *M. fortuitum*.

Métodos: Se incluyeron las cepas de colección *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467, *Mycobacterium abscessus* DSMZ 44196, *Mycobacterium mucogenicum* DSMZ 44124 y *Mycobacterium septicum* ATCC 700731, así como 23 cepas de aislamientos clínicos cuyo significado fue evaluado mediante el análisis de la historia clínica de acuerdo con los criterios aceptados internacionalmente. Se fotografiaron y analizaron los fenotipos de las colonias (lisas o rugosas) tras incubación durante 7 días a 30 °C en Middlebrook 7H10. Las cepas fueron posteriormente inoculadas en monocapas de fibroblastos tras opsonización en suero humano de acuerdo con el protocolo de Byrd et al. Las monocapas inoculadas fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora y lavadas tres veces con medio de Iscove. Posteriormente, las monocapas fueron incubadas a 37 °C durante 4 días en Earle's MEM-Agarosa. Las microcolonias resultantes fueron entonces fijadas, teñidas y fotografiadas a distintos aumentos para su ulterior análisis.

Resultados: No se observaron asociaciones estadísticamente significativas en relación con el fenotipo de las colonias y el significado clínico. Asimismo, no hubo asociaciones en relación con la morfología de las microcolonias y el significado clínico, salvo para dos cepas de *M. chelonae* responsables de bacteriemia relacionada con catéter. Las cepas de *M. fortuitum* y *M. peregrinum* presentaron microcolonias mayores que las otras especies y de aspecto desflecado, en contraste con el aspecto redondeado del resto.

Conclusiones: Aunque el modelo de microcolonias en fibroblastos puede ser de utilidad para el estudio del potencial patógeno de algunas cepas, no se puede determinar la patogenicidad de las mismas en humanos exclusivamente por el aspecto de las microcolonias o el fenotipo.

285

LA TIPIFICACIÓN GENÉTICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *M. KANSASII* EN EL ÁREA DE BILBAO POR PCR-RFLP Y RAPD-PCR

A. Gaafar*, M.J. Unzaga*, C. Ezpeleta*, R. Cancer* y F. Calvo**

*Servicio Microbiología, Hospital de Basurto.

**Servicio Microbiología, Hospital de Santa Marina.

Objetivos: La tipificación genética de los aislamientos clínicos de *M. kansasii*, aislados en el Hospital de Basurto y Santa Marina, con dos técnicas PCR-RFLP del gen *hsp 65* y RAPD-PCR.

Métodos: *Cepas:* Se estudiarán un total de 98 aislamientos de *M. kansasii*. La identificación se ha realizado mediante el sistema de sondas (Gen-Probe). Se usaron como controles una cepa corresponde a la subespecie I de *M. kansasii* (cedida del Instituto de Pasteur, París) y la cepa de referencia de *M. kansasii* (CECT3030T). *Extracción del ADN:* para la técnica RFLP-PCR, se ha usado DNA crudo preparado con un método rápido (sonicado y hervido). Para la técnica RAPD-PCR, se ha usado ADN puro (sonicado y purificado con Phenol:Chloroform:Isomyl) ajustándose la concentración de cada muestra a 100 ng/μl usando espectrofotómetro. *RFLP-PCR,* se amplifica el gen *hsp65* usando los iniciadores Tb11 y Tb12. Tras la amplificación, se realiza la digestión con dos enzimas (*Bst*II y *Hae*III) y se visualizan los fragmentos en un gel de 4% de agarosa (MS-8). *Para RAPD-PCR,* se usaron 9 iniciadores (MPTR-1, MPTR-F, INS-2, IS986-fp, R-4, P-2, Pntb-1, Pntb-2 y RISK-1). Se visualizan los fragmentos en un gel al 2% agarosa (MS-8).

Resultados: Por la técnica PCR-RFLP, todos los aislamientos clínicos han producido el perfil del subtipo I. Por RAPD-PCR, entre los 9 iniciadores usados, la máxima discriminación y reproducibilidad se han conseguido con los iniciadores MPTR-1 y INS-2 consiguiendo 3 clones con MPTR-1 (A, B y C) y 3 clones con INS-2 (1, 2 y 3). Se han identificado 5 genotipos: (A1, A2, A3, B1, C1). La gran mayoría de los aislamientos (72) formaron el genotipo A1 y 21 aislamientos formaron el genotipo B1.

Conclusiones: La mayoría de los aislamientos forman un grupo homogéneo ya que corresponden al mismo subtipo. La existencia de un genotipo dominante, nos lleva a pensar en una posible fuente común puede ser el responsable de este incremento en la provincia de Vizcaya. RFLP-PCR.

Métodos: Se revisaron las historias clínicas de 36 pacientes con SIDA y LMP pertenecientes a 12 hospitales, durante un período de 6 años. Se cumplimentó un protocolo que incluía datos del diagnóstico clínico-radiológico, virológico [detección de virus JC (VJC) en líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)], tratamiento instaurado y evolución, así como datos inmunológicos, carga viral plasmática y otras enfermedades del SNC. El diagnóstico de referencia de LMP se estableció por los datos clínico-radiológicos.

Resultados: Del total de los pacientes estudiados, 8 presentaron LMP en la era pre-TARGA, siendo éxitos la totalidad de ellos. De los 28 restantes, 11 (39%) estaban recibiendo TARGA en el momento del diagnóstico; de éstos, 8 (73%) fallecieron entre los 1 y 8 meses, y 3 (27%) se mantienen estables hasta la fecha (media 2 meses de supervivencia); en estos 11 casos se continuó el mismo TARGA, al que se añadió cidofovir en seis (3 estables), y a uno un cuarto antirretroviral. A los 17 restantes (61%), se les instauró TARGA, manteniéndose estables 8 (47%), con una media de 24 meses de supervivencia. El resto, 9 (53%), fallecieron. En todos los pacientes, la PCR de VJC en LCR fue positiva.

Conclusiones: 1) Se confirma que la LMP continúa presentándose en los pacientes con SIDA a pesar del TARGA. 2) La instauración de TARGA mejora el pronóstico de vida de algunos pacientes, aunque, en otros casos, su fracaso es evidente. Otros factores, como la inmunidad específica del paciente, o de tipo virológico, podrían estar implicados. 3) La PCR de VJC en LCR demostró ser un excelente método diagnóstico poco invasivo para la LMP en esta serie.

287

CIDOFOVIR ASOCIADO A TARGE EN LA LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA EN PACIENTES CON SIDA: NUESTRA EXPERIENCIA

M. Cousinou, J.A. Gómez, M. Herrán, D. Selma, R. Valiente, I. Trouillhet, M.A. Martín y A. Vergara

Unidad de E. Infecciosas. Hospital Universitario de Puerto Real (Cádiz).

Objetivo: Analizar la eficacia del tratamiento combinado de cidofovir con la terapia antirretroviral de gran eficacia (TARGE) en la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LEMP) asociada a SIDA, en los pacientes tratados en nuestra consulta.

Material y método: Estudio retrospectivo, descriptivo de los casos de LEMP+SIDA tratados con TARGE+cidofovir, se administró a dosis de 5 mg/Kg intravenoso en intervalo de 1 semana las 2 primeras semanas y cada 2 semanas después, junto con probenecid e infusión salina. El diagnóstico se realizó basándose en: clínica y radiología compatible.

Resultados: Se ha usado cidofovir como tratamiento pasivo asociado a TARGE en 5 pacientes. *Edad media:* 40 años, 4 mujeres. Los factores de riesgo de infección VIH: 4 UDVP (80%) y 1 transfusión sanguínea previa a 1985. La media CD4: $222 \times 10^6/l$ (rango $10-623 \times 10^6$) y carga viral: 105389 copias/ml rango (indeterminada-208063 copias/ml). El 100% en estadio C3, con infecciones oportunistas previas: (1 TBC pulmonar, 2 coriorretinitis CMV, 1 meningitis cryptocócica, 1 Ca. in situ cérvix, 2 toxoplasmosis cerebral). 3 pacientes (60%) estaban recibiendo TARGE previo a LEMP. El debut clínico: 3 demencias, 3 disminución visual/ceguera, 2 alteraciones deambulación (síntomas cerebelosos). *RNM craneal:* cambios en la sustancia blanca, señal hiperintensa en T2 en todos los pacientes, sin evidencia de efecto masa, localizadas: 4 pacientes (80%) supra- e infra-tentorial. Media de ciclos administrados: 11,8 (rango 6-20). *Efectos 2°:* 1 paciente (20%) con leucopenia. *Seguimiento:* 4 pacientes (80%) mejoría clínica y radiológica, 1 (20%) éxitos.

Conclusiones: 1) Cidofovir añadido a TARGE en pacientes afectados de LEMP asociada a SIDA produce una mejoría clí-

Sesión 14

VIH (II). Clínica y estudio de resistencias

286

LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA (LMP) DURANTE EL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE GRAN ACTIVIDAD (TARGA)

P. Pérez, E. Cordero, M.A. Pulido, J.M. Miró, J. Niubò, C. Polo, M. Javaloyas, N. Margall, P. Fernández y J.L. Pérez

Hospital Prínceps d'Espanya. L'Hospitalet. Barcelona.

Objetivo: El TARGA ha modificado sustancialmente la aparición de infecciones oportunistas. Sin embargo, su eficacia en la LMP es más controvertida. Se evalúa el papel del TARGA en la frecuencia de aparición y en el pronóstico de vida de la LMP en pacientes con SIDA.

nica y radiológica, mejorando la supervivencia y la calidad de vida. 2) LEMP puede desarrollarse durante TARGE a pesar de evolución favorable (inmunológica y virológica) de la infección VIH (3 de nuestros pacientes 60%) con buena respuesta al añadir cidofovir.

288

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ARN PREVIA A LA DETECCIÓN DE RESISTENCIAS DE VIH-1

J.M. Eiros, C. Labayru, B. Hernández, M. Ortega, M.A. Mantecón, R. Ortiz de Lejarazu y A. Rodríguez Torres
Microbiología. HCU. Valladolid.

Objetivo: Evaluar la utilización de dos métodos de extracción de ARN, para su aplicación en la detección de resistencias genotípicas de VIH-1, mediante Line Probe Assay (LiPA).

Material y métodos: 50 muestras de plasma fueron testadas para determinación de carga viral (CV) mediante el sistema Cobas Amplicor HIV-1 Monitor™ (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA), conservando los extractos de ARN obtenidos. Así mismo se realizó extracción de ARN por el sistema "SV Total RNA Isolation System" (Promega Corporation, Madison, WI, USA), tras lo cual se procesaron en paralelo ambos extractos para la detección de resistencias mediante LiPA, realizando una lectura comparativa de las bandas.

Resultados: Se obtuvieron resultados favorables para el método de Roche en todos los parámetros estudiados; número de muestras amplificadas (66,0% por Promega vs. 98,0% por Roche para LiPA RT y 76,0% vs. 100% para LiPA P), porcentaje de detección de mutaciones (32,0% vs 58,0% de las muestras presentaban genotipos mutados en LiPA RT, tras extracción por Promega y Roche respectivamente y un 30,0% frente a un 42,0% en LiPA P) y por último las diferencias en la intensidad de las bandas, así en el LiPA RT el 66,6% de las muestras presentaban intensidad fue superior por Roche frente al 18,4% observado en el LiPA P.

Conclusiones: El rendimiento alcanzado por el LiPA tras la extracción de la técnica de Roche es notablemente superior al de Promega. Es necesario realizar nuevos estudios encaminados a la optimización de las técnicas de extracción previas al estudio de resistencias genotípicas de VIH.

289

INTERPRETACIÓN DE TESTS GENOTÍPICOS DE DETERMINACIÓN DE RESISTENCIAS A ANTIRRETROVIRALES

F. García, N.M. Martínez, S. Suárez, M. Álvarez, R. Daza, F. García Jr., M.C. Bernal, J. Hernández y M.C. Maroto
Hospital Clínico San Cecilio. Granada.

Objetivo: Comparar distintos algoritmos informáticos para la interpretación de las mutaciones de resistencia en la secuencia de los genes de la proteasa y de la transcriptasa inversa de VIH.

Pacientes y métodos: Hasta el momento hemos analizado 43 pacientes con infección VIH-1 a los que se ha realizado genotipado de VIH en la proteasa y transcriptasa reversa (TruGene HIV-1 genotyping kit, Visible Genetics). De estos, el 23% se estudiaron por presentar un primer fracaso terapéutico, el 32% por estar en segundo fracaso y el 37% por estar en el tercer fracaso. El resto (8%) se estudiaron por ser mujeres embarazadas. Todas las secuencias se analizaron mediante 11 sistemas distintos de interpretación, incluidos el software de Visible Genetics, que se consideró como el de referencia.

Resultados: La media de concordancia entre los 11 algoritmos estudiados para los 15 fármacos analizados fue superior

al 80% para AZT, 3TC, NVP, DLV, EFV, SQV, RTV, NFV y LPV, y fue del 54% para ddI, 55% para ddC, 59% para d4T, 53% para ABC, 79% para IDV y 71% para AMP. La concordancia media de los algoritmos analizados respecto al de Visible Genetics tuvo un máximo de 82,02% (Retrogram) y un mínimo de 53% (ADRA).

Conclusiones: Existen serias discrepancias en la interpretación de la resistencia a ddI, ddC, d4T, Abacavir y Amprenavir, posiblemente porque el perfil de mutaciones de resistencia de estos fármacos no está bien establecido. No existen buenos niveles de concordancia de todos los algoritmos con respecto al de Visible Genetics. La interpretación sigue siendo el principal problema de los tests genotípicos de resistencias.

290

INTERPRETACIÓN DEL GENOTIPADO DE RESISTENCIAS DEL VIH-1 A LOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

M. Lara, C. Gil, M. Arnedo, J.L. Blanco, J. Mallolas, J.M. Gatell, T. Pumarola y M.T. Jiménez de Anta
Institut Clínic Infeccions i Immunologia, ICII (Hospital Clínic).

Las pruebas de detección de resistencias genotípicas del VIH-1 a los FARV han demostrado ser útiles en el manejo clínico de los pacientes. Sin embargo, la interpretación de los resultados es compleja.

Objetivo: Analizar el nivel de concordancia en la interpretación de los resultados de las pruebas de resistencia genotípica según tres métodos de análisis.

Método: Se realizó el genotipado en 43 muestras utilizando el método ViroSeq HIV-1 Genotyping (Applied Biosystems). Los resultados fueron analizados según el criterio del microbiólogo que realizó el genotipado y por las bases de datos de Stanford y Geno2pheno. El nivel de concordancia entre los diferentes métodos se realizó mediante el índice Kappa (κ) y el paquete estadístico SPSS v 9.0.

Resultados: Se realizó el genotipado en 43 muestras correspondientes a 43 pacientes, 14 de ellos en 1^{er} o 2^o fracaso terapéutico (32,6%) y 29 con tres o más fracasos (67,4%). El nivel de concordancia entre los tres métodos fue de 0,71 ($p < 0,05$). Cuando el análisis se estratificó por número de fracasos se observó una concordancia de 0,74 en los pacientes en 1^{er} o 2^o fracaso y de 0,68 en los pacientes con 3 o más fracasos. Cuando se estratificó por familia de antirretrovirales los niveles de concordancia fueron de 0,62, 0,77 y 0,75 para los NRTI, NNRTI e IP respectivamente. Se analiza el nivel de concordancia para cada antirretroviral.

Conclusiones: A pesar de existir diferencias entre los tres métodos de interpretación existe un nivel de concordancia aceptable entre ellos, siendo mayor en las muestras correspondientes a 1^{er}, 2^o fracasos y en la familia de los NNRTI.

291

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIAS, FENOTIPO REAL FRENTE AL FENOTIPO VIRTUAL, EN PACIENTES EN FRACASO VIRAL

M.J. Perez-Elias¹, I. García-Arata¹, V. Muñoz¹, I. Santos², J. Sanz³, V. Abaira, A. Moreno¹, J.R. Arribas⁴, J. González⁴, A. Antela¹, F. Dronda¹, P. Geijo⁵, M. Pumares¹, P. Martí-Belda¹ y S. Moreno¹

¹H. Ramón y Cajal; ²H. Princesa; ³H. Príncipe de Asturias;

⁴H. La Paz; ⁵H. Virgen de las Nieves.

Objetivo y métodos: Estudio multicéntrico, randomizado, prospectivo, doble ciego con 300 pacientes en fracaso viral (HIV-ARN > 1000 copias/mL), asignándose a los pacientes (1:1) a recibir previo al tratamiento la información del Fe-

notipo real (FR) (Antivirogram®, Virco) o del Fenotipo virtual (FV) (VircoGenII®, Virco), estratificándose en función de las clases de fármacos antirretrovirales recibidos (1-2 vs 3 clases). Se realizaron análisis por *intención de tratamiento* (rama asignada) y *según el tratamiento* (rama recibida). Las variables principales analizadas fueron los cambios de carga viral y el porcentaje de indetectabilidad a las 24 semanas.

Resultados: Se analizaron 260 pacientes que habían completado 24 semanas de seguimiento (129 FR y 131 FV). La duración de la exposición previa a los antirretrovirales era de 65, 37, y 14 meses para los ANITI, IP, y NANITI, respectivamente. La mayor parte de los pacientes se habían expuesto a tres familias de fármacos. Las cifras iniciales de CD4 y carga viral fueron de 341 y 330 células/mcl y 3.9 and 4.01log copias/mL para el grupo de FR y de FV, respectivamente. La media de drogas activas prescritas fue de 2.96 para el FR y 2.85 para el FV. En la semana 24, la media de caída de la carga viral fue de 0,89 y 1,22 log copias/mL en el FR y FV, respectivamente ($p = 0,028$). Cuando se analizaron los grupos por *intención de tratamiento*, 46,5% y 56,5 de los pacientes en el grupo FR y FV, respectivamente, tuvieron una carga viral inferior a 400 copias/mL [OR 1,75, 95% IC 2,85-1,03, $p = 0,1$]. El análisis de los grupos *según el tratamiento* recibido mostró diferencias significativas (42,7% vs 56,7%) [OR 1,49, 95% IC 2,43-0,91, $p = 0,038$]. El análisis de regresión logística, ajustando por factores de confusión, mostró que la probabilidad de fracaso viral aumentaba en el grupo FR [OR 4.02, 95% CI 1,75-9,22, $p = 0,001$].

Conclusiones: La información del FV resultó ser tan eficaz o más que la del FR en el diseño del tratamiento de rescate independientemente de la exposición previa a una o más clases de antirretrovirales.

292

EVALUACIÓN DE DOS PRUEBAS, PARA LA DETERMINACIÓN DE RESISTENCIAS GENOTÍPICAS DEL VIH-1 A LOS ANTIRRETROVIRALES

A. Corral, C. de Mendoza, O. Gallego y V. Soriano
Hospital Carlos III, ISC III. Madrid.

Introducción: La detección de resistencias genotípicas a fármacos antirretrovirales en pacientes VIH-1+ se ha generalizado en la práctica clínica. Las pruebas genotípicas se han impuesto en la rutina hospitalaria a las fenotípicas debido a su rapidez y menor coste.

Métodos: Se analizaron muestras clínicas de pacientes VIH+ utilizando dos pruebas comerciales: HIV Genotyping System, Versión 1 y 2 (Applied Biosystems) y TrueGene HIV-1 (Visible Genetics). En las muestras con CV < 1.000 cop/ml se introdujeron cambios en la extracción para lograr una mayor concentración de ARN viral. De esta forma, aumento el rendimiento en ambas pruebas comerciales.

Resultados: 1.503 muestras fueron analizadas durante los dos últimos años. Se procesaron 523 muestras con el método HIV Genotyping System versión 1, $n = 804$ con la versión 2 y el resto utilizando el sistema TrueGene HIV-1 ($n = 176$). La CV media fue de 75.191 cop/ml. De las muestras analizadas con el método HIV Genotípico System versión 1 amplificaron el 57% ($n = 298$) de ellas, obteniéndose producto de PCR para su posterior análisis genotípico. Con la versión 2 se amplificó el 78% ($n = 628$), aumentando el rendimiento respecto a la anterior versión ($p < 0,05$). Con el sistema TrueGene amplificaron el 80% de las muestras ($n = 141$).

En un subgrupo de 45 pacientes con CV < 1.000 cop/ml se amplificó el 58% de las muestras variando el protocolo de extracción comercial, frente al 2% siguiendo las recomendaciones de los fabricantes ($p < 0,05$).

Conclusiones: Estos datos indican que los métodos de secuenciación son cada vez más eficientes en la realización de

las pruebas de determinación de resistencias genotípicas. Sin embargo, aún hay un número de muestras que no son amplificables por los distintos sistemas de determinación de resistencias genotípicas. Por lo que se hace necesario desarrollar nuevos sistemas o mejorar los actualmente comercializados para amplificar mayor número de muestras, en especial aquellas con CV < 1.000 cop/ml.

293

DETECCIÓN DE MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES EN PACIENTES CON UNA BAJA CARGA VIRAL

A. Suárez, B.A. Sánchez y J.J. Picazo

Microbiología Clínica. Hospital Clínico San Carlos.

Objetivos: La detección mediante secuenciación de mutaciones asociadas a resistencia a los antirretrovirales tiene como limitación una baja carga viral, es por ello que el objetivo de nuestro estudio ha sido valorar la presencia de estas mutaciones mediante hibridación con sondas específicas.

Métodos: Hemos estudiado 35 muestras de plasma de pacientes infectados por VIH en las que la reacción de secuenciación no pudo llevarse a cabo por no obtener suficiente cantidad de cDNA. Las cargas virales oscilaban entre 51.000 y < 50 copias/ml ($> 10^4$: 11, 10^4 - $> 10^3$: 13, 10^3 - $> 10^2$: 6, igual o < 10^2 : 5). La presencia del virus salvaje o mutantes se realizó mediante una hibridación reversa (InnoLiPA Innogenetics) de un producto previamente amplificado frente a las regiones de transcriptasa inversa y proteasa del VIH-1, en tiras de nitrocelulosa que contienen un panel de oligonucleótidos. Los resultados indican si los codones son mutantes, salvajes o mixtos.

Resultados: En 7 muestras con cargas virales inferiores a 200 copias/ml no hubo cDNA suficiente para llevar a cabo la hibridación en la transcriptasa inversa y solo en una con carga viral < 50 copias/ml no pudo ser determinada la de proteasa. Se detectaron 62 mutaciones, en los codones 41 (5), 69 (5) 70 (6), 74 (4), 103 (5) 106 (2), 151 (1), 181 (2), 184 (18) y 215 (14). De ellas 12 fueron mutaciones mixtas. Todas ellas eran mutaciones primarias.

En la región proteasa se detectaron 56 mutaciones, en los codones: 30 (3) 46 (7), 48 (2), 50 (2) 54 (11), 82 (17), 84 (5) y 90 (9), de las cuales 29 eran mutaciones mixtas. Consideramos como mutaciones primarias 40, las incluidas en los codones 30, 46, 48, 50 82 y 90.

Conclusiones: La detección de mutaciones asociadas con resistencia a los antirretrovirales puede ser útil en pacientes con baja carga viral.

Con hibridación los límites de carga viral para detección de mutaciones han sido de 200 copias/ml para la transcriptasa inversa y 36 para la proteasa.

La hibridación detecta mutaciones mixtas presentando gran sensibilidad en la detección de poblaciones mutantes minoritarias.

294

EVALUACIÓN DE DIFERENTES BASES DE DATOS DE RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES DE VIH

J.M. Rodríguez, M.C. Palomares y J.C. Palomares

Dpto. Microbiología. Universidad de Sevilla.

Objetivos: Comparar los distintos patrones de resistencia y sensibilidad a antirretrovirales (ARVs) de VIH-1 proporcionados por distintas bases de datos, basándose en la secuencia de la proteasa y la retrotranscriptasa del virus.

Material y métodos: Se estudiaron las secuencias del gen de la proteasa (*pr*) y la retrotranscriptasa (*rt*) del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-1) en muestras de

plasma sanguíneo pertenecientes a un total de 26 pacientes. Todos ellos pertenecían al área hospitalaria de Sevilla, y en todos se observó al menos un fracaso terapéutico. La secuenciación de los genes *pr* y *rt* se realizó con el sistema comercial *TRUGENE™ HIV-1 Genotyping Kit* (Visible Genetics Inc., Toronto, Canadá) y con el uso de un secuenciador automático. Se utilizaron distintas bases de datos para determinar la resistencia. Estas bases de datos fueron: ANRS AC11 v.2000 (Francia), Detroit Medical Center (EEUU), Grupo de Aconselhamento Viroológico (Brasil), CHL v3.2 (Luxemburgo), Rega v5.0 (Bélgica), Scored HIVDB Mut, Scored RCG Mut, VGI (Visible Genetics), Retrogram™ 1,4 y HIVResistanceWeb.

Resultados: Se obtuvieron los porcentajes de coincidencia de las distintas bases de datos para cada antirretroviral. El mayor consenso se obtuvo para la Nevirapina con un 92,3%, el menor fue para la Didanosina con un 68,8%.

En los NNRTIs la coincidencia fue de 90,8%, en los IPs fue del 85,3%, y en los NRTIs 74,8%.

Conclusiones: Vistos los porcentajes de coincidencia de las distintas bases de datos analizadas se llega a la conclusión de que no existe un consenso claro entre las mismas, ya que cada una proporciona una valoración diferente tanto a mutaciones puntuales de resistencia como a combinaciones de éstas. Por otro lado se ha observado que en el grupo de los NNRTIs se da un mayor porcentaje de coincidencia, siendo la Nevirapina el ARV de mayor consenso.

295

MÉTODO RÁPIDO DE ANÁLISIS GENOTÍPICO DEL VIH-1 PARA LA DETECCIÓN POR SECUENCIACIÓN DE RESISTENCIAS A ANTIRRETROVIRALES

D. Gutiérrez, A. Aguilera, M.J. Iglesias, S. Novoa, A. Vela, T. Verdura, M.L. Abad y B.J. Regueiro

Centro Hospitalario Universitario Santiago de Compostela.

Objetivos: Desarrollar un método de análisis genotípico por secuenciación que acorte el tiempo de detección de resistencias del VIH-1 a fármacos antirretrovirales.

Material y métodos: Se extrajeron muestras de ARN procedentes de plasma de 37 pacientes infectados por VIH-1 con carga viral comprendida entre 50 y 750000 cp/ml. *RT-PCR:* Se realizó conjuntamente la retrotranscripción y amplificación de 2498 bp con los primers F1548 (forward) y R4046 (reverse) que abarcan todo el gen de la proteasa y retrotranscriptasa. *Nested:* Para las muestras con baja carga viral (< 500 cp/ml) se realizó una segunda amplificación de 1372 bp con los primers F2156 (forward) y R3528(reverse). *Secuenciación:* Los productos fueron secuenciados por el método químico que usa terminadores marcados. Los primer diseñados para secuenciación fueron: F2156 (forward), F2588 (forward), F3004 (forward), F3194 (forward), R4023 (reverse), R3549 (reverse), R3154 (reverse) y R2735 (reverse). Para la lectura se empleó un sistema de secuenciación automática (CEQ 2000) y los resultados fueron exportados a un programa de análisis (Sequencher). Finalmente la secuencia resultante se envió a las bases de datos de Stanford y Los Álamos para detectar las posibles resistencias.

Resultados: El método fue reproducible en 37 muestras de pacientes presentándose resistencias en 21 de ellos.

Conclusiones: Comprobamos que el método diseñado era perfectamente válido para la detección de mutaciones primarias y secundarias que confieren resistencias a antirretrovirales. Asimismo la amplia región que abarcan nuestros primers permite un mayor estudio de codones de la retrotranscriptasa hasta el momento sin relevancia.

Se consiguió una reducción del tiempo de análisis del método, comparado con el tiempo empleado en el método descrito por otros autores (Merel *et al.*, 2001), presentándose resultados de resistencias en 24 horas.

Trabajo financiado por el proyecto FIPSE 3074/99.

296

PATRÓN GENOTÍPICO BASAL EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR VIH, SIN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL PREVIO, INCLUIDOS EN UN ENSAYO PROSPECTIVO, MULTICÉNTRICO, ABIERTO, ALEATORIZADO Y COMPARATIVO ENTRE DIVERSAS PAUTAS DE TERAPIA. (ENSAYO AMADEUS-01)

A. Antela¹, J.A. Iribarren², V. de Miguel¹⁰, I. Santos³, E. Ribera⁴, P. Labarga⁵, J. González⁶, J. Locutura⁷, A. Muñoz⁸, A. Andía⁹, L. Moreno¹, M.E. Moreno¹, C. Gutiérrez¹, Y. Martín¹ y P. Martí-Belda¹

Hospitales: Ramón y Cajal¹, Aránzazu², La Princesa³, Vall d'Hebron⁴, San Millán⁵, La Paz⁶, General Yagüe⁷, Infanta Cristina⁸, Santiago Apóstol⁹ y AEC GESIDA¹⁰.

Objetivo: Determinar el patrón genotípico basal de pacientes con infección crónica por VIH, sin tratamiento antirretroviral previo.

Métodos: Se realizó secuenciación completa de los genomas de la transcriptasa inversa (TI) y de la proteasa (PRO), mediante un secuenciador PE ABI 377, en 54 pacientes con infección crónica por VIH, sin tratamiento previo, provenientes de 6 regiones distintas de España, incluidos en un ensayo prospectivo, multicéntrico, abierto, aleatorizado, que compara AZT+3TC frente a d4T+ddI, más efavirenz, nevirapina, o ritonavir/indinavir.

Resultados: La mediana de edad fue de 38 años, el 77% eran varones, el 42% ex-UDVP. Las medianas de carga viral y CD4+ fueron 4,85 log10 copias/mL y 458/μL. No se encontraron mutaciones mayores en la TI o en la PRO en ningún paciente. En 4 (7,4%) y 29 (53,7%) pacientes se hallaron mutaciones secundarias en la TI y en la PRO, y 2 (3,7%) pacientes mostraron 3 mutaciones secundarias asociadas en la PRO. Las mutaciones secundarias más frecuentes fueron V77I (27,8%), M36I (24,1%), A71V/T (9,3%), L10I (7,4%), K20R (3,7%) y V82I (3,7%). Un total de 52 pacientes han llegado a 6 meses de seguimiento, sin ningún fracaso virológico.

Conclusiones: La prevalencia de mutaciones asociadas a resistencias en nuestra serie es más baja que en estudios previos. A pesar de la presencia de mutaciones secundarias, ningún paciente ha fracasado virológicamente a los 6 meses. Estos resultados no apoyan el uso en nuestro medio de análisis genotípico de rutina en pacientes sin tratamiento previo.

297

PREVALENCIA DE MUTACIONES ASOCIADAS A MULTIRRESISTENCIA Y DE SUBTIPOS NO-B EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH-1

M. Ortiz, M.I. León, A. Bernal y A. García-Saiz

Centro Nacional de Microbiología. ISCIII, Majadahonda.

Objetivos: Estudio de las mutaciones asociadas a multirresistencia frente a inhibidores de la RT análogos de nucleósidos (NRTI) y de subtipos no B en pacientes infectados por VIH-1 en España.

Métodos: Se estudiaron 594 muestras de plasma obtenidas de pacientes infectados por VIH-1 sometidos a diferentes regímenes terapéuticos, procedentes de nueve comunidades autónomas durante el año 2001. El estudio se realizó mediante secuenciación de los genes de la proteasa y RT utilizando el método comercial HIV Genotyping System (Applied Biosystem). A partir de las secuencias obtenidas se llevó a cabo la interpretación de las mutaciones observadas según la base de datos de Stanford (<http://hiv-4.stanford.edu>). La caracterización de los subtipos no B de VIH-1 se realizó mediante el análisis filogenético de las secuencias utilizando el paquete informático Philyp v3.5.

Resultados: Se analizó la prevalencia de la mutación Q151M y de la inserción de dos aminoácidos en la posición 69

de la RT como marcadores de multiresistencias a NRTIs. En 10 pacientes se observó la mutación Q151M (1,7%) y en 6 pacientes la inserción T69S_XX (1%). En 4 de los pacientes que presentaban la mutación Q151M se observó la presencia de la mutación M184V y dos de ellas presentaban también la mutación K103N que confiere alto nivel de resistencia a efavirenz, delavirdina y nevirapina.

Se detectaron 9 (1,5%) subtipos no B de VIH-1: 2 subtipos C, 2 subtipos D, 1 subtipo G, 1 forma recombinante CRF02-AG, 1 subtipo F1, 1 subtipo D/B y 1 subtipo F/B.

Conclusiones: La prevalencia de la mutación Q151M y de la inserción T69S_XX fue del 1,7% y del 1% respectivamente. Esta prevalencia es relativamente baja, teniendo en cuenta la amplia utilización de los inhibidores de la RT análogos de nucleósidos (NRTI). La circulación de subtipos no B observada fue de un 1,5%.

298

MUTAGÉNESIS DIRIGIDAS EN EL GEN POL DEL VIH-1 EN EL PLÁSMIDO pNL4.3

M.J. Iglesias, D. Gutiérrez, A. Vela, T. Verdura, M.L. Abad, S. Novoa, A. Aguilera, M. Veiga y B.J. Regueiro

Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (C.H.U.S.).

Objetivos: Generar varias mutaciones en el gen pol del VIH-1 contenido en el plásmido pNL4.3 (NIH) con el fin de modificar las regiones de estudio para el análisis de las resistencias fenotípicas en los genes RT y PR del VIH-1.

Métodos: A partir del plásmido pNL4.3, amplificamos regiones comprendidas entre 1548bp y 5979bp, correspondientes al gen pol, con diversos primers (Expand high fidelity PCR System). Estos amplificados se clonaron en el vector TOPO TA (Invitrogen) en el que, una vez comprobadas con enzimas de restricción la orientación correcta de los insertos, realizamos cuatro mutagénesis dirigidas (Transformer Site-Directed Mutagénesis Kit -Clontech) usando diferentes primers mutagénicos y uno de selección NcoR 5'AGGCATC GC-CATATGGATCA CGAC3', fosforilados en el extremo 5'. Una vez conseguida las mutagénesis, cortamos el fragmento Apa I y Pflm I que incluye las mutaciones y lo reintroducimos en el pNL4.3, obteniendo nuevos plásmidos que denominamos pNL4.3X4624, pNL4.3X4411, pNL4.3C4254 y pNL4.3C4696.

Resultados: A partir de una preparación de alta pureza del plásmido pNL4.3 se obtuvieron productos de PCR que fueron clonados en el vector intermediario TOPO TA. Sobre estas nuevas construcciones se realizaron mutagénesis dirigidas que crearon nuevos sitios para enzimas restricción ClaI y XmaI manteniendo la secuencia de aa del gen pol (excepto en el caso de pNL4.3X4624).

Conclusiones: Los vectores obtenidos suponen una mejora en las posibilidades de análisis de resistencias fenotípicas. Ya que nos permite un estudio funcional más amplio de la RT y PR del VIH-I de los pacientes. (Fipse 3074/99).

299

RESISTENCIAS GENOTÍPICAS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA VICTORIA. MÁLAGA

I. Vicianá, J. Ruiz*, M. González*, A. Anguita, A. Rivera, E. Martín y A. Pinedo

Servicio de Microbiología y Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Málaga.*

Objetivo: Analizar la frecuencia de mutaciones primarias de VIH que confieren resistencia al tratamiento antirretroviral.

Métodos: Hemos realizado estudio de resistencias genotípicas a 62 pacientes de la Unidad de Enfermedades Infecciosas

de nuestro hospital, con fracaso virológico confirmado (carga viral VIH > 1000 cp/ml). La detección de mutaciones se obtuvo por secuenciación (Trugene TM HIV1 genotyping Kit, Visible Genetics).

Resultados: de los 62 pacientes estudiados, 55 eran hombres (88%), con una edad media de 42 años (17-60), y como factor de riesgo para contraer la infección por VIH: homosexualidad 31 (50%), ADVP 18 (29%) y heterosexual 13 (20%). En el momento del estudio la media de CD4 era 364 (3-937) y de carga viral 92315 cp/ml (1035-861000). La prevalencia de mutaciones primarias a análogos de nucleósidos (AN) fue 46,7% a 184V, 45% a 215Y/F, 30% a 41L, 8% a 69D y 3,2% a 65R, 75T y 151M. A no análogos (NAN): 29% 103N, 13% 108 I/C, 11,3% 188L/H y 8% a 106 A/I y 190A/S. La prevalencia a inhibidores de proteasa fue 35,4% 90M, 34% 46I/L, 14,5% 84V, 13% 82 A/T y 6% 30N. Ocho pacientes presentaron la secuencia wild-type. Por tanto la resistencia genotípica a 3TC, AZT, D4T, ABC, DDC y DDI fue del 60, 56, 27, 22, 11 y 10% respectivamente; a NVP, EFV y DLV del 50, 43 y 31%, y para IDV, SQV, NFV, RTV y LPV del 40, 40, 38,7, 24 y 4% respectivamente.

