

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

Bilbao, 16-19 de mayo de 2004

Sesión 1 Resistencia antibiótica (I)

001

ESTREPTOCOCCO DEL GRUPO B DE TRANSMISIÓN VERTICAL RESISTENTE A MACRÓLIDOS Y LINCOSAMIDAS EN ESPAÑA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y POBLACIONAL

J.J. González, A. Andreu, P. Alomar, M.A. Blanco, A. Bordes, J. Bosch, J. Cacho, A. Cid, A. Coira, M. de Cueto, E. Dopico, J.M. García, A. Gil, C. Gimeno, C. Guardia, S. Illescas, T. Juncosa, J. Lite, R. Martínez, A. Mazón, B. Orden, M.P. Pérez, M. Rebollo, M. de la Rosa, M. Rodríguez, I. Sanfeliu, F. Sanz, P. Villanueva, L. Viñas. Grupo de Estudio de Infección Perinatal (GEIP) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)

Objetivos: Estudiar el mecanismo de resistencia a macrólidos y lincosamidas en cepas de estreptococos del grupo B (EGB) aisladas en España. Analizar su clonalidad.

Material y métodos: En un estudio multicéntrico de sensibilidad a antimicrobianos se caracterizaron 79 cepas resistentes a macrólidos (12,5%) y/o lincosamidas (11,8%): 61 aisladas en vagina/recto de gestantes (año 2002) y 18 en neonatos con sepsis precoz (1997-2002). Sesenta y nueve cepas presentaban un fenotipo constitutivo de resistencia (cMLS_B), 4 inducible (iMLS_B), 3 por bomba de expulsión activa y 3 sensibles a macrólidos pero resistentes a clindamicina. Por PCR se determinó la presencia de los genes de resistencia a macrólidos y/o lincosamidas *ermB*, *ermTR*, *mefA* y *linB*. La clonalidad de las cepas se estudió por PFGE del DNA digerido con *Sma*I.

Resultados: Del total de cepas resistentes a macrólidos se detectó el gen *ermB* en un 63,2% (48 cepas), *ermTR* en un 30,3% (23 cepas), *mefA* en un 3,9% (3 cepas) mientras que en el 2,6% (2 cepas) no amplificó ningún gen. De las cepas con fenotipo cMLS_B: 69,6% presentaban *ermB* (48 cepas), 27,5% *ermTR* (19 cepas) y en el 2,9 % restante (2 cepas) no se detectó ninguno. Todas los EGB con fenotipo iMLS_B presentaron el gen *ermTR*. Los 3 EGB con fenotipo de resistencia por bomba de expulsión presentaban el gen *mefA*. El gen *linB* no amplificó en ninguno de los 3 EGB con resistencia exclusiva a clindamicina. No se observaron diferencias significativas entre las cepas aisladas de sepsis y las aisladas en colonización ($p > 0,05$). Mediante PFGE, las 79 cepas analizadas presentaron 48 patrones distintos, mientras que 14 cepas fueron no tipables. Ajustando el nivel de similitud a un 50%

se definieron 4 grupos: en el grupo I se incluyeron 42 cepas (53,2%), en el II 21 (26,6%) y en los grupos III y IV una cepa respectivamente (1,6%). En el grupo I predominaron las cepas de EGB con el gen *ermB* ($P = 0,02$) mientras que en el II predominaron las cepas con el gen *ermTR* ($P = 0,005$). Las cepas procedentes de sepsis y de colonización se distribuyeron de forma equitativa entre los distintos grupos.

Conclusiones: En España, el gen de resistencia a macrólidos y lincosamidas más frecuente en EGB es el *ermB*. Existe una gran diversidad clonal en las cepas de EGB resistentes a macrólidos aunque, probablemente, las cepas que presentan el gen *ermB* y las que presentan el gen *ermTR* provienen de dos ancestros diferentes.

002

SENSIBILIDAD IN VITRO A TELITROMICINA, DE *STREPTOCOCCUS VIRIDANS* RESISTENTES A ERITROMICINA (GENOTIPOS ERM-B O MEF-A) AISLADOS EN BACTERIEMIAS DE ORIGEN ORAL

I. Tomás, M. Álvarez, C. López-Meléndez, M. Tomás, J. Limeres y P. Diz

Introducción/objetivo: En España, la eritromicina (E) continúa siendo el antimicrobiano de elección en la profilaxis de infecciones focales, para pacientes alérgicos a las penicilinas con factores de riesgo reconocidos, que van a someterse a determinadas manipulaciones odontológicas. Sin embargo, se ha demostrado una elevada prevalencia de bacteriemia de origen oral provocadas por *Streptococcus viridans* (SV) resistentes a E. En base al genotipo, la resistencia a E puede asociarse a resistencia a otros antimicrobianos recomendados en los actuales protocolos profilácticos, por lo que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas antimicrobianas. El objetivo del presente estudio fue determinar la sensibilidad in vitro a telitromicina (TL) de *Streptococcus viridans* (SV) sensibles y resistentes a E genéticamente caracterizados (*ermB* y *mefA*), aislados de hemocultivos post-extracción dentaria.

Material y métodos: Se seleccionaron un grupo de 36 SV: 11 sensibles a E, 15 resistentes a E y 10 resistentes a E y clindamicina (CM). La CMI a TL se determinó mediante el método de dilución en agar propuesto por el NCCLS. Para la interpretación cualitativa de las CMIs se aplicaron las recomendaciones del fabricante. Para la extracción del ADN se utilizó la matriz de Instagene (Biorad). Los fragmentos de ADN se amplificaron con cebadores específicos para *ermB* y *mefA*. Se aplicaron los protocolos de PCR descritos previamente y la electroforesis se efectuó en gel de agarosa al 1%.

Resultados: Todos los SV fueron sensibles a TL (rango de CMIs, $< 0,008$ -1 mg/l). En los SV sensibles a E, la CMI90 a

TL (< 0,008 mg/l) fue inferior a la obtenida frente a E (0,128 mg/l) y CM (0,128 mg/l). En los SV resistentes a E, la CMI90 a TL fue 1 mg/l. La CMI90 a TL de los SV *mefA* positivos y *ermB* negativos fue inferior a la presentada por los SV *mefA* negativos y *ermB* positivos (0,128 mg/l versus 1 mg/l).

Conclusión: La actividad in vitro a TL de *Streptococcus viridans* es elevada, independientemente de la sensibilidad a E y del genotipo identificado. En consecuencia, TL podría representar una posible alternativa antimicrobiana para la prevención de infecciones focales estreptocócicas asociadas a determinadas manipulaciones odontológicas.

003

ESTUDIO FENO/GENOTÍPICO DE RESISTENCIA A MACROLÍDOS Y LINCOSAMIDAS EN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* S. *PYOGENES* Y S. *AGALACTIAE* AISLADOS EN EL NOROESTE DE ESPAÑA

D. Velasco*, R. Villanueva, F. Molina, R. Moure, y G. Bou C.H.U. Juan Canalejo, A Coruña.

Introducción: En *Streptococcus spp* se han descrito dos mecanismos mayoritarios de Resistencia (R) frente a macrólidos (mac) y lincosamidas (lin): Modificación de la diana (ARNr) mediante metilación (genes *erm*) y bombas de extrusión (genes *mef*). Los genes *erm* generan R a mac, lin y estreptograminas B (fenotipos MLS_B), y los genes *mef* confieren R sólo frente a mac de 14 y 15 átomos de carbono.

Objetivo: Estudio de los diferentes fenotipos de R a mac y de los genes asociados a ellos en cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. agalactiae* resistentes a mac aislados de muestras clínicas.

Material y métodos: Se seleccionaron 51 cepas de *S. pneumoniae*, 52 cepas de *S. pyogenes* y 51 cepas de *S. agalactiae* resistentes a mac y lin procedentes de aislamientos clínicos de pacientes distintos aislados en 2003. Las cepas de *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. agalactiae* se aislaron mayoritariamente de muestras respiratorias, faríngeas y vaginales respectivamente. Todas las cepas se identificaron fenotípicamente (optoquina y grupo de Lancefield). Se establecieron los fenotipos de R siguiendo los criterios de la NCCLS (disco-difusión y E-Test). Utilizando técnicas de PCR con iniciadores descritos previamente se estudió la presencia de los genes *ermA*, *ermTR*, *ermB*, *ermC* y *mef* asociados a R a mac y lin. Se usaron distintas cepas como controles positivos para las reacciones de PCR de los genes de R.