Conclusiones: Más de la mitad de los pacientes del estudio presentaron mutaciones primarias de resistencia a 3TC y AZT. Un tercio mostró resistencia a los tres fármacos no análogos debido a la presencia de la mutación 103N. Las mutaciones 90M y 46 I/L destacan como las más frecuentes en relación con los inhibidores de la proteasa, siendo baja la prevalencia de la mutación 30N. El 13% de pacientes no presentaron mutaciones de resistencia que implicaran pérdida de sensibilidad al tratamiento antirretroviral.

300

PREVALENCIA Y PATRONES DE RESISTENCIA GENOTÍPICA EN UNA COHORTE DE 500 PACIENTES QUE INICIARON TERAPIA ANTIRRETROVIRAL TRIPLE

M.A. García-Viejo, M.J. Pérez-Eliás, A. Moreno, I. García-Arata, E. Bermudez, V. Muñoz, C. Gutiérrez, Y. Martín, D. López y S. Moreno

Hospital Ramón y Cajal. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Madrid.

Objetivo y métodos: Cuantificar y describir la prevalencia y patrones de resistencia genotípica en pacientes con fracaso virológico (carga viral HIV-RNA > 3 log10/ml) tras un año de inicio de terapia TARGA. Se secuenciaron con éxito los genes de la retrotranscriptasa (RT) y la proteasa (PR) viral en 59 de los 67 pacientes que cumplieron los criterios de fracaso.

Resultados: El 93% de los pacientes recibieron tratamiento con IP's (66% IDV, 15% SQV, 7% NFV y 6% RTV ± SQV) y sólo 4 con NANITI (NVP = 3; EFV = 1). En el 70% de los pacientes 3TC formó parte del tratamiento inicial. La media de tiempo hasta la realización del genotipado fue de 336 días (DS 125). En un 34% de los pacientes la adherencia fue menor del 90%. El 35,5% (21 de 59) de los pacientes no presentaron mutaciones principales para los antirretrovirales, 55% presentaron mutaciones principales para los ANITI (M184V n = 23; T215Y/F n = 7; K70R n = 5; M41L n = 3, V75M n = 1; T69D n = 1), 10% para los NANITI (Y181C/Y n = 1; K103N n = 6) y 15,5% para los IP's (L90M n = 5; M46I n = 3; V82F n = 2; D30N n = 1; G48V n = 1). La media de mutaciones para el gen de la RT fue de 6,41 (DS 4,58) y de 4,85 (DS 2,5) para el de la PR y fue independiente del número de líneas de tratamiento utilizadas. El uso de 3TC se asoció de manera significativa con una menor incidencia de mutaciones en el gen de la PR, tanto en el número total de mutaciones (4,15 vs 6,44, p = 0,05) como en el número de mutaciones principales (0,12 vs 0,41, p = 0,02). Asimismo, el número de mutaciones totales para la RT fue menor en los pacientes tratados con 3TC (5,77 vs 9,11, p = 0,05).

Conclusiones: En un tercio de los pacientes con TARGA y fracaso viral no se observaron mutaciones principales para

los antirretrovirales. La prevalencia del número de mutaciones principales fue mayor en la RT. El 3TC en terapia inicial podría dificultar la aparición de mutaciones totales y principales en el gen de la TR y PR.

301

RESISTENCIA A NEVIRAPINA EN LA ERA DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE GRAN ACTIVIDAD

J.L. Casado, C. Gutiérrez, E. Bermúdez, M. Uriarte, A. Moreno, A. Antela, M.J. Pérez-Eliás, F. Dronda y S. Moreno
Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Introducción: Tras los estudios de resistencias a nevirapina en monoterapia, existen controversias sobre el tiempo, la frecuencia y la resistencia cruzada de las resistencias que aparecen durante tratamiento con nevirapina.

Métodos: Estudio de 129 pacientes incluidos en un régimen con nevirapina. En todos los casos, estudio genotípico de resistencias basales y tras fracaso.

Resultados: A la inclusión, se observaron mutaciones principales frente a los no análogos (Y181C y K103N) en 4 y 3% de pacientes. Existió una correlación estrecha entre tiempo y tratamiento y la aparición de mutaciones asociadas a resistencia ($r = 0,47$, $p = 0,01$). Sin embargo, no se observaron dichas mutaciones en los pacientes que cambiaban su tratamiento antes de 16 semanas, a pesar que solamente 7% tenían carga viral indetectable en ese momento. Después de este periodo, 38% de los pacientes que cambiaban su régimen presentaban la mutación Y181C, con independencia de la razón de cambio. En todos los casos, se observó la aparición progresiva de resistencia cruzada con efavirenz, si se continuaba el régimen con nevirapina a pesar del fracaso virológico, demostrándose una correlación entre tiempo en fracaso y aparición de la mutación K103N ($p = 0,04$). La presencia concomitante de la mutación T215Y frente AZT determinó una menor incidencia de la mutación Y181C (35 vs 55%) y consecuentemente de mayor resistencia cruzada con efavirenz.

Conclusión: La resistencia a nevirapina aparece de forma más tardía de lo descrito cuando se utiliza en un régimen eficaz, aún en presencia de replicación viral. Existe una correlación clara entre tiempo en fracaso con nevirapina y la emergencia de resistencia cruzada con efavirenz, permitiendo que un cambio precoz de fármaco no limite las opciones de tratamiento.

302

ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE MUTACIONES DEL VIH-1 A LOS ANTIRRETROVIRALES EN PACIENTES PHI EN BARCELONA

M. Arnedo, J.M. Miró, T. Pumarola, C. Gil, A. Cruceta, F. García, E. Martínez, J. Mallolas y J.M. Gatell
Hospital Clínic de Barcelona.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales (FARV) con infección aguda por el VIH en Barcelona durante los últimos 5 años (1997-2001).

Diseño: Se diagnosticaron 47 casos consecutivos ellos presentaron una serología negativa durante todo el año previo al diagnóstico de la infección. Se realizó el estudio de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales durante los 3 meses desde el inicio de los síntomas.

Métodos: El diagnóstico de la infección por VIH-1 se realizó mediante EIA (AxSYM, Abbott) y confirmación por WB (Sano-fi-Pasteur). Se utilizó el ensayo Amplicor VIH-1 Monitor TM

(Roche Diagnostics, Branchburg NJ USA) para la cuantificación de la carga viral plasmática. La detección de las mutaciones de resistencia a los FARV se realizó mediante secuenciación automática de la PR y RT del VIH-1 empleando el sistema de ViroSeq v.2 (Applied Biosystems). El fenotipo virtual de las secuencias del ARN del virus fue realizado por Virco Ink.

Resultado: 29 casos eran homosexuales, 9 heterosexuales y 9 ADVP. La PHI fue diagnosticada en 1997, 1998, 1999, 2000 y 2001 en 10, 8, 14, 5 y 10 respectivamente. La mediana de la carga viral basal en plasma fue de 356.998 cp/ml (rango 3.236-10⁶). La prevalencia de los genotipos asociados a resistencia fue de 9,1% (4 de 47 pacientes). De ellos 2,1% (1/4) presentaron mutaciones de resistencia a los ANITI, 4,7% (2/4) a los NNITI y 2,1% (1/4) a los IP. Se detectaron mutaciones de resistencia al menos a dos familias de antirretrovirales en dos casos (4,2%). Se detectó un elevado nivel de polimorfismos en la PR. En los resultados del fenotipo virtual se observó un resultado de 5 veces la IC₅₀ para la ZDV en el virus de un paciente que presentaba las mutaciones 41L y 215Y en la RT y 38 veces, 54,5 y 24,5 la IC₅₀ para la NVP, DLV y EFV respectivamente en el virus de otro paciente que presentaba la mutación 103N.

Conclusiones: Los resultados en este estudio sugieren que la determinación de mutaciones de resistencia en PHI es necesaria en casos de se inició el tratamiento.

303

RESISTENCIAS GENOTÍPICAS DEL VIH EN TERAPIA DE RESCATE

J. Ruiz, M. González, R. Palacios, I. Vicianá*, J. Santos y M. Márquez

Unidad de Enfermedades Infecciosas y Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Virgen de la Victoria. Málaga.*

Objetivo: Evaluar la eficacia virológica de una pauta terapéutica de rescate orientada por el Estudio de Resistencias Genotípicas (ERG) del VIH.

Métodos: Estudio retrospectivo, observacional, de pacientes VIH en fracaso virológico confirmado (CV-VIH > 1.000 cop/ml), atendidos en una consulta especializada. Se revisaron las historia clínica y los datos del ERG (True Gene TM HIV 1 genotyping kit, Visible genetics), desde marzo/00 a octubre /01. El tratamiento pautado orientado por el resultado del ERG se consideró eficaz si la CV descendió a < 50 cop/ml o cayó más de 1 log a las 12 semanas. En los casos con otro ERG, sólo se valoró el último. La adherencia terapéutica fue valorada por el interrogatorio del paciente. El estudio estadístico se ha realizado mediante SSPS.

Resultados: Se analizaron 52 pacientes. Edad media 43 años (29-60); sexo 45 varones (86,5%); factor riesgo: HMX 23 (44%); ADVP 13 (25%); HTX 12 (23%). En el fracaso: media de CD4 324 (3-808) y de CV-VIH 4,96 log (3,39-5,64). La media de tratamientos previos fue de 3,6 (1-8). Con 1 fracaso 14 pacientes (26,9%), 2 fracasos 29 (55,8%) y 3 o más en 9 (17,3%). El tiempo medio del tratamiento que fracasó fue de 11,9 meses (3-31) e incluía AN con IP en 21 casos (40,4%), con NAN en 23 (44%) y con ambos grupos farmacológicos en 8 (15,4%). La media de mutaciones primarias a AN fue 1,42 (0-3), a NAN 0,75 (0-4) y a IP 2 (1-3). Se cambió el tratamiento a 46 pacientes (88,5%), no se modificó en los 6 pacientes restantes. Tiempo medio de seguimiento 7,27 meses (3-18; SD: 4,1). Se obtuvo respuesta virológica mantenida en 40 pacientes (76,9%). La respuesta se asoció de forma significativa a la adherencia al tratamiento (97,6% de respuesta en los adherentes vs 0% en los no adherentes; $p < 0,0001$).

Conclusiones: La pauta de tratamiento de rescate orientada por el Estudio de Resistencias Genotípicas fue eficaz en la mayoría de los pacientes. Los fracasos se relacionaron con falta de adherencia.

304

**EVALUACIÓN DE LAS RESISTENCIAS
A ANTIRRETROVIRALES DE VIH EN PACIENTES
MULTITRATADOS**

J.M. Rodríguez, E.J. Perea, J. Vázquez y J.C. Palomares
Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla.

Objetivos: Determinar la frecuencia y secuencia de aparición de resistencia genotípica a los distintos tipos de antirretrovirales (ARVs) de VIH, y las principales mutaciones asociadas a resistencia. También, determinar la eficacia del tratamiento recibido.

Materiales y métodos: Se examinaron las secuencias del gen de la *proteasa* (*pr*) y la *retrotranscriptasa* (*rt*) del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I) en muestras de plasma sanguíneo pertenecientes a un total de 284 muestras cuyas cargas virales estaban comprendidas entre 500-10⁶ copias/ml. Todos los pacientes pertenecían a diferentes centros hospitalarios de la Comunidad Autónoma Andaluza, y en la mayoría de ellos se observó al menos un fracaso terapéutico. La secuenciación de los genes *pr* y *rt* se realizó con el sistema comercial *TRUGENE™ HIV-1 Genotyping Kit* (Visible Genetics Inc., Toronto, Canadá) y con el uso de un secuenciador automático.

Resultados: Del total de 284 muestras, el 25,7% no presentaba mutaciones relacionadas con resistencia a ningún ARV; un 14,1% no eran resistentes a ningún ARV del tratamiento, aunque presentaban mutaciones vinculadas a resistencias; y un 60,2% presentaba mutaciones que conferían resistencia a alguno de los ARVs del tratamiento. En este último grupo, las mutaciones más frecuentes fueron: L90M (15,2%) y V82A (14,6%) para IPs; M184V (58,5%) y T215Y/F (6,4%) para NRTIs; y K103N (15,2%) y G190A (10,5%) para NNRTIs. Para estos pacientes, el 43,4% de las mutaciones eran frente a NRTIs, el 34,3% era frente a IPs y el 21,5% eran frente a NNRTIs.

Conclusiones: 1) Existe un elevado porcentaje de pacientes que presentan resistencia a alguno de los ARVs del tratamiento. 2) La mutación M184V fue la más frecuente de todas las asociadas a resistencia. 3) Los NRTIs son los ARVs en los que aparecen mutaciones de resistencia con mayor frecuencia.

305

**¿EXISTEN DIFERENCIAS REGIONALES EN LA
RESISTENCIA PRIMARIA DEL VIH?. COMPARACIÓN
ENTRE DOS COMUNIDADES ESPAÑOLAS**

A. Cañizares, M. Abalde, D. Velasco, M. Cartelle, S. Tomás*, A. Guerrero** y G. E. resistencia primaria en las Comunidades Valenciana y Gallega

C.H. Juan Canalejo, A. Coruña. *Dir. Gral Salut, Valencia.

**H. de la Ribera, Alzira.

Objetivos: Comparar las tasas de resistencia (R) genotípica en pacientes VIH+ no tratados entre dos comunidades separadas geográficamente.

Métodos: Se estudiaron muestras de plasma obtenidas durante el año 1998 de 39 pacientes infectados con el VIH no tratados con fármacos antirretrovirales procedentes de la Comunidad Valenciana (CV) y 34 pacientes de la Comunidad Gallega (CG). Se determinó la carga vírica y el recuento de CD4. Se realizó la extracción del RNA vírico (QIAmp Viral RNA, Qiagen), tras una RT PCR de amplificación y una PCR de secuenciación (TruGene HIV) se determinó el genotipo (OpenGene) usando un sistema de secuenciación automático (Visible Genetics Inc.). Se consideró mutación a aquellas incluidas en el documento de consenso del Hirsch et al. (JAMA 2000, May 10; 283 (18): 2417-26) con las modificaciones propuestas por los miembros del Resistance Mutations Project Panel (Junio, 2001). Se compararon las tasas de resistencia entre ambas comunidades.

Resultados: En la CV no se detectaron mutaciones asociadas a R en la retrotranscriptasa (RT). Sin embargo, en la CG tres pacientes (8,8% de los casos) presentaron una única mutación en la RT (K70R y L74V que confieren R a los análogos de nucleósidos y L100I que la confiere a los no análogos). En cuanto a la Proteasa (P), no se detectaron mutaciones primarias en ningún paciente de ambas comunidades; en la CV 16 pacientes presentaron al menos una mutación secundaria (41%). Cuatro presentaron dos mutaciones secundarias. En la CG a 15 pacientes se les detectó al menos una mutación secundaria, (44,1%). Un paciente presentó dos mutaciones y otro, tres mutaciones. La mutación más frecuente en ambas comunidades es V77I (47,6% del total en la CV y 61,1% en la CG).

Conclusiones: Pueden existir diferencias significativas entre las tasas de resistencia entre comunidades por lo que se precisan estudios epidemiológicos periódicos regionales de resistencia a los antirretrovirales.

306

**PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES DE RESISTENCIA
EN PACIENTES VIH+ ENCARCELADOS**

O. Gallego, A. Corral, J.M. González-Lahoz y V. Soriano
Hospital Carlos III, ISC III. Madrid.

Introducción: Las mutaciones de resistencia presentes en el VIH representan uno de los mayores obstáculos para el éxito de la terapia antirretroviral. La mala adherencia conlleva la aparición de estas mutaciones en la mayoría de los casos.

Métodos: Se analizaron 309 muestras mediante secuenciación automática, n = 127 eran naive y n = 182 pre-tratados. Para comparar la posible variación en la prevalencia de los dos grupos de pacientes, la mitad de las muestras de los pacientes naive y pre-tratados fueron recogidas aleatoriamente durante el año 1999 y 2001.

Resultados: 64% (n = 197) de las muestras tenían CV > 1000 cop/ml, obteniéndose material amplificado en el 94%. Mutaciones primarias aparecieron en el 13% de pacientes naive en 1999 frente al 15% en el 2001. Por el contrario la prevalencia de mutaciones de resistencia en pre-tratados fue del 35% en 1999 frente al 59% en 2001 (p = 0,02). Por familias las prevalencias fueron en 1999, NRTI (26%) > NNRTI (21%) > IP (13%) frente a NRTI (37%) > NNRTI (33%) > IP (27%) en el año 2001. Un 20% de los pacientes tratados tenían CV indetectable en 1999 frente al 29% en el año 2001. Estos datos son menores que los obtenidos en un estudio similar desarrollado en pacientes que acuden a consulta externa hospitalaria, en el que el porcentaje de CV indetectable alcanza el 46% y el de mutaciones el 80% (Gallego et al. AIDS 2001;15:1701).

Conclusiones: La prevalencia de mutaciones de resistencia ha aumentado entre los presos en los dos últimos años (59%). Comparando con la población general, los presos tienen una mayor frecuencia de fracaso virológico y una menor frecuencia de mutaciones afectando estas a fármacos de barrera genética baja (3TC, NNRTI). Estos datos muestran la peor adherencia de estos pacientes apoyando la intervención psicológica para mejorarla. En este ámbito, deberían considerarse fármacos de barrera genética alta como primera opción terapéutica.

307

**ANÁLISIS DEL GENOTIPO Y SEROTIPO EN LA REGIÓN
V3 DEL VIH-1 EN MUESTRAS DE ORIGEN AFRICANO**

M.P. González, L. García, L. Herrero y A. García-Sáiz
CNM, ISCIII-Majadahonda. Madrid.

Objetivos: Analizar el genotipo y serotipo en la región V3 del VIH-1 de muestras de origen africano para establecer su nivel de concordancia.

Métodos: Se han estudiado 70 muestras de sangre seca sobre papel de filtro procedentes de Guinea Ecuatorial, en las que se detectaron anticuerpos frente al VIH-1. Para el estudio genético se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del ADN proviral en la región codificante de la proteína gp120, que incluye la región V3. El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 2%, se purificó y se cuantificó para su posterior utilización en la secuenciación. Las secuencias fueron alineadas mediante el programa Clustal X, analizadas filogenéticamente con el programa MEGA 2.1 y para el análisis de recombinantes se utilizó el programa SimPlot. Para el estudio de serotipado se utilizó un sistema desarrollado en el laboratorio tipo ELISA, con péptidos consenso de la región V3 de los subtipos A, B, C, D, E, F y G del grupo M además de un péptido del grupo O y otro del N.

Resultados: De las 70 muestras analizadas genéticamente, 11 se subtiparon como A, 1 como B, 7 como C, 5 como D, 2 como F, 5 como G, 2 como H y 37 se agrupaban con la forma recombinante circulante AG, aunque en la posición del lazo V3 se asociaban con el subtipo A. En las muestras clasificadas como A/AG, el 48% presentaban dos cambios de aminácido respecto al péptido utilizado (H→R y F→T), el 27% presentaban sólo uno de ellos. Todas las C tenían un cambio de Y→F y de Q→R en un 71%. Todas las D presentaban cuatro cambios (Q→K, R→G, T→I y T→A) y las F dos (L→I y Q→R). La correlación entre serotipo/genotipo es muy baja y hay un alto porcentaje de reacciones cruzadas.

Conclusiones: 1) Existe una baja correlación positiva con el serotipo. 2) Hay aminoácidos críticos en determinadas posiciones que intervienen en el patrón de reactividades.

308

EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DEL GENOTIPADO DEL VIH EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

L. Force*, P. Barrufet, R. Olea, L. Garro, I. Falcón, R. Boixeda y J.A. Capdevila

Hospital de Mataró. Barcelona.

Objetivo: Evaluar, en la práctica clínica, la utilidad del test de resistencias genotípicas, para la elección del tratamiento antirretroviral (TAR) en los enfermos infectados por el VIH con fracaso terapéutico.

Material y métodos: Se analizan los genotipados del VIH (Visible Genetics) realizados en los últimos 24 meses en una cohorte de 320 enfermos infectados por el VIH, evaluándose la indicación, la exposición previa a antirretrovirales (ART) y la eficacia del TAR de rescate establecido.

Resultados: Se han realizado 51 genotipados en 48 enfermos (16% de la cohorte, CD4 $255 \pm 179/\mu\text{l}$ y c. viral $4,4 \pm 0,6$ log). Las indicaciones más frecuentes fueron: fracaso a un primer TAR altamente activo (HAART) en el 29%, a un 2º o sucesivo HAART en el 48% y abandono de la medicación en un 19%. Estos enfermos habían experimentado previamente $6 \pm 2,5$ ART y un 67% habían iniciado el TAR en la era pre-HAART.

Las mutaciones más frecuentes fueron la T215Y, M184V, M41L, K103N, L90M, M46I y V82A. Se detectaron las siguientes tasas de resistencias: ZDV 63%, 3TC, abacavir y DDI 53%, D4T 6%, nevirapina 29%, efavirenz 25%, saquinavir 39%, nelfinavir 43%, indinavir y ritonavir 31%, amprenavir 26%. El fracaso del TAR fue por resistencia a 1 o más ART de la pauta en el 71% y en el 25% no se detectaron resistencias. La mala adherencia condicionó el fracaso de la TAR en el 58%. Los INTI más utilizados en la TAR de rescate fueron: D4T 66% y DDI 53%. En el 47% se indicaron INNTI y en el 58% IP. El seguimiento medio en 35 enfermos fue de $13,6 \pm 6$ (3-27 meses), consiguiéndose en el último control una disminución media de la c. viral de 1.4 log (< 80 copias 31% y entre 80 -1000 copias 26%).

Conclusiones: 1) El ART que presentó una menor tasa de resistencia fue el D4T y el de mayor la ZDV. 2) El D4T i el DDI fueron los INTI más utilizados para el rescate. 3) En el último control la c. viral fue < 1.000 copias en más de la mitad de los pacientes y indetectable en una tercera parte.

Sesión 15

Neumococo y Legionella

309

BACTERIEMIA POR *S. PNEUMONIAE*. ESTUDIO DE 419 CASOS

M. Sampere, B. Font, V. Pineda, D. Fontanals y F. Segura
Corporació Parc Taulí de Sabadell, Barcelona.

Objetivos: Analizar la incidencia y el origen de bacteriemia neumocócica, los serotipos aislados con más frecuencia, la resistencia a penicilina, y la mortalidad, en los pacientes con bacteriemia por *S. pneumoniae* detectados en nuestro hospital.

Material y métodos: Estudio realizado en la Corporació Parc Taulí de Sabadell, hospital de referencia con un área de influencia de 398.731 hab. Se consideran tres grupos de pacientes, los niños (< 15 años), los adultos jóvenes (15-64 años) y los adultos mayores (> 64 años). *S. pneumoniae* se identifica por procedimientos estándar, la sensibilidad antimicrobiana por microdilución en Müller Hinton y el serotipado mediante reacción capsular de Quellung.

Resultados: Se detectaron 419 bacteriemias por *S. pneumoniae* en 404 pacientes, el 62,9% de los cuales eran varones. La incidencia/100.000 hab./año fue de 13,7, 4,7 y 20 casos, en niños, adultos jóvenes y mayores, respectivamente. En ...2 años la incidencia fue de 61,7 casos/100.000 hab./año. La neumonía fue el origen de la bacteriemia en el 81,6% de adultos, mientras que en el 57,2% de niños no se encontró el origen (bacteriemia primaria). Los serotipos aislados con más frecuencia en los niños fueron el 6, 14, 18, 19, 1 y 5, en el adulto joven el 3, 8, 4, 1, 5 y 9, y en el adulto mayor el 3, 19, 14, 5, 6 y 9. El 43,8% de las cepas aisladas en niños presentaron sensibilidad disminuida a la penicilina vs. un 18,2% en los adultos jóvenes y un 32,5% en los mayores. Los serotipos que asociaron susceptibilidad disminuida a la penicilina fueron el 6, 9, 14, 19 y 23. La mortalidad global fue del 14,4%; del 1,1, 11,5 y 25,3% en los 3 grupos de edad respectivamente.

Conclusiones: La incidencia de bacteriemia neumocócica es máxima en ...2 años. El origen principal en el adulto es la infección pulmonar, mientras que en la mayoría de niños no se identifica (bacteriemia primaria). Los serotipos aislados con más frecuencia difieren en función de la edad del paciente. La resistencia a penicilina es más alta en las edades extremas de la vida. Los > 64 años son el grupo con mayor mortalidad.

310

INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS PRODUCIDAS POR *S. PNEUMONIAE*: DIMENSIÓN Y SIGNIFICADO CLÍNICO

J. García-Lechuz, A. Martín, E. Cercenado, M. Sánchez-Conde, T. Peláez y E. Bouza

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Introducción: El aislamiento de *S. pneumoniae* (*Sp*) de piel y tejidos blandos es un hallazgo inusual y muchas veces de difícil interpretación clínica. Generalmente, los casos descritos se presentan en el contexto de una infección diseminada.

Métodos: Desde enero de 1994 a diciembre de 2000 revisamos retrospectivamente las historias clínicas de todos los pacientes con aislados de *Sp* de piel y tejidos blandos. Asimismo, se estudió su sensibilidad a antimicrobianos por el método de microdilución en caldo siguiendo las normas del NCCLS.

Resultados: Durante el periodo de estudio, se aislaron un total de 1.788 *Sp*: 581 de sangre y 1.207 de otras muestras. De éstas, 57 *Sp* se aislaron de piel y tejidos blandos (3,2%). De los 57 casos no se obtuvieron datos clínicos suficientes en 14, por lo que solamente se evaluaron 43. En 16 de estos (37%) no encontramos significado clínico y los 27 restantes (17 adultos, 10 niños) fueron: una pustulosis, 2 celulitis, 7 abscesos subcutáneos, 10 infecciones de herida y 7 infecciones sobre quemadura. Las enfermedades de base fueron: 3 diabetes mellitus, 3 neoplasias, 3 VIH, 2 EPOC, 5 otras y 11 ninguna. La infección fue monomicrobiana en 8 casos y polimicrobiana en 19 (de 2 a 4 aislados). La resistencia a penicilina fue del 63% (CMI > 0,06 mg/L), a cefotaxima del 33% (CMI > 0,5 mg/L) y a eritromicina del 22% (CMI > 0,25 mg/L). La evolución clínica fue favorable en 24 casos (9 a pesar de tratamiento inadecuado) y la mortalidad del 11% (sólo en 1 caso relacionada con la infección).

Conclusiones: Los *S. pneumoniae* de piel y tejidos blandos representan el 3,2% de todos los *Sp* aislados en nuestro hospital. Sólo el 63% tienen significado clínico y generalmente presentan buena evolución.

311

ENFERMEDAD INVASIVA NEUMOCÓCICA: ESTUDIO RETROSPECTIVO DE 7 AÑOS

F. Jover, P. Roig, A. Andreu, L. Andreu, R. Tomás, R. Cañizares, V. Ortiz*, C. Martín* y J.M. Cuadrado

Hospital de San Juan. Unidad Enferm. Infecciosas. Servicios Medicina Interna y *Microbiología. San Juan, Alicante.

Objetivos: 1) Conocer las formas clínicas, morbilidad y factores asociados a la enfermedad invasiva neumocócica (EIN). 2) Estudiar las indicaciones de vacunación neumocócica en pacientes con EIN según las recomendaciones del comité asesor de vacunación de EE.UU. (ACIP, 1997).

Material y métodos: Estudio retrospectivo mediante revisión de historias clínicas de pacientes diagnosticados de EIN entre enero 1995-octubre 2001. Se identificó *S. pneumoniae* mediante los procedimientos habituales. El análisis estadístico se realizó mediante los test de Chi-cuadrado y Fischer, considerando como nivel de significación una $p < 0,05$.

Resultados: Encontramos 79 casos (76 pacientes), siendo 13 de ellos < 18 años. En los adultos, la edad media era de $58,6 \pm 18,6$ años (71% V). Hemos observado un aumento de incidencia a partir de 1998 (65%). Las principales formas clínicas fueron: neumonía (69%), bacteriemia (16,5%), meningitis (7,6%) e infección nosocomial (2,5%). Los factores de riesgo más frecuentes fueron: tabaquismo activo (40%), alcoholismo (26%), ingresos previos (22%) e infección VIH (19%). La mortalidad global fue del 14%, asociándose de forma significativa a neoplasia, elevación de bilirrubina total y los menores niveles de pCO_2 y pH sanguíneos. La tasa de resistencia a la penicilina fue del 5% y a macrólidos del 14%. En los pacientes con neumonía ($n = 55$), las formas clínicas atípicas, hepatopatía, alcoholismo, neoplasia, enfermedad neurológica grave y fiebre persistente se asociaron de forma significativa con mayor mortalidad. El patrón radiológico más frecuente fue el lobar (42%). En 65 pacientes (82%), la vacunación hubiese estado recomendada, teniendo un grado de evidencia A (67%), grado B (20%) y grado C (18%).

Conclusiones: El aumento de incidencia de EIN junto con la elevada morbilidad y la frecuente existencia de factores de riesgo en la población general hacen de la vacunación una medida de vital importancia para prevenir infecciones graves.

312

NEUMONÍA NEUMOCÓCICA CON BACTERIEMIA EN ADULTOS: ESTUDIO DESCRIPTIVO EN EL NOROESTE DE ESPAÑA

M.J. Núñez, R. Ojea, F. Lueiro, M.V. Pulian, M. Hernández, M. Núñez y J.M. de Lis

C.H. de Pontevedra y Xeral-Cies de Vigo. Pontevedra.

Objetivo: Estudio retrospectivo de una cohorte de adultos diagnosticados de neumonía neumocócica con bacteriemia (NNB).

Material y métodos: Se estudiaron 83 casos de NNB diagnosticados en el Complejo Hospitalario de Pontevedra en el periodo 1995-2000.

Resultados: Había 57 varones y 26 mujeres. La edad media era de 56 años. El diagnóstico se realizó de forma mayoritaria en los meses de invierno. Dos tercios de los casos, tenían mas de un factor predisponente, entre los que destacaban: el tabaquismo, el alcoholismo y la infección por VIH. La presentación clínica típica de neumonía neumocócica, la encontramos en el 73% de los pacientes. Había anemia en el 10%, leucopenia en el 7% y leucocitosis en la mitad de los casos. La albúmina era inferior a 3 g/dL en el 66% de los pacientes. El cálculo del índice de severidad de la neumonía (ISN) adquirida en la comunidad, encuadró a la mitad de los pacientes en el grupo de bajo riesgo (grupos I, II y III). El 31% de los neumococos aislados eran resistentes a la penicilina (66% con resistencia alta). Tras conocer el resultado de los hemocultivos, se modificó el tratamiento antibiótico, en el 11% de los casos. Hubo 8 pacientes con complicaciones y 6 precisaron ingreso en UCI. Fallecieron un total de 9 pacientes (10%). El estudio estadístico relacionó con la mortalidad: edad > 65 años, mayor grado de hipoxemia e hipercapnia, presencia de taquipnea y derrame pleural, el ingreso en UCI y una puntuación de ISN > 140.

Conclusiones: Los pacientes con NNB en nuestra área suelen ser: varones, en la 6ª década de la vida, con una presentación típica de neumonía neumocócica, y con factores de riesgo conocidos. La mitad se incluyen en el grupo de bajo riesgo de mortalidad. Los facultativos son reacios a modificar el tratamiento antibiótico, tras conocer el resultado de los hemocultivos. Se ha relacionado con la mortalidad: edad > 65 años, mayor grado de hipoxemia e hipercapnia, presencia de taquipnea y derrame pleural, el ingreso en UCI y una puntuación de ISN > 140.

313

ESTUDIO COMPARATIVO DE ENFERMEDAD INVASIVA NEUMOCÓCICA EN PACIENTES CON Y SIN INFECCIÓN POR VIH

F. Jover, P. Roig, A. Andreu, L. Andreu, R. Tomás, R. Cañizares, V. Ortiz*, C. Martín* y J.M. Cuadrado

Hospital de San Juan. Unidad Enferm. Infecciosas.

Servicios Medicina Interna y *Microbiología. San Juan, Alicante.

Objetivo: Comparar las características demográficas, clínicas, de laboratorio, microbiológicas y la evolución de pacientes seropositivos y seronegativos para infección VIH con enfermedad invasiva neumocócica (EIN).

Material y métodos: Estudio retrospectivo mediante revisión de historias clínicas de pacientes diagnosticados de EIN entre enero 1995-octubre 2001.

Resultados: Encontramos 15 casos en 13 pacientes (2 recidivas, 13%) de EIN en pacientes > 18 años con infección VIH y 51 casos en pacientes seronegativos. La edad media de los casos VIH positivos fue menor ($36 \pm 8,2$ vs $65 \pm 15,2$ años, $p = 0,029$). Las formas clínicas de presentación fueron: neumonía (80%) y bacteriemia primaria (20%). El 40% cumplían criterios de SIDA, siendo la adicción a drogas por vía parenteral (ADVP) el factor de riesgo más frecuente (87%). Otros factores de riesgo asociados para EIN fueron: tabaquismo activo (80%),

ingresos previos (53%), hepatopatía crónica (40%) y alcoholismo (13%). Dos de los pacientes habían sido vacunados previamente para el neumococo. Recibían tratamiento antirretroviral el 60% (33% HAART). La tasa de mortalidad fue del 20% ($p = \text{NS}$). El patrón radiológico predominante fue el lobar (40%). Existió resistencia a penicilina en el 6% y a sulfamidas en el 13%. Encontramos diferencias significativas (grupo seronegativo) en la presencia de hepatopatía crónica, tabaquismo activo, ADVP, esplenectomía, ingresos previos y algunos datos bioquímicos (sodio, glucosa, urea, creatinina y pH arterial).

Conclusión: Las diferencias entre ambos grupos no influyen en cuanto al pronóstico. Sin embargo, esos factores añadidos a la inmunodepresión propia del VIH hacen más firme la recomendación de vacunación. Actualmente se recomienda la revacunación a los 5 años debido a que se han comunicado algunos casos de fallo en la inmunización.

314

MORTALIDAD DE LA ENFERMEDAD INVASORA NEUMOCÓCICA

L. Iglesias, J.M. García-Arenzana, C. López-Lopategui, J.L. Díaz de Tuesta y E. Pérez-Trallero

Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián.

Objetivos: La búsqueda de información sobre complicaciones o mortalidad de la enfermedad neumocócica para valorar la relación coste-efectividad de la vacuna conjugada anti-neumocócica pone de manifiesto la escasez de datos disponibles. En este estudio se determinó la mortalidad de la enfermedad invasora neumocócica (EIN) en el Hospital Donostia (San Sebastián) en los últimos 12 años.

Métodos: Estudio retrospectivo de los episodios de EIN (aislamiento en LCR o sangre) desde enero-1989 a dic-2000. Se diferenciaron los casos de meningitis por su importancia epidemiológica. Se definió mortalidad atribuible a EIN como la muerte ocurrida durante la infección sintomática o como consecuencia de sus complicaciones en los treinta días siguientes al diagnóstico.

Resultados: Se registraron 522 episodios de EIN. Se determinó la evolución de 515 (no fue accesible la historia de 7 pacientes). La mortalidad media fue del 18,83% (97/515 episodios). No se observaron diferencias entre la mortalidad de hombres y mujeres, ni analizadas conjuntamente, ni por grupos de edad. La mortalidad según la edad fue: en < 20 años: 0% (0/100 episodios); 21-40 años: 11,7% (15/128); 41-65 años: 28,5% (38/133); y > 65 años: 26,8% (44/164). De los 522 episodios de EIN, 69 fueron de meningitis. La mortalidad media asociada a meningitis fue del 11,6% (8/69 episodios) y por edades fue: en < 20 años: 0% (0/20); 21-40 años: 5,5% (1/18); 41-65 años: 5,5% (1/18); y > 65 años: 46,15% (6/13). Un total de 27 serotipos/serogrupos diferentes causaron los episodios de EIN. El serotipo más frecuentemente aislado en episodios de exitus fue el serotipo 3, y se relacionó con 20 de los 97 episodios con desenlace fatal (20,6%).

Conclusiones: 1) no hubo mortalidad en la edad pediátrica. 2) No se hallaron diferencias en función del sexo. 3) Los grupos con mortalidad más alta fueron los de 41-65 y > 65 años (media = 27,6%).