Resultados: 1) *S. pneumoniae*: El 86,3% de las cepas presentan fenotipo MLS_B. De estas el 88,6% contienen el gen *ermB*. Cuatro cepas contienen a la vez *ermB* y *mefE* y a una de ellas no se le detectó ninguno de los genes estudiados. El 13,7% de las cepas expresan fenotipo M, todas ellas contienen *mefE* y una de ellas contiene además el gen *ermB*. 2) *S. pyogenes*: El 88,5% corresponden con fenotipo M. Todos excepto uno contienen el gen *mefA*. En las cepas con fenotipo MLS_B aparecen los genes *ermA*, *ermB* *ermB+mefA* e incluso únicamente *mefA*. 3) *S. agalactiae*: El 96,0% de las cepas expresan fenotipo MLS_B. De estas el 77,0% corresponden con genotipo *ermB*, el 16,6% con *ermA* y el 2,0% con *ermA+ermB*. A una cepa no se le detectó ningún gen de R. Sólo una cepa presenta fenotipo M y otra cepa expresó un fenotipo inusual con R a lin y sensibilidad a mac.

Conclusiones: En *S. pneumoniae* con R a mac es más frecuente el fenotipo MLS_B, proporcionado sobre todo por el gen *ermB*. Existen cepas que aun conteniendo genes *erm* expresan bajos niveles de R. El fenotipo M es el más prevalente en *S. pyogenes* con R a mac. Los aislamientos con fenotipo MLS_B presentan gran heterogeneidad en cuanto a los genes de R (*ermA*, *ermB*, *mefA* y combinaciones entre ellos). Se detectan algunas cepas con fenotipo M conteniendo genes *erm*. La práctica totalidad de *S. agalactiae* con R a mac expresan fenotipo MLS_B, con predominio del gen *ermB*. Hemos detectado una cepa con fenotipo de R aun no descrito en esta especie que no contiene ninguno de los genes de R considerados.

004

SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS Y GENOTIPOS DE RESISTENCIA A MACROLÍDOS EN CEPAS DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* AISLADAS DE GESTANTES EN CANTABRIA

A.B. Campo-Esquisabel*, E. Ugalde*, A. Portillo**, M.A. Martínez-Bernal* y L. Martínez-Martínez*

*Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. **Área Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Rioja. Logroño.

Objetivo: Estudiar la actividad in vitro de ocho antimicrobianos frente a cepas de *Streptococcus agalactiae* (SGB) aisladas de gestantes en el Hosp. Univ. Marqués de Valdecilla de Santander (Cantabria) en el período de Abril a Noviembre del 2003 y determinar el fenotipo y genotipo de resistencia a macrólidos en dichas cepas.

Material y métodos: Durante el período de estudio se evaluaron 898 exudados vaginales y 739 frotis rectales procedentes de 1160 pacientes. Las muestras se procesaron en los medios Granada y CNA. La identificación se realizó en base a la morfología de la colonia y la aglutinación con antisero específico frente al polisacárido capsular de SGB. Se determinó la sensibilidad a penicilina G (PEN), amoxicilina (AMX), cefuroxima (FUR), eritromicina (ERY), clindamicina (CLI), telitromicina (TEL), levofloxacino (LFX) y vancomicina (VAN) mediante microdilución, empleando placas preparadas en el laboratorio, siguiendo las recomendaciones del NCCLS. El fenotipo de resistencia a macrólidos se evaluó mediante difusión con disco, empleando discos de ERY (15 µg) y CLI (2 µg) separados entre 15-21 mm en placas de agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero. La detección de los genes de resistencia a macrólidos se realizó por PCR, empleando cebadores específicos para *erm* (A), *erm*(B), *erm*(C) y *erm* (TR).