315

MENOR RIESGO DE BACTERIEMIA EN NEUMONÍAS POR *S. PNEUMONIAE* RESISTENTE A PENICILINA

E. García, M.A. Marcos, J. Gómez, A. de Roux, J. Mensa, J.A. Martínez, F. Marco y A. Torres

H. Clínico. Barcelona.

Objetivos: Analizar el perfil de resistencia (R) a betalactámicos (BL) de las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) de etiología neumocócica y la influencia de dicha resistencia en la capacidad invasora de las cepas.

Métodos: Estudio prospectivo de pacientes diagnosticados de NAC entre octubre de 1996 y octubre de 2001 en un hospital de tercer nivel. El diagnóstico (Dx) de NAC se realizó según criterios de la ATS. El Dx de etiología neumocócica se estableció mediante aislamiento microbiológico de *S. pneumoniae* en muestras respiratorias válidas, en líquido pleural o en sangre. Se excluyeron los casos en que el Dx se realizó solamente por presencia de antígeno neumocócico en orina y los procesos de etiología polimicrobiana. Los puntos de corte de R a antibióticos se establecieron según las recomendaciones estándar de la NCCLS (M100-SII; enero 2001).

Resultados: Se evaluaron 1.490 NAC; 238 (16%) de etiología neumocócica. De las 238 cepas, 79 (33%) eran R a penicilina (P); 57 (24%) a eritromicina; y 44 (18,5%) a cefotaxima (C). El 67% de los pacientes con aislamiento de cepas R a P y el 67% de los casos con R a C pertenecían a las categorías IV-V de Fine, frente a 56% y 58%, respectivamente, de los casos debidos a cepas sensibles a P y a C ($p > 0,05$). La mortalidad de los casos con aislamiento de cepas R a P fue del 13% frente a 7,5% en las NAC debidas a cepas sensibles a P ($p = 0,2$). La mortalidad de los casos por cepas R a C fue de 13,6% frente a 8,2% en el grupo sensible a C ($p = 0,26$). Se obtuvieron hemocultivos en 228 casos, de los que 100 (44%) fueron positivos; de estos, 25 (25%) fueron por *S. pneumoniae* resistente a penicilina, frente a 48 de los 128 (37,5%) no bacteriémicos ($p = 0,04$).

Conclusiones: En nuestra serie la presencia de R a BL se asoció a mayor mortalidad y a categorías de Fine superiores, aunque de forma estadísticamente no significativa. El porcentaje de R a P entre las NAC neumocócicas bacteriémicas fue significativamente menor que entre las NAC neumocócicas no bacteriémicas.

316

CORRELACIÓN ENTRE GRAVEDAD CLÍNICA Y SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA EN PACIENTES CON NEUMONÍA NEUMOCÓCICA

R. López, A. Pérez, M. Falguera y M. García

Servicio Medicina Interna. Sección de Microbiología. Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida.

Objetivos: Estudiar la correlación entre la severidad clínica y la resistencia antibiótica en pacientes con neumonía neumocócica en nuestro medio.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de 50 pacientes con neumonía neumocócica comunitaria atendidas en nuestro centro entre enero 1996 y diciembre 2000. Todos los pacientes cumplían los siguientes criterios: 1) Cuadro clínico-radiológico compatible con el diagnóstico de neumonía. 2) Adquisición comunitaria. 3) Aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* en sangre y/o líquido pleural. La gravedad clínica ha sido determinada siguiendo los criterios establecidos por Fine (N Engl 1997). La resistencia antibiótica se determinó por microdilución en caldo (Wider® Soria Melguizo) siguiendo los criterios de NCCLS.

Resultados: Globalmente, las resistencias detectadas fueron: 12% a penicilina (10% intermedia y 2% alta), 12% a ampicilina (10% intermedia y 2% alta), 0% a cefotaxima, 2% a ciprofloxacino, 10% a eritromicina, 6% a cotrimoxazol y 2% a rifampicina. Se apreció una tendencia, aunque estadísticamente no significativa, hacia la concentración de las resistencias en los pacientes con neumonía más grave (grupos III-V de Fine) con respecto a las más leves (grupos I-II) (17% vs 0% para penicilina y 14% vs 0% para eritromicina), en cambio no se observó relación entre resistencia y sexo, edad o presencia de patología de base. Así mismo, la tasa de resistencia no fue superior entre los pacientes que fallecieron.

Conclusiones: Observamos una probable relación entre gravedad clínica inicial de la neumonía y resistencia antibacteriana en pacientes con neumonía neumocócica. Entre los pacientes con neumonía leve el porcentaje de resistencia fue muy reducido.

317

COMPARACIÓN DE LOS SEROTIPOS DE NEUMOCOCOS INVASIVOS CON LOS DE LAS VACUNAS CONJUGADAS DE 7,9,11 Y 13 SEROTIPOS

A. Gil-Setas, A. Mazón, A. Barricarte, L. Torroba, J.J. García-Irure, A. Petit y M.E. Polo

Servicio Navarro de Salud. Navarra.

Objetivo: Conocer si los serotipos de *S. pneumoniae* productores de enfermedad neumocócica invasiva en niños menores de 5 años, en Navarra, están incluidos en las vacunas anti-neumocócicas conjugadas.

Métodos: Se recogieron prospectivamente (temporada octubre de 2000-septiembre de 2001) los neumococos aislados en hemocultivos y LCR de pacientes menores de 5 años con enfermedad invasiva, en los 5 laboratorios de Microbiología del Servicio Navarro de Salud. Los aislamientos fueron serotipados en CNM del Instituto de Salud Carlos III. Se compararon los serotipos aislados con los incluidos en la vacuna heptavalente disponible y con los de las vacunas conjugadas en desarrollo de 9,11 y 13 serotipos. Se ha estudiado la cobertura potencial de las diferentes vacunas en menores de 5 y menores de 2 años de edad.

Resultados: Se aislaron 18 cepas de *S. pneumoniae*, 12 en menores de 2 años y 6 en niños de 2 a 5 años. El 33% (4), 41,7% (5), 58,3% (7) y 75% (9) de los serotipos aislados en pacientes menores de 2 años, estaban incluidos en la vacuna conjugada de 7, 9, 11 y 13 serotipos respectivamente. El 33% (6), 50% (9), 61,1% (11) y 77,7% (14) de los serotipos aislados en pacientes menores de 5 años, estaban incluidos en la vacuna de 7, 9, 11 y 13 serotipos respectivamente.

Conclusiones: La única vacuna conjugada disponible en el mercado (vacuna heptavalente), sólo contiene el 33% de los serotipos aislados durante la temporada estudiada en nuestro medio, tanto en menores de 2 como de 5 años de edad. Es preciso conocer la distribución de los serotipos de neumococos circulantes por grupos de edad, en cada área geográfica así como su evolución temporal y compararlos con los de las vacunas disponibles y en desarrollo, para instaurar medidas preventivas efectivas.

318

ANTIBIOTERAPIA EMPÍRICA INICIAL EN LA MENINGITIS NEUMOCÓCICA DEL ADULTOJ.M. Flores, R. Amaya, P. Castro, R. Rodríguez y J. Garnacho
Hospitales Virgen del Rocío, Virgen del Valme y Virgen Macarena. Sevilla.

Objetivo: Estudiar las pautas, posología y tiempo de inicio de la antibioterapia empírica inicial en las meningitis neumocócicas del adulto, analizando las sensibilidades del antibiograma y la mortalidad.

Métodos: Estudio observacional, prospectivo y multicéntrico entre enero 2000 y noviembre 2001, que incluye 19 episodios de meningitis neumocócicas en pacientes adultos. Se ha recogido la edad de los pacientes y las fechas y h del ingreso en urgencias y del inicio de la antibioterapia empírica prescrita. Se recoge la pauta y posología de dicha antibioterapia y la sensibilidad de *Streptococcus pneumoniae* a la misma según el antibiograma. Se analiza la mortalidad relacionada con el episodio de meningitis mediante la prueba exacta de Fisher.

Resultados: La mediana de edad fue de 63 años (rango 25-79) y del inicio de la antibioterapia desde el ingreso en urgencias de 05:00 h (rango 30'-11:45). Todos los casos fueron tratados con cefalosporinas de 3ª generación, siendo cefotaxima la más frecuentemente indicada (73%, 14/19). La asociación con vancomicina fue la pauta prescrita más frecuente (58%, 11/19), mientras que monoterapia se indicó en 5 casos (26%) y triple antibioterapia en los 3 restantes (15%). La

posología indicada más frecuente fue la asociación de cefotaxima 2 g IV/4 h + vancomicina 1 g IV/12 h, en 4 casos (21%). *S. pneumoniae* mostró criterios de resistencia a penicilina (CMI $\geq 0,1$ µg/ml) en 5 casos (26%) y a cefotaxima (CMI $> 0,5$ µg/ml) en un sólo caso (5,2%). La mortalidad relacionada fue del 26% (5 casos), encontrándose significativamente asociada a una edad ≥ 63 años ($p = 0,02$) y a un tiempo de inicio de la antibioterapia ≥ 5 h tras el ingreso ($p = 0,04$).

Conclusiones: Nuestros resultados muestran la existencia de una variabilidad clínica en la pauta y, principalmente, en la posología de la antibioterapia empírica inicial en las meningitis neumocócicas del adulto, y que la mortalidad se encuentra asociada a mayor edad y a mayor demora en el inicio del tratamiento.

319

MENINGITIS NEUMOCÓCICA EXPERIMENTAL PRODUCIDA POR DOS CEPAS CON DISTINTA SENSIBILIDAD A β -LACTÁMICOS

S. Ribes, A. Doménech, C. Cabellos, F. Tubau, J. Liñares, P.F. Viladrich y F. Gudiol

Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, Barcelona.

Introducción: El aumento de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a betalactámicos ha supuesto un problema en el tratamiento de las infecciones graves, como la meningitis, pero también han surgido interrogantes sobre las características de estas cepas, como su capacidad para producir infecciones graves o la actividad inflamatoria que generan.

Objetivos: A partir del modelo de meningitis neumocócica en conejo, se examinaron las posibles diferencias en determinados parámetros inflamatorios entre dos cepas de *S. pneumoniae* con distinta sensibilidad a β -lactámicos.

Métodos: Los animales se inocularon intracisternalmente. Se utilizaron dos cepas: cepa A (PEN 4 µl/ml, CRO/CTX 2 µl/ml) y cepa B (PEN 0,5-1 µl/ml, CRO/CTX 16-32 µl/ml). A las 18 h se tomó una muestra de sangre para hemocultivo y se inició el proceso de obtención de muestras de LCR en diferentes puntos horarios para el estudio de los siguientes parámetros: bacteriemia secundaria, mortalidad, títulos bacterianos, recuento de leucocitos, concentración de lactato y proteínas en LCR, edema cerebral.

Resultados: la bacteriemia fue del 80% en cepa A y del 28,6% en cepa B. La mortalidad fue del 30% en cepa A y del 85,7% en cepa B. Los recuentos bacterianos (en UFC/ml) para la cepa A fueron: $4,59 \pm 1,04$ (h 0); $4,73 \pm 1,32$ (h 2); $4,93 \pm 0,92$ (h 6) y $5,86 \pm 1,23$ (h 24); para la cepa B fueron: $3,69 \pm 0,44$ (h 0); $4,07 \pm 0,76$ (h 2); $5,38 \pm 1,02$ (h 6) y $6,24 \pm 0,86$ (h 24).

Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las dos cepas en la mortalidad, en la presencia de bacteriemia secundaria, en el número de leucocitos a la h 24, en los niveles de lactato a las h: 0,2 y 6, y en la concentración de proteínas a la h 0. El edema cerebral fue superior en la cepa B.

Conclusiones: La cepa A mostró una mayor presencia de bacteriemia y parámetros inflamatorios concordantes con los recuentos bacterianos. La cepa B presentó mayor mortalidad y actividad inflamatoria a la h 24.

320

SEROTIPOS Y RESISTENCIAS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* EN EL ÁREA DEL HOSPITAL GENERAL DE CASTELLÓN

M. Montaner*, M.D. Tirado**, R. Moreno**, F. Pardo**, S. Cuéllar*, A. García del Busto** y E. Cantón*

*Ctro. Invest. H.U. La Fe, Valencia. **Hosp. Gral. Castellón.

Objetivo: Las infecciones por *S. pneumoniae* conllevan una elevada tasa de morbilidad y mortalidad. Ante la implanta-

ción de programas de vacunación nos propusimos conocer los serotipos más frecuentes de nuestra área geográfica así como sus patrones de resistencia.

Material y métodos: Las muestras procedían tanto de pacientes hospitalizados como externos. El periodo de estudio fue de 1 año. La identificación se realizó mediante las pruebas de sensibilidad a la optoquina y solubilidad en sales biliares. Se determinaron los serotipos por la reacción de Quellung (antisueros del State Serum Institute). Las CMI a penicilina, ampicilina, cefotaxima y eritromicina fueron halladas por E-test y se aplicaron los puntos de corte del NCCLS 2000 (M7-A5).

Resultados: Se evaluaron un total de 156 *S. pneumoniae* (65,3% procedentes de niños y 34,7% de adultos). La distribución por sexos fue 36,1% hembras y 63,9% varones. El 83,0% de las muestras procedían de foco respiratorio, el 9,5% de exudados (conjuntival, ótico y de herida), el 5,4% de sangre, el 1,4% de líquidos estériles y el 0,7% de abscesos. Los serotipos más frecuentes fueron: 19 (19,9%); 6 (16,7%); 23 (14,7%); 9 (9%); 14 (9%); 3 (7%) teniendo el resto de los serotipos una frecuencia menor del 3,25% cada uno. El 62% de las cepas mostraban sensibilidad disminuida a penicilina, sin embargo, el 98,6% fueron sensibles a ampicilina y el 85,1% a cefotaxima. En el caso de eritromicina encontramos un 50% de cepas sensibles. La CMI₉₀ de penicilina, ampicilina y cefotaxima fue 1 µg/mL y la de eritromicina > 256 µg/mL. Los serotipos más resistentes a los antibióticos fueron, por orden: 14, 6, 19, 23, 9 y 3.

Conclusiones: Los serotipos más frecuentes en nuestro medio coinciden con los publicados en otras zonas de nuestro país y todos están incluidos en la vacuna polisacáridica de 23 serotipos. El porcentaje de resistencias a penicilina y eritromicina son sensiblemente superiores al resto de España.

321

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* EN PACIENTES CON NAC DEL ÁREA 2 DE MADRID

E. Escudero, A. Perkins, S. Jiménez, L. Pérez, B. Buendía y M. López-Brea

Servicio de Microbiología. H.U. La Princesa. Madrid.

Objetivos: Determinar la sensibilidad a antibióticos de distintas cepas de neumococos obtenidos de muestras diversas (esputos, BAS, LBA y hemocultivos) de pacientes del área 2 con diagnóstico de NAC.

Métodos: Se incluyen 75 cepas de *Str. Pneumoniae* aisladas de pacientes con diagnóstico de neumonía neumocócica segura, es decir, aquellos en los que se aísla neumococo en hemocultivos, líquido pleural o secreciones del TRI obtenidas por punción transtorácica, CT ($\geq 10^3$ ufc/ml) o LBA ($\geq 10^4$ ufc/ml) o de neumonía neumocócica probable (cultivo puro en esputo con clasificación de Murray-Washington G4 o superior o BAS $\geq 10^5$ ufc/ml) con antigenuria positiva para neumococo. Las 75 cepas aisladas se identificaron por sensibilidad a optoquina; se realizó la susceptibilidad por el método de dilución en agar.

Resultados: Siguiendo los criterios del NCCLS los resultados fueron:

	S	I	R
Penicilina	33 (44%)	29 (38,6%)	13 (17,5%)
Cefotaxima	49 (65,3%)	20 (26,6%)	6 (8%)
Eritromicina	50 (66,6%)	0	25 (33,3%)
Vancomicina	75 (100%)	0	0
Levofloxacino	75 (100%)	0	0
Imipenem	41 (54,6%)	22 (29,3%)	12 (16%)

Conclusiones: 1) El % de cepas resistentes a penicilina en el área 2 es mayor que los publicados a nivel nacional. 2) Pe-

nicilina sigue siendo el tratamiento de elección; para cepas intermedias se recomienda aumentar la dosis o administrar cefotaxima. 3) No se encuentra ninguna cepa resistente a vancomicina ni a levofloxacino, siendo una buena alternativa para cepas resistentes a penicilina y cefotaxima.

321 bis

PERITONITIS NEUMOCÓCICA EN PACIENTES ADULTOS. ESTUDIO DE 20 CASOS EN EL PERÍODO 1993-2001

L. Calonge, B. Almirante, V. Falcó, I. Gasser, O. del Valle, C. Pigrau y A. Pahissa

Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

Objetivo: La peritonitis primaria neumocócica es una infección poco frecuente en adultos. En el presente estudio se describen las características clínicas y la evolución de 20 pacientes con esta infección.

Pacientes y métodos: En el período comprendido entre enero de 1993 y octubre del 2001 se han identificado 20 episodios de peritonitis neumocócica. El diagnóstico se efectuó por aislamiento de *S. pneumoniae* en líquido ascítico y/o en hemocultivo en pacientes con criterios citológicos de peritonitis bacteriana espontánea. La identificación y pruebas de sensibilidad se realizaron por métodos estándar. Se consideró mortalidad atribuible la observada antes de completarse el tratamiento antibiótico.

Resultados: De los 20 pacientes, 19 tenían una cirrosis hepática. El paciente restante tenía una insuficiencia renal crónica. Los pacientes con cirrosis tenían enfermedades asociadas: infección por VIH en 4 casos, diabetes en 2, EPOC en 1 y esplenectomía en 1. Los hemocultivos fueron positivos en 9 casos (45%). En 4 pacientes la infección fue intrahospitalaria (2 con antecedentes de fibrogastroscoopia). En ningún caso se evidenció la existencia de neumonía. Únicamente 3 de los pacientes habían presentado una peritonitis previa y solamente uno de ellos realizaba profilaxis con norfloxacino. El tratamiento consistió en cefalosporinas de 3ª generación en 11 pacientes, amoxicilina clavulánico en 2 y penicilina G en 1. Cuatro pacientes no recibieron tratamiento antibiótico porque fallecieron en las primeras horas. En 7 de las 18 (39%) cepas estudiadas se detectó disminución de la sensibilidad a la penicilina. El 50% de los pacientes fallecieron durante el ingreso, 7 en la primera semana tras el diagnóstico y los 3 restantes en días posteriores a consecuencia de otras complicaciones. De los 10 supervivientes, 5 fallecieron durante el primer año y otros 2 fueron trasplantados. De los 3 pacientes restantes desconocemos la evolución.

Conclusiones: La peritonitis neumocócica del adulto es casi exclusiva de pacientes cirróticos. La mortalidad atribuible es elevada (35%).

322

INCIDENCIA Y SEROTIPOS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* INVASIVOS EN NAVARRA. OCT 2000-SEP 2001

A. Gil-Setas, A. Mazón, A. Barricarte, L. Torroba, J.J. García-Irurre, A. Petit y M.E. Polo

Servicio Navarro de Salud. Navarra.

Objetivo: Conocer la incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva y sus serotipos, en la Comunidad Foral de Navarra durante la temporada octubre 2000-septiembre 2001.

Métodos: Se recogieron prospectivamente los *S. pneumoniae* aislados en sangre y LCR de pacientes con enfermedad neumocócica invasiva en los 5 laboratorios de microbiología del Servicio Navarro Salud, que atienden a una población de 520.574 habitantes. Se serotiparon en el CNM (ISC III).

Resultados: Se aislaron 73 cepas de neumococos:

Tabla 1. Frecuencia de serotipos

Ser.	n	%	Ser.	n	%
1	10	13,7	12	2	2,7
3	13	17,8	14	7	9,6
4	5	6,8	15a	2	2,7
6a	4	5,5	15c	1	1,4
7	3	4,1	15f	1	1,4
8	4	5,5	18c	3	4,1
9v	2	2,7	19	5	6,8
10	3	4,1	23f	5	6,8
11	2	2,7	34	1	1,4

Tabla 2. Tasa de incidencia. x 100.000 habitantes

Grupos de edad	Tasa incidencia
< 2 años	138,3
2-4 años	44
5-14 años	1,9
15-24 años	3,8
25-44 años	3,8
45-64 años	15,16
≥ 65 años	30,9

Conclusiones: Los serotipos de cepas invasivas más frecuentes en nuestro medio fueron el 3, el 1 y el 14. La tasa mayor de incidencia se dio en los niños menores de 2 años, seguida de los niños de 2 a 4 años y de los adultos mayores de 65 años. El conocimiento de los serotipos circulantes en cada zona geográfica y la incidencia de enfermedad invasiva son imprescindibles para instaurar medidas preventivas efectivas.

323

SISTEMA EUROPEO DE VIGILANCIA EARSS: RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN CEPAS INVASIVAS DE *S. PNEUMONIAE* (ESPAÑA 2000)

S. Cruchaga*, J. Oteo*, J.A. Sáez*, J. Campos* y F. Baquero**, Grupo de EARSS España (ver listado)

Ctro. Nacional de Microbiología, *Instituto de Salud Carlos III. **Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

Introducción: La CE fundó en 1998 la Red Europea para el control de la resistencia a antimicrobianos (ABs) en patógenos invasivos (EARSS). Presentamos los datos de *S. pneumoniae* obtenidos en España en 2000.

Material y métodos: Participaron 33 hospitales con representación proporcional a su población de las principales regiones españolas (cobertura poblacional aproximada 9,6 millones de personas). Cada laboratorio aisló, identificó y estudió la sensibilidad con sus métodos de rutina. El control de calidad fue realizado por NEQUAS. Se rellenó un protocolo por cada aislamiento/paciente en el constaban datos clínicos, del hospital y servicio en el que se realizó el aislamiento así como de su sensibilidad.

Resultados: En 622 pacientes se aisló *S. pneumoniae* invasivo. La incidencia media fue de 7,6 casos/100.000 habitantes (IC 95% = 5,1-10,1). El 33,5% de las cepas no fueron sensibles a Penicilina (P) (24,2% intermedias (I); 9,3% resistentes (R)); el 11,9% fueron no a Cefotaxima (CTX) (10,8% I; 1,1% R); el 21,1% fueron R a Eritromicina (ERI). El % de cepas R a ERI fue del 5,21% entre las S a P, en comparación con el 48,7% que se observó en las R a P ($p < 0,001$). En los niños ≤ 4 años, el 51,7% de las cepas no fueron sensibles a P, en comparación con el 29% en pacientes > 4 años ($p < 0,001$). El 2,5% de los aislados presentó una CMI para Ciprofloxacino (CIP) > 2 mg/L.

Conclusiones: 1) La R a Penicilina de las cepas invasivas de *S. pneumoniae* en España se encuentra entre la más elevadas de la CE, de acuerdo con las bases de datos de la Red EARSS (www.earss.rivm.nl). 2) La disminución de la sensibilidad a Penicilina se asocia significativamente con la per-

didada de sensibilidad de Cefotaxima y la R a Eritromicina. 3) La R a fluorquinolonas es poco frecuente. 4) Los niños de ≤ 4 años tienen un riesgo significativamente superior que los adultos de infectarse por cepas resistentes a Penicilina, Cefotaxima y Eritromicina. 5) EARSS es una Red eficaz para la vigilancia comparada a nivel nacional y europeo de la R a ABs en patógenos invasivos.

324

SEROTIPOS Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* (ENERO 1997-JULIO 2001)

M.T. Camacho, D. Vicioso, S. Berrón, I. Jado, J. Casal y A. Fenoll
Laboratorio de Referencia de Neumococos. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.

Durante los últimos 4 años y medio se han recibido 11.166 cepas de neumococo procedentes de 113 laboratorios hospitalarios pertenecientes a 16 Comunidades autónomas. Cataluña y Madrid han sido las comunidades más representadas (34,4% y 21% de las muestras, respectivamente). Un 41% de los neumococos se aislaron de sangre, 4% de LCR, 18% de esputo, 13% de tracto respiratorio inferior, 7% de ex. conjuntival, 6,6% de ex. ótico, 3,2% de ex. nasal y un 4% de otros orígenes. En el 5,1% de los casos no se informó la edad del paciente, 2.854 fueron cepas pediátricas y 7745 se aislaron de adultos. Los principales serogrupos/serotipos (SGTs) por orden decreciente de frecuencia ha sido: 19, 6, 3, 23, 14, 9, 4, 1, 15, 18, 8, 11, y 10 que incluyen el 80% de todos los neumococos estudiados. Los 6 SGTs más frecuentes son los mismos que se aislaron en nuestro país en años anteriores. El 47,5% de los neumococos presentaron sensibilidad disminuida a la penicilina, pero sólo el 12,7% tuvieron una CMI ≥ 2 µg/ml. El 38,4% fueron resistentes a tetraciclina, 22% a cloranfenicol, 34,8% a eritromicina y 21,4% a cefotaxima (3,4% CMI ≥ 2 µg/ml). Comparando estos porcentajes con los correspondientes a los años 1990 a 1996 no se aprecia un aumento de las resistencias a los antibióticos ensayados. Como es habitual, la resistencia en los neumococos aislados de sangre o LCR es menor que la encontrada en las cepas productoras de infecciones locales (36% vs 66%), y en población adulta respecto a niños (38% vs 62%). Estas diferencias en las tasas de resistencia por origen de los aislamientos y grupos de edad son debidas fundamentalmente a la diferente distribución de serotipos en cada uno de los grupos analizados.

325

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACCIÓN COMBINADA DE BETA-LACTÁMICOS Y SISTEMA INMUNOLÓGICO FRENTE A UNA CEPA RESISTENTE DE NEUMOCOCO EN CONEJOS Y EN EL HOMBRE

J. Yuste, F. Molero, D. Tarragó, A. Fenoll y J. Casal
Laboratorio de Referencia de Neumococos. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto combinado de antibióticos beta-lactámicos y sistema inmunológico en una cepa de *S. pneumoniae* ST 6B con susceptibilidad disminuida a amoxicilina (AMX) y cefotaxima (CTX) (CMI/CMB AMX y CTX de 4/4 g/l y 2/4 g/l respectivamente). La técnica de estudio empleada fue opsonofagocitosis por muerte bacteriana que mide la presencia de anticuerpos funcionales. Con el fin de obtener suero hiperinmune, un grupo de voluntarios humanos sanos se inmunizaron con la vacuna polisacáridica 23-valente y un grupo de conejos con la cepa del estudio inactivada. Se utilizó complemento de cobayos y los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) se obtuvieron de humanos y conejos el día de los experimentos. Los antibióticos utilizados fueron AMX y CTX a la concentración de 1CMI. Se analizaron 6 tipos de curvas.

S: Bacteria + suero + complemento.

SP: Bacteria + suero + complemento + PMNs.

SA: Bacteria + suero + complemento + antibiótico 1CMI (AMX, CTX).

SAP: Bacteria + suero + complemento + antibiótico 1CMI (AMX, CTX) + PMNs.

Resultados: En los dos modelos se observa que la actividad bactericida obtenida en la asociación de antibióticos beta-lactámicos y sistema inmunológico (SAP) es mayor que la obtenida por ambos de modo independiente (S) (SP) y (SA). La actividad bactericida a lo largo del experimento se mantuvo un logaritmo por debajo en la combinación (SAP) respecto a (SA) y fue superior a 2 logaritmos por debajo, respecto a (S) y (SP) para ambos antibióticos en ambos modelos.

326

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA EN EL C.H. CARLOS HAYA

J.J. López, A. Guzmán, I. de Toro, P. Bermúdez, J. Porras y P. Manchado

Servicio de Microbiología. C.H. Carlos Haya. Málaga.

Objetivos: Analizar las características epidemiológicas, formas de presentación clínica de la enfermedad neumocócica y conocer la sensibilidad de *S. pneumoniae* a penicilina, ceftriaxona y eritromicina en los enfermos atendidos en el C.H. Carlos Haya.

Material y métodos: Estudio prospectivo de las cepas de *S. pneumoniae*, aisladas en enfermos atendidos en el C.H. Carlos Haya entre el 15/11/00 y 15/05/01. Se completó una ficha de recogida de datos en la que constaba edad y género del paciente, fecha de aislamiento de la cepa, antecedentes personales de interés, foco de infección y tipo de muestra. La CMI de penicilina y ceftriaxona se determinó mediante el método de E-test®. La sensibilidad a eritromicina se determinó mediante disco-difusión en agar. Todas las cepas aisladas se remitieron al Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, para su serotipado.

Resultados: Se incluyeron 34 pacientes, 22 varones y 12 mujeres. 8 de edad pediátrica, 14 entre 14 y 65 años y 12 enfermos mayores de 65 años.

Habían tenido un ingreso hospitalario reciente 6 de los pacientes. 8 eran fumadores, 6 alcoholicos y 3 consumían drogas ilegales inhaladas. 6 pacientes eran diabéticos y 6 padecían EPOC. Recibían tratamiento corticoideo 4 pacientes y 10 presentaban como enfermedad de base una neoplasia. 4 estaban infectados por el VIH. Las formas clínicas fueron: 21 neumonías, 3 infecciones respiratorias sin neumonía, 2 meningitis, 2 sepsis sin foco aparente, 2 peritonitis bacterianas espontáneas y 1 celulitis-angioedema, 1 quemadura sobreinfectada, 1 conjuntivitis y 1 absceso de tabique nasal. El 53% de las cepas eran sensibles a penicilina, el 97,1% a ceftriaxona y a eritromicina el 67,6%. Se aislaron 18 serotipos diferentes, siendo los más frecuentes el 6B, 3, y el 19.

Conclusiones: Varones, edades extremas y pacientes con enfermedad de base se afectan preferentemente. La forma clínica más frecuente es la respiratoria. Mayor sensibilidad a cefalosporinas de 3ª generación.

327

EPIDEMIOLOGÍA DEL *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* EN EL PONIENTE ALMERIENSE

M.T. Cabezas, M.A. Molina, M.J. Giménez, L. Martínez, P. Infante, A. Fenoll*, C. Avivar y M. Delgado

Hospital Poniente. El Ejido. Almería. *CNM-ISC III Madrid.

Objetivos: Estudio de serotipos y resistencias antimicrobianas de *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) en el área sanitaria Poniente de Almería.

Material y métodos: Durante los años 1999 a 2001 se han aislado un total de 67 cepas de *S.p.* (36 en esputo, 19 en sangre, 6 en exudado ótico, 3 en exudado conjuntival, 1 en exudado nasal, 1 en exudado faríngeo y 1 en absceso). La identificación se llevó a cabo por métodos estándares y la CMI frente a Penicilina, Eritromicina, Cefotaxima, Cloranfenicol, Tetraciclina y Vancomicina se realizó mediante E-test®. El serotipaje se llevó a cabo en el Centro Nacional de Microbiología (CNM).

Resultados: Los serotipos más frecuentes en orden decreciente son: 3 (24 - 35,8%), 6B (7 - 10,4%), 19 (6 - 8,9%), 23F (4 - 6%), 9V (3 - 4,5%), 11 (2 - 3%), 14 (2 - 3%), 22 (2 - 3%), 15A (2 - 3%), 23A (2 - 3%); con sólo 1 cepa, los serotipos 4, 8, 10, 15B, 15F, 18F, 33, 34 y 4 no testados.

Entre las cepas no invasoras destacan el serotipo 3 (20 cepas - 41,7%), 19 (6 - 12,5%) y 6B (5 - 10,4%). Entre las invasoras el serotipo 3 corresponde al 21% de todas las cepas aisladas (4/19).

En los años 1999, 2000 y 2001 se asiste a una disminución del serotipo 3 (11-8-5 respectivamente), serotipo 19 (4-1-1) y serotipo 6B (3-3-1).

El estudio de sensibilidad nos muestra 23 cepas resistentes a Eritromicina CMI ≥ 1 µg/ml (34,3%) y 8 a Penicilina CMI ≥ 2 µg/ml (11,9%), ninguno de ellos serotipo 3. Entre los serotipos 6, 9, 14, 19 y 23 el 29% eran resistentes; 7 (10,5%); 3 cepas resistentes a Cefotaxima con CMI ≥ 2 µg/ml y 10 cepas con CMI de 1 µg/ml; 14 cepas resistentes a Cloranfenicol con CMI ≥ 8 µg/ml (20,9%); 24 cepas resistentes a Tetraciclina (35,8%). Todas, sensibles a Vancomicina.

Conclusiones: Entre las cepas invasoras no hubo un serotipo predominante. Destaca la disminución del serotipo 3 desde 1999 hasta el momento actual. La resistencia media a Penicilina de los serotipo 6, 9, 14, 19 y 23 fue del 29%, menor a la descrita en otras series. La resistencia media a macrólidos se mantiene igual.

328

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES CON NEUMONÍA POR *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* EN EL BROTE DE MURCIA

A. Menasalvas, R. Blázquez, F.J. Espinosa, R. Cesteros, I. Carpena, F. Herrero y M. Segovia

Hospital J.M. Morales Meseguer. Murcia.

Objetivo: Describir las características epidemiológicas de los pacientes afectados de neumonía por *Legionella pneumophila* en el brote epidémico de Murcia.

Métodos: Se recogieron de forma prospectiva según un protocolo de recogida de datos previamente preestablecido las características epidemiológicas de los pacientes atendidos de neumonía por *L. pneumophila* en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital J.M. Morales Meseguer de Murcia durante la epidemia de julio de 2001.

Resultados: Entre el 28 de junio y el 24 de julio se atendieron en nuestra unidad 110 pacientes diagnosticados de neumonía. En 75 casos se obtuvo el diagnóstico de certeza de neumonía por *L. pneumophila*. La edad media de los pacientes fue de $56,8 \pm 2,9$ años (rango 20-90). Dos pacientes tenían menos de 30 años, 24 (32%) entre 30 y 50 años, 32 (42,6%) entre 51 y 70 años y 17 pacientes eran mayores de 70 años. El 75% de los pacientes eran hombres. Sólo el 32% tenía alguna enfermedad de base: 22,6% diabetes mellitus, 13,3% cardiopatía, 9,3% EPOC, 6,6% inmunodepresión, 5,3% hepatopatía, 5,3% insuficiencia renal y % infección VIH. El 54,6% eran fumadores activos y el 17,3% reconocía un consumo elevado de alcohol. Sesenta y tres pacientes (84%) fueron ingresados en el hospital, con una estancia media hospitalaria de 4,7 días. Según la clasificación pronóstica de FINE, los pacientes se agruparon en: grupo I 22 (29,3%), grupo II 19 (25,3%), grupo III 17 (22,6%), grupo IV 15 (20%) y grupo V 2 (2,6%).

Conclusiones: La neumonía por *Legionella* afecta preferentemente a hombres de edad media, siendo excepcional en pacientes menores de 30 años. La mayoría de los pacientes atendidos no presentaron criterios pronósticos de gravedad.

329

NEUMONÍA POR *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*: EFICACIA DEL TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO EN UN BROTE EPIDÉMICO

F.J. Espinosa, R. Blázquez, I. Carpena, A. Menasalvas, R. Cesteros, M. Segovia y F. Herrero

Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario J.M. Morales Meseguer. Murcia.

Objetivo: Describir el tratamiento y la respuesta al mismo en pacientes con neumonía por *L. pneumophila*.

Método: La serie está integrada por los pacientes con un diagnóstico definitivo de neumonía por *L. pneumophila* (antigenuria positiva o seroconversión) que fueron atendidos en la Unidad de Enfermedades Infecciosas durante la epidemia de Murcia (julio/2001). Se describen las pautas de tratamiento usadas, se valora su eficacia y se comparan.

Resultados: Tratamos 75 pacientes que separamos en dos grupos. Grupo I: 62 pacientes tratados con levofloxacino, divididos en tres subgrupos: Ia: levofloxacino iv 500 mg/12 h + rifampicina 600 mg/12 h v.o., durante 2,4 días, seguido de levofloxacino 500 mg/día v.o. hasta completar 14 días; Ib: igual que "Ia" pero sin rifampicina; Ic: levofloxacino 500 mg v.o./24 h, 13,2 días. Grupo II: 13 pacientes tratados con macrólidos: 3 con claritromicina (500 mg/12 h; duración media 12,1 días) y 10 con azitromicina (500 mg/24 h; duración media 8,9 días). Según la clasificación pronóstica de Fine los pacientes del grupo I tenían mayor riesgo de mortalidad a corto plazo. Así, en el grupo I (clase/nº pacientes): I = 14, II = 16, III = 15, IV = 15 y V = 2; en el grupo II: I = 8, II = 3, III = 2 (p 0,04). Los pacientes del grupo I tuvieron mayor incidencia de insuficiencia respiratoria (30% vs 0%; p 0,01), mayor edad (58,3 vs 49,9 años; p 0,002), mayor afectación radiológica (p 0,004). Todos los pacientes se curaron sin secuelas. Ningún paciente falleció. La duración de la tos, de la expectoración y del dolor torácico fue significativamente menor en el grupo I, pero no la defervescencia (2,5 días). No hubo diferencias entre los subgrupos tratados con levofloxacino.

Conclusiones: Todos los pacientes evolucionaron a la curación. El grupo tratado con levofloxacino, en comparación al tratado con macrólidos, tuvo una mejoría sintomática más precoz, a pesar de su mayor gravedad. La utilización inicial de levofloxacino por vía i.v. a dosis de 1 g/día ± rifampicina, no mejoró la respuesta clínica respecto a levofloxacino oral a dosis de 500 mg/día.

330

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 48 CASOS DE NEUMONÍA POR *LEGIONELLA*: EL BROTE EPIDÉMICO DE LA BARCELONETA

C. Jericó*, X. Nogués*, M. Mariñosa*, M.J. Santos**, X. Sanz*, J.M. Garcés* y M. Félez**

Servicios de *M. Interna y **Neumología. Hospital del Mar. Barcelona.

Objetivo: En noviembre de 2000 se produjo en el barrio de la Barceloneta de Barcelona un brote epidémico de neumonía comunitaria por *Legionella*. Se describen las características generales, clínicas y de laboratorio de los 48 casos que se diagnosticaron en el Hospital del Mar.

Métodos: Todos los casos fueron confirmados mediante cultivo, antígeno urinario o serología. Se revisaron en las historias clínicas los factores predisponentes (edad avanzada, ta-

baco, alcohol y patología de base), y los datos clínicos y analíticos más relevantes. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete SPSS 10.0.

Resultados: La incidencia por sexos fue de 64,6% varones y 35,4% mujeres. La edad media fue de 67,8 años (intervalo 38-93). El 49% de los casos eran fumadores, y en un 21% el consumo de alcohol era > 30 g/día. Las patologías de base más prevalentes fueron diabetes (39,6%), EPOC (27,1%) y cardiopatía (18,7%). 10 de los casos tenían dos o más enfermedades de base, mientras que 12 no presentaban ninguna. Los 7 pacientes que ingresaron en UCI tenían 2 o más factores predisponentes, mientras que sólo 1 de los 3 no ingresados tenía patología de base. La sintomatología predominante era la respiratoria (81%). 12 (25%) de los pacientes presentaban síntomas gastrointestinales y 14 (29%) clínica neurológica. Los hallazgos clínicos más frecuentes fueron fiebre (> 38 °C) y tos con un 81% y 71% respectivamente. A nivel analítico destacaba elevación de transaminasas (70%), hiponatremia (56%) y leucocitosis (43,7%). El único dato analítico distintivo en los pacientes ingresados en UCI con respecto al resto fueron los niveles de transaminasas superiores (p < 0,005).

Conclusiones: Destaca en esta serie el menor consumo de tabaco y alcohol, y la elevada prevalencia de diabetes. La presencia de varias patologías de base parece ser un factor agravante. No se aprecian diferencias clínicas ni analíticas con respecto a otros brotes epidémicos.

331

BAJA MORTALIDAD EN UN BROTE DE NEUMONÍA COMUNITARIA POR *LEGIONELLA*: FACTORES CONDICIONANTES

C. Jericó, M. Mariñosa, M.J. Santos*, M. Payés, J. Mercadal, M. Félez* y X. Nogués

Servicios de M. Interna y *Neumología. Hospital del Mar. Barcelona.

Objetivo: Descripción de los casos de neumonía grave y la mortalidad asociada entre los 48 pacientes con neumonía comunitaria por *Legionella* diagnosticados en el Hospital del Mar, incluidos en los 54 casos del brote registrado en noviembre de 2000 en un barrio de Barcelona (la Barceloneta).

Métodos: Se seleccionaron los pacientes con neumonía por *Legionella* que presentaban factores de gravedad (insuficiencia respiratoria, definida como $pO_2 < 60$ mmHg en aire ambiente, la afectación de 2 o más lóbulos en la Rx de tórax o progresión radiológica del infiltrado a pesar del tratamiento antibiótico). Se analizó, mediante la revisión sistemática de las historias clínicas, la evolución clínica completa de todos los casos de legionelosis y las causas de éxitos en el caso de producirse.

Resultados: Se hallaron 26 casos (54%) con al menos uno de los criterios de gravedad. 7 pacientes (14,6%) ingresaron en UCI por precisar soporte ventilatorio (3 ventilación no invasiva y 4 ventilación mecánica). La evolución de la neumonía fue favorable, excepto en 2 pacientes que fallecieron (4,1%). Ambos habían precisado ventilación mecánica. La causa de muerte del primero fue fallo multiorgánico en el contexto de neumonía extrahospitalaria grave, conociéndose postmortem el diagnóstico de legionelosis por cultivo positivo. El segundo, tras resolución de la neumonía por *Legionella* y 2 meses de evolución tórpida en UCI, falleció por sepsis por *Pseudomonas*. La estancia media de los pacientes con factores de gravedad fue de 18,2 ± 14 días mientras que en el resto fue de 8,7 ± 6,7 días (p = 0,023).

Conclusiones: El número de casos con neumonía grave es similar a los de otras series de legionelosis comunitaria. Cabe destacar la baja mortalidad (4,1%), muy inferior en relación a otros brotes. El diagnóstico precoz mediante detección de antígeno en orina y la rápida instauración de la antibio-

terapia adecuada (claritromicina en el 87,5% de los casos), se han considerado como coadyuvantes para la reducida mortalidad.

332

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON NEUMONÍA POR *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* Y ANTIGENURIA POSITIVA

R. Blázquez, A. Menasalvas, F.J. Espinosa, I. Carpena, R. Cesteros, C. Martínez-Toldos y M. Segovia
S. Microbiología-Unidad Enf. Infecciosas. Hosp. J.M. Morales Meseguer. Murcia.

Objetivo: Valorar las características diferenciales de los pacientes diagnosticados de neumonía por *Legionella pneumophila* con detección de antigenuria positiva en comparación con el grupo de pacientes con antigenuria negativa.

Métodos: Se recogieron de forma prospectiva los pacientes atendidos de neumonía por *L. pneumophila* en la Unidad de Enfermedades Infecciosas durante el mes de julio de 2001. El protocolo de recogida de datos incluía las características epidemiológicas, las manifestaciones clínicas, la exploración física, los exámenes complementarios realizados, el tratamiento y la evolución. Se realizó la detección de antígeno en orina de *L. pneumophila* mediante inmunoanálisis (Biotest Legionella Urin Antigen EIA).

Resultados: De los 110 pacientes atendidos, en 75 se alcanzó el diagnóstico de certeza (seroconversión y/o determinación de antígeno en orina positivo) de neumonía por *L. pneumophila*. En 42 (56%) pacientes la detección de antígeno en orina fue positiva. Al comparar estos pacientes con los que presentaron antigenuria negativa no se encontraron diferencias clínicas significativas salvo por la mayor duración de la fiebre (6,8 días vs 5,3 p 0,02) mayor frecuencia de tos (74% vs 51,5%, p 0,04) y diarrea (28,5% vs 6%, p 0,01) en el grupo de pacientes con antigenuria positiva. En la exploración física destacaba el hallazgo de una mayor proporción de pacientes con crepitantes en la auscultación pulmonar (74% vs 48%, p 0,02) a pesar de no encontrar diferencias en las manifestaciones radiológicas. Los pacientes con antigenuria positiva presentaron significativamente mayor número de criterios de gravedad definidos por los grupos IV-V de la escala de FINE (31% vs 13%, p 0,05) y la presencia de insuficiencia respiratoria (40% vs 10%, p 0,005).

Conclusiones: Los pacientes con neumonía por *L. pneumophila* y detección de antígeno positivo en orina presentan un síndrome febril más prolongado y un cuadro clínico más grave que aquellos con detección negativa.

Sesión 16

Beta-lactamasas

333

UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE DISCOS PRÓXIMOS EN LA DETECCIÓN DE BLEA ASOCIADAS A OTRAS RESISTENCIAS

E. Varela, M.V. Martino, P. Ordóñez, D. Peñalver, M. Treviño y C. García-Riestra
Servicio de Microbiología. C.H.U. de Santiago de Compostela.

Introducción: El incremento de enterobacterias productoras de Bleas obliga a su detección por los laboratorios de Microbiología, tanto por sus implicaciones epidemiológicas co-

mo terapéuticas. En los últimos años, se ha tratado de poner a punto técnicas fáciles y asequibles. Sistemas automáticos, como el Vitek2 y su programa *experto* alertan ante un perfil de resistencias inusual. Un problema, observado con cierta frecuencia en nuestro hospital, surge cuando se asocian otros mecanismos de resistencias que enmascaran la Blea, como por ejemplo la impermeabilidad, alterando el patrón típico esperado.

Material y métodos: Aquellas cepas que presentaban CMI disminuidas o un patrón de resistencia típico, se sometieron a la prueba de sinergia de doble disco, con discos de cefotaxima, ceftazidima, cefepime, cepodoxima y aztreonam próximos a un disco de amoxi/clavulánico (AC). Esta técnica se realiza por duplicado, con una única diferencia, la distancia entre los discos fue 3 cm en una prueba y 1,5 cm en la otra. En total se estudiaron 142 *E. coli* y 23 *Klebsiella* spp. productoras de Bleas.

Resultados y conclusiones: *E. coli* (2,6%) y *Klebsiella* spp (3,14%) eran productoras de Blea, de las que 38 *E. coli* y 13 *Klebsiella* spp. se asociaban con resistencias a clavulánico. En estas últimas cepas, el incremento del halo en los discos de cefalosporinas no se detectó cuando la distancia entre ellos era 3 cm. Mientras que se encontraban signos de sinergia cuando los discos estaban situados a 1,5 cm. De no haber hecho por duplicado este test, en 51 cepas (28,3%) habría pasado desapercibida la presencia de BLEA.

334

PROYECTO GEIH-BLEE 2000: RELACIÓN CLONAL Y ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE INTERÉS CLÍNICO EN *E. COLI* PRODUCTOR DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN HOSPITALES ESPAÑOLES

J.R. Hernández, L. Martínez Martínez, R. Cantón, L. Romero, A. Pascual y GEIH (Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria) HUV Macarena. Sevilla.

Objetivos: Estudiar la relación clonal y determinar la sensibilidad a antimicrobianos de interés clínico de 170 cepas de *E. coli* productores de BLEEs, aisladas en el estudio BLEE-GEIH.

Material y métodos: Se estudiaron 170 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de muestras clínicas entre marzo y junio de 2000, procedentes de 40 hospitales españoles.

Se realizó REP-PCR de todas las cepas utilizando el cebador REP-1. Las bandas obtenidas se analizaron en geles de agarosa al 2%. Se consideraron patrones distintos aquellos que tuvieran dos o más bandas diferentes. La producción de BLEE se consideró positiva cuando las CMIs de cefotaxima, ceftazidima y/o aztreonam disminuyeron 8 o más veces en presencia de ácido clavulánico (4 µg/ml).

Se determinó la CMI mediante microdilución en caldo (normas NCCLS) de los siguientes antibióticos: amikacina (AK), gentamicina (GN), ciprofloxacino (CIP), cotrimoxazol (SxT), imipenem (IMP), meropenem (MPM), cefoxitina (FOX), piperacilina-tazobactam (PTZ) y amoxicilina-clavulánico (AMC).

Resultados: Se obtuvieron 114 patrones diferentes de REP-PCR. Las CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron las siguientes: AK: 2 y 16; GN: 1 y 128; CIP: 8 y 128; SxT: 304 y > 608; IMP: 0,125 y 0,25; MPM: ≤ 0,06 y ≤ 0,06; PTZ: 2 y 256; FOX: 4 y 32; AMC: 16 y 64. Los porcentajes de cepas sensibles a estos antimicrobianos fueron: AK: 92%; GN: 65%; CIP: 37%; SxT: 38%; IMP: 100%; MPM: 100%; FOX: 75%; PTZ: 77% y AMC: 40%.

Conclusiones: Existe una gran variabilidad genética en nuestro país entre los *E. coli* productores de BLEE. Las mayores frecuencias de cepas sensibles se obtuvieron con las carbapenemas (100%) seguidas de AK, PTZ, FOX, GN, AMC, SxT y CIP.

335

PROYECTO GEIH-BLEE 2000: RELACIÓN CLONAL Y ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE INTERÉS CLÍNICO EN *K. PNEUMONIAE* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN HOSPITALES ESPAÑOLES

J.R. Hernández, L. Martínez Martínez, R. Cantón, L. Romero, A. Pascual y GEIH (Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria) HUV Macarena. Sevilla.

Objetivos: Estudiar la relación clonal y determinar la sensibilidad a antimicrobianos de interés clínico de 70 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEEs, aisladas en el estudio BLEE-GEIH.

Material y métodos: Se estudiaron 70 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de muestras clínicas entre marzo y junio de 2000, procedentes de 40 hospitales españoles.

Se realizó REP-PCR de todas las cepas utilizando el cebador REP-1. Las bandas obtenidas se analizaron en geles de agarosa al 2%. Se consideraron patrones distintos aquellos que tuvieran dos o más bandas diferentes. La producción de BLEE se consideró positiva cuando las CMI de cefotaxima, ceftazidima y/o aztreonam disminuyeron 8 o más veces en presencia de ácido clavulánico (4 µg/ml).

Se determinó la CMI mediante microdilución en caldo (normas NCCLS) de los siguientes antimicrobianos: amikacina (AK), gentamicina (GN), ciprofloxacino (CIP), cotrimoxazol (SxT), imipenem (IMP), meropenem (MPM), cefoxitina (FOX), piperacilina-tazobactam (PTZ) y amoxicilina-clavulánico (AMC).

Resultados: Se obtuvieron 19 patrones diferentes de REP-PCR.

Las CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron las siguientes: AK: 1 y 8; GN: 32 y > 128; CIP: 0,25 y 2; SxT: 19 y 608; IMP: 0,25 y 0,5; MPM: <=0,6 y <=0,6; PTZ: 4 y > 1024; FOX: 4 y 16; AMC: 16 y 64. Los porcentajes de cepas sensibles a estos antimicrobianos fueron: AK: 90%; GN: 33%; CIP: 86%; SxT: 51%; IMP: 100%; MPM: 100%; FOX: 87%; PTZ: 64% y AMC: 24%.

Conclusiones: Existe una moderada variabilidad genética en nuestro país entre las *K. pneumoniae* productoras de BLEE.

Las mayores frecuencias de cepas sensibles se obtuvieron con las carbapenemas (100%) seguidas de AK, FOX, CIP, PTZ, SxT, GN y AMC.

336

EVOLUCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *E. COLI* PRODUCTOR DE β-LACTAMASAS DE ESPECTRO AMPLIADO EN LOS HH.UU. V. DEL ROCÍO

M. Ruiz, A.C. Llanos, L. A. Arroyo y J. Aznar
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

Objetivo: determinar el número de aislamientos de *Escherichia coli* productor de β-lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y su distribución en los H.H.U.U. Virgen del Rocío en los últimos cuatro años (1998-15 noviembre 2001).

Métodos: la identificación y pruebas de sensibilidad se realizó mediante el sistema automatizado MicroScan® (Dade-Berhing); la comprobación de resultados mediante el cociente entre las CMI de ceftazidima y ceftazidima/ácido clavulánico obtenidas con el método de difusión E-test® (valor ≥ 8).

Resultados: De un total de 8.562 aislamientos de *E. coli*, 134 (1,5%) fueron productores de BLEA. La distribución por hospitales y años se muestra en la tabla 1. Asimismo, se estudió la distribución por servicios, encontrándose la mayor tasa de aislamientos en el servicio de cirugía (9,7%) y la U.C.I. (7,4%) del Hospital General.

Años	H. General		H.R.T.		H. Infantil	
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> BLEA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> BLEA	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> BLEA
1998	1531	8 (0,5%)	413	3 (0,7%)	945	8 (0,8%)
1999	1068	7 (0,6%)	360	1 (0,2%)	624	10 (1,6%)
2000	1032	34 (3,3%)	338	13 (3,8%)	600	10 (1,6%)
2001	855	30 (3,5%)	271	5 (1,8%)	525	5 (0,9%)

(Enero-15 Nov)

H.R.T.: Hospital de Rehabilitación y Traumatología.

Conclusiones: a) El número de cepas aisladas en el Hospital General está aumentando de forma significativa ($p < 0,01$) en los 2 últimos años; b) Hay diferencia significativa ($p < 0,01$) entre los aislamientos de la población adulta y de la población infantil durante el año 2001; c) La tasa máxima de aislamientos fue en el año 2000.

337

RELACIÓN CLONAL Y DEMOGRAFÍA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN EL PERÍODO 1995-2001 EN EL ÁREA NORTE DE SEVILLA

L. Romero, A. Pascual, L. Martínez Martínez, J.R. Hernández, M.D. Navarro y J. Rodríguez Baño
Hospital Universitario Virgen Macarena.

Objetivos: Estudiar la variabilidad en los patrones genotípicos de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas en el área hospitalaria Virgen Macarena (Sevilla), y analizar los datos demográficos correspondientes a estas cepas.

Material: Se han evaluado 224 cepas aisladas de muestras clínicas. Se realizó REP-PCR a 120 cepas de *E. coli* y a 104 cepas de *K. pneumoniae*. Se utilizó el cebador REP-1 y se analizó el patrón de bandas de ADN en un gel de agarosa al 1,5%.

Resultados: Se obtuvieron 94 patrones distintos de REP-PCR en las cepas de *E. coli* y 3 patrones en las cepas de *K. pneumoniae*. Las frecuencias de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE (cepas BLEE (+)/cepas totales) en nuestra área hospitalaria fue: 0,04% y 5,17% (1996), 0,15% y 6,49% (1997), 0,05% y 2,54% (1998), 0,39% y 0,20% (1999), 1,48% y 1,66% (2000) y 2,16% y 1,93% (2001). El 69% de las cepas eran intrahospitalarias y el 31% extrahospitalarias. No hubo diferencias en la distribución de cepas por sexos. La edad media fue de 67 años (rango < 1 año-99 años). Las muestras clínicas de donde se aislaron cepas BLEE (+) con más frecuencia fueron orina (55%) y exudado de herida (19%). El 31% de las muestras eran extrahospitalarias, el 42% de Medicina Interna (MI), el 11% de UCI y el 16% de especialidades médico quirúrgicas.

Conclusión: Existe gran variabilidad genotípica en las cepas de *E. coli* y gran uniformidad en las de *K. pneumoniae*. La frecuencia de *E. coli* con BLEE ha ido aumentando en los años de estudio mientras que ha disminuido la de *K. pneumoniae*. La mayoría de las cepas BLEE (+) se aíslan en orina y proceden de Medicina Interna. Un 30% de las cepas fueron de origen extrahospitalario.

338

IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

J. Romero, F.J. Escabias, E. Manrique, M. García, M.L. García, J. Rodríguez Granger, C. Miranda y M. de la Rosa
Servicio de Microbiología. H.U. Virgen de las Nieves. Granada.

Objetivos: Conocer la procedencia de enterobacterias productoras de BLEE así como la importancia de su identifica-

ción para la modificación del informe de susceptibilidad antimicrobiana.

Métodos: La identificación y la susceptibilidad se realizó por sistema comercial (WIDER). La presencia de BLEE se sospechó (según las recomendaciones del NCCLS) en los casos de CMI de Cefotaxima o Ceftazidima ≥ 2 y se comprobó con las tiras de E-test ESBL y mediante difusión en agar con doble disco.

Resultados: Desde julio 2000 a octubre de 2001, se han aislado 18 cepas de enterobacterias productoras de BLEE. Todas se identificaron como *E. coli*. Las muestras de las que se aislaron fueron: sangre 4, exudado de herida 6, líquido peritoneal 3, aspirado traqueal 2, exudado vaginal 1, orina 1 y catéter arterial 1. Los servicios de los que procedían fueron: Cirugía 5, UCI 3, Digestivo 2, Medicina Interna 2, Nefrología 2, Hematología 1, Urología 1, Obstetricia 1 y 1 Consulta externa. Según los puntos de corte del NCCLS (Sensible: CMI ≤ 8) 5/18 cepas (27,7%) se categorizaron como sensibles a cefotaxima, 10/18 (55,5%) como sensibles a ceftazidima, y 8/16 (50,0%) como sensibles a Cefepime. Tuvimos acceso a las historias clínicas de 7 pacientes, 6 de ellos, habían sido sometidos a intervenciones quirúrgicas y habían sido tratados, previamente al aislamiento, con múltiples antibióticos entre los que se incluían cefalosporinas de 2ª y 3ª generación. Cinco pacientes estaban tratados en el momento del aislamiento con este grupo de antimicrobianos.

Conclusiones: Un alto porcentaje de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE se hubieran considerado sensibles a alguna cefalosporina de 3ª generación de no haber realizado estudios de detección de BLEE. Los aislamientos de *E. coli* productor de BLEE en nuestro hospital corresponden principalmente a pacientes multitratados, sobre todo con cefalosporinas de 2ª y 3ª generación.

339

DETECCIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN *E. COLI* Y *K. PNEUMONIAE* DE ORIGEN HOSPITALARIO Y AMBULATORIO

A. Fleites, P. Venero, I. Cahue, G. Sierra, M. del Castillo y M.J. Santos

Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospital Central de Asturias (Hospital General). Oviedo.

Objetivos: Determinar la frecuencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestras clínicas procedentes de un hospital general (H) y 31 centros de atención primaria (A).

Métodos: De enero-2000 a octubre-2001 se estudió la sensibilidad, por microdilución (Sensititre), de 2.752 cepas consecutivas de *E. coli* (1820 H y 932 A) y 219 de *K. pneumoniae* (136 H y 83 A) aisladas en 2057 y 196 pacientes respectivamente. Se usaron, como métodos de cribado inicial sistemático, valores de CMI > 1 $\mu\text{g/ml}$ para cefotaxima y ceftazidima y el test de sinergia de doble difusión con discos. La confirmación fenotípica se realizó por difusión con discos de cefotaxima y ceftazidima con y sin clavulánico (NCCLS M100-S9) y tiras de Etest ESBL con los mismos antimicrobianos.

Resultados: No se determinó ninguna cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE y se detectaron 25 cepas de *E. coli* en 25 pacientes adultos (19 mujeres y 6 varones). En A, se obtuvieron 8 cepas que representaron el 0,85% de los aislados, 0,87% de los urocultivos por *E. coli* y 0,99% de los pacientes. En H, se detectaron 17, siendo el 0,93% de los aislados y el 1,3% de los pacientes; las muestras fueron: 11 (0,79%) en orinas, 2 en sangre y 4 en otras; los servicios: urología 4, nefrología 3, UVI 3, medicina interna 2, oncología 2 y 3 en otros. El rango de CMI para cefotaxima fue de 4- >16 $\mu\text{g/ml}$ y para ceftazidima $\leq 0,5$ - >32 . Se obtuvieron 2 patrones fenotípicos: a) 20 cepas con afectación de cefotaxima y sensibilidad a ceftazidima (rango $\leq 0,5$ -2 $\mu\text{g/ml}$) b) 5 cepas que presentaron resistencia elevada (CMI ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$) a cefotaxi-

ma, ceftazidima, cefepima y aztreonam. Todos los aislados fueron sensibles a cefoxitina (CMI ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$).

Conclusiones: La frecuencia de *E. coli* productor de BLEE es baja. Las cepas están distribuidas en el ámbito hospitalario y en la comunidad. Debe mantenerse la vigilancia y determinar la relevancia clínica-terapéutica de estos casos.

340

INCIDENCIA DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO AMPLIADO EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE HECEs

B. Mirelis, E. Miró, L. Gómez, A. García, F. Navarro y G. Prats
Servei de Microbiologia. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

Objetivos: Conocer la incidencia y tipo de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) en las cepas de enterobacterias aisladas de las heces de pacientes de procedencia intrahospitalaria y extrahospitalaria.

Métodos: En el periodo comprendido entre febrero y mayo de 2001 se procesaron 1183 muestras de heces de pacientes con gastroenteritis para detección de enteropatógenos; 707 muestras procedían de pacientes extrahospitalarios y 476 de intrahospitalarios. Toda enterobacteria crecida en el medio CC-DA (charcoal-cefoperazone-deoxicholate agar) selectivo para *Campylobacter*, fue seleccionada mediante el test de sinergia para estudiar si era portadora de una BLEA. Se estudió la sensibilidad a 24 antimicrobianos por técnica de difusión. Las β -lactamasas se caracterizaron mediante isoelectroenfoque, PCR para la amplificación del gen implicado y secuenciación. Asimismo, se determinó el biotipo de las cepas.

Resultados: De las 1183 muestras procesadas se aisló un total de 28 cepas (2,4%) portadoras de BLEA, 27 de *E. coli* y una de *P. mirabilis*. El 2,1% (15/707) pertenecían a pacientes de la comunidad y el 2,7% (13/476) a pacientes intrahospitalarios. Las β -lactamasas detectadas fueron: CTX-M-9: 10 (35,7%), SHV-12: 3 (10,7%), CTX-M-1: 1 (3,6%), CTX-M-3: 1 (3,6%), CTX-M-9 + TEM-1: 8 (28,6%), CTX-M-15 + TEM-1: 1 (3,6%), CTX-M + TEM-1: 1 (3,6%), 2 cepas de pI de 7,6 y 8,4 respectivamente pendientes de caracterizar y 1 cepa de *P. mirabilis* con una BLEA de pI 5,4.

Conclusión: La presencia de cepas con BLEA en el tubo digestivo de pacientes con enteritis es, a pesar de las limitaciones del medio utilizado, significativamente superior a la detectada en muestras clínicas (2,4% vs 0,6%; $p < 0,05$); no mostrando diferencias significativas entre las cepas intrahospitalarias y extrahospitalarias ($p > 0,4$). Así pues, la incidencia de BLEA en los pacientes extrahospitalarios es sin duda un reflejo de lo que ocurre en la comunidad, siendo la β -lactamasa más frecuentemente detectada la CTX-M-9.

341

INCIDENCIA DE CEPAS PORTADORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEEs) EN LOS HOSPITALES COMARCALES DE CATALUNYA (1996-1998)

M. Sierra¹, J. Lite², A. Gasós³, C. Ardanuy⁴ y Grupo de Microbiólogos de Hospitales Comarcales de Catalunya

¹Hospital de Barcelona SCIAS, ²Hospital Mutua de Terrassa,

³Hospital de Sant Joan de Déu, ⁴Hospital de Bellvitge.

Objetivos: Conocer la incidencia de BLEEs en las cepas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp aisladas en 13 hospitales comarcales de Catalunya. Caracterización de las BLEEs.

Material y método: Se estudiaron prospectivamente todas las cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp. aisladas en 13 hospitales durante un periodo de tres años (1996-1998). En todas ellas se efectuó un cribado para la detección

de BLEEs (método del doble disco o patrón de resistencia compatible). Las cepas con cribado positivo se remitieron a un laboratorio de referencia donde se realizó el doble disco y/o E-test-ESBL para confirmación. A las cepas consideradas BLEE positiva se efectuó el estudio de las β -lactamasas por determinación del punto isoelectrónico (una por paciente).

Resultados: Durante el periodo de estudio se aislaron 98.857 cepas de enterobacterias de las cuales 57.547 (58%) corresponden a las cepas de *E. coli*, 4.744 (4,8%) a *K. pneumoniae* y 3.601 (3,6%) a *Salmonella spp.* El 92,2% de las cepas enviadas al laboratorio de referencia se confirmaron como BLEE. El número de cepas portadoras de BLEEs fue de (No cepas/No pacientes): *E. coli* (81/74), *K. pneumoniae* (7/6) y *Salmonella spp.* (16/13), con una incidencia de 0,14%, 0,15% y 0,44% respectivamente. En el 85,4% de las cepas de *E. coli* y el 100% de las de *Salmonella spp.* se detectaron dos β -lactamasas, una de pI 5.4 compatible con TEM-1 y otra de pI \approx 7,9 compatible con una CTX-M. En *K. pneumoniae* todas las cepas presentaron β -lactamasas compatibles con la familia SHV.

Conclusiones: Se ha encontrado una baja incidencia de BLEEs en las especies de enterobacterias estudiadas. La técnica del doble disco se muestra como un método sencillo y fiable para su detección. Las BLEEs de *E. coli* y *Salmonella spp.* son preferentemente tipo CTX-M, mientras que en *K. pneumoniae* son SHV.

342

COLONIZACIÓN PERSISTENTE POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* (Kp) PRODUCTORA DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

C. Ardanuy, M.A. Domínguez, S. Merino, L. Izquierdo, J. Liñares y J.M. Tomas

Microbiología. Hospital de Bellvitge. Universidad Barcelona.

Durante un brote nosocomial causado por Kp productora de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), un paciente adquirió colonización urinaria por la cepa epidémica (dic 93). Dos meses después desarrolló infección urinaria y bacteriemia. Al alta, los cultivos de orina y sangre fueron negativos (mar 94). Desde entonces se ha detectado Kp-BLEE en 22 cultivos de orina de control durante un periodo de 4 años. Se seleccionaron 7 aislamientos: uno de sangre (feb 94) y 6 de orina (dic 93, may 95, oct 95, mar 96, dic 96 y mar 98).

Objetivos y métodos: 1) Establecer la relación clonal de los aislamientos por electroforesis en campo pulsátil (ECP) del DNA cromosómico. 2) Estudiar las BLEE por isoelectroforesis, conjugación y caracterización de la familia (TEM o SHV) por PCR. 3) Estudiar las diferentes moléculas de superficie implicadas en la colonización persistente por Kp-BLEE.

Resultados: Se encontró el mismo patrón de resistencia antibiótica en todos los aislamientos. Todas las cepas producían una BLEE de pI 8.2 transferible por conjugación, clasificada como SHV por PCR. Todas presentaron el mismo ECP, idéntico al de la cepa epidémica. El aislamiento de sangre mostró el antígeno O2a del lipopolisacárido (LPS) y el K81 de polisacárido capsular. En 2 aislamientos urinarios posteriores no se detectó el antígeno O2a LPS ni por geles ni por Western blott usando anticuerpos específicos anti-O2a. Sin embargo, se detectó la presencia del gen *wb*, que codifica la biosíntesis del antígeno O2a LPS por sonda de DNA; también se recuperó el antígeno O2a LPS de estos aislamientos cuando se hicieron crecer en suero no inmune. Los aislamientos de orina eran mucho más capsulados que el de sangre.

Conclusión: Este estudio sugiere que la colonización urinaria persistente por Kp-BLEE se relaciona con la ausencia del antígeno O2a LPS y con un incremento en la capsulación. Los aislamientos de Kp-BLEE pertenecen a un clon alta-

mente estable durante un periodo de 4 años, con una producción de BLEE estable pero con disminución de la capacidad invasiva.

343

MULTIRRESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN CEPAS DE *E. COLI* PRODUCTORAS DE BLEAS EN EL ÁREA SANITARIA DE SANTIAGO

M.V. Martino, C. García-Riestra, P. Ordoñez, E. Varela, A. Aguilera, A. G.-Zabarte y B. Regueiro
Servicio Microbiología. C.H.U. de Santiago.

Introducción: Las Bleas son enzimas codificadas por plásmidos, estos pueden además transportar otros genes que confieren resistencia a distintos grupos de antimicrobianos. También pueden confluir resistencias mediadas cromosómicamente a agentes como las quinolonas. Por último, la resistencia a β -láctamicos puede deberse a la producción de Blea simultáneamente con la hiperproducción de cefalosporinas o la disminución de la permeabilidad. Nuestro objetivo fue evaluar la asociación de resistencias que presenta *E. coli* BLEA+ en nuestra Área Sanitaria.

Material y métodos: Se estudiaron 5500 cepas de *E. coli* aisladas en los últimos 22 meses. La detección de BLEA se realizó utilizando los criterios de la NCCLS para cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam y posterior confirmación con la técnica de sinergia con doble disco descrita por Jarlier o su modificación en el caso resistencia concomitante a ácido clavulánico. Las resistencias a los otros antimicrobianos se detectaron por la CMI en Vitek2 aplicando los criterios de la NCCLS.

Resultados y conclusiones: Del total de las 5.500 cepas estudiadas 142 (2,5%) producían BLEAs (B).

En 32 (22,5%) no apareció ninguna otra resistencia. En las restantes se encontraron resistencias a fluorquinolonas (F), cotrimoxazol (C), aminglicósidos (A) y amoxi/clavulánico (X), distribuidas como sigue: B+F = 24, B+C = 19, B+X = 6, B+F+C = 12, B+F+X = 7, B+F+A = 3, B+C+A = 2, B+X+A = 2, B+F+C+X = 16, B+F+C+A = 5, B+F+X+A = 4, B+C+X+A = 1, B+F+C+X+A = 9. F total fue de 56,3% para BLEA+(B+) y del 16,4% para todos los *E. coli* (TC), C 36,6% en B+ y 25,5% en TC, X 26,8% en B+ y 12,3% en TC y A 18,3% en B+ y 6,6% en TC. Existe un porcentaje significativamente mayor de resistencias en aislamientos productores de BLEAs, lo que añade aún mayor interés epidemiológico a estas cepas.

344

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL)

M. L. López-Yeste*, M. Navía**, J. Ruiz**, J. Vila**, J. Lite* y E. Martínez*

*Servei de Microbiologia, Hospital Mútua de Terrassa;

**Servei de Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona.

Objetivo: Caracterizar las cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasa de espectro ampliado (ESBL) aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Mutua de Terrassa de enero de 2000 a marzo de 2001.

Material y métodos: La identificación al nivel de especie se realizó por técnicas convencionales. La sensibilidad a los antibióticos se estudió mediante microdilución con la tarjeta AST-N010 (VITEK-TWO, bioMérieux). La presencia de ESBL se detectó por la técnica de doble disco con amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam y por E-test de ceftazidima y ceftazidima/ácido clavulánico. Las ESBL se confirmaron y caracterizaron me-

diente PCR, estudio del punto isoelectrico (pI) y secuenciación. Para determinar si las cepas tenían o no un origen clonal, se realizó REP-PCR.

Resultados: Se aislaron 17 cepas de *Escherichia coli* productoras de ESBL (0.47% del total de cepas de *Escherichia coli* aisladas y 0.32% de las enterobacterias), seis de ellas en muestras de pacientes hospitalizados. Las cepas se aislaron en 13 muestras de orina, 3 de sangre y 1 de biopsia pleural. Diez cepas producían TEM-70, dos TEM-54, tres SHV5a y dos producían dos tipos de betalactamasa: la primera TEM-70 más SHV5a y la segunda SHV5a y una betalactamasa del grupo TEM con pI 5.2 pero que no se pudo afiliar por secuenciación.

Conclusiones: En nuestro centro la incidencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasa de espectro ampliado es baja (0.47% de *E. coli*), no habiéndose producido ningún brote epidémico. Si bien la mayoría son del tipo TEM-70 (58,8%), el estudio molecular determinó que no tenían un origen clonal.

345

PREVALENCIA Y SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *KLEBSIELLA* SPP. Y *E. COLI* PORTADORES DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO AMPLIADO

M.M.O. Pérez, M. Pérez, M. Carulla, C. Rubio, A. Jardí y J. Zaragoza

Servicio Análisis Clínicos. Hospital de Tortosa Verge de la Cinta.

Objetivo: Estimar la prevalencia de β -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado (β LPEA) de clase A en las cepas de *E. coli* y *Klebsiella* spp. aisladas en nuestro laboratorio y estudiar su perfil de sensibilidad antimicrobiana.

Material y métodos: Se analizaron los 3800 aislados de *E. coli*, 281 de *K. pneumoniae* y 173 de *K. oxytoca* recuperados en nuestro laboratorio entre junio de 1998 y septiembre de 2001. La identificación y pruebas de sensibilidad in vitro se realizaron mediante los paneles WIDER 6W, que incluyen cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CTZ) como β -lactámicos (β L) de amplio espectro y dos pocillos de CTZ + clavulánico (1/4 y 8/4 μ g/ml) destinados al cribado de β LPEA. En aquellas cepas con CMI a CTX y/o CTZ superior a 1 μ g/ml y cuya CMI a cefoxitina fue \leq 8 μ g/ml, se efectuó la prueba de doble difusión con discos para detección de β LPEA inhibidas por clavulánico.