Resultados: Se identificaron 102 cepas de SGB. Los valores de rango, CMI50 y CMI90 (mg/l) de los distintos antimicrobianos fueron: ≤ 0,015 - 0,125, 0,03 y 0,06 para PEN, ≤ 0,015 - 0,25, 0,06 y 0,125 para AMX, ≤ 0,06 - 0,5, ≤ 0,06 y 0,125 para FUR, ≤ 0,06 - >64, ≤ 0,06 y 0,25 para ERY, ≤ 0,06 - >64, ≤ 0,06 y 0,5 para CLI, ≤ 0,06 - 0,5, ≤ 0,06 y 0,12 para TEL, ≤ 0,06 - 2, 1 y 2 para LFX y ≤ 0,06 - 1, 0,5 y 1 para VAN. Todas las cepas fueron sensibles a PEN, AMX, FUR, LFX y VAN. Se identificaron 8 cepas (7,8%) resistentes a ERY (ERY-R). En 7 de las 8 cepas ERY-R se observó el fenotipo MLS_B con expresión constitutiva y en todas se detectó el gen *erm* (B). En la restante cepa, sin fenotipo MLS_B constitutivo y con CMI de CLI superior a la de ERY, se identificó el gen *erm*(TR).

Conclusiones: Todas las cepas de SGB incluidas en este estudio fueron sensibles a PEN, AMX, FUR, LFX y VAN. Las cepas ERY-R presentaron mayoritariamente el fenotipo MLS_B constitutivo mediado por el gen *erm*(B).

005

ENTEROCOCCUS FAECALIS RESISTENTE A LINEZOLID

J.C. Sánchez Gómez, E. Fraile Malmierca, J.E. García Sánchez, E. Valverde Romero y J.A. García Rodríguez

Departamento de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Salamanca.

Linezolid es el primer miembro de una nueva clase de antibióticos en uso clínico, las oxazolidinonas, que tienen una excelente actividad frente a microorganismos gram positivos.

Descripción del caso. Mujer de 58 años ingresada en Unidad de Cuidados Intensivos de nuestro hospital debido a un cuadro de neumonía y agranulocitosis. Sin administración previa de linezolid se obtuvieron aislados de *E. faecalis* resistente al mismo en muestras de aspirado bronquial, esca-

ra sacra y en sangre. La identificación y los test de sensibilidad antibiótica rutinarios se llevaron a cabo usando el sistema Wider (F. Soria Melguizo S.A. Madrid). La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los distintos aislados se realizaron por E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) y por el método de macrodilución en tubo según las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): CMI > 4 mg/L implica resistencia al antimicrobiano.

Resultados: Las CMI obtenidas fueron: 1. Cepa aislada de aspirado bronquial: E-test = 32 mg/L, macrodilución en tubo = 64 mg/L 2. Cepas aisladas de escara sacra y sangre: E-test = 8 mg/L, macrodilución en tubo = 16 mg/L.

Conclusión: Hasta la fecha, estas cepas son los primeros aislamientos de *E. faecalis* resistente a Linezolid registrados en España de los que tengamos constancia. Las cepas aisladas se encuentran actualmente sometidas a estudio genético para describir las mutaciones responsables de esta resistencia.

006

BETALACTAMASAS DE ESPECTRO AMPLIADO: EVOLUCIÓN DURANTE 5 AÑOS EN EL ÁREA SANITARIA DE TERUEL

M.P. Chocarro Escanero, F.J. Ramos Germán y A. Coscolluela Abadía

Hospital Obispo Polanco de Teruel. Centro de Salud Teruel.