Resultados: a) *E. coli*: La prueba de doble difusión con discos fue positiva en 38 aislados (0,84%), que correspondían a 24 cepas, sin relación epidemiológica aparente, procedentes de otros tantos pacientes (10 de ellos hospitalizados y el resto ambulatorios). Se obtuvieron CMI > 1 para CTX y CTZ en 12 cepas, sólo para CTX en 10 cepas y sólo para CTZ en otras dos. En 3 cepas la CMI de CTX y CTZ fue ≤ 8 . Las resistencias a ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB) y clotrimoxazol (CLO) fueron del 75, 17, 25 y 75%. En 19 casos (79,2%) la resistencia a β L se acompañó de resistencia a otros antimicrobianos, siendo las asociaciones más frecuentes β L+CIP+CLO y β L+CIP+CLO+ GEN+TOB. b) *Klebsiella* spp: Se detectó la presencia de β LPEA en dos cepas de *K. oxytoca* (1,15%) y una de *K. pneumoniae* (0,36%), una de ellas resistente a CIP, procedentes de un paciente hospitalizado y de dos ambulatorios. Las CMI a CTX y CTZ de las tres cepas fue > 8 y 2 μ g/ml, $< 0,12$ y 4 μ g/ml y 8 y 4 μ g/ml respectivamente.

Conclusiones: La prevalencia de β LPEA en nuestro medio es muy baja. La producción de β LPEA se asocia con frecuencia a resistencia a otros antimicrobianos. El 18,5% (5/27) de las cepas con β LPEA se mostraron sensibles a CTX y CTZ según los criterios NCCLS (CMI ≤ 8). En nuestra serie, el cribado con CTZ+clavulánico resultó de limitada utilidad, ya que no aportó ninguna información en el 41,7% de las cepas de *E. coli* que albergaban β LPEA, al tratarse de enzimas con escasa actividad frente a CTZ (CMI ≤ 1).

346

CAMBIO EPIDEMIOLÓGICO EN LAS β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO. HOSP. RAMÓN Y CAJAL (1988-2000): DE SHV A CTX-M

T.M. Coque, M.C. Varela, A. Oliver, M. Morosini, F. Baquero y R. Cantón

Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

Introducción: Desde el hallazgo de las BLEE en 1983 se han descrito diferentes familias de estas enzimas. En Europa, las de tipo SVH han sido predominantes, si bien en la actualidad comienzan a ser frecuentes nuevas variantes de tipo TEM y CTX-M.

Objetivo: Investigar la prevalencia y evolución de todos los microorganismos productores de BLEE aislados en nuestro hospital desde su aparición en 1988.

Métodos: Entre 1988 y 2000 se aislaron 150 *K. pneumoniae* (Kp), 104 *E. coli* (Ec), 24 *Salmonella* s. Othmarschen (Sa) y 15 *Enterobacter* spp. (Ent) procedentes de 58, 67, 8 y 14 pacientes, respectivamente. Para estudios de clonalidad (PFGE o AP-PCR) se seleccionó un aislado por paciente o más de uno cuando se observaron diferentes pls. La caracterización de las BLEE se realizó por pl, PCR y/o secuenciación.

Resultados: Se detectaron 97 clones (31 Kp, 57 Ec, 8 Ent y 1 Sa) correspondientes a 147 pacientes. La distribución de BLEE por clones fue: TEM-4 (5 Kp), TEM-27 (1 Ec, 1 Sa, 1 Ent), TEM-24 (1 Ent), TEM-pl = 5,9 (11 Ec), SHV-2 (12 Kp), SHV-5 (1 Kp), SHV-pl = 7,6 (8 Ec), SVH-pl 8,2 (3 Ec); CTX-M-9 (1 Kp, 23 Ec), CTX-M-10 (12 Kp, 5 Ec, 6 Ent), BLEE-pl 6,5 (1 Ec) y no determinadas (5 Ec). La prevalencia de los tipos TEM, SHV y CTX-M fue del 30%, 46% y 24% de 1987 a 1995; 28%, 18% y 53% de 1996 a 1998 y del 13%, 13% y 76% de 1999 a 2000. 72% de los clones se detectaron en un solo paciente, (n = 57/79); 13% (n = 10/79) en 2 pacientes; 6% (n = 5/79) en 3 pacientes y sólo un 9% (n = 7/79) en más de 4 pacientes. Los microorganismos productores de SHV y TEM fueron aislados frecuentemente en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos a diferencia de los productores de CTX-M.

Conclusiones: La distribución de BLEE ha cambiado drásticamente durante el periodo de estudio, siendo las de tipo CTX-M las BLEE predominante en nuestra institución. Su aislamiento en pacientes no ingresados en áreas de alto riesgo sugiere la existencia de un reservorio ambiental muy extendido responsable de múltiples introducciones en el ámbito hospitalario.

347

IDENTIFICACIÓN Y DISEMINACIÓN DE UNA β -LACTAMASA DEL TIPO CTX-M-14 EN EL NOROESTE DE ESPAÑA

G. Bou, M. Cartelle, M. Tomás, E. Gil, D. Velasco, A. Beceiro, D. Canle y A. Guerrero

Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña.

Objetivos: Caracterizar molecularmente el mecanismo de resistencia de una cepa clínica de *Escherichia coli* con alto nivel de resistencia a cefotaxima (CTX) y determinar el grado de dispersión del gen en otras cepas de enterobacterias en un área sanitaria de 516.000 habitantes.

Métodos: 25 cepas de *Escherichia coli* y 3 de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en el 2001 portadoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEA) causantes de patología infecciosa fueron seleccionadas. De entre ellas, 13 *Escherichia coli* presentaban un fenotipo de actividad cefotaximasa. La clonación del gen tipo CTX-M-14 se efectuó por técnicas de restricción-selección positiva. La detección del gen CTX-M-14 se realizó por PCR con los oligonucleótidos 5'-AACACG-

GATTGACCGTATTG y 5'-TTACAGCCCTTCGGCGAT, de la zona promotora y 3' del gen, respectivamente. Análisis de RFLPs plasmídicos, tipación por REP-PCR y determinación de pl se efectuaron por métodos convencionales. CMIs se efectuaron por E-test.

Resultados: Se clonó un gen del tipo CTX-M-14 en un plásmido de una cepa de *Escherichia coli* causante de infección urinaria. CMIs (mg/L) de un *Escherichia coli* sensible transformado con el gen CTX-M-14, Cefotaxima, 4; CTX ≥ 128 ; y Aztreonam, 64. Por técnicas de PCR, secuenciación de ADN y análisis de pl se demuestra la presencia del mismo gen en otras 12 cepas de *Escherichia coli* sin relación genética (REP-PCR). Estas cepas causaron infección en 13 pacientes procedentes de diferentes zonas geográficas de la provincia sin aparente conexión entre ellos. Casi todos ellos tuvieron ingreso hospitalario en distintas áreas y sólo 2 recibieron cefalosporinas de tercera generación previamente al aislamiento.

Conclusiones: Se ha aislado e identificado por primera vez en España un gen BLEA del tipo CTX-M-14. Este gen está ampliamente diseminado en distintas cepas clínicas de *Escherichia coli* procedentes del noroeste de España, siendo probable que sea el mecanismo de resistencia tipo BLEA más prevalente en la provincia de A Coruña.

348

CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO INTEGRÓN In60, PORTADOR DE UNA β -LACTAMASA DE ESPECTRO AMPLIADO (*bla*_{CTX-M-9})

M. Sabaté, E. Miró, F. Navarro, B. Mirelis, J. Barbé y G. Prats

Servei de Microbiologia. Hospital de Sant Pau y Dept. Genètica i Microbiologia. UAB.

Objetivos: Caracterización de un nuevo integrón compuesto de la clase 1 portador de una β -lactamasa de espectro ampliado (*bla*_{CTX-M-9}).

Métodos: A partir del plásmido pMSP071 y utilizando iniciadores correspondientes a regiones internas de In7 y de *bla*_{CTX-M-9} se han obtenido diferentes fragmentos solapados de PCR. Estos fragmentos se han clonado en el plásmido pGEM-T y se han secuenciado.

Resultados: La secuencia nucleotídica obtenida ha confirmado que *bla*_{CTX-M-9} se halla formando parte de un integrón compuesto de la clase 1, denominado In60 (número de acceso AF174129). Dicha secuencia consta de dos secuencias conservadas 5'-CS y 3'-CS entre las que se hallan dos genes casete: *aadA2* y *dfra16*; a continuación se encuentra una región que contiene el orf513, *bla*_{CTX-M-9} y una nueva secuencia de inserción IS3000. Finalmente hay una repetición de la secuencia conservada 3'-CS. Tanto *bla*_{CTX-M-9} como una región de 394 pb en su extremo 3', muestra una elevada homología con los genes cromosómicos *bla*_{KluA-1} y orf3 de *Kluyvera ascorbata* (81% y 78%, respectivamente).

Se estudió la presencia de In60 en un total de 34 enterobacterias no clonales (30 *E. coli* y cuatro *Salmonella*) portadoras de una β -lactamasa compatible con CTX-M-9, aisladas entre 1996-1999. Utilizando técnicas de PCR con iniciadores específicos pertenecientes a regiones internas de In60 se demostró que 33 de las 34 cepas presentaba el entorno de In60. La cepa restante presentaba una delección de 1.5Kb en una región interna de In60.

Conclusiones: El alto grado de identidad entre la región que incluye *bla*_{CTX-M-9} y una secuencia a 3' de éste con *bla*_{KluA-1} y orf3 de *K. ascorbata*, es indicativo de que esta región pueda proceder del genoma de *K. ascorbata*. Por otro lado, In60 comparte una organización genética similar con los otros tres integrones compuestos descritos, lo que sugiere un origen común.

El hecho de detectar el entorno de In60 en 33 de 34 enterobacterias no clonales, muestra una gran difusión de In60.

349

RESISTENCIA A CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN (C3G) EN CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* SUB. *ENTERICA* SEROVAR *INFANTIS*

L.A. Merino, M.M. Navia, J. Ruiz y J. Vila

Instituto de Medicina Regional (Argentina) y Hospital Clínic. Barcelona.

Objetivo: Estudiar la resistencia a antibióticos betalactámicos y los mecanismos involucrados en cepas de *Salmonella Infantis* aisladas de pacientes pediátricos.

Materiales y métodos: Se estudiaron 29 cepas de *Salmonella Infantis* aisladas a partir de heces de niños hospitalizados en Presidencia Roque Sáenz Peña (Argentina). La susceptibilidad antimicrobiana fue determinada mediante difusión con discos y la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) mediante la técnica de dilución en agar frente a Ampicilina (AMP), Ampicilina/sulbactama (AMS), Cefalotina (CEF), Cefoxitina (CFX), Cefotaxima (CTX) y Cefotaxidima (CAZ). Adicionalmente se probó la susceptibilidad frente a Gentamicina (GEN) y Sulfisoxazol (SUL). La detección de β -lactamasas (Blasa) se llevó a cabo mediante isoelectroenfoque (IE) y la presencia de genes codificantes de Blasa se realizó por PCR.

Resultados: Todas las cepas estudiadas fueron resistentes a AMP, CEF y AMS, y sensibles a CFX. El 73% de las cepas fueron resistentes a CTX con CIM ≥ 512 μ g/ml aunque solo el 33% presentó CIMs frente a CAZ ≥ 32 μ g/ml. Por medio de PCR se amplificaron en todas las cepas genes codificantes de tipo TEM mas no para SHV, OXA, CARB o PER. Mediante IE se detectó en todas las cepas una enzima con punto isoelectrico (pI) de 5,4 compatible con TEM-1, y sólo en las resistentes a CTX se detectó una enzima con pI de aproximadamente 8,7 compatible con una Blasa tipo CTX-M. Los aislamientos resistentes a CTX también lo fueron a GEN y SUL.

Conclusión: La mayor actividad de las cepas frente a CTX, la resistencia acompañante frente a GEN y SUL y la presencia de una enzima con elevado pI hace pensar en la expresión, además de una TEM-like, de una Blasa con actividad de cefotaximasa del tipo CTX-M, descrita previamente en otras cepas de *Salmonella infantis*. Este hecho constituye un problema para la Salud Pública ya que las C3G constituyen drogas de elección en el tratamiento de infecciones complicadas por especies de *Salmonella*.

350

DIFUSIÓN DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* MULTIRRESISTENTES MEDIADA POR ALIMENTOS

G. Prats, T Llovet, B. Mirelis, I. Barrabeig*, N. Camps*, S. Minguell*, A. Dominguez* y L. Salleras*

Servei de Microbiologia. Hospital de Sant Pau, Barcelona.

*Direcció General de Salut Pública. Dept. de Sanitat i Seguretat Social.

Objetivos: En junio del 2001 se detectó un brote alimentario por *Salmonella enterica* en una casa de colonias que afectó a 109 personas.

Durante el estudio etiológico, en los coprocultivos se observó el crecimiento de *E. coli* multirresistente (ECMR).

Métodos: En nuestro laboratorio estudiamos 22 de los pacientes con gastroenteritis, 3 manipuladores de alimentos relacionados con el brote y 10 familiares de 4 pacientes. A todos ellos se determinó la presencia de ECMR en las heces mediante preselección en caldo de MacConkey con cefotaxima (2 mg/L) (MacC+CTX) y posterior siembra en agar MacC+CTX. La sensibilidad a los antimicrobianos se determinó por técnicas de disco difusión y microdilución. Las β -lactamasas implicadas se caracterizaron mediante determinación del pI, PCR y secuenciación. La posible relación clonal de las cepas se estableció mediante biotipado, serotipado y patrón de macrorestricción genómica por PFGE con *Xba*I

Resultados: Se detectó la presencia de ECMR, portador de la β -lactamasa de espectro ampliado, CTX-M-9, en 10 pacientes y en un manipulador. La correlación entre el biotipo, serotipo y PFGE fue total detectándose 3 bioseropulsotipos distintos. Por otro lado se detectaron cepas de ECMR portador de la β -lactamasa plasmídica de tipo AmpC, CMY-2, en un manipulador y la presencia de dos cepas distintas portadoras de CTX-M-9 y CMY-2 en 2 pacientes. En 9 pacientes se aisló simultáneamente la salmonela y ECMR.

Conclusiones: El progresivo aumento de cepas con este tipo de β -lactamasas (CTX-M-9 y CMY-2) en nuestro ámbito, puede deberse además de la transmisión horizontal de los genes de resistencia, a su transmisión a través de los alimentos y del agua, que podrían constituir un vector de difusión de bacterias multirresistentes muy eficaz.

351

INCIDENCIA DE β -LACTAMASAS PLASMÍDICAS RESISTENTES A LOS INHIBIDORES EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* (1996-1998)

E. Miró, L. Gómez, M. Sabate, B. Mirelis y F. Navarro
Servei de Microbiologia, Hospital de Sant Pau, Barcelona.

Objetivo: Estudiar la incidencia de las β -lactamasas implicadas en la resistencia a las asociaciones β -lactámico-inhibidor en 7252 cepas de *Escherichia coli* aisladas entre 1996 y 1998 en el Hospital de Sant Pau.

Métodos: Estudio de la sensibilidad a β -lactámicos e inhibidores mediante disco-difusión y dilución en agar. Isoelectroenfoco y cálculo de la constante I_{50} para la caracterización del enzima y PCR para la amplificación del gen implicado. Secuenciación de las posibles IRTs (β -lactamasas derivadas de TEM resistentes a los inhibidores) y estudio epidemiológico mediante biotipado y PFGE.

Resultados: El 1,8% (130 cepas) de las 7252 cepas aisladas presentaron sensibilidad reducida a la asociación amoxicilina-ác. clavulánico (AMC) y sensibilidad a cefoxitina (FOX). De las 130 cepas, el 20,7% (27 cepas) producían IRTs: cinco TEM-30 (IRT-2), dos TEM-31 (IRT-1), dos TEM-33 (IRT-5), una TEM-34 (IRT-6), tres TEM-37 (IRT-8), cuatro TEM-40 (IRT-11), dos TEM-51 (IRT-15) y dos TEM-54. Además, seis cepas fueron productoras de dos enzimas, de pI 5,2 y 5,4, cinco de ellas producían TEM-30 (IRT-2) y la otra TEM-31 (IRT-1), junto con TEM-1. También presentaban este fenotipo el 46,2% (60 cepas), las cuales hiperproducían la β -lactamasa TEM-1 y el 12,3% (16 cepas) que resultaron hiperproductoras de la β -lactamasa cromosómica. Finalmente, el 10% expresaban el enzima OXA-1, el 8,4% hiperproducían SHV-1 y el 2,3% producían PSE-1 o PSE-4. El estudio epidemiológico no muestra relación clonal entre las cepas productoras de IRTs. La única excepción fueron dos cepas idénticas (biotipo y pulsotipo) aisladas de un mismo paciente, productoras de TEM-51 y TEM-54 respectivamente, enzimas que solo difieren en un nucleótido: His₂₄₄ (CAC) a Leu₂₄₄ (CTC).

Conclusión. El 0,4% de las 7252 cepas de *E. coli* aisladas durante este trienio son productoras de IRTs, no existiendo relación clonal entre ellas.

352

SECUENCIACIÓN DE UN PLÁSMIDO DE β -LACTAMASA EN *N. MENINGITIDIS*

M.J. Uria^{1,3}, B. Alcalá¹, C. La Torre², C. Salcedo¹, L. Arreaza¹ y J.A. Vazquez¹

¹Centro Nacional de Microbiología-ISCIII, Majadahonda (Madrid). ²Hospital San Joan de Deu (Barcelona). ³Hospital La Paz (Madrid).

La reducción en la sensibilidad a Penicilina (CMI 0,125-1 mg/L) en cepas de *N. meningitidis* se relaciona con alteraciones en la estructura de la PB_P. La producción de β -lactama-

sa plasmídica es responsable del alto nivel de resistencia a Penicilina. Hasta el momento, se han descrito 5 cepas de meningococo productoras de β -lactamasas: dos de ellas en Sudáfrica, una en Canadá y dos en España. En una revisión en nuestro laboratorio de cepas con CMI de 0,5-1 mg/L en las que no se había realizado determinación de β -lactamasa, se encontró una cepa aislada en LCR en el año 91 (CMI = 1 mg/L) productora de β -lactamasa. El serotipado y suptipado permitió caracterizarla como B:4:P1.15, al igual que las dos ya descritas en España. El análisis del contenido plasmídico mostró un plásmido de aproximadamente 5500 pb. El propósito del estudio fue analizar la presencia del gen *TEM-1*, que codifica la producción de β -lactamasa en ese plásmido, así como secuenciarlo y compararlo con el plásmido pAB6 descrito ya para *N. meningitidis*. El estudio se realizó con el secuenciador automático Prism 377 (Applied Biosystems) utilizando terminadores (dNTPs) con marcaje Big Dye (DNA sequencing kit, PE Biosystems). Se completó la secuenciación, encontrando un bajo número de cambios en los pares de bases con respecto al pAB6, no afectando ninguno de los cambios al gen *TEM-1*. La secuenciación del plásmido y la caracterización fenotípica de la cepa nos hace pensar que la cepa pueda ser la misma que las otras dos aisladas también en España en los años 89 y 96. Teniendo en cuenta que las tres cepas con importancia clínica se aislaron en un periodo de 7 años, podríamos pensar en una baja circulación de la cepa o bien en una pérdida "in vitro" del plásmido con la consiguiente sub-detección de estos aislamientos. Por todo esto es aconsejable determinar la producción de β -lactamasa en todas las cepas de *N. meningitidis* con sensibilidad intermedia a Penicilina en niveles cercanos a la resistencia clínica (CMI = 0,5-1 mg/l).

353

RESISTENCIA A AMOXICILINA/CLAVULÁNICO EN *E. COLI*: AUMENTO DE β -LACTAMASAS IRT Y CEFALOSPORINASAS DE CLASE C

O. Cuevas, E. Cercenado, J. Guinea, M. Marín, J. Martín-Pedroviejo, F. García-Garrote y E. Bouza
Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

Objetivo: Durante los últimos 4 años hemos observado un aumento de la resistencia a amoxicilina/ác. clavulánico (A/C) (CMI > 16/8 mg/L, halo de inhibición < 14 mm) en aislados de *E. coli* que ha alcanzado el 18% en 2000. Estudiamos la prevalencia de diferentes mecanismos de resistencia de *E. coli* a A/C en nuestra institución: producción de cefalosporinasa de clase C (CFC), hiperproducción de penicilinas (HP), oxacilinas (OXA), beta-lactamasa de espectro extendido - no cefamicinas- (BLEE), y beta-lactamasa de tipo TEM resistente a los inhibidores (IRT).

Métodos: Desde 1997 a 2000 a todos los *E. coli* aislados en nuestro laboratorio con resistencia a A/C se les realizaron pruebas de sensibilidad adicionales siguiendo las normas del NCCLS que incluían la determinación de las CMI y los halos de inhibición de A/C, ampicilina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulánico, mecilinam, cefalotina, cefazolina, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, y cefepima. Se realizó isoelectroenfoco en aislados seleccionados.

Resultados: Se estudiaron 13.727 aislados de *E. coli*. De ellos, 12% eran resistentes a A/C. El mecanismo de resistencia más frecuente fue HP (80%), seguido de BLEE (13,5%), CFC (4,3%), IRT (1,3%), y OXA (0,8%). El número de aislados que presentaban CFC aumentó de 7 (1997) a 42 (2000), así como el de productores de IRT (de 2 a 8). El 80% de los productores de IRT procedían de pacientes ambulatorios.

Conclusiones: Aunque en nuestra institución el principal mecanismo de resistencia de *E. coli* a A/C es la hiperproducción de penicilinas, existe un creciente aumento de cepas productoras de cefalosporinasas de clase C, de BLEE y de beta-lactamasas de tipo IRT. Son necesarios estudios de vigilancia para determinar la prevalencia actual de estas beta-lactamasas en *E. coli*.

354

BETA-LACTAMASAS GRUPO 1 EN *AEROMONAS CAVIAE*, Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS

Z. González-Lama, P. Lupiola, J.L. Martín, M. González y M.T. Tejedor

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Objetivos: Estudiar la resistencia a antibióticos β -lactámicos y la producción de β -lactamasas de una cepa de *Aeromonas caviae* (AC7), aislada de aguas residuales, y una mutante (AC7m) seleccionada "in vitro" con cefotaxima.

Métodos: Las CMI de los antibióticos β -lactámicos (AM, MZ, CR, MA, CFZ, CTX, FOX, IPM, TIC, PIP, CAZ, CRO, CX, ATM) se determinaron por dilución en tubo. Para la detección de β -lactamasas se usó nitrocefina. En los perfiles de sustrato e inhibidores utilizamos una modificación del método espectro-fotométrico. Como inductor usamos cefoxitina y el isoelectroenfoque se llevó a cabo en un gradiente de pH: 3,5-9,5.

Resultados: *A. caviae* (AC7) fue sensible a todos los antibióticos utilizados, excepto a AM y CFZ, no era inhibida por el Ac. Clavulánico (CA) y aumentaba su resistencia en presencia de FOX. La cepa mutante (AC7m) era resistente a la mayoría de los antibióticos utilizados, excepto a CAZ, ATM e IPM. Ambas cepas eran productoras de β -lactamasas. AC7 aumentaba su producción de β -lactamasas cuando crecía en presencia de FOX; mientras que AC7m no. Ambas cepas mostraban el mismo perfil de sustrato, pero la actividad hidrolítica de AC7m fue siempre más alta. La hidrólisis fue inhibida por CLOX y CARB, pero no por CA, p-CMB, EDTA. Por IEF en AC7 se detecta una banda de pI: 6,5 y después de la inducción, bandas satélites de pIs: 5,9-6,5. En CA7m se detectan bandas similares a las de AC7 inducida.

Conclusiones: Basándonos en los perfiles de sustratos e inhibidores, y el pI: 6,5 de las β -lactamasas de ambas cepas, podemos concluir que AC7 presenta una β -lactamasa cromosómica inducible del grupo 1; y AC7m es una mutante hiperproductora estable que posee una β -lactamasa cromosómica constitutiva perteneciente al grupo 1.

355

SENSIBILIDAD A β -LACTÁMICOS DE AMPLIO ESPECTRO EN UNA COLECCIÓN DEFINIDA DE ENTEROBACTERIACEAE Y *P. AERUGINOSA*. ESTUDIO MULTICÉNTRICO MENSURA

R. Canton, E. Loza, M.C. Conejo, F. Baquero, L. Martínez-Martínez y grupo de estudio MENSURA
Servicios de Microbiología de los Hospitales Ramón y Cajal (Madrid) y Virgen Macarena (Sevilla).

Objetivo: Determinar la capacidad en el estudio de sensibilidad a β -lactámicos de amplio espectro en una colección de aislamientos con fenotipos complejos y mecanismos de resistencia caracterizados.

Métodos: Se enviaron 18 cepas a 52 laboratorios en los que se estudió e interpretó rutinariamente la actividad de 8 β -lactámicos. Los resultados se compararon con los obtenidos (microdilución e interpretación NCCLS) en los dos laboratorios que coordinaron el estudio.

Resultados: El 88% de los participantes utilizó un sistema automático, el 10% difusión con disco y un 2% dilución en agar. En todos los casos se aplicaron criterios NCCLS, corregidos en un 15% por los de MENSURA. Los porcentajes de discrepancias en la interpretación fueron: 30% cefepima, 21% aztreonam, 21% piper-tazobactam, 19% ceftriaxona, 17% cefotaxima, 12% ceftazidima, 6% meropenem y 2% imipenem. El mayor número de errores, graves (ME) + muy graves (MVE) (> 30%), se observó en las cepas de *E. coli* con cTX-M-9, *K. Oxytoca* con K1, *E. cloacae* con AmpC inducible + CTX-M-10 y *P. aeruginosa* AmpC hiperproductora + OprD. El me-

nor número de errores, ME+ VME (< 5%), se observó con *E. coli* ATCC 25922 o con OXA-1, *K. Pneumoniae* y SHV-1 o SHV-5+OprK35, *E. cloacae* AmpC hiperproductora + CTX-M-10 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 o hiperproductora de AmpC o con eflujo (MexAB-OprM). Más del 90% de los VME se detectaron en las cepas con β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). La capacidad de detección de estas cepas osciló entre el 70% para *E. coli* con TEM-27 y el 10% para *E. cloacae* hiperproductora de AmpC + CTX-M-10.

Conclusiones: La utilización de una colección de cepas con fenotipos complejos y mecanismos de resistencia caracterizados permitió detectar problemas específicos en el estudio e interpretación de su sensibilidad concentrándose la mayoría en los aislamientos productores de BLEE.

356

FIABILIDAD DEL SISTEMA VITEK 2 PARA LA DETECCIÓN DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* CON RESISTENCIA A CEFOTAXITINA (FOX) Y AMOXICILINA-ÁCIDO CLAVULÁNICO (AMC)

G. Amblar, L. Martínez Martínez, A. Pascual y E.J. Perea
Facultad de Medicina y Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de la Macarena. Sevilla.

Objetivo: Durante los últimos meses hemos observado un incremento en la frecuencia de aislamientos de cepas de *Escherichia coli* con resistencia simultánea a FOX y a AMC, pero sensibles a cefepima (FEP). El objetivo de este estudio es evaluar la fiabilidad del sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux) para detectar la resistencia a FOX y/o AMC.

Material y métodos: Se han evaluado 100 aislamientos consecutivos de *Escherichia coli* (marzo a diciembre del 2000) con resistencia aislada o combinada a FOX y/o AMC, y sensibles a FEP. La inoculación y lectura de paneles V2 se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Como método de referencia se determinó la CMI de ampicilina (AMP), AMC, FOX y FEP mediante microdilución (normas del NCCLS). Se definieron los errores en la categoría clínica determinada por V2 en comparación con la definida por microdilución y se evaluaron los porcentajes de acuerdo esencial (valores de CMI obtenidos con V2 y con el método de referencia que no varían en más de una dilución en base 2).

Resultados: Los resultados de acuerdo en categoría clínica y de acuerdo esencial expresados en porcentaje fueron los siguientes: 99% y 100% (AMP), 82% y 98% (AMC), 81% y 93% (FOX), y 100% y 97% (FEP). Los errores menores correspondieron a: FOX (16%), AMC (18%) y AMP (1%). Para FOX se observaron errores mayores y errores máximos en el 1% y en el 2% de las cepas, respectivamente. Para los demás antimicrobianos no se observaron errores máximos o mayores.

Conclusiones: El sistema Vitek 2 permite obtener valores fiables de CMI de AMP, AMC, FOX y FEP frente a las cepas de *E. coli* resistentes a cefoxitina y/o amoxicilina-ácido clavulánico. Sin embargo, para estas cepas existe un porcentaje elevado de errores menores en la categoría clínica para cefoxitina y amoxicilina-ácido clavulánico obtenidos con este sistema.

357

PROYECTO GEIH-BLEE 2000: DESCRIPCIÓN DEL PERFIL DE PORINAS DE CEPAS DE *E. COLI* PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) AISLADAS EN HOSPITALES ESPAÑOLES

J.R. Hernández, A. Pascual, V.J. Benedi, L. Martínez Martínez y GEIH, Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria.
HUV Macarena. Sevilla.

Introducción: *E. coli* K12 produce dos porinas, OmpC y OmpF, cuya expresión depende del medio de cultivo: OmpF se reprime en medios con alta osmolaridad. El objetivo del

estudio fue evaluar la expresión de proteínas de membrana externa en 50 cepas clínicas de *E. coli* productores de BLE-*Es*, aisladas en el estudio BLEE-GEIH.

Material y métodos: Se estudiaron 50 cepas de *E. coli* BLEE (+), aisladas de muestras clínicas entre marzo y junio de 2000, procedentes de 27 hospitales españoles participantes en el estudio BLEE-GEIH.

La expresión de porinas se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con urea 6M y SDS de proteínas de membrana externa purificadas. Se estudiaron bacterias crecidas en caldo Mueller-Hinton (MH- medio con alta osmolaridad) y en caldo nutritivo (NB- medio con baja osmolaridad). El patrón de expresión de porinas se comparó con el fenotipo de resistencia a betalactámicos, fluorquinolonas y aminoglucósidos, determinado mediante microdilución (normas NCCLS).

Resultados: De las 50 cepas, el 52% expresaban OmpC y OmpF en medio MH, el 28% expresaban sólo OmpC y el 20% expresaban sólo OmpF. En medio NB, el 66% de las cepas expresaban las dos porinas, el 10% sólo OmpC y el 24% sólo OmpF. No hubo ninguna cepa deficiente en OmpC y OmpF. Para cada uno de los grupos de cepas con igual perfil de porinas, los valores de CMI de los antimicrobianos evaluados presentaron un alto grado de variabilidad.

Conclusiones: Todas las cepas estudiadas expresaban OmpC, OmpF o ambas. El perfil de porinas no es un buen marcador epidemiológico. La expresión de porinas dependía del medio de cultivo empleado, aunque en muchos de los casos, dichos patrones no se correspondían con los descritos en la cepa de referencia *E. coli* K12. Dentro de los grupos de cepas con el mismo perfil de porinas existe una gran variabilidad en las CMIs de los antimicrobianos estudiados.

358

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y PAPEL DE LAS PORINAS OmpF Y OmpC DE *E. CLOACAE* (EC) EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

F. Ballesteros, A. Doménech-Sánchez, L. Martínez Martínez, A. Pascual, M.C. Conejo y V.J. Benedit

IMEDEA (CSIC-UIB) y Universidad de Sevilla.

Objetivos: La literatura describe la existencia de tres porinas en EC (OmpF, OmpC y OmpD). Hasta ahora se dispone de datos fenotípicos, pero se carece de la correspondiente caracterización genotípica. El objetivo de este estudio fue clonar las porinas de EC, expresarlas en cepas sin porinas y estudiar directamente el papel de estas proteínas en la resistencia a los antimicrobianos.

Métodos. Hemos diseñado cebadores específicos para amplificar por PCR, y posteriormente clonar y secuenciar, los genes que codifican OmpF y OmpC de la cepa EC ATCC13047. Su papel en la resistencia se estudió mediante la expresión de las porinas clonadas en la cepa EC 201-RevM3, deficiente en porinas. Las CMIs se determinaron por microdilución y Etest.

Resultados. Hemos caracterizado la expresión fenotípica de las 3 porinas de EC ATCC 13047 mediante electroforesis en geles de 8% acrilamida-6M urea. Los genes de dos de estas porinas se clonaron y sus secuencias resultaron homólogas a las de los genes *ompF* y *ompC* de *E. coli*. Las CMIs (mg/l) de imipenem, cefoxitina y ceftazidima frente a la cepa Ec 201-RevM3 fueron de 16, > 256 y > 256, respectivamente. Las CMIs (mg/l) de imipenem frente a los transformantes derivados de Ec201-RevM3 que expresan los genes *ompF* (OmpF+C-) u *ompC* (OmpF-C+) se redujeron a 0,25 y 0, 38, respectivamente, mientras que las CMIs de cefoxitina y ceftazidima permanecieron inalteradas (> 256 en todos los casos). No se observaron diferencias en las CMIs de cefepima en los aislados con o sin porinas. Las CMIs de norfloxacin frente a las cepas que expresan una u otra de las porinas clonadas fueron cuatro (OmpF) o dos (ompC) veces menores que frente a la cepa inicial sin porinas.

Conclusiones. Hemos clonado y secuenciado los genes de las porinas OmpF y OmpC de *E. cloacae* (Nº. acceso: AJ316539 y AJ316540). La resistencia de *E. cloacae* a carbapenemas y a quinolonas está relacionada con la pérdida de estas porinas.

Sesión 17

Actividad *in vitro* de antimicrobianos

359

SEGUIMIENTO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE CEPAS CLÍNICAS DE *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* DURANTE LOS AÑOS 1998-2000

M.L. López-Yeste y J. Lite

Servei de Microbiologia. Hospital Mútua de Terrassa. Barcelona.

Objetivo: Estudiar la sensibilidad a los antibióticos de las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, una por paciente, aisladas a partir de muestras clínicas durante los años 1998, 1999 y 2000.

Material y métodos: La identificación al nivel de especie se realizó con la tarjeta GNI+ (Vitek, bioMérieux) y las CMIs se determinaron mediante microdilución con el panel EMIZA 8EF (Sensititre; Trek Diagnostic Systems Ltd, East Grinstead, UK). Los métodos estadísticos utilizados fueron la JI² y la prueba exacta de Fisher.

Resultados: Se aislaron 56 cepas que procedían de 14 mujeres de 72,7 años de media de edad y 42 varones de 62,7 años de media. Cuarenta pacientes (71,4%) estaban ingresados en el hospital, con un promedio de 20,7 días desde el ingreso. Las cepas procedían: 25 de muestras respiratorias, 25 de muestras de piel y tejidos y 6 de orinas.

Las frecuencias de sensibilidad más altas fueron para: clinafloxacin (96,4%), cotrimoxazol (94,6%), amikacin (55,4%), cloranfenicol (55,4%), gentamicina (48,2%), ciprofloxacina (48,2%) y tobramicina (46,4%). Al comparar la sensibilidad a los antibióticos por años, vemos que ha disminuido significativamente para norfloxacin ($p < 0,05$). Según el tipo de muestra, las cepas de origen respiratorio eran más sensibles a tobramicina ($p < 0,05$) y a cloranfenicol ($p < 0,01$) que las de otras procedencias. Sólo tres cepas (5,4%) eran resistentes a cotrimoxazol, dos aisladas en muestras de orina y una de una úlcera de origen vascular. Dos cepas aisladas el año 2000 presentaron sensibilidad intermedia a clinafloxacin.

Conclusiones: Los pacientes hospitalizados en los que se aisló *Stenotrophomonas maltophilia* en nuestro centro, llevaban una media de 20,7 días ingresados. Observamos en los tres años estudiados una disminución significativa en la sensibilidad a norfloxacin y la aparición de cepas con sensibilidad intermedia a clinafloxacin.

360

EFICACIA DE CEFTAZIDIMA Y COTRIMOXAZOL Y SU COMBINACIÓN, EN LA NEUMONÍA EXPERIMENTAL POR *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

D. Martín, C. Pichardo, M. Herrero, M.E. Jiménez, M. Bernabeu, M.E. Pachón, M.J. Rodríguez, A. García y J. Pachón
HH.UU. Virgen del Rocío. Sevilla.

Objetivos: Comparar la actividad de ceftazidima (CAZ) y cotrimoxazol (TS) en monoterapia y combinación en un modelo de neumonía experimental por *S. maltophilia*.

Material y métodos: 2 cepas (A y B), procedentes de bacteriemiás, sensibles tanto a CAZ como a TS. Estudios *in vitro*: actividad bactericida y sinergia. Estudios *in vivo*: modelo de neumonía experimental murino, inoculación intratraqueal con 50 µL de suspensión bacteriana; los animales se adscribieron a 2 tipos de experimentos: estudio de mortalidad (tratamiento durante 72 h y evaluación de la supervivencia) y estudio de aclaramiento bacteriano en pulmón (tratamiento cada 2 h durante 12 h y sacrificio secuencial de animales cada 2 h). En cada experimento los animales se agruparon en CON (controles, no tratados), CAZ (200 mg/kg/d), TS (40 mg/kg/d) y CAZ+TS para el estudio de mortalidad, y CON, CAZ (50 mg/kg/2 h), TS (10 mg/kg/2 h) y CAZ+TS para el de aclaramiento. Variables: mortalidad y aclaramiento bacteriano en pulmón. Test estadísticos: χ^2 y test exacto de Fisher, ANOVA, y post-hoc de Tukey y Dunnett.

Resultados: *In vitro*: para ambas cepas sólo CAZ presentó actividad bactericida; para la cepa A existió sinergia con la combinación a concentraciones equivalentes a CMI y Cmax; para la B no pudo observarse sinergia, ya que CAZ en monoterapia fue muy activo, por ello no se utilizó la combinación para el estudio *in vivo* con esta cepa. *In vivo*: mortalidad: cepa A, tanto CAZ como la combinación redujeron la mortalidad respecto a CON (40 y 14,3% vs. 86,6%, $p \leq 0,001$); cepa B, sólo CAZ fue mejor que CON, y a su vez mejor que TS (0% vs. 93,3 y 75%, $p = 0,000$); aclaramiento pulmonar: cepa A, la combinación fue el único tratamiento que aclaró el pulmón respecto de CON (7,34 vs. 8,48, $p = 0,025$), siendo además mejor que TS ($p = 0,001$); cepa B, CAZ fue el antimicrobiano más activo, mejorando CON (5,71 vs. 9,70, $p = 0,000$) y siendo mejor que TS ($p = 0,000$).

Conclusiones: CAZ, solo o en combinación con TS, es eficaz en la neumonía experimental grave por *S. maltophilia*.

361

EFICACIA DE MOXIFLOXACINO Y COTRIMOXAZOL Y SU COMBINACIÓN, EN LA NEUMONÍA EXPERIMENTAL POR *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

D. Martín, C. Pichardo, M. Herrero, M.E. Jiménez, M. Bernabeu, M.E. Pachón, M.J. Rodríguez, A. García y J. Pachón
Serv. Enf. Infecciosas. HH. UU. Virgen del Rocío. Sevilla.

Objetivos: Comparar la actividad de moxifloxacino (MX) y cotrimoxazol (TS) en monoterapia y en combinación en un modelo de neumonía experimental por *S. maltophilia*.

Material y métodos: 2 cepas (A y B), procedentes de bacteriemiás, sensibles a TS y sensible e intermedia a MX, respectivamente. Estudios *in vitro*: actividad bactericida y sinergia. Estudios *in vivo*: modelo de neumonía experimental murino, inoculación intratraqueal con 50 µL de suspensión bacteriana; los animales se adscribieron a 2 tipos de experimentos: estudio de mortalidad (tratamiento durante 72 h y evaluación de la supervivencia) y estudio de aclaramiento bacteriano en pulmón (tratamiento cada 2 h durante 12 h y sacrificio secuencial de animales cada 2 h). En cada experimento los animales se agruparon en CON (controles, no tratados), MX (40 mg/kg/d para el estudio de mortalidad y 20 mg/kg/2 h para el de aclaramiento), TS (40 mg/kg/d, para el estudio de mortalidad y 10 mg/kg/2 h para el de aclaramiento) y MX+TS. Variables: mortalidad y aclaramiento bacteriano en pulmón. Test estadísticos: χ^2 y test exacto de Fisher, ANOVA, y post-hoc de Tukey y Dunnett.

Resultados: *In vitro*: para ambas cepas sólo MX presentó actividad bactericida y, además, existió sinergia con la combinación a concentraciones equivalentes a Cmax. *In vivo*: mortalidad: sólo el tratamiento combinado redujo la mortalidad respecto a CON (cepa A: 13,3% vs. 86,6%, $p = 0,000$; cepa B: 0% vs. 93,3%, $p = 0,000$), siendo además mejor que las monoterapias ($p < 0,01$); aclaramiento pulmonar: al igual que ocurría con la mortalidad, la combinación fue el único tratamiento que aclaró el pulmón respecto de

CON (cepa A: 4,98 vs. 8,44, $p = 0,037$, y cepa B: 6,16 vs. 8,37, $p = 0,008$). Entre grupos terapéuticos, MX fue mejor que TS en monoterapia para la cepa A, $p = 0,000$, y la combinación fue mejor que las monoterapias para ambas cepas, $p < 0,01$.

Conclusiones: en la neumonía experimental por *S. maltophilia*, la asociación de MX mejoró la monoterapia con TS.

362

SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE *ACHROMOBACTER XYLOXIDANS* AISLADOS DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA (FQ)

M.D. Hernández, A. Oliver, J.C. Pérez-Díaz, T.M. Coque, C. Robledo, F. Baquero y R. Cantón

Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

Objetivos: Estudiar la sensibilidad a 30 antimicrobianos de 47 aislados de *A. xylooxidans* obtenidos de 13 pacientes con FQ en el Hosp. Ramón y Cajal (1993-2001).

Métodos: La CMI se determinó por dilución en agar (NCCLS) y los sistemas Pasco y Wilder. La caracterización molecular se realizó por PFGE.

Resultados: Se identificaron 19 clones, utilizando el 1^{er} aislado de cada paciente para el análisis de los datos. Todos fueron resistentes a cef. De 1^a y 2^a gen., cefoxitina, cefotaxima, aminoglicósidos y fosfomicina. El 100% de AXSD fueron sensibles a los β -lactámicos tabulados excepto a la cefepima y destacó la elevada actividad de minociclina y doxiciclina. En AXSX se observaron dos subpoblaciones, una sensible a penicilinas y carbapenems y otra resistente.

	<i>A. xylo. subsp. xylooxidans</i> (AXSX)		<i>A. xylo. subsp. denitrificans</i> (AXSD)	
	Rango CMI	Media geom.	Rango CMI	Media geom.
Amoxicilina*	4-> 128	36,8	4-16	9,3
Amox/Clav*	4-> 128	17,2	4-8	6,4
Ticarclina	1-> 128	4,3	0,5-4	1,1
Ticar/Clav	1-32	3,0	0,5-4	1,4
Piperacilina	$\leq 0,5-8$	0,9	$\leq 0,5-1$	0,5
Piper/Tazo	$\leq 0,5-8$	1	$\leq 0,5-1$	0,5
Ceftazidima*	4-128	7,5	0,5-4	2,7
Cefta/Clav*	4-64	6,5	0,5-4	2,7
Cefepima*	16-> 128	39,4	4-32	14,8
Imipenem*	2-16	3,3	1-2	1,5
Meropenem	$\leq 0,5-8$	0,7	$\leq 0,5-4$	0,3
Cotrimoxazol*	$\leq 0,1-2$	0,1	$\leq 0,1-8$	0,7
Ciprofloxacino	2-32	7,5	2-16	4
Tetraciclina	$\leq 4-> 128$	32	$\leq 4-> 128$	12,7
Doxiciclina*	1-32	7,5	$\leq 0,1-32$	1,3
Minociclina*	0,5-16	2,6	$\leq 0,1-8$	0,6

*diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney)

Conclusiones: AXSX fue más resistente que AXSD, esencialmente debido a la presencia de una subpoblación con CMIs más elevadas a β -lactámicos.

363

IMPORTANCIA DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL PÉPTIDO HÍBRIDO CA(1-8)M(1-18) EN SU ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA

E. Guerrero*, J.M. Saugar*, M.L. Valero**, D. Andreu** y L. Rivas*

*Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC),

**Universitat Pompeu Fabra.

La importancia de la conformación en α -hélice de los péptidos eucariotas lineales respecto a su actividad antibiótica es controvertida¹. El péptido antibiótico híbrido Cecropina

A-Melitina (KWKLFFKKIGIGAVLKVLTTGLPALIS-a), CA(1-8)M(1-18) posee 2 regiones α -hélice anfipática unidas por una secuencia bisagra. La sustitución de residuos del péptido por su forma D (diastereómeros) modifica la helicidad preservando el resto de sus características físicas². Se diseñaron 2 diastereómeros: [D]-L(4),F(5)-CA(1-8)M(1-18) y [D]-V(16),L(17)-CA(1-8)M(1-18), localizados en la α -hélice de la cecropina A y de la melitina respectivamente. Su efecto antibiótico se resume en:

Péptido	MIC (μ M)		LD ₅₀ (μ M)	
	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. donovani</i>	Eritrocitos
CA(1-8)M(1-18)	1	1	1,2	7
[D]-L(4),F(5)	1	2	1,7	8
[D]-V(16),L(17)	4	4	9,3	> 10

Conforme a los datos obtenidos en: Inhibición de la proliferación, del consumo de O₂, despolarización de membrana accesibilidad de sondas fluorescentes al citoplasma, disminución de niveles de ATP intracelular y liberación de marcadores enzimáticos intracelulares³⁻⁵, el mecanismo letal de estos péptidos es la permeabilización de membrana, con pérdida de la homeostasis interna. Como aplicación al desarrollo de nuevos análogos que disminuyan su citotoxicidad manteniendo su actividad antibiótica, la región de la α -hélice de la cecropina no es esencial para la misma, en contraposición a la fuerte disminución que sucede en el diastereómero de la melitina que correlaciona con los datos de diroísmo circular y permeabilización de liposomas obtenidos para los mismos péptidos.

Bibliografía:

- Andreu D, Rivas L. (1998) Biopolymers 47, 415.
- Oren D, Shai H. (2001) Peptides 22, 1629.
- Luque JR. (2001) Antimicrob Ag Chemother 45, 1121.
- Saugar JM. (2001) *ibidem* en prensa.
- Chicharro C. (2001) *ibidem* 45, 2441.

Proyectos: Programa de grupos estratégicos de la CAM. FIS-99/0025-02.

364

ACTIVIDAD DE PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS EUCARIÓTICOS SOBRE BACTERIAS AISLADAS DE QUEMADOS

J. Saugar¹, E. Guerrero¹, M. Carretero², P. García-Hierro³, F. Larcher², M. del Río², D. Andreu⁴ y L. Rivas¹

¹CIB-CSIC, ²CIEMAT Madrid, ³Hospital Universitario Getafe, ⁴Universidad Pompeu Fabra.

Los péptidos antimicrobianos forman parte de la inmunidad innata del hombre¹. Su expresión está fuertemente disminuida en quemados², lo que favorece la sepsis bacteriana con una alta mortalidad y el frecuente fracaso de injertos de piel. El tratamiento con antibióticos tradicionales conduce al desarrollo de multiresistencia.

En el presente estudio se ha probado *in vitro* la actividad antibiótica de los péptidos híbridos cecropina A-Melitina CA(1-8)M(1-18) y CEMA y F5W-Magainina2, A, B, F10W-Butorina2 y L18W-PGLa sobre 5 cepas de *Alcaligenes xylosoxidans*, 1 de *Enterobacter aerogenes*, 6 de *Pseudomonas aeruginosa*, 1 de *Stenotrophomonas maltophilia* y 1 de *Staphylococcus aureus* con diversos patrones de resistencias, aisladas de pacientes de la Unidad de Quemados del H.U. de Getafe. El orden de prelación fue CA(1-8)M(1-18)>CEMA>>> (resto de péptidos). Las MICs de CA(1-8)M(1-18) estaban comprendidas entre 4 y 32 μ M, excepto sobre *A. xylosoxidans* (MIC > 32 μ M). El mecanismo de acción se basa en la permeabilización de la célula. Por otro lado se ha descrito la neutralización por el mismo de los efectos biológicos del LPS y lipoteicoico como inductores del shock séptico³. Debido a que la acción letal se realiza mediante interacción péptido-fosfolípido, lo que determina su baja o nula inducción de resistencias frente a los mismos y al amplio rango de microorganismos susceptibles, estos pép-

tidos son potenciales agentes quimioterapéuticos frente a la sepsis bacteriana en pacientes quemados.

Bibliografía:

- Andreu D y Rivas L. (1998) Biopolymers 47, 415-433.
- Milner S y Ortega M. (1999) Burns 25, 411-413.
- Scott MG y Hancock RE. (2000) Crit Rev Immunol 20, 407-431.

Proyectos: Programa de grupos estratégicos de la CAM. FIS-99/0025-02

365

ERTAPENEM (MK-0826): ACTIVIDAD COMPARATIVA IN VITRO FRENTE A MICROORGANISMOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS

M.I. Morosini, E. Loza, R. Cantón, F. Almaraz y F. Baquero
Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

Objetivo: Evaluar la actividad de ertapenem, nuevo carbapenem estable frente a la dihidropeptidasa I, frente a 440 aislamientos bacterianos recientes procedentes de 4 hospitales españoles, en comparación con la de imipenem, cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, pip/taz. y norflox.

Método: Las CMIs (μ g/ml) se obtuvieron por microdilución (NCCLS).

Resultados: Las CMI₅₀/CMI₉₀ se exponen en la siguiente tabla:

Aislamientos (Nº)	Ertapenem	Imipenem	Cefepima	Norfloxac.
<i>E. coli</i> (15)	≤ 0,008/0,01	0,25	0,06/0,12	≤ 0,06/1
<i>Klebsiella</i> sp. (30)	≤ 0,008/0,03	0,25/0,5	≤ 0,06/0,25	≤ 0,06/0,25
<i>Enterobacter</i> sp. (30)	0,12/0,5	1/1	≤ 0,06/1	≤ 0,06/0,12
<i>S. marcescens</i> (15)	0,03/0,06	0,5/1	0,12/0,25	0,12/1
<i>M. morgani</i> (15)	0,03/0,06	2/4	≤ 0,06	≤ 0,06/0,12
<i>P. mirabilis</i> (15)	0,01	1/2	≤ 0,06/0,12	≤ 0,06/2
<i>P. aeruginosa</i> (15)	8/> 16	1/1	8/> 16	1/> 16
<i>S. aureus</i> (15)	0,12/0,25	0,06/0,12	2/4	0,5/1
<i>S. pneumoniae</i> (15)	0,25/1	0,25/0,5	0,5/2	4/8
<i>S. pyogenes</i> (16)	0,01/0,01	≤ 0,03	≤ 0,06	2/2
<i>E. faecalis</i> (15)	8/> 16	1/2	> 16/> 16	4/> 16
<i>H. influenzae</i> (15)	0,03/0,06	0,5/0,5	0,12/0,12	≤ 0,06/0,12
<i>M. catarrhalis</i> (15)	≤ 0,008/0,01	0,12/0,12	0,5/2	0,25/0,5
<i>N. gonorrhoeae</i> (12)	≤ 0,008	0,06/0,12	≤ 0,01/0,06	0,03/0,06
<i>Clostridium</i> sp. (12)	0,03/2	0,06/2	4/> 16	2/16
<i>B. fragilis</i> (15)	0,06/0,5	0,12/0,25	> 16/> 16	> 16/> 16
<i>B. thetaiotaomic</i> . (12)	0,5/4	0,25/2	> 16/> 16	> 16/> 16

Conclusiones: Ertapenem posee un amplio espectro de actividad. Es más activo que imipenem frente a *Enterobacteriaceae*, *Moraxella*, *Haemophilus* y *N. gonorrhoeae* y similar en anaerobios, estafilococos y estreptococos. Estos datos sugieren su potencial utilización en infecciones mixtas.

366

SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE PATÓGENOS RESPIRATORIOS (ESPAÑA VS EUROPA).

SENTRY 1997-2000

E. Loza¹, J. Liñares², R. Cantón¹, A. Pascual³, M.I. Morosini¹, F. Tubau², E. Perea³ y F. Baquero¹

Servicios de Microbiología de los ¹Hospitales Ramón y Cajal, Madrid; ²Bellvitge, Barcelona y ³Virgen Macarena, Sevilla.

Objetivo: Comparar la sensibilidad de patógenos del tracto respiratorio inferior de 3 hospitales españoles con la de los procedentes de 19 centros de 12 países europeos obtenidos del programa SENTRY (1997-2000).

Método: El estudio de sensibilidad fue realizado en The Jones Group (Iowa, USA) por la técnica de microdilución (NCCLS).

Resultados: La sensibilidad antibiótica de *S. pneumoniae* (SP), *H. influenzae* (HI) y *M. catarrhalis* (MC) se presenta en la tabla:

Antibiótico	España 1997-2000 (%S)			Europa 1997-2000 (%S)		
	SP (291)	HI (366)	MC (155)	SP (1309)	HI (1474)	MC (611)
Penicilina	50,8	-	-	72,9	-	-
Amoxicilina	-	66,6	50,9	-	83,7	49,7
Amox./clav.	-	99,7	100	-	99,6	100
Cefotaxima	80,8	100	100	91,6	100	100
Eritromicina	69,4	-	-	77,2	-	-
Ciaritromicina	-	87,1	100	-	91,4	100
Quin./dalp.	98,9	-	-	98,3	-	-
Cloranfenicol	77,3	97,5	100	92,4	98,1	99,5
Cotrimoxazol	48,1	72,6	92,2	71,1	82,1	98,3
Tetraciclina	63,2	96,9	100	75,1	97,2	97,0
Levofloxacina	99,6	-	-	99,8	-	-
Ciprofloxacina	-	100	100	-	100	100
BMS-284756**	100	100	100	100	100	100

*puntos de corte de *Haemophilus* spp. **punto de corte: ≤ 2 µg/ml.

Conclusiones: España presenta mayores tasas de resistencia que Europa particularmente de penicilina, cefalosporinas de 3ª generación, cloranfenicol, cotrimoxazol y tetraciclina frente a SP y amoxicilina en HI.

367

SENSIBILIDAD A 14 QUINOLONAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *H. INFLUENZAE* RESISTENTES A CIPROFLOXACINA, Y PUNTOS DE CORTE MICROBIOLÓGICOS

M. Pérez-Vázquez*, J. Campos*, F. Roman*, C. Varela** y R. Canton**

*CNM. ISCHII, **Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivo: Estudiar la actividad de 14 quinolonas frente a cepas de *H. influenzae* con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina; proponer nuevos puntos de corte microbiológicos con el fin de discriminar entre la población sensible y otras con distinto grado de sensibilidad a quinolonas y sugerir métodos de laboratorio para detectar la disminución de la sensibilidad y/o resistencia a quinolonas en *H. influenzae*.

Material y métodos: La sensibilidad a 62 aislamientos clínicos (32 con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina, y 30 controles sensibles ajustados mediante edad, patología, procedencia de la cepa y localización geográfica) se llevó a cabo por tres métodos: E-test, dilución en agar y microdilución.

Resultados: El E-test y la dilución en HTM agar se correlacionaron muy bien con el método de microdilución ($r = 0,96$). Las CMI₅₀ fueron: ciprofloxacina y trovafloxacina, 4,0 µg/ml; sparfloxacina, grepafloxacina, ofloxacina, pefloxacina, enrofloxacin y fleroxacin, 8,0 µg/ml; norfloxacina y ácido nalidixico, 16 and 128 µg/ml, respectivamente; Levofloxacina y moxifloxacina 2,0 µg/ml Las quinolonas que presentaron una mayor actividad fueron clinafloxacina y gatifloxacina (CMI₉₀ 0,25 µg/ml). Puntos de corte microbiológicos propuestos:

Nal: sensible: ≤ 1 µg/ml (≥ 32 mm), resistente: ≥ 8 µg/ml (≤ 18 mm)
Cip: sensible: $\leq 0,06$ µg/ml (≥ 34 mm), resistente: ≥ 2 µg/ml (≤ 24 mm)
Nor: sensible: $\leq 0,25$ µg/ml (≥ 36 mm), resistente: ≥ 2 µg/ml (≤ 24 mm)
Oflox: sensible: $\leq 0,12$ µg/ml (≥ 30 mm), resistente: ≥ 4 µg/ml (≤ 20 mm)
Peflox: sensible $\leq 0,12$ µg/ml (≥ 30 mm), resistente: ≥ 2 µg/ml (≤ 20 mm)

En ningún caso se detectaron errores mayores el porcentaje de errores menores fue: nal 3%, cip 4,5%, nor 4,5%, oflox 10,6% y peflox 6%.

Conclusiones: Las cepas de *H. influenzae* resistentes a ciprofloxacina, presentan resistencia cruzada con el resto de las quinolonas evaluadas. El disco de ciprofloxacina se puede utilizar para detectar la disminución de la sensibilidad al grupo completo de las quinolonas.

368

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *AEROMONAS* SPP. AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS

M. Lamata, M. Soler, J.L. del Pozo, S. Hernaez, M. Fernández-Alonso y J. Leiva

Clínica Universitaria de Navarra. Dpto. Microbiología. Pamplona.

Objetivo: Estudiar los patrones de sensibilidad antibiótica de *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. sobria* aisladas de muestras clínicas.

Material y métodos: Hemos estudiado la sensibilidad a diferentes antibióticos de 50 cepas de *Aeromonas*: 7 *A. sobria*, 21 *A. hydrophila* y 22 *A. caviae*. Las muestras clínicas donde se aislaron fueron 35 heces, 2 biopsias intestinales, 2 bilis, 5 heridas, 1 exudado vaginal, 3 muestras respiratorias, 1 hemocultivo y 1 líquido ascítico. Los antibióticos testados fueron amoxicilina/clavulánico, ceftriaxona, cefoxitina, cefepime, piperacilina/tazobactam, amikacina, gentamicina, ciprofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol y fosfomicina. El estudio de sensibilidad se realizó mediante la tarjeta GNS-518 (VITEK).

Resultados: Todas las cepas fueron sensibles a ceftriaxona, cefepime, amikacina, gentamicina y ciprofloxacino. El 33,4% de las cepas fueron sensibles a amoxicilina/clavulánico (40% en *A. sobria*, 46% *A. hydrophila* y 16% *A. caviae*), un 89% a cefoxitina (67% en *A. hydrophila* y *A. sobria*, no encontrándose resistencias en *A. caviae*). Todas las cepas de *A. caviae* y *A. sobria* fueron sensibles, y se observó un 92% de sensibilidad en *A. hydrophila*. El 91,3% fueron sensibles a trimetoprim/sulfametoxazol (95,2% en *A. caviae* y 83,4% en *A. hydrophila*). Frente a fosfomicina un 77% de las cepas fueron sensibles, observándose un 63,7% de sensibilidad en *A. caviae* y un 60% en *A. hydrophila*. No hubo resistencias en *A. sobria* frente a este antibiótico.

Conclusiones: Se ha encontrado una alta tasa de sensibilidad a los diferentes antibióticos estudiados, por lo que cualquiera de ellos pueden ser empleados en el tratamiento de infecciones producidas por *Aeromonas* spp. excepto amoxicilina/clavulánico debido a su elevada resistencia.

369

GENERACIÓN DE RESISTENCIAS *IN VITRO* DE *SALMONELLA* SPP A FLUOROQUINOLONAS. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES

E. Sirvent, L. Cebrian, J.C. Rodríguez y G. Royo

S. Microbiología. H. General Universitario de Elche. U. Miguel Hernández. Elche, Alicante.

Objetivo: Conocer la capacidad de *Salmonella* sp. para generar resistencias a las fluorquinolonas tras exposición repetida a concentraciones subinhibitorias. Detectar las mutaciones de los genes que codifican *gyr A* y *par C* en los mutantes resistentes obtenidos.

Métodos: Se ensayaron dos aislados clínicos de *S. enteritidis*, dos de *S. hadar* y dos de *S. typhimurium* frente a ciprofloxacino, ofloxacino, trovafloxacino, sparfloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino. Un aislado de cada serotipo era resistente a ácido nalidixico. Se generaron mutantes resistentes mediante exposiciones repetidas a concentraciones subinhibitorias y constantes de cada quinolona (1/8 de su CMI). La caracterización de los mutantes se realizó mediante amplificación de fragmentos de los genes *gyr A* y *par C* y corte posterior con las enzimas de restricción HinfI y Hae II. Los patrones obtenidos se compararon con los previamente descritos (Giraud et al, 1999).

Resultados: Las cepas de *S. enteritidis* necesitaron más tiempo para generar mutantes resistentes (11,1 pases) que las cepas de *S. typhimurium* (3,2) o *S. hadar* (5,5). El número de pases varió en función del fármaco ensayado; moxifloxacino (8,1 pases) generó mutantes más lentamente. Los mutantes del gen *gyr A* obtenidos presentan distinto patrón

en función de la sensibilidad a nalidixico de la cepa original y de la quinolona ensayada. No detectamos la presencia de mutantes *par C*.

Conclusiones: La exposición a concentraciones subinhibitorias de fluorquinolonas induce la aparición de mutantes resistentes con mutaciones distintas en función de la sensibilidad a ácido nalidixico. Los mutantes pueden presentar CMI's relativamente bajas, que según los criterios del NCCLS estarían dentro de la categoría de sensible. *S. enteritidis* presenta menor capacidad de generar mutantes, lo que puede explicar que este serotipo tenga un porcentaje de aislados resistentes a ácido nalidixico menor que los otros. Moxifloxacino genera mutaciones más lentamente.

370

SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN EL PERÍODO 1995-2001 EN ÁREA NORTE DE SEVILLA

L. Romero, L. Martínez-Martínez, J.R. Hernández, M.D. Navarro, J. Rodríguez-Baño y A. Pascual
H.U. Virgen Macarena. Sevilla.

Objetivos: Estudiar la frecuencia y la sensibilidad a antimicrobianos de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas consecutivamente en el Laboratorio de Microbiología de nuestro hospital.

Material: La identificación se determinó mediante WalkAway (MicroScan; EEUU) o VITEK 2 (bioMérieux; Francia). La producción de BLEE se confirmó mediante la técnica de doble disco y microdilución (Criterios del NCCLS). Se evaluó la sensibilidad a 24 antimicrobianos mediante microdilución siguiendo criterios del NCCLS.

Resultados: Se aislaron un total de 120 de *E. coli* y 104 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Las cepas de *K. pneumoniae* disminuyeron a lo largo del tiempo desde 34 en 1995 a 5 en 2000. Inversamente, los aislamientos de *E. coli* aumentaron desde 7 cepas en 1995 a 53 en 2000. Las CMI90s (mg/l) frente a *K. pneumoniae* fueron: Cefoxitina (FOX): 4, Ceftazidima (CAZ): 512, Cefepima (FEP): 8, Piperacilina/Tazobactam (PIP/TZ): 512/4, Imipenem (IMP): 0,25, Meropenem (MPM): 0,06, Ciprofloxacino (CIP): 32 y Gentamicina (GENT): 8. Los porcentajes de cepas sensibles a PIP/TZ, CIP, GENT, IMP y MPM fueron: 28%, 50%, 64%, 100% y 100% respectivamente. Frente a *E. coli*, las CMI90s fueron: FOX: 32, CAZ: 512, FEP: 16, PIP/TZ: 128/4, IMP: 0,25, MPM: 0,06, CIP: 64 y GENT: 16. Los porcentajes de sensibilidad a PIP/TZ, CIP, GENT, IMP y MPM fueron de: 67%, 17%, 60%, 100%, 100% respectivamente.

Conclusión: En el período 1995-2001 ha habido un descenso significativo en el aislamiento de *K. pneumoniae* productor de BLEE en nuestro medio. Este descenso se ha acompañado de un incremento de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE. Todos los aislamientos fueron sensibles a las carbapenemas.

371

ACTIVIDAD DE CEFEPIMA (CFP), IMIPENEMA (IMP) Y MEROPENEMA (MRP) EN UN MODELO DE NEUMONÍA EXPERIMENTAL POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* (kp) PRODUCTORA DE β-LACTAMASA TIPO AmpC

C. Pichardo, A. Pascual, D. Martín, M.C. Conejo, M.E. Jiménez, I. García, M. Bernabéu, M. de Cueto, L. Martínez y J. Pachón
H.U. Virgen del Rocío, H.U. Virgen Macarena y Facultad de Medicina. Sevilla.

Objetivos: Evaluar la actividad *in vivo* de CFP, IMP y MRP en un modelo de neumonía experimental en cobayas producida por *Kp C2* (cepa sin porinas) y su derivada isogénica

C2p(MG252), que produce la β-lactamasa plasmídica tipo AmpC FOX-5.

Métodos: Se determinó la CMI de CFP, IMP y MRP frente a las dos cepas mediante macrodilución (normas NCCLS). Los cobayos fueron inoculados con 0,25 mL de suspensión bacteriana (10^8 ufc/mL) y se trataron durante 72 horas: Grupo control (CON) (salino estéril im, tid); CFP, IMP y MRP (240 mg/kg/d, im, tid para cada antimicrobiano). El sacrificio se realizó a las 4 h de la última dosis y se evaluaron la esterilización de hemocultivos y pulmones y el aclaramiento bacteriano en pulmón (ufc/g). Análisis: test exacto de Fisher, ANOVA, y post-hoc de Tuckey y Dunnett.

Resultados: Las CMI's (mg/L) de CFP, IMP, y MRP frente a *Kp C2/Kp C2p(MG252)* fueron: 0,5/4, 0,5/0,5 y 0,25/0,5. En CON y en los grupos tratados con CFP o MRP los animales inoculados con *Kp C2* presentaron hemocultivos positivos entre 19% y 30%, mientras que para los inoculados con *Kp C2 p(MG252)* la positividad osciló entre 0% y 11%. Los cobayos tratados con IMP fueron más bacteriémicos que CON [50% vs. 23,5% y 43% vs 11% para los inoculados con *Kp C2* y *Kp C2p(MG252)* respectivamente]. No hubo pulmones estériles en ningún grupo. Con respecto al aclaramiento, todos los grupos terapéuticos de animales infectados con *Kp C2* mejoraron con respecto a CON (CFP: $4,41 \pm 0,5$, IMP: $4,65 \pm 0,4$, MRP: $4,72 \pm 0,5$ vs. CON: $5,65 \pm 0,8$; $p < 0,01$), sin diferencias entre ellos ($p > 0,05$). En los infectados con *Kp C2p(MG252)* el aclaramiento mejoró en todos los grupos de tratamiento (CFP: $4,54 \pm 0,5$, IMP: $4,04 \pm 0,3$, MRP: $4,68 \pm 0,4$ vs. CON: $6,13 \pm 0,6$; $p < 0,01$), e imipenem produjo un aclaramiento mayor que CFP y MRP ($p < 0,05$).

Conclusiones: CFP, IMP y MRP son efectivos *in vivo* frente a *K. Pneumoniae* que expresa la β-lactamasa plasmídica tipo AmpC FOX-5.

372

SELECCIÓN *IN VIVO/IN VITRO* DE MUTANTES RESISTENTES A CEFEPIMA (CFP), IMIPENEMA (IMP) Y MEROPENEMA (MRP) A PARTIR DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* (Kp) PRODUCTORA O NO DE FOX-5

M.C. Conejo, C. Pichardo, A. Pascual, D. Martín, M. de Cueto, M.E. Jiménez, I. García, M. Bernabéu, J. Pachón y L. Martínez Martínez

H.U. Virgen Macarena, Facultad de Medicina, y H.U. Virgen del Rocío. Sevilla.

Objetivo: Estudiar la capacidad de CFP, IMP y MRP para seleccionar *in vivo* e *in vitro* mutantes resistentes de *K. pneumoniae* productora [*Kp C2p(MG252)*] y no productora (*Kp C2*) de FOX-5 (beta-lactamasa tipo AmpC).

Métodos: Las CMI's y CMB's de CFP, IMP y MRP se determinaron por macrodilución. Para la selección de mutantes *in vivo* se sembraron pulmones homogenizados de cobayas inoculados (0,25 mL, 10^8 cfu/mL) y tratados durante 72 h. con CFP, IMP o MRP (240 mg/kg/d, im, tid) en placas con 4 x CMI o con un gradiente (0-16 x CMI) de cada agente. La selección *in vitro* se realizó con bacterias crecidas en TSB (10^8 cfu/mL, 35 °C, 20 h). En cada placa se seleccionaron hasta 4 colonias, definiéndose como mutantes los microorganismos para los que la CMI del antimicrobiano usado en la selección aumentó ≥ 2 diluciones. En las mutantes se determinó la actividad beta-lactamasa por espectrofotometría.

Resultados: Las CMI's/CMB's (mg/L) frente a *Kp C2* y *Kp C2 p(MG252)* fueron: 0,5/0,5 y 4/32 (CFP); 0,5/0,5 y 0,5/0,5 (IMP) y 0,25/0,25 y 0,5/0,5 (MRP), respectivamente. En 2 de los 3 animales inoculados con *Kp C2* tratados con CFP crecieron múltiples colonias en las placas con 4 x CMI y en la zona de gradiente hasta 4 x CMI; la CMI de CFP frente a estos organismos fue de 4-16 mg/L; todos presentaron hiperproducción de beta-lactamasa (219-303 mU/mg vs. 5 mU/mg en la cepa original). En ningún otro caso se seleccionaron mutantes *in vivo*. Sólo hubo crecimiento en la selección *in vitro* a partir de *Kp C2p(MG252)* en presencia de CFP, pero la

CMI de CFP no aumentó frente a ninguna de las posibles mutantes.

Conclusiones: CFP (pero no IMP ni MRP) seleccionó in vivo mutantes resistentes por hiperproducción de beta-lactamasa a partir de *Kp* C2. CFP, IMP y MRP no seleccionaron mutantes a partir de *Kp* C2 p(MG252). Los estudios de selección in vitro no se correlacionaron con los resultados in vivo.

373

ACTIVIDAD COMPARATIVA IN VITRO DE BMS-284756. PROGRAMA SENTRY ESPAÑA (1999-2000)

R. Cantón¹, A. Pascual², E. Loza¹, F. Tubau³, M.I. Morosini¹, E. Perea², R. Martín³, F. Baquero¹ y R.N. Jones⁴

Servicios de Microbiología de los Hospitales

¹Ramón Cajal, Madrid; ²Virgen Macarena, Sevilla;

³Bellvitge, Barcelona y ⁴The Jones Group, Iowa-EEUU.

Objetivo: Evaluar la actividad in vitro de la nueva des-fluoro (6) quinolona BMS-284756 (BMS) frente a microorganismos recogidos en 1999 y 2000 en 3 hospitales españoles durante el programa SENTRY.

Métodos: El estudio de la sensibilidad de 2.599 aislamientos fue realizado en The Jones Group (Iowa, USA) por la técnica de microdilución (NCCLS).

Resultados: La actividad de BMS en comparación con la de ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV) y gatifloxacina (GAT) fue:

Microorganismos (Nº)	BMS Moda (%S)	CIP Moda (%S)	LEV Moda (%S)	GAT Moda (%S)
<i>E. coli</i> (547)	≤ 0,03 (84,0)	≤ 0,25 (83,9)	≤ 0,03 (84,6)	≤ 0,03 (85,1)
<i>Proteus</i> Sp. (63)	0,25 (84,1)	≤ 0,25 (85,7)	0,06 (98,4)	0,12 (93,6)
<i>Klebsiella</i> Sp (152)	0,12 (99,3)	≤ 0,25 (98,0)	≤ 0,03 (98,6)	≤ 0,03 (99,3)
<i>Enterobacter</i> (103)	0,06 (98,0)	≤ 0,25 (96,1)	≤ 0,03 (98,0)	≤ 0,03 (98,0)
<i>P. aeruginosa</i> (227)	1 (66,9)	≤ 0,25 (84,5)	0,5 (85,0)	0,5 (80,1)
<i>A. baumannii</i> (134)	> 4 (15,6)	> 4 (15,6)	> 4 (8,2)	> 4 (8,2)
SARM (64)	2 (95,3)	> 2 (4,6)	4 (91,3)	2 (34,3)
SASM (234)	≤ 0,03 (99,1)	≤ 0,25 (94,8)	0,12 (97,6)	0,06 (97,8)
SCN (143)	≤ 0,03 (86,7)	≤ 0,25 (52,4)	0,12 (44,4)	0,12 (94,4)
<i>Enterococcus</i> (148)	0,25 (66,8)	> 2 (44,5)	1 (63,0)	0,5 (65,5)
<i>S. pneumoniae</i> (246)	0,06 (100)	1 (-)	1 (99,5)	0,25 (99,5)
<i>H. influenzae</i> (219)	≤ 0,03 (100)	≤ 0,03 (100)	≤ 0,03 (100)	≤ 0,03 (100)
<i>M. catarrhalis</i> (94)	≤ 0,03 (100)	≤ 0,03 (100)	≤ 0,03 (100)	≤ 0,03 (100)

CMI (µg/ml); S criterio NCCLS, para BMS se utilizó el mismo que para GAT.