Las β -lactamasas de espectro ampliado (ESBL) se caracterizan por ampliar su espectro de acción a cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos y ser inhibidas por inhibidores de β -lactamasas, así como por la elevación de las CIM a cefalosporinas de tercera generación en gérmenes muy sensibles, como *E. coli* y *K. pneumoniae*. En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en la detección de ESBL en aislamientos clínicos de enterobacterias realizados durante un periodo de 62 meses, mediante el sistema automatizado VITEK® (Biomerieux). Se analizaron un total de 5.624 aislamientos hospitalarios y extrahospitalarios, de los cuales 107 (1,90%) eran productores de ESBL. Estos aislamientos correspondían a las especies de enterobacterias *E. coli* (54,21%), *K. pneumoniae* (13,08%), *E. cloacae* (12,15%), *P. mirabilis* (4,67%) y otras especies en porcentajes menores. *C. koseri* (12%), *P. vulgaris* (8,33%) y *S. marcescens* (3,41%) fueron las especies que presentaron un mayor porcentaje de cepas productoras de ESBL respecto al total de cepas aisladas de la especie. Las muestras de las que procedían las cepas productoras de ESBL eran diversas, destacando los aislamientos procedentes de esputos (17,07% del total) y orina (12,20%), habiéndose obtenido también aislamientos en heridas, catéteres, frotis nasales, anales y vaginales en porcentajes similares. La procedencia de los aislamientos era diversa, tanto hospitalaria (68,22%), como extra hospitalaria (31,78%) Entre los aislamientos hospitalarios la mayoría procedían del servicio de Medicina Interna (21,92%) y de la UCI (16,44%) del total. Los porcentajes de aislamientos de enterobacterias productoras de ESBL se mantienen muy bajos en nuestro medio, si bien en el periodo de estudio hemos constatado un constante incremento desde los primeros aislamientos del año 1999 hasta la actualidad: desde el 1,75% al 4,25% en los de origen hospitalario y del 1,22% al 3,52% en los extrahospitalarios. *E. coli* fue la especie en la que más frecuentemente se detectaron, seguido de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, lo que coincide con los datos recogidos en la bibliografía. Respecto a la resistencia a otros antibióticos nuestras cepas productoras de ESBL presentaron porcentajes de resistencias superiores respecto a las no productoras de ESBL en la mayoría de los antibióticos ensayados, al igual que lo que indican otros datos bibliográficos. Finalmente es especialmente destacable que todas las cepas productoras de ESBL poseían CIM bajas para las cefalosporinas de tercera generación (85% de cepas con CIM < 4 mg/ml pa-

ra cefotaxima, frente a 99,7% de las cepas no productoras de ESBL), por lo que hubiesen sido informadas como sensibles de no procederse a la detección específica de ESBL, por lo que destacamos especialmente la necesidad de utilizar métodos específicos para la detección de ESBL que de otro modo pueden pasar desapercibidas y condicionar fracasos terapéuticos si se utilizan cefalosporinas de tercera generación

007

CARACTERIZACIÓN DEL ENTORNO GENÉTICO DE LA BETALACTAMASA CTX-M-9

A. García, F. Navarro, E. Miró, B. Mirelis y P. Coll

Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.

Introducción: En 1996 aislamos una cepa de *Escherichia coli* en la que se describió una nueva betalactamasa de espectro extendido, la CTX-M-9, cuya incidencia ha ido incrementando en España detectándose en diversas especies de enterobacterias. Posteriormente se caracterizó el entorno genético de la CTX-M-9 definiendo un nuevo integrón compuesto de clase 1, el In60. Dada la rápida expansión de esta betalactamasa nos planteamos estudiar su mecanismo de difusión.

Material y métodos: Desde 1996 a 1999 se aislaron en nuestro hospital 33 cepas, 32 *E. coli* y una *Salmonella enterica*, portadoras de CTX-M-9. El tipado de las cepas se realizó por macrorestricción genómica con alternancia de campos (PFGE). Para la caracterización del perfil plasmídico se utilizó la endonucleasa S1 y PFGE, con posterior transferencia e hibridación con CTX-M-9. Mediante PCR solapadas se describió en las 33 cepas el entorno de la CTX-M-9 con los iniciadores específicos utilizados para caracterizar el In60.

Resultados: No se ha encontrado relación clonal entre las 32 cepas de *E. coli* y se ha observado una amplia variabilidad plasmídica. Cabe destacar dos cepas con más de un plásmido portador de CTX-M-9 y una cepa que carecía del plásmido portador de ésta. Este hecho indicaría que el In60 podría encontrarse en el cromosoma bacteriano. En la caracterización del entorno de CTX-M-9 se detectó una alta plasticidad de este elemento, pues un tercio de las 33 cepas estudiadas presentaba variaciones: una cepa presentaba una delección situada entre el *orf3*-like y la IS3000 que ha sido confirmada mediante PCR y secuenciación, tres cepas presentaban inserciones en diferentes zonas del integrón (una de ellas presentaba una inserción de la ISEc8) y nueve carecían de la integrasa de clase 1 en el extremo 5', así como el *orf513* (a excepción de una de ellas que conservaba parte de éste).