Conclusiones: La actividad de BMS fue similar a la del resto de las fluoroquinolonas en *Enterobacteriaceae*, inferior en *P. aeruginosa* y superior frente a gram-positivos, incluyendo *S. pneumoniae* y SARM.

374

SENSIBILIDAD DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A METICILINA (SARM) A NUEVOS ANTIMICROBIANOS

E. Martín, R. Cías, F. de la Torre y J.J. Picazo

Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

Introducción: Recientemente, han aparecido nuevos antimicrobianos, activos frente a Cocos Gram positivos, que pretenden solucionar los problemas de resistencias que aparecen cada vez con mas frecuencia en éstas bacterias. Entre éstos se encuentran Linezolid y Quinupristina-dalfopristina. El objeto de éste trabajo es comprobar la actividad de éstos antibióticos en *S. aureus* meticilin-resistentes, comparándola con otros antimicrobianos de uso habitual en el tratamiento de éstas infecciones estafilocócicas.

Materiales y métodos: Se ha estudiado la actividad de Linezolid, Quinupristina-dalfopristina, Moxifloxacina, Vancomicina y Teicoplanina frente a 100 cepas aisladas en nuestro Laboratorio en el año 2001 a partir de muestras clínicas de *S. aureus* que presentaban meticilin-resistencia. Las CMI se

obtuvieron por el método de difusión en agar E-test. Como cepa control se utilizó *S. aureus* ATCC 29213 y *E. faecalis* ATCC 29212. La interpretación de los resultados se ha realizado siguiendo los criterios del NCCLS y MENSURA.

Resultados: Los nuevos fármacos Linezolid y Quinupristina-dalfopristina presentan una buena actividad frente a los *S. aureus* meticilin-resistentes probados, siendo sus CMI₅₀ y CMI₉₀ similares a las que muestran Vancomicina y Teicoplanina. Estableciendo el punto de corte para Linezolid en ≤ 2 hay una cepa resistente a éste antibiótico, no encontrándose ninguna resistente a Quinupristina-dalfopristina, Vancomicina ni Teicoplanina. Según las CMI obtenidas con Moxifloxacina, más de la mitad (55%) de las cepas estudiadas son resistentes.

Conclusiones: Linezolid y Quinupristina-dalfopristina se muestran como antibióticos útiles en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* meticilin-resistentes. Moxifloxacina no parece una buena alternativa para el tratamiento de éstas bacterias. *S. aureus* sigue sin presentar resistencias en nuestro medio a Vancomicina y Teicoplanina.

375

ACTIVIDAD IN VITRO DE DIFERENTES COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICOS FRENTE A SARM CON RESISTENCIA INTERMEDIA A LA VANCOMICINA (GISA)

Y. Armero, J.M. Miró, F. Marco, C. García de la Mària, M. Almela, A. Moreno, M.E. Díaz, A. del Río, N. de Benito, X. Claramonte, J.M. Gatell y M.T. Jiménez de Anta
Hospital Clínic. Instituto de Inmunología. Barcelona.

Objetivo: En las infecciones graves por SARM, el tratamiento de elección es la vancomicina. La descripción de cepas que manifiestan resistencia intermedia a este antibiótico (GISA) o que presentan pequeñas subpoblaciones resistentes (hGISA) obliga a buscar tratamientos alternativos.

Métodos: Las cepas GISA objeto del estudio fueron Mu 50, ATCC 700788 y ATCC 700789 y las cepas hGISA, Mu 3, 1178 y 1299 (estas dos últimas aisladas en nuestro centro). Se determinó la actividad *in vitro* de vancomicina (Van), linezolid (Lz) y quinupristina/dalfopristina (Q/D) más oxacilina (Ox) o Imipenem (I). Fosfomicina (F) se combinó con I o Q/D. Las combinaciones se testaron por el método del tablero de ajedrez y aquellas que se mostraron más activas también se estudiaron mediante curvas de letalidad.

Resultados: En las cepas homogéneas, las combinaciones de Van, Lz o Q/D más antibióticos betalactámicos mostraron una actividad sinérgica y en las heterogéneas, un efecto aditivo o indiferente. F más I presentó, en las cepas sensibles a F, una actividad sinérgica frente a las cepas heterogéneas y bactericida para las cepas homogéneas. El resto de las combinaciones no presentaron ninguna actividad.

Conclusiones: En las cepas sensibles a la F, tanto GISA como hGISA, F más I se mostró como la combinación más activa y la única con actividad bactericida. En conjunto, el resto de las combinaciones sólo mostraron una actividad aditiva o moderadamente sinérgica. Son necesarios los estudios *in vivo* para confirmar estos resultados.

376

EFICACIA DE LA COMBINACIÓN DE GLICOPÉPTIDOS Y β-LACTÁMICOS EN UN MODELO DE PERITONITIS EXPERIMENTAL POR GISA

A. Domenech, S. Ribes, C. Cabellos, M.A. Domínguez, A. Montero, J. Linares, J. Ariza y F. Gudiol
Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Barcelona.

La aparición en los últimos años de cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a glicopéptidos ha llevado a la búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento (tto) de estas infecciones. Se ha sugerido que las com-

binaciones de glicopéptidos y β -lactámicos pueden actuar de manera sinérgica frente a estas cepas.

Objetivo y métodos: Intentamos determinar la eficacia de las combinaciones de Vancomicina (VAN) 30 mg/kg/4 h y Teicoplanina (TEI) 40 mg/kg/24 h con Cloxacilina (CL) 160 mg/kg/2 h en el tratamiento de la peritonitis experimental por *S. aureus*. Para ello desarrollamos un modelo de peritonitis en el ratón y estudiamos tres cepas de *S. aureus* con diferente sensibilidad a glicopéptidos. CIMs de las cepas de estudio (en μ g/ml); cepa A: CL > 256; VAN 1,5; TEI 2; cepa B: CL > 256, VAN 2, TEI 4; cepa C: CL > 256, VAN 4, TEI 12. Diferentes grupos de ratones fueron inoculados via intraperitoneal con la suspensión bacteriana. Cuatro horas más tarde (hora 0) se inició el tratamiento (vía sc) durante 48h (n = 6 por pauta de tto). Las dosis de antibiótico se escogieron en base a un estudio farmacocinético previo. Se incluyeron animales control (n \geq 12 por cepa) inoculados y sin tratamiento. A las 48 h de tto se tomaron muestras de sangre y se realizó un lavado peritoneal para determinar la presencia de bacteriemia y el recuento bacteriano en el líquido peritoneal respectivamente.

Resultados: La disminución del recuento bacteriano a las 48h (Δ log ufc/ml 48h) para las pautas VAN/VAN + CL/TEI/TEI + CL fue el siguiente:

cepa A: -4,25/-4,66/-3,58/-4,03;

cepa B: -4,31/-4,49/-4,36/-3,36;

cepa C: -2,81*/-3,04*/-3,67/-3,56.

*p < 0,05 pautas VAN/VAN + CL de cepa C vs cepas A y B.

Conclusiones: En estas condiciones no se demostró sinergia ni antagonismo entre glicopéptidos y β -lactámicos frente a cepas GISA. Se demostró de manera significativa el descenso de la eficacia del tratamiento con VAN y VAN + CL al aumentar la CIM de *S. aureus* a los glicopéptidos.

377

VENTAJAS DE LA PRUEBA DEL TRÉBOL (CLOVERLEAF) PARA DETECTAR LA PRODUCCIÓN DE PENICILASA EN *S. SAPROPHYTICUS*

M.T. Bastida, M. Expósito, C. Martínez, M.A. Ruiz y P. López
Laboratorio de Microbiología. Hospital de l'Esperit Sant. Barcelona.

Objetivo: Comparar los métodos de difusión en placa, detección de β -lactamasa por la prueba de la hoja del trébol y por la prueba de la Cefinasa (BBL) para mostrar la producción de penicilinas en *S. saprophyticus*.

Métodos: Se estudiaron 55 *S. saprophyticus* aislados de muestras significativas desde enero de 2000 a septiembre de 2001. Difusión en placa; utilizando la adaptación de NeoSensitab de la normativa de la NCCLS para estafilococos con tabletas de 5 μ g de penicilina, y considerando resistentes halos < 26 mm. Determinación de CMI por E-test a la penicilina, según indicaciones del fabricante. Prueba de la hoja del trébol, según método standard en placa de Mueller Hinton usando como indicador *Micrococcus luteus* ATCC 9341, como antibiótico una tableta de 5 μ g de penicilina e incluyendo controles positivo y negativo (*S. aureus* ATCC 29213 y ATCC 25923 respectivamente). Se consideró la prueba positiva cuando se produjo una modificación del halo de inhibición de *M. luteus* alrededor de la cepa investigada.

Resultados: De las 20 cepas con halos \geq 26 mm, en 4 cepas no se detectó penicilinas por ningún método; y su CMI fue 0,12 mg/L. Otras 4 presentaron una prueba del trébol positiva débil con cefinasa negativa, y en tres la CMI fue de 0,12 y de 0,25 mg/L en la cuarta. Solo una cepa (CMI de 0,25 mg/L) fue positiva para Cefinasa y negativa para la prueba del trébol. En el resto de cepas con halos < 26 (n = 35) no se hizo sistemáticamente CMI, todas fueron positivas en la prueba del trébol y 19 en la de Cefinasa.

Conclusiones: La prueba de la hoja del trébol es la más sensible, barata y cómoda para detectar la inactivación enzimática de penicilina por *Staphylococcus saprophyticus*.

El procedimiento que ha resultado más eficaz y rápido es la combinación simultánea del antibiograma y la prueba del trébol, reservando la prueba de la Cefinasa para las cepas con halos \geq 26 mm y prueba de trébol negativa.

378

ESTUDIO EN *STAPHYLOCOCCUS SAPROPHYTICUS* DE LA RESISTENCIA A LA OXACILINA POR DIFERENTES TÉCNICAS IN VITRO

M.T. Bastida, M. Expósito, C. Martínez, M.A. Ruiz y P. López
Laboratorio de Microbiología. Hospital de l'Esperit Sant. Barcelona.

Objetivo: Estudiar y comparar las técnicas de detección de resistencia a la oxacilina en *Staphylococcus saprophyticus*: Látex de detección rápida de PBP2 (L_PBP2), crecimiento en placas con 6 μ g de oxacilina (placas MRSA), difusión en placa y microdilución en caldo, en un laboratorio convencional de microbiología sin emplear técnicas de biología molecular. CEPAS: Cincuenta y cinco cepas de *S. saprophyticus*, aisladas entre enero de 2000 y agosto de 2001.

Métodos: Para estudio de crecimiento en placas MRSA, difusión en placa y microdilución en caldo, se siguió la normativa de la NCCLS aplicando las siguientes modificaciones: Las placas MRSA se incubaron 48 h. Para la difusión en placa, se siguió la adaptación de la normativa de NeoSensitab con tabletas de 1 μ g de oxacilina (R_OXA1). Técnica L_PBP2: se siguieron las instrucciones del fabricante (bioMérieux), usando como inóculo el crecimiento bacteriano del borde del halo de inhibición generado alrededor de una tableta de R_OXA1 en una placa de agar sangre.

Resultados: Aplicando los criterios de lectura de estafilococos plasmocoagulasa negativa y *S. aureus* respectivamente, la CMI de 50 cepas fue \geq 0,5 mg/L y solamente en dos cepas \geq 4 mg/L (CMI \geq 16 mg/L). Por difusión en placa con R_OXA1, en 18 cepas se obtuvieron halos \leq 17 y en tres \leq 13, dos con CMI \geq 16 y una 0,5 mg/L, estas tres cepas fueron las únicas que crecieron en la placa MRSA. La prueba de L_PBP2, solo presentó una reacción claramente positiva en una cepa con CMI de \geq 16 mg/L. Otras 5 cepas presentaron reacción positiva débil tras inducción.

Conclusiones: Los criterios establecidos para *S. aureus* son más adecuados que los de los SPC- para aplicarlos a *S. saprophyticus*. El crecimiento en placas MRSA constituye un método complementario y sencillo. La prueba de L-PBP2, con frecuencia es de difícil interpretación incluso tras inducción y no es aconsejable como estudio de rutina para la detección de resistencia a oxacilina en *S. saprophyticus*.

379

EVALUACIÓN DEL SISTEMA WIDER I CON CEPAS CLÍNICAS DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* Y *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

F. Fernández Cuenca*, L. Martínez Martínez*, A. Pascual*, M. de Cueto*, O. Gutiérrez**, J. Nieto** y E.J. Perea*
Departamento de Microbiología, *Universidad de Sevilla.
**Francisco Soria Melguizo, S.A., Madrid.

Objetivo: Evaluar el sistema Wider I (Francisco Soria Melguizo, S.A.) para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos en cepas clínicas de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*.

Métodos: Se incluyeron 42 cepas de *H. influenzae* y 57 cepas de *S. pneumoniae* aisladas (1997-1999) del tracto respiratorio superior, y con diferentes fenotipos de sensibilidad antimicrobiana. Se determinaron las CMIs de amoxicilina más ácido clavulánico, ampicilina, cefotaxima, cefuroxima, ciprofloxacino, claritromicina, cloranfenicol, eritromicina, levofloxacino, meropenem, penicilina, rifampicina, tetraciclina, trimetoprim más sulfametoxazol y vancomicina median-

te el sistema WIDER I empleando paneles Wider 1W MIC (Francisco Soria Melguizo, S.A), que se inocularon siguiendo las instrucciones del fabricante. Como método de referencia se empleó la microdilución, siguiendo las recomendaciones del NCCLS. Se evaluaron 3 tipos de errores en las categorías clínicas: máximo, mayor y menor.

Resultados: El porcentaje total de resultados concordantes (diferencia de CMI en $\pm 1 \log_2$ dilución) fue del 99,6% para *H. influenzae* y del 99,7% para *S. pneumoniae*. No se detectaron errores máximos. Los errores mayores sucedieron en el 1,7% de las cepas de *H. influenzae* (ampicilina). Los errores menores se distribuyeron como sigue: 2,3% (amoxicilina más ácido clavulánico, cefuroxima y cloranfenicol), 7,1% (ampicilina) y 16,7% (claritromicina) para *H. influenzae*, y 1,7% (meropenem, cloranfenicol y eritromicina), 3,4% (cefuroxima, amoxicilina más ácido clavulánico y tetraciclina) y el 10,3% (levofloxacin) para *S. pneumoniae*.

Conclusiones: El sistema Wider I es un método fiable para determinar la sensibilidad in vitro de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* a los antimicrobianos.

380

ELEVADA RESISTENCIA DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* A ERITROMICINA

J. Colomina, A. Burgos, M.L. Vaya, J. Villar y A. Guerrero
Servicio de Microbiología, Hospital de La Ribera, Alcira-Valencia.

Objetivos: El Hospital de la Ribera es un centro de reciente creación (enero-1999). Atiende a una población de 235.000 personas, distribuidas en las 29 poblaciones que constituyen el Área de Salud 10 de la Comunidad Valenciana. El presente trabajo constituye el primer estudio de sensibilidad de *S. pyogenes* en nuestra área geográfica.

Métodos: Se han estudiado 108 cepas aisladas entre enero y noviembre de 2001.

El 82% (84/108) procedían de pacientes pediátricos, el 53% (57/108) eran varones y el 80% (86/108) correspondieron a muestras faríngeas.

Los antibióticos estudiados fueron: penicilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclinas, cotrimoxazol y telitromicina.

El estudio de sensibilidad se realizó mediante el método de disco-difusión según normas NCCLS. La diferenciación fenotípica de las cepas resistentes a eritromicina se efectuó mediante la prueba del doble disco en agar.

Resultados: Todas las cepas fueron sensibles a penicilina, tetraciclina y telitromicina, y resistentes a cotrimoxazol. El 42% fue resistente a eritromicina y el 6% a clindamicina. La resistencia a eritromicina fue: 1) según el tipo de muestra, del 47% en las de origen faríngeo y del 14% en las no faríngeas; 2) según la edad, del 52% en población pediátrica y del 7% en adultos. Los resultados de diferenciación fenotípica fueron: 87% fenotipo M, 5% MLS-inducible y 8% MLS-constitutivo.

Conclusiones: Se ha detectado un elevado nivel de resistencia a eritromicina, fundamentalmente en las muestras de origen faríngeo. No se han detectado resistencias a telitromicina. Consideramos importante realizar, al menos periódicamente, estudios de sensibilidad frente a *S. pyogenes*.

381

ACTIVIDAD IN VITRO DE FLUORQUINOLONAS FRENTE A AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *CORYNEBACTERIUM UREALYTICUM*

F.J. Sánchez*, M.N. Gutiérrez*, B. Mora**, G. Yagüe** y J.L. Muñoz Bellido*

*Dpto. de Microbiología. Hospital Universitario de Salamanca.

**Hospital Morales Meseguer. Murcia.

Objetivos: Determinar la actividad antimicrobiana de fluoroquinolonas frente a aislamientos clínicos de *Corynebacterium urealyticum*.

Material y métodos: Se ha estudiado la actividad in vitro de nueve fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino, sitafloxacino, clinafloxacino) frente a 64 aislamientos clínicos de *C. urealyticum* mediante dilución en agar siguiendo las normas de los NCCLS para enterococos.

Resultados: Únicamente el 8% de los aislamientos se mostraron sensibles a las quinolonas clásicas (ciprofloxacino, ofloxacino), con CIM₅₀ entre 32 µg/ml y > 128 µg/ml. Las nuevas quinolonas (levofloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino) muestran una mejor actividad frente a este tipo de aislamientos aunque las CIMs se encuentran por encima del punto de corte. Las quinolonas de más reciente desarrollo mostraron mayor actividad intrínseca con CIM90s de 4 µg/ml y 8 µg/ml para moxifloxacino y gatifloxacino y 2 µg/ml para sitafloxacino y clinafloxacino.

Conclusiones: Los resultados obtenidos confirman la alta frecuencia de resistencia de la antiguas fluoroquinolonas, algunas de ellas con más del 90% de resistencia. Las nuevas fluoroquinolonas aumentan significativamente la actividad sobre todo clinafloxacino y sitafloxacino.

Sesión 18

Infecciones por *Acinetobacter*

382

PROYECTO GEIH-Ab 2001: ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE LA EPIDEMIOLOGÍA DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

J. Rodríguez Baño, J.M. Cisneros, J. Vila, A. Pascual, L. Martínez Martínez, G. Bou, J. Pachón y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH)

Objetivos: Numerosos hospitales han comunicado brotes epidémicos causados por *A. baumannii* (AB). Este estudio pretende describir la epidemiología de este microorganismo en una amplia muestra de hospitales españoles.

Métodos: Estudio prospectivo multicéntrico de prevalencia de periodo de colonización/infección por AB. Se incluyeron todos los casos detectados a partir de muestras clínicas durante el mes de noviembre de 2000 en los hospitales que aceptaron participar. Las cepas se enviaron a un laboratorio centralizado para identificación definitiva.

Resultados: Participaron 28 hospitales que atienden a una población de más de 11 millones de personas (6 de Andalucía; 5 de Cataluña, Comunidad de Madrid y Galicia; 2 de Castilla-La Mancha; y 1 de Baleares, Canarias, Cantabria, Castilla-León y Navarra); uno de ellos es un centro de crónicos. Siete tienen < 500 camas, 10 tienen entre 500 y 1.000 camas, y 11 > 1.000 camas. En el periodo de estudio se aisló AB en 25 centros (89%). El número de casos incluidos fue de 245. El rango de casos por hospital fue de 0 a 42. La prevalencia de periodo fue de 0,19 casos por 1.000 estancias (rango: 0 a 1,17). No hubo diferencias significativas por comunidades autónomas o tamaño del centro. El 93% de los casos se consideró de adquisición nosocomial, el 3% importados de otro centro y el 4% comunitarios. Solo 3 casos fueron pediátricos. La prevalencia de periodo fue mayor en UCIs (1,29 casos por 1.000 estancias) que en servicios médicos o quirúrgicos. La mediana de estancia previa a la obtención de la muestra fue de 15 días.

Conclusiones: AB se aisló en la mayoría de hospitales participantes, siendo principalmente de adquisición nosocomial tardía. Algunos casos se consideraron importados de otros centros. Hay un absoluto predominio en adultos. La prevalencia de periodo fue muy variable entre los hospitales, y fue mayor en las UCIs que en otros servicios.

383

PROYECTO GEIH-Ab 2001: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COLONIZACIÓN/INFECCIÓN POR *A. BAUMANNII* EN HOSPITALES ESPAÑOLES

J.M. Cisneros, J. Rodríguez-Baño, A. Pascual, L. Martínez-Martínez, J. Vila, G. Bou, J. Pachón y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH).

Métodos: Estudio prospectivo multicéntrico de prevalencia de período de colonización/infección por *A. baumannii*. Se incluyeron todos los pacientes con aislamiento de *A. baumannii* en muestras clínicas durante el mes de noviembre del año 2000.

Resultados: Se incluyeron 206 pacientes pertenecientes a 25 hospitales. Edad media 54,3 años (0-91 años), 149 varones (72%). Enfermedad subyacente crónica 149 (72%). Adquisición nosocomial 201 (97,6%). Factores de riesgo más comunes: tratamiento antimicrobiano 164 (80%); sonda uretral 161 (78%) y estancia en UCI 142 (69%). Muestras clínicas más frecuentes: respiratorias 82 (40%); orina 51 (25%); exudado herida quirúrgica 46 (22%) y sangre 8 (4%). Se consideraron infección 110 casos (53%) y colonización 96 (47%). La neumonía fue la infección más común 36 (33%), seguida de la ITU 17 (15,5%), la traqueobronquitis 16 (14,5%) y la infección de la herida quirúrgica 15 (14%). La infección se manifestó con sepsis grave, shock séptico o síndrome de disfunción multiorgánica en 29 (26%). Recibieron tratamiento antimicrobiano apropiado 71 pacientes (64,5%). La mortalidad a los 30 días del diagnóstico fue del 18,9% (39 pacientes). En los pacientes infectados la mortalidad y la estancia hospitalaria postcultivo fueron mayores que en los colonizados (26,3% vs 10,4%, $p < 0,05$ y 23,2 vs 19,2 días, $p < 0,05$). En los pacientes infectados la presencia de sepsis grave/shock séptico; la estancia en UCI y el tratamiento inapropiado son los factores independientes de mal pronóstico seleccionados en el análisis multivariante.

Conclusiones: *A. baumannii* causa con igual frecuencia colonización e infección nosocomial. La infección se acompaña de mayor morbimortalidad que la colonización. En los pacientes infectados el tratamiento antimicrobiano inapropiado es un factor independiente de mal pronóstico.

384

INFECCIÓN NOSOCOMIAL POR *ACINETOBACTER BAUMANNII* EN ÁREAS DE MEDICINA INTERNA Y CUIDADOS INTENSIVOS EN NUESTRO HOSPITAL

M.T. Cabezas, J. Salas, J. Fierro, M.A. Molina, M.J. Giménez, L. Martínez, T. Fernández, R. Álvarez-Ossorio, J.A. Sáez y C. Avivar

H. Poniente. El Ejido, Almería. ISCIH.

Objetivos: Estudio descriptivo de la situación en nuestro hospital, de la infección por *Acinetobacter baumannii* (*A.b.*).

Material y métodos: Se ha aislado *A.b.* en 56 pacientes en el período comprendido entre 1 de marzo de 1999 y 31 de octubre de 2001. Para el control de la infección se tomaron muestras ambientales (habitaciones de paciente, equipo médico y personal sanitario), mediante el método de gasa húmeda. El cultivo de *A.b.* en Agar MacConkey (Biomérieux®) y la identificación y el estudio de sensibilidad en VITEK (Biomérieux®), y en paralelo, antibiograma en Agar-Müller-Hinton con técnicas disco-difusión. El serotipado se llevó a cabo en CNM-ISCIH mediante PFGE.

Resultados: La edad media de los pacientes media es de 72 ± 11 años (rango 22-88) con un perfil similar: edad avanzada, patología crónica de base, ingresos previos (44%), y politratados con diferentes antibióticos. Se han aislado 187 cepas, 73 en esputo, 59 en heridas, 6 en sangre, 5 en catéter y, además, 122 cepas en muestras ambientales. Hasta septiembre del 2001 se detectan brotes epidémicos en área de MI; a partir de

entonces aparece un brote en UCI. Durante el año 1999 predomina el serotipo 1 (a,b,c) en 6 pacientes y en 2, se aislaron 2 serotipos diferentes. En el año 2000 se serotiparon 22 cepas: hasta julio, 14 eran serotipo 1 (10 cepas) y 1 de los serotipos 3, 4, 5, 6. A partir de octubre del 2000 a marzo del 2001 aparece el serotipo 14 en 9 de 16 cepas. La sensibilidad a Imipenem es estable durante todo el período (63,3%), al igual que a Ampicilina + Sulbactam (72,7%); a Tobramicina, disminuye claramente durante el 2001 (de 54,24% a 27%). Todas las cepas testadas frente a Colistina han sido sensibles (93%).

Conclusiones: En nuestros pacientes, *Acinetobacter baumannii* es responsable de una elevada morbimortalidad. Observamos la desaparición del serotipo 1 a favor del serotipo 14, demostrando mayor resistencia. La Colistina parece ser una buena alternativa de tratamiento.

385

***ACINETOBACTER BAUMANNII*: ¿EXISTE LA TRANSMISIÓN AÉREA NOSOCOMIAL?**

A. Cotura, C. Roig, A. Rivera, P. Cortes, F. Sánchez y J. Barrio
Servei Microbiologia y Unitat Malalties Infeccioses. Hospital Sant Pau. Barcelona.

Objetivos: Evaluar la correlación entre cepas aisladas del aire en una Unidad de Cuidados Intensivos con cepas aisladas de controles de portadores en esa Unidad.

Métodos: Durante un control ambiental rutinario en la Unidad de Cuidados Intensivos de nuestro hospital se detectó la presencia en el aire de *Acinetobacter baumannii* cuyo patrón de sensibilidad era comparable al de las cepas de la misma especie aisladas de pacientes ingresados en esa Unidad. Como consecuencia de esta observación se estudió la relación entre las cepas de ambos orígenes. Se han evaluado seis cepas: tres de procedencia aérea (obtenidas a partir del muestreador Air Sampler MAS 100 System, Merck) y tres de procedencia humana, según el protocolo establecido por el hospital para control de portadores (frotis faríngeo, rectal y axilar). Las cepas de *Acinetobacter baumannii* fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas y se realizaron los estudios de sensibilidad a los antimicrobianos por técnicas de difusión y microdilución. La posible relación clonal entre las cepas se estableció mediante estudio del patrón de sensibilidad y del patrón de restricción genómica por PFGE utilizando la enzima *ApaI*.

Resultados: En las tres cepas de origen aéreo se detectó tres patrones de sensibilidad (I, II, III) y tres pulsotipos (A, B, C) existiendo una correlación absoluta entre ambos (AI, BII, CIII). De estas tres clonas, dos de ellas, AI y BII, se aislaron en los frotis de los pacientes.

Conclusiones: La difusión de *Acinetobacter baumannii* en el medio intrahospitalario tiene lugar, fundamentalmente, por contacto a través de las manos y fomites. El aislamiento de la misma cepa en el aire y en los pacientes colonizados sugiere la posibilidad de valorar prospectivamente el papel de la transmisión aérea en la diseminación de cepas multirresistentes en unidades como las de Cuidados Intensivos.

386

ANÁLISIS GENOTÍPICO DE UN BROTE DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL POR *ACINETOBACTER BAUMANNII* MULTIRRESISTENTE

A. Saldarreaga, P. Marín, P. García-Martos, J. Puerto, J. Mira, R. Cisterna y A. García-Tapia
Hospital Puerta del Mar, Cádiz. Hospital de Basurto, Bilbao.

Objetivos: Comunicar un brote de infección por *Acinetobacter baumannii* multirresistente y caracterizar molecularmente las cepas para determinar su relación genética y definir los distintos clones implicados.

Métodos: Se estudiaron un total de 22 aislados clínicos de *A. baumannii* pertenecientes a otros tantos pacientes, 20 de ellos ingresados en Cuidados Intensivos, obtenidos en un período de 4 meses. La identificación se realizó mediante sistema comercial WIDER (Soria Melguizo, Madrid) y pruebas convencionales. La sensibilidad a antimicrobianos se efectuó por dilución en medio líquido según las normas del NCCLS. La caracterización genotípica se llevó a cabo mediante el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), utilizando la técnica ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences-Polimerase Chain Reaction*), con los primers ERIC I y ERIC II, y RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) con el primer AP₃.

Resultados: El análisis genómico permitió identificar 6 patrones de amplificación diferentes entre las 22 cepas de *A. baumannii*; clones denominados aleatoriamente 1, 2, 3, 4, 5, 6. El clon 2 fue el predominante, englobando al 55% de las cepas, todas ellas resistentes a imipenem y meropenem y sensibles a colimicina. El 22% de los aislamientos pertenecieron al clon 1, con el mismo perfil de resistencia a carbenapenemas que el clon 2. Solamente 2 aislamientos (9%) se incluyeron en el clon 3. Las tres cepas restantes mostraron patrones o clones diferentes.

Conclusiones: En el brote epidémico de infección por *Acinetobacter baumannii* detectado en la Unidad de Cuidados Intensivos de nuestro hospital, existe un clon predominante al que pertenecen la mayor parte de las cepas. Las técnicas de biología molecular son suficientemente discriminatorias para diferenciar especies y subespecies de *Acinetobacter* y, por tanto, una herramienta muy valiosa para tipificar brotes de infección, dada la limitación de otros marcadores epidemiológicos.

387

ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* PROCEDENTES DEL HOSPITAL DE SANTA MARINA (BILBAO)

M.J. Canduela*, F. López-Otsoa*, I. Pujana*, G. Martín**, K. Towner*** y L. Gallego*

*Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. UPV. **Servicio Microbiología Hospital de Santa Marina. ***QMC-PHLS Nottingham, UK.

El objetivo de este estudio fue determinar las características genéticas y epidemiológicas de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* aislados en el hospital de Santa Marina (Bilbao) de pacientes bronquiectásicos crónicos.

Se analizaron un total de 126 aislamientos clínicos. Para la identificación se utilizó la técnica de PCR con los iniciadores AP₃, ERIC2 y M13. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa *Molecular Analyst/Machintosh Fingerprinting*. En todos los aislamientos se realizó también un análisis del contenido plasmídico.

Se identificaron 20 clones diferentes mediante el iniciador M13. Sin embargo con los iniciadores AP₃ y ERIC2 se observaron diferencias en algunas cepas de 2 o 3 bandas mostrando 9 variantes subclonales. Tres fueron los clones predominantes: uno de ellos con 51 aislamientos (40,47%), otro con 33 aislamientos (26,2%) y un tercero con 11 aislamientos (8,73%).

51 aislamientos contenían plásmidos cuyos tamaños estaban representados en un rango de 205 -1,35 kb

En conclusión, el número de clones encontrados fue elevado pero la mayor parte de los aislamientos pertenecían a tres clones. Esto significa la amplia diseminación de estos genotipos en el medio ambiente hospitalario estudiado. Para determinar el clon definitivo es importante combinar los resultados de varios iniciadores. La mayoría de los aislamientos no contenían plásmidos y tampoco observamos ninguna relación entre los clones aislados y su contenido plasmídico.

388

CONTROL DE DOS BROTES POR *ACINETOBACTER BAUMANNII* MULTIRRESISTENTE EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS POSQUIRÚRGICOS

B. Padilla, C. Sánchez-Carrillo, C. Pérez, J. Guinea, J.A. Gómez y E. Bouza

Servicio de Microbiología Clínica. H. Gregorio Marañón. Madrid.

Objetivo: Descripción de dos brotes nosocomiales por *Acinetobacter baumannii* multirresistente (AB-MR) y su control en una unidad de cuidados intensivos post-quirúrgicos de nuestro hospital donde no existía previamente infección y/o colonización por este microorganismo.

Métodos: Tras la aparición de cada caso índice, se inició un plan de actuación para detectar activamente pacientes que presentarían colonización por AB-MR mediante la realización de 3 muestras (exudado rectal, piel y muestra del TRS) a todos los pacientes que permanecían al menos 48 h en la unidad y semanalmente hasta el alta. A los pacientes con aislamiento de AB-MR en cualquier muestra se les sometió a un estricto aislamiento de contacto y lavados con clorhexidina.

Resultados: El primer brote tuvo lugar desde abril a octubre 1998 (196 pacientes estudiados) y el segundo desde abril a julio 2001 (98 pacientes estudiados). El número de pacientes colonizados y/o infectados fue de 27 en el 1º brote y 7 para el segundo. La estancia media de los pacientes con colonización respecto a los no colonizados de la misma unidad fue de 27,6/7,2 días para el 1º brote y de 38,3/6,9 días para el segundo. La mortalidad global fue de 32,2 y 71,4% para el primer y segundo brote respectivamente. Globalmente, el rendimiento para la detección de AB-MR fue de 72, 70 y 68% para la muestra rectal, de piel y respiratoria respectivamente. Después de un periodo de seguimiento de 3 meses tras el alta del último paciente detectado en cada brote, no se evidenció ningún caso nuevo.

Conclusión: La detección activa y rápida de pacientes infectados y de posibles colonizados así como el cumplimiento inmediato y estricto de las medidas de aislamiento, son medios útiles para el control de un brote por AB-MR en una unidad sin incidencia previa por este microorganismo.

389

ERRADICACIÓN DE UN BROTE DE *A. BAUMANNII* (AB) EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS

M. Navarro, J. Vallés, G. Serrate, M. Canals, D. Fontanals, D. Mendoza y F. Segura

Corporació Sanitària Parc Taulí. Dpto. Enfermedades Infecciosas. Sabadell, Barcelona.

En agosto de 2001 apareció un brote de *A. baumannii* en la UCI de nuestro centro, lo que motivó la puesta en marcha de un programa de control.

Objetivos: Describir las características del brote y evaluar la eficacia de las medidas de aislamiento y los métodos de control empleados.

Métodos: Se iniciaron medidas de aislamiento de contacto en el caso índice y con la detección del segundo caso se procedió al aislamiento por cohortes (pacientes colonizados, no colonizados y los que ingresaron posteriormente). Se recogían semanalmente muestras faríngeas, perianales, axilares u otras según criterio clínico y se continuaron los cultivos hasta tres semanas después de la aparición del último caso. Se utilizó para la siembra un medio Mckonkey y posteriormente, al comprobar que se trataba de un brote epidémico, un medio selectivo. Se destinó un equipo exclusivo de enfermería para los enfermos colonizados en UCI y posteriormente en las unidades de hospitalización.

Resultados: Total de pacientes con AB: 11 (1 infección, caso índice, y 10 colonizaciones. En los primeros 15 días se detectaron 4 casos y en los 20 días posteriores los restantes. En

este momento se restringió el número de ingresos y se mantuvieron cerradas 6 camas durante 3 días utilizándose seguidamente para nuevos ingresos, estableciéndose medidas de aislamiento de contacto en todos ellos. Sólo se detectó un nuevo caso después de la adopción de estas medidas. El número máximo de pacientes colonizados simultáneamente en UCI fue 6/14 (42,8%). Media días de positivización desde el ingreso en UCI: 14,6 (1-48). La axila fue primer lugar de detección de muestras positivas en 6 casos (3 casos con simultaneidad). El total de pacientes a los que se les realizó cultivos de vigilancia fue 110 (10% pacientes colonizados).

Conclusiones: La aplicación precoz de medidas de aislamiento, la distribución de los pacientes en cohortes y la colaboración de todo el equipo asistencial ha permitido erradicar el brote de *A. baumannii* en nuestro centro.

390

DIFERENCIACIÓN DE BIOTIPOS DE *A. CALCOACETICUS-A. BAUMANNII* MEDIANTE ESPECTROMETRÍA INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A.I. Dueñas, M.A. Bratos, J.M. Eiros, A. Mayo, M.A. Miguel, A. Orduña y A. Rodríguez-Torres

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario, Facultad de Medicina, Valladolid.

Objetivos: Diferenciar los biotipos de *A. calcoaceticus-A. baumannii* mediante espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier.

Material y métodos: Se estudiaron 356 cepas de *A. calcoaceticus-A. baumannii* que se identificaron y biotipificaron según el esquema simplificado de Bouvet y Grimont. Las muestras se procesaron para la espectrometría (se sembraron en caldo, se sometieron a tres ciclos de lavado-centrifugación y los sedimentos se liofilizaron) y se analizaron en un espectrofotómetro Cygms 100 FT-IR Spectrometer (Mattson Instruments). Se obtuvo el registro (espectro) de la región del infrarrojo medio (4.000-500 cm^{-1}) y los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de componentes principales y análisis discriminante mediante el programa el programa SAS v.6.12

Resultados: Los mejores porcentajes de correcta clasificación de los cuatro biotipos estudiados se obtuvieron en el análisis discriminante de las dos primeras ventanas del espectro (900-700 cm^{-1} y 1.200-900 cm^{-1}) y sus derivadas, que fueron del 57,9% para el biotipo 2, el 76,5% para el biotipo 9, el 85,6% para el biotipo 1 y el 93,3% para el biotipo 18, con una especificidad próxima al 100% para este último biotipo. En las demás ventanas del espectro (1.500-1.200 cm^{-1} , 1.800-1.500 cm^{-1} , 3.000-2.800 cm^{-1}) se obtuvieron, en general, porcentajes de clasificación más bajos. Se analizaron, además, las combinaciones por pares de las tres ventanas más discriminativas, con las que no se mejoraron los resultados obtenidos con el análisis de las ventanas por separado.

Conclusiones: La espectrometría-FTIR se ha mostrado útil para diferenciar algunos biotipos de *A. calcoaceticus-A. baumannii*, especialmente el biotipo 18, aunque se requieren más estudios para confirmar estos resultados.

391

PROYECTO GEIH-Ab 2001: SENSIBILIDAD DE *ACINETOBACTER* SPP. AISLADOS EN HOSPITALES ESPAÑOLES A LOS ANTIMICROBIANOS

F. Fernández Cuenca, A. Pascual, J. Vila, G. Bou, J.M. Cisneros, J. Rodríguez Baño, J. Pachón, L. Martínez Martínez y Grupo de estudio de Infección Hospitalaria (GEIH)

Objetivo: Determinar la sensibilidad de los aislamientos de *Acinetobacter* spp. (Ab) del proyecto GEIH a antimicrobianos de uso clínico.

Métodos: Se incluyeron 244 cepas aisladas durante noviembre de 2000 en 28 hospitales españoles. La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas y genotípicas (AR-DRA). La relación clonal entre las cepas de Ab se determinó mediante PFGE. Las CMI₅₀ de amikacina (AK), ampicilina (AP), ampicilina más sulbactam (A/S), azitromicina (AZ), cefalotina (CF), cefepima (FP), cefoxitina (FX), ceftazidima (CZ), ciprofloxacino (CP), doxiciclina (DX), gemifloxacino (GX), gentamicina (GN), imipenem (IP), meropenem (MP), piperacilina (PP), polimixina B (PB), rifampicina (RF), sulbactam (SB) y tobramicina (TO) se determinaron mediante microdilución, siguiendo las recomendaciones del NCCLS.

Resultados: Se obtuvieron 96 clones diferentes de Ab. La sensibilidad se estudió con un representante de cada clon, incluyendo dentro de un mismo clon todas las cepas con distinta sensibilidad a CZ, SB, IP, CP, GN AK y DX. La CMI₅₀ (mg/L) fue similar a la CMI₉₀ para AP, PP, CF y FX (≥ 512), GN (≥ 256), CP (≥ 128) y GX (≥ 32), mientras que para los demás antimicrobianos estos valores fueron 64 y ≥ 512 (CZ), 32 y 256 (AK, FP), 8 y 64 (DX, SB), 16 y 128 (A/S), 1 y 128 (IP), 2 y ≥ 128 (MP), 8 y 128 (TO), 32 y 64 (AZ), 4 y 8 (RF) y 1 y 2 (PB), respectivamente. Los porcentajes de cepas sensibles y con sensibilidad intermedia (para los que se definen puntos de corte por el NCCLS) fueron 6,2 y 15,8 (PP), 25,9 y 6,8 (CZ), 24,9 y 15,3 (FP), 57,6 y 17,5 (SB), 44,1 y 24,3 (A/S), 63,3 y 6,2 (IP), 53,1 y 9,0 (MP), 18,6 y 0,6 (CP), 22,0 y 4,5 (GN), 33,3 y 16,4 (TO), 49,2 y 12,4 (AK) y 45,2 y 4,0 (DX), respectivamente.

Conclusiones: Existe gran variabilidad en los patrones de sensibilidad de Ab aislados en España a los antimicrobianos. Los antimicrobianos más activos frente a Ab fueron PB, RF, IP, MP, DX, SB y A/S.

392

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

F. Lopez-Otsoa*, M.J. Canduela*, I. Pujana*, G. Martín**, K. Towner*** y L. Gallego*

*Universidad del País Vasco. **H. de Santa Marina.

***QMC-PHLS Nottingham, U.K.

Se analizaron 126 aislamientos de *Acinetobacter baumannii*, recogidos durante 18 meses en el Hospital de Santa Marina (Bilbao). El objetivo del estudio fue el análisis de la susceptibilidad antibiótica y la relación epidemiológica entre aislamientos. La susceptibilidad frente a los antibióticos testados (CMI) fue realizada siguiendo las normas de la NCCLS. Las técnicas empleadas para la caracterización genética fueron AP-PCR: AP3 (5'-TCACGATGCA-3') y ERIC-PCR: ERIC2 (5'-AAGTAAGTCACTGGGGTGAGCG-3'). El análisis epidemiológico se realizó utilizando el software informático: Molecular Analyst/Macintosh Fingerprinting.

El porcentaje de aislamientos resistentes frente a cada uno de los antibióticos ensayados fue el siguiente: Cefotaxima: 90%, Amikacina: 49%, Gentamicina: 85% Imipenem: 61%, Meropenem: 59%, Ticarcilina: 83%, Ceftazidima: 86%, Cefepime: 82%, Aztreonam: 82%, Ciprofloxacino: 86%, Norfloxacino: 88%, Levofloxacino: 89% y Ofloxacino: 92%. Este patrón de resistencias reveló a la Amikacina como antibiótico más eficaz, siendo el Ofloxacino el menos activo. Los perfiles de amplificación obtenidos con cada secuencia, nos demostraron de manera inequívoca, la existencia de 29 agrupaciones clonales, siendo 3 de ellos predominantes (62% de la población analizada).

Como conclusión, destacar que la mayoría de cepas multi-resistentes pertenecía a una de las agrupaciones clonales mayoritarias, aunque también había aislamientos multirresistentes en el resto de agrupaciones identificadas y afirmar que el aumento de cepas de *Acinetobacter baumannii* multi-resistentes del Hospital de Santa Marina (Bilbao), parece deberse principalmente a la diseminación de un clon multi-resistente mayoritario.

393

SENSIBILIDAD A DIVERSOS ANTIBIÓTICOS DE LAS CEPAS DE DIFERENTES BIOTIPOS DE *A. CALCOACETICUS-A. BAUMANNII*

A.I. Dueñas, J.M. Eiros, M.A. Bratos, C. Merino, M.A. Miguel, P. Gutiérrez, A. Orduña y A. Rodríguez-Torres

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario, Facultad de Medicina de Valladolid.

Objetivos: Estudiar la sensibilidad mediante microdilución en caldo de cepas de distintos biotipos de cepas de *A. calcoaceticus-A. baumannii* aisladas entre marzo de 1999 y enero de 2000.

Material y métodos: La identificación presuntiva de las cepas de *Acinetobacter* y el antibiograma se obtuvieron mediante paneles comerciales (Wider, Fco Soria Melguizo, Madrid). La identificación a nivel de especie se confirmó con las pruebas indicadas en el esquema simplificado de Bouvet y Grimont. La biotipificación de las cepas se realizó mediante pruebas de asimilación de sustratos siguiendo el procedimiento descrito por Bouvet y Grimont.

Resultados: Se identificaron ocho biotipos entre las cepas de *A. calcoaceticus-baumannii*: biotipo 1 (271), biotipo 2 (30), biotipo 3 (1), biotipo 6 (1), biotipo 8 (4), biotipo 9 (5), biotipo 14 (1) y biotipo 18 (11). Las cepas del biotipo 1, mostraron porcentajes de sensibilidad inferiores al 10% frente a piperacilina, ticarcilina, ampicilina, gentamicina, tobramicina, aztreonam las cuatro cefalosporinas ensayadas y las dos quinolonas. Los porcentajes de sensibilidad más altos se observaron frente a sulbactam (76,9%) e imipenem (91,2%). Los porcentajes de sensibilidad frente a la mayoría de los antibióticos de las cepas del biotipo 2 fueron ligeramente superiores a los del biotipo 1, con porcentajes del 85,7% para el sulbactam y del 96,4% para el imipenem. Las cepas de los restantes biotipos consideradas conjuntamente, mostraron porcentajes de sensibilidad superiores al 80% frente a ocho de los antibióticos ensayados (ticarcilina, ceftriaxona, cefepime, piperacilina-tazobactam, sulbactam, imipenem, meropenem y ampicilina).

Conclusiones: Se observaron diferencias en la sensibilidad de las cepas de los distintos biotipos de *A. calcoaceticus-A. baumannii* estudiadas, siendo las cepas de los biotipos 1 y 2 más resistentes que las de los restantes biotipos.

394

ANÁLISIS IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DE VARIOS ANTIBIÓTICOS RESPECTO A LA COLISTINA FRENTE A UNA CEPA DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* (Ab) CON ALTA RESISTENCIA (R) A CARBAPENÉMICOS

C. Borraz, A. Montero, J. Ayats, F. Tubau, A. Doménech, S. Ribes, C. Ardanuy y J. Ariza

Hospital de Bellvitge. Departamento de Enfermedades Infecciosas. Hospital de Llobregat, Barcelona.

Ab presenta en la actualidad en muchos hospitales del mundo R a todos los antibióticos, incluidos los carbapenémicos. En nuestro hospital, la cepa prevalente presenta R de alto nivel a imipenem (IMP) (CMI = 512) y sulbactam (SUL) (CMI = 128), y CMI = 8 de tobramicina (TOB) y rifampicina (RIF), y es sensible únicamente a la colistina (COL) (CMI = 0,5).

Objetivos: Valorar la actividad de la COL en solitario frente al resto de ATB y sus combinaciones mediante el método de curvas de letalidad.

Métodos: Se estudiaron cada uno de los ATB en solitario a concentraciones de 2x, 1x, 1/2x y 1/4x CMI. El efecto bactericida de la COL se estudió a concentraciones de 4x, 8x, 16x y 32x CMI. Las combinaciones estudiadas fueron: IMP+TOB, IMP+RIF, IMP+SUL, SUL+TOB, SUL+RIF y TOB+RIF, a concentraciones de 1x, 1/2x y 1/4x CMI para ca-

da uno de los antibióticos. Un ATB se definió como bactericida cuando se obtuvo un descenso en el número de LOGs de UFC ≥ 3 respecto al inóculo inicial. Se definió como sinergia entre 2 ATB cuando el efecto de Δ LOGs de la combinación fue ≥ 2 comparado con la actividad del ATB más activo en solitario.

Resultados: Con cada ATB en solitario, IMP y RIF fueron bactericidas a las 24 h a concentraciones de 1x y 2x CMI. La COL mostró actividad bactericida con concentraciones $\geq 16x$ CMI. Respecto a la utilización de 2 ATB en combinación, las combinaciones de IMP con SUL, TOB o RIF, de SUL con TOB o RIF y de RIF con TOB presentaron actividad aditiva o sinérgica.

Conclusiones: Mediante el método de curvas de letalidad frente una cepa de Ab con alta R a carbapenémicos el único ATB bactericida a concentraciones alcanzables en humanos fue la RIF. La COL mostró escasa eficacia, precisando concentraciones $\geq 16x$ CMI para lograr un efecto bactericida. Las combinaciones IMP con SUL, TOB o RIF, SUL con TOB o RIF y TOB con RIF podrían ser alternativas terapéuticas en el tratamiento de las infecciones causadas por Ab resistente a carbapenémicos.

395

MECANISMO DE ACCIÓN ANTIBIÓTICA SOBRE *ACINETOBACTER BAUMANNII* MULTIRRESISTENTES DE PÉPTIDOS CORTOS CECROPINA-MELITINA

J.M. Saugar*, T. Alarcón**, C. Chiva***, M. López-Brea**, D. Andreu*** y L. Rivas*

*Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid.

**Hospital Universitario La Princesa, Madrid.

***Universidad Pompeu Fabra, Barcelona.

Los péptidos antibióticos eucariotas constituyen una potencial alternativa quimioterapéutica a los antibióticos habituales¹ frente a la cada vez más frecuente aparición de multirresistencias en *Acinetobacter baumannii*, incluyendo polimixina B². Recientemente hemos descrito la actividad del análogo de cecropina A-melitina CA(1-8)M(1-18) frente a *Acinetobacter* multirresistente³, cuyo mecanismo de acción difiere de la polimixina B⁴. En una nueva etapa se han estudiado 9 análogos de dicho péptido de entre XX y XX residuos; las LD₅₀ de 7 de ellos son inferiores a 3 μ M. El desplazamiento de dansil-polimixina por los análogos activos demuestra su unión al LPS, con la consiguiente permeabilización de la membrana externa, demostrada por la sensibilización de la célula a la lisis por detergente. Se seleccionó el análogo 3 (KWKLKKIGAVLKV-NH₂) como el de mayor actividad para los estudios de permeabilización de membrana interna. Este análogo facilita la entrada de la sonda catiónica SYTOX y su unión al DNA intracelular, medida por el incremento de su fluorescencia, despolariza la membrana plasmática conforme al incremento de fluorescencia de la sonda DiSC(3)-5 y disminuye la velocidad de consumo de oxígeno. La correlación entre estas actividades es estadísticamente significativa, por lo que el mecanismo letal se basaría esencialmente en la permeabilización de la membrana interna, con pérdida de la homeostasis intracelular.

La disminución de la longitud del péptido disminuye considerablemente los costos de obtención sintética del mismo así como su inmunogenicidad, lo que facilita su posible utilización como nuevo agente quimioterapéutico.

Bibliografía:

1. Andreu D, Rivas L. (1998) Biopolymers 47:415-433.
2. Urban C et al. (2001) Antimicrob Ag Chemother 44:415-433.
3. Alarcon et al. (2001) Rev Esp Quimioterap 14:184-190.
4. Saugar et al. (2001) Antimicrob Ag Chemother (En prensa).

Subvencionado por proyectos FIS 99/0025, CAM 08/0029/1998 y Programa de Grupos Estratégicos CAM.

396

ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 PÉPTIDOS CORTOS HÍBRIDOS CECROPINA-MELITINA EN *ACINETOBACTER BAUMANNII*

T. Alarcón*, J. M. Saugar**, L. Rivas**, D. Andreu*** y M. López-Brea*

*H.U. La Princesa, Madrid. **C. Inv. Biológicas (CSIC), Madrid.

***Univ. Pompeu Fabra, Barcelona.

Objetivo: Determinar la actividad de 3 híbridos cecropina-melitina de cadena corta en *A. baumannii*, comparando su actividad con la de CA(1-8)M(1-18).

Métodos: Se estudiaron dos cepas de *A. baumannii*, una cepa control sensible (ATCC 19606) y un aislamiento clínico multirresistente (incluyendo carbapenémicos). Se determinó la actividad *in vitro* de 3 péptidos híbridos cecropina A-melitina de cadena corta: CRIS2 (KWKLFFKKILKVL), CRIS3 (KWKLKKIGAVLKVL) y CRIS7 (WKLLKKILKIL) y el péptido CA(1-8)M(1-18) (CAM). Se determinó la CMI mediante microdilución en caldo y la actividad bactericida mediante curvas de muerte. Se utilizó Mueller Hinton caldo, inóculo de 10^5 - 10^6 ufc/ml y 5 concentraciones dobles seriadas desde 16 μ M para CAM y desde 8 μ M para los otros péptidos. Se realizó recuento de colonias al tiempo 0 y después de 1, 2, 6 y 24 h de incubación a 37 °C.

Resultados: La CMI fue de 1 mg/l con CAM, 2 mg/l con CRIS2 y 1 mg/L con CRIS3 y CRIS7 tanto para la cepa sensible como para la cepa multirresistente. En el estudio de curvas de muerte se observó una disminución del número inicial de colonias por debajo del nivel de detección (100 ufc/ml), en 2 horas con 4, 8 y 16 μ M de CAM, en las dos cepas probadas, aunque con 4 y 8 μ M se observó un aumento del número de colonias a las 24 h. Los 3 péptidos más cortos fueron más activos que CAM y la muerte bacteriana se produjo en 1 o 2 h de incubación a concentraciones de 2, 4, 8 μ M con CRIS2, CRIS3 y CRIS7 en la cepa resistente y también con 1 μ M en la cepa sensible. Además, no se observa recuperación bacteriana con concentraciones $\geq 1 \mu$ M de CRIS3 y CRIS7 o $\geq 2 \mu$ M de CRIS2, tanto en la cepa sensible como en la multirresistente.

Conclusión: Los péptidos híbridos cecropina-melitina presentan buena actividad *in vitro* frente a *A. baumannii* y los de cadena corta mejoran en la actividad bactericida, sugiriendo que pueden ser alternativas en el tratamiento de las infecciones producidas por estos patógenos.

397

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES DE CLASE I EN *ACINETOBACTER BAUMANNII*

M.J. Canduela*, F. López-Otsoa*, I. Pujana*, G. Martín**, K. Towner*** y L. Gallego*

*Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. UPV, Bilbao.

**Servicio Microbiología Hospital de Santa Marina, Bilbao.

***QMC-PHLS Nottingham, UK.

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de integrones de clase I en aislamientos de *Acinetobacter baumannii*, identificar los genes que contienen y su relación con la resistencia a aminoglicósidos y a β -lactámicos.

Se analizaron un total de 126 aislamientos procedentes de muestras clínicas del Hospital de Santa Marina (Bilbao). La sensibilidad de los antimicrobianos se determinó mediante CMI según los criterios de la NCCLS. Los antibióticos testados fueron amikacina, gentamicina, ticarcilina, ceftazidima, cefotaxima y cefepime. La detección de integrones de Clase I se realizó mediante amplificación con los iniciadores 5'CS y 3'CS y posterior digestión con el enzima *Hinf*I. Por último se llevó a cabo la secuenciación de los integrones detectados. El porcentaje de resistencia a los antibióticos analizados fue de

un 85% a Gentamicina, 49% a Amikacina, 90% a Cefotaxima, 86% a Ceftazidima, 82% a Cefepime y de un 83% a Ticarcilina. Los integrones encontrados fueron de 4 tipos a, b, c y d. El integrón a con 760 pb y en cuya digestión obtuvimos 3 fragmentos de 350, 220 y 190 pb; el integrón b con 550 pb; el integrón c con 800 pb y en cuya digestión obtuvimos dos fragmentos de 550 y 170 pb y el integrón d con 600 pb y en cuya digestión obtuvimos tres fragmentos de 300, 170 y 100 pb. La secuenciación del integrón a mostró la presencia de un gen *aadB* que comenzaba en el nucleótido 87 y un gen OXA-7 en el 472. La secuenciación del integrón c mostró un gen *aac(6')* que comenzaba en el nucleótido 120. No se han podido secuenciar los integrones b y d.

En conclusión, el elevado nivel de resistencia mostrado en las cepas de *A. baumannii* analizadas puede deberse a la presencia de integrones de clase I en los que se confirmó la presencia de genes de resistencia a β -lactámicos y aminoglicósidos.

398

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA β -LACTAMASA TIPO OXA, CODIFICADA EN UN INTEGRÓN, EN *ACINETOBACTER BAUMANNII*

J. Ruiz, M.M. Navia, J. Sánchez, M.T. Jiménez de Anta y J. Vila S. Microbiología, Hospital Clinic-IDIBAPS, Barcelona.

Objetivo: Estudiar los mecanismos de resistencia a β -lactámicos presentes en una cepa clínica de *Acinetobacter baumannii*.

Metodología: Los niveles de susceptibilidad a antimicrobianos se establecieron mediante E-test. La presencia de β -lactamasas se determinó mediante isoelectroenfoque. La presencia de integrones tipo 1 se estableció mediante PCR con cebadores específicos. Los integrones obtenidos se clonaron en un vector tipo pCRII, y se secuenciaron. Mediante PCR con cebadores adaptados, se subclonó la β -lactamasa en un vector (pAlter) seleccionable por tetraciclina, determinándose su espectro de actividad.

Resultados: En una cepa resistente a ampicilina, ceftazidima, piperacilina, cefotaxima, ceftoxitina, ticarcilina, piperacilina + tazobactam y aztreonam (CMI > 256 μ g/ml) y a cefepime (CMI > 32 μ g/ml) e intermedia a amoxicilina + clavulánico (CMI: 16 μ g/ml), se determinó, mediante pI, la presencia de 2 β -lactamasas (pI: 7,4 y > 8), la segunda de las cuales, probablemente, la cefalosporinasa cromosómica. El estudio de integrones reveló la presencia de 2 (550 pb y > 2Kb). En el segundo de ellos se detectó la presencia de una *aacA4*, un ORF y una *oxa* (OXA-37), con una homología en aminoácidos del 99,6% con la OXA-20 (previamente descrita en este microorganismo). Al igual que en esta la principal característica de la OXA-37 es el codón de inicio (TTG en vez de ATG). Al ser subclonada se detectaron las siguientes CMIs: ampicilina 6 μ g/ml, cefotaxima 0,125 μ g/ml ceftoxitina 16 μ g/ml, ticarcilina 12 μ g/ml, piperacilina + tazobactam 4 μ g/ml, aztreonam 6 μ g/ml, cefepime < 0,002 μ g/ml y amoxicilina + clavulánico 6 μ g/ml.

Conclusiones: Se ha identificado una nueva β -lactamasa tipo OXA en *A. baumannii*. No obstante, su contribución en el desarrollo de resistencia frente a β -lactámicos es modesta.

399

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN TRANSPOSÓN QUE CONTIENE EL GEN *tetA* EN UN AISLAMIENTO CLÍNICO DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

A. Ribera*, I. Roca**, J. Ruiz*, I. Gibert** y J. Vila*

*S. Microbiología, ICII, H. Clínic IDIBAPS, Barcelona.

**D. Genética y Microbiología. UAB, Barcelona.

Objetivo: El objetivo de este estudio es el de analizar los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a te-

traciclina en un aislamiento clínico de *Acinetobacter baumannii*.

Metodología: Para ello, se obtuvo una librería genómica de esta cepa mediante extracción de DNA genómico, digestión parcial con enzima de elevada frecuencia de corte (*Sau3AI*), clonación de fragmentos entre 4-9kb en un vector de expresión (pBSK) y posterior transformación de una cepa de *Escherichia coli* (DH5 α) sensible a la mayoría de antibióticos. Posteriormente se seleccionó mediante 18 μ g/ml de tetraciclina y se analizaron los clones obtenidos resistentes a dicho antibiótico.

Resultados: Se obtuvo un clon resistente a tetraciclina. Se procedió a caracterizar el inserto (5859pb) y se encontró que correspondía al gen *tetA* asociado a un sistema de expulsión activa de tetraciclina. Junto al gen *tetA* (1199pb), se clonó *tetR* (650pb), gen represor del anterior, 2019pb de una transposasa (*tnpA*), de un total de 2972pb, y entre el gen *tetR* y la transposasa, se encontraron unos 1348pb correspondientes a una IS (IR más otra transposasa) similar a un IS encontrado en *Salmonella typhi*. Además, se comprobó la actividad del gen responsable de la resistencia a tetraciclina en la cepa de *E. coli* mediante el cálculo de la CMI de dicho antibiótico. Mientras que la CMI de tetraciclina de la cepa salvaje era de 0,75 μ g/ml, la de la cepa clonada era de 256 μ g/ml.

Conclusión: En este trabajo se demuestra la presencia del gen *tetA* (gen que codifica para una bomba de expulsión activa y es responsable de resistencia a tetraciclina) en *A. baumannii* y se sugiere la transferencia de resistencia a tetraciclina entre diferentes especies, ya que dicho gen se encuentra localizado en un transposón y mantiene una homología casi del 100% con el descrito en otras bacterias gram-negativas.

400

ESTUDIO DEL PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS EN ACINETOBACTER BAUMANNII

L. Pérez, T. Alarcón, S. López-Hernández, S. Jiménez, E. Escudero, B. Buendía y M. López-Brea
Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

Objetivo: Comparar el perfil de resistencia de 156 cepas de *A. baumannii*, aisladas de muestras clínicas significativas en el periodo de 1995-1997, con 97 cepas obtenidas en el periodo 1999-2000.

Materiales y métodos: Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de las 253 cepas de *A. baumannii* por el método de dilución en agar, siguiendo las normas del NCCLS del año 2000, a los siguientes antibióticos: ticarcilina (TIC), piperacilina (PIP), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), imipenem (IMP). Se definieron 5 grupos según la sensibilidad a los betalactámicos (BL) probados: el fenotipo I incluía los aislamientos sensibles a los 5 BL, el fenotipo II, las cepas resistentes a TIC, PIP y sensibles a CTX, CAZ e IMP, el fenotipo III, los aislamientos sensibles a TIC e IMP, resistentes a CTX y con actividad variable frente a PIP y CAZ. El fenotipo IV agrupaba los aislamientos solamente sensibles a IMP y con actividad variable a CAZ, y el fenotipo V las cepas resistentes a todos los BL (variable = intermedio o resistente).

Resultados: Al comparar las cepas aisladas en el periodo 1995-1997 con las de los años 1999-2000, se observó que el porcentaje de cepas del fenotipo I disminuyó del 7% al 1%. Con respecto al fenotipo II, los resultados fueron similares, 0,6% en el periodo 1995-1997 y 0% en las aisladas en 1999-2000. Con respecto al fenotipo III se produjo una disminución brusca del 55,1% al 1%. En el caso del fenotipo IV, los porcentajes aumentaron del 26,2% al 78,3% y el número de cepas agrupadas en el fenotipo V, aumentó del 10,8% al 19,5%.

Conclusiones: Durante el primer periodo de estudio, el fenotipo predominante fue el III (55,1%), seguido del IV (26,2%), mientras que durante el segundo periodo, los fenotipos más frecuentes fueron el IV (78,3%) y el V (19,5). En el segundo periodo de estudio, la mayoría de los aislamientos fueron resistentes a todos los BL excepto IMP.

401

RESISTENCIA A IMIPENEM EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE ACINETOBACTER BAUMANNII

F. Lopez-Otsoa*, N. Elguezabal, M.J. Canduela*, I. Pujana*, G. Martín**, K. Towner*** y L. Gallego*

*Universidad del País Vasco, Bilbao. **H. de Santa Marina, Bilbao. ***QMC-PHLS Nottingham, U.K.

Se analizaron 126 aislamientos de *Acinetobacter baumannii*, recogidos durante 18 meses en el Hospital de Santa Marina (Bilbao). El objetivo del estudio fue el análisis de la susceptibilidad antibiótica frente a Imipenem y la identificación de los clones y mecanismos implicados en la resistencia. La sensibilidad frente a Imipenem (CMI) fue determinada siguiendo las normas de la NCCLS. Efectuamos la caracterización genética mediante AP-PCR y ERIC-PCR. La extracción de proteínas de membrana (OMPs) se realizó con el método de carbonato y análisis en SDS-PAGE 10% con tinción de Coomassie. La detección fenotípica de carbapenemasas se llevó a cabo mediante el test de Hodge y la de metalobetalactamasas (M β LS), mediante el ensayo de sinergia entre discos (ED-TA-Imipenem).

El 61% de los aislamientos fueron resistentes frente a Imipenem (62% de la población analizada). Se detectaron 29 agrupaciones clonales totales, siendo dos las mayoritariamente resistentes. No se apreciaron diferencias significativas en las OMPs, entre aislamientos susceptibles y resistentes. El ensayo de Hodge, reveló de forma inequívoca la existencia de carbapenemasas en cuatro de los aislamientos seleccionados. Solo uno fue claramente positivo en el test de detección de M β LS.

Como conclusión, destacar que el aumento de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a Imipenem del Hospital de Santa Marina (Bilbao), parece deberse a la diseminación de un clon y que la mayoría de cepas resistentes pertenecían exclusivamente a una de las agrupaciones clonales mayoritarias. En los aislamientos analizados se detectó la presencia de carbapenemasas, que podrían explicar la resistencia a Imipenem.

402

TRATAMIENTO DE LA NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA POR ACINETOBACTER BAUMANNII MULTIRRESISTENTE

J. Garnacho, J.L. García, C. Ortiz, F.J. Jiménez, S. Gallego y A. Barrero

Servicio de Cuidados Críticos y Urgencias. H.U. Virgen del Rocío. Sevilla.

Objetivo: Comparar las distintas pautas de tratamiento de la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) por *Acinetobacter baumannii* (Ab) para conocer la eficacia y toxicidad de la colistina intravenosa.

Material y métodos: Estudio prospectivo de 37 episodios de NAV (criterios del CDC) por Ab. El diagnóstico microbiológico se llevó a cabo por aspirado traqueal cuantitativo ($> 10^6$ UFC/mL) o por cepillo telescópico ($> 10^3$ UFC/mL). En los casos de Ab solo sensible a colistina se empleó ésta por vía intravenosa (metansulfonato de colistina 3-5 mg/kg/día). Si existía otra opción se empleó tratamiento según antibiograma. Se evaluó: gravedad al ingreso por APACHE II, dis-

función de órganos por escala SOFA, manifestación clínica, tiempo de tratamiento, curación clínica, curación microbiológica y efectos adversos: toxicidad renal (definida como incremento de creatinina > 2 mg/dL o reducción de diuresis al 50%), hepática, hematológica y neurológicas por estudio neurofisiológico (ENF). Se empleó la Chi-cuadrado y la t-Student siendo significativo $p < 0,05$.

Resultados: Se empleó colistina (Grupo C) en 21 casos, imipenem-cilastatina (Grupo IM) en 14 y otros en 2. El APACHE II ($19,6 \pm 7,2$ vs. $20,5 \pm 7$) y el SOFA al diagnóstico de NAVM ($10 \pm 4,9$ vs. $11,7 \pm 6,6$) fueron similares en ambos grupos así como la incidencia de sepsis grave o shock séptico (86% vs. 79% $p = \text{NS}$). La antibioterapia empírica fue apropiada más veces en el grupo IM (71% vs. 19%; $p = 0,002$). La curación clínica se obtuvo en un 57% en ambos grupos con erradicación microbiológica en un 32% en el grupo C y 22% en el IM ($p = \text{NS}$). El tiempo medio de tratamiento fue de 11 días en ambos casos. La mortalidad hospitalaria fue 62% en grupo C y 64% en IM ($p = \text{NS}$). La mortalidad atribuible fue del 40% y 39% respectivamente. Desarrollaron toxicidad renal 3 en Grupo C y 5 en IM ($p = \text{NS}$). Se realizó ENF en 12 pacientes del grupo C sin objetivarse bloqueos de conducción.

Conclusiones: El empleo de colistina intravenosa es un tratamiento al menos tan seguro y eficaz como el imipenem para la NAVM por Ab.

403

TRATAMIENTO SIMPLE Y COMBINADO FRENTE A LA INFECCIÓN POR *ACINETOBACTER BAUMANNII* (Ab) CON MODERADA Y ALTA RESISTENCIA (R) A IMPENEM (IMP) EN UN MODELO DE NEUMONÍA EXPERIMENTAL EN RATÓN

A. Montero, X. Corbella, A. Doménech, J. Ayats, F. Tubau, C. Borraz, C. Cabellos, F. Gudiol y J. Ariza

Hospital de Bellvitge, Barcelona.

En los últimos años, Ab ha adquirido un grado de multi-R antibiótica que incluye al IMP. A pesar de que se ha utilizado ampliamente colistina (COL) como tratamiento (tto), no hay estudios in vivo que comparen su actividad antibacteriana frente otros antibióticos (ATB).

Objetivo: Comparar la eficacia de COL frente otros ATB en solitario y en combinación en el tto de la neumonía por Ab en el ratón.

Métodos: Se utilizaron 2 cepas de Ab con distinto grado de R a IMP. Las CMIs fueron (clon D/clon E): IMP 8/512, sulbactam (SUL) 4/128, tobramicina (TOB) 8/8, rifampicina (RIF) 8/8 y COL 0,5/0,5. Mediante canulación intratraqueal se indujo neumonía a ratones inmunocompetentes C57BL/6. Las dosis de ATB administradas fueron: IMP 200 mg/kg/d, SUL 120 mg/kg/d, TOB 60 mg/kg/d, RIF 25 mg/kg/d y COL 500.000 U/kg/d. Los resultados de la eficacia antibiótica a las 44 horas de tto se expresaron como: media recuentos pulmonares grupo control-media grupo tratamiento (en $\Delta \log_{10}$ UFC/g).

Resultados: En los ratones control, los recuentos pulmonares a las 48 horas de la inoculación fueron: clon D $10,83 \pm 0,32$; clon E $10,77 \pm 0,35$ UFC/g de tejido pulmonar. Los resultados de la actividad antibiótica fueron (clones D/E): IMP -4,48/0,24; SUL -3,67/-0,04; TOB -3,45/-4,16; RIF -3,62/-5,15; COL -0,4/-2,39; IMP + SUL -3,34; IMP + TOB -5,37/-5,59; IMP + RIF -3,82/-6,98; SUL + TOB -4,62/-4,95; TOB + RIF -3,97/-6,81.

Conclusiones: Aunque COL mostró in vitro CMI bajas que hacían pensar en una buena eficacia antibiótica, los tratamientos aislados con TOB o RIF fueron más efectivos en este modelo de neumonía en ratón para el tto de Ab con R moderada o alta a IMP. IMP y SUL mantuvieron su eficacia en el tto de Ab con R moderada. Las combinaciones de IMP o SUL con TOB mejoraron la actividad de los anti-

bióticos en solitario para el tto del clon D y E. Las combinaciones de IMP o TOB con RIF fueron las más eficaces en el tto de la neumonía en ratones por el clon E o con alta R a IMP.

403 bis

PROYECTO GEIH-Ab 2001: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE 244 CEPAS DE *ACINETOBACTER* SP. AISLADAS EN DIVERSOS HOSPITALES ESPAÑOLES

A. Ribera, F. Fernández-Cuenca, A. Beceiro, G. Bou, L. Martínez Martínez, A. Pascual, J.M. Cisneros, J. Rodríguez-Baño, J. Pachon, J. Vila y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH).

Objetivo: Los objetivos de este estudio son: 1) identificar la especie de *Acinetobacter* de todos los aislamientos clínicos recopilados de diferentes hospitales del estado español y 2) estudiar la relación epidemiológica entre ellos.

Metodología: Primeramente se identificaron todos los aislamientos clínicos mediante métodos fenotípicos (pruebas bioquímicas), y genotípicos (ARDRA, Análisis del patrón de restricción resultante de la digestión con enzimas de restricción de elevada frecuencia de corte del producto de amplificación del DNA ribosomal 16S). Posteriormente se procedió a estudiar la relación epidemiológica de todas las cepas mediante dos técnicas epidemiológicas comúnmente utilizadas, REP-PCR y PFGE (Digestión del DNA cromosómico con enzimas de baja frecuencia de corte y electroforesis en campo pulsado).

Resultados: Según los resultados de las pruebas de identificación, de las 244 cepas, 225 correspondían a *A. baumannii*, 18 a *Acinetobacter* Genoespecie 3 y un aislado correspondía a *A. junii*. Con respecto al estudio epidemiológico se obtuvieron 96 pulsotipos diferentes entre los 28 hospitales, mientras que por REP-PCR se obtuvieron 95 patrones diferentes. El índice de discriminación, calculado según el método de Hunter y Gaston, para el PFGE y REP-PCR era de 0,972 y 0,963 respectivamente.

Conclusiones: La especie más prevalentemente aislada en estos 28 hospitales es *A. baumannii*. Asimismo, se puede concluir que ambas técnicas epidemiológicas (REP-PCR y PFGE) poseen un poder discriminativo equivalente y que existe una gran heterogeneidad de clones de *A. baumannii* en toda España.

Sesión 19

VIH (III). Tratamiento antirretroviral

404

EVOLUCIÓN DEL USO DE ANTIRRETROVIRALES EN ANDALUCÍA, 1992-2000

F. Lozano, R. Jurado, P. Viciano, L. Rodríguez-Félix, V. Gutiérrez-Ravé, M. Causse, M. Torres-Tortosa, J. Marín, M. González y A. Arco. GAEI.

Unidad Enfermedades Infecciosas. Hospital de Valme. Sevilla.

Objetivo: Describir la evolución del tratamiento antirretroviral (TAR) en la población infectada por el VIH atendida en los hospitales públicos de Andalucía en el período 1992-2000.

Métodos: 12 estudios transversales de pacientes adultos con infección por el VIH atendidos en las consultas externas de Enfermedades Infecciosas y Medicina Interna de