Conclusiones: No existe clonalidad entre las 33 cepas portadoras de CTX-M-9 ni comparten el mismo plásmido. Asimismo, se observa variabilidad estructural en el In60. Estas conclusiones podrían hacernos pensar que el In60 está situado en un transposón u otro elemento móvil que explicaría la gran difusión de la betalactamasa CTX-M-9.

008

ESTUDIOS ESTRUCTURA FUNCIÓN EN BETA-LACTAMASAS DEL GRUPO CTX-M-1

M. Cartelle, D. Canle, M. Tomás, R. Villanueva y G. Bou C.H.U. Juan Canalejo. La Coruña.

Introducción: Las β -lactamasas tipo CTX-M están incrementando su aparición desde el primer aislamiento en 1992 (MEN-1). Se caracterizan por poseer alta capacidad hidrolítica sobre cefotaxima (CTX). El mecanismo bioquímico y los aminoácidos implicados en la hidrólisis de CTX permanece desconocido aunque se ha descrito el cambio S130G en enzimas del grupo CTX-M-9, como implicado en la hidrólisis de CTX.

Objetivos: Realizar estudios de estructura función en β -lactamasas del tipo CTX-M grupo I, elucidando los aminoácidos implicados en la hidrólisis de CTX.

Material y métodos: Se ha generado el gen de la CTX-M-1 a partir del gen CTX-M-32 identificado en nuestro laboratorio y se ha clonado en la diana *Bam*HI del vector pBGS18. Transformaciones sobre la estirpe *E. coli* TG1. Se realizó mutagénesis aleatoria de este gen siguiendo las recomendaciones del fabricante (Kit Mutazymme, Stratagene) para obtener una tasa de mutación 7-12 nt/1 Kb. La librería obtenida se clonó en pBGS18- en la diana *Bam*HI. Los transformantes obtenidos, fueron seleccionados mediante estudios de CMI (mg/L) a CTX, ceftazidima (TZ), aztreonam (AT) y cefepime (PM) con disco-difusión y E-test, siguiendo los criterios de la NCCLS. Se secuenció el ADN por métodos convencionales. La mutagénesis dirigida confirmatoria se realizó según Ho SN, y col, 1989. Se estudió la orientación de los genes CTX-M obtenidos, respecto al promotor LacZ del pBGS18- mediante PCR con iniciadores específicos.

Resultados: Se obtuvieron 64 clones recombinantes en la librería de CTX-M-1; de ellos 6 clones mostraron disminución en la CMI a CTX y la CMI a ampicilina se mantuvo como > 256 en todos ellos. CMI control CTX-M-1 wt AT 24, CTX > 256, TZ 6, PM 24. Las CMI de los genes CTX-M-1 mutagenizados: A51T (S1), AT 2, CTX 24, TZ 1,5 y PM > 256; S87N (H2b- H3) AT 12, CTX 48, TZ 1,0 y PM 24; N135S (H5) AT 0,094, CTX 0,094, TZ 0,125 y PM 0,032; T171M (H7) AT 128, CTX > 256, TZ 8 y PM 32; T238S (S3) AT 1, CTX 8, TZ 0,50 y PM 4; y K255E (S4-S5) AT 1,5, CTX 32, TZ 0,38 y PM 3; [tomando como patrón la estructura 3D de un consenso de β -lactamasas de clase A, S es lámina B y H hélice alfa].

Conclusiones: Las mutaciones A51T, S87N, N135S, T238S y K255E disminuyen la CMI a CTX, pero no son específicas, ya que también se ve alterada la degradación de otros antibióticos. En el caso de la mutación T171M aumenta la CMI de *E. coli* TG1 al AT. No sólo los tres dominios catalíticos y el lazo omega están implicados en las propiedades bioquímicas de las CTX-M sobre los β -lactámicos, sino que cambios aminoacídicos en otras posiciones pueden afectar la estructura tridimensional de la enzima dificultando o favoreciendo el paso de antibióticos al centro activo y su posterior hidrólisis.

009

BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) PRODUCIDAS POR *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* DESCRITAS POR PRIMERA VEZ EN ESPAÑA (PROYECTO GEIH-BLEE)

J.R. Hernández Bello, L. Martínez-Martínez, R. Cantón, A. Pascual y el Grupo para el Estudio de las Infecciones Hospitalarias (GEIH).

Objetivos: Describir las BLEEs producidas por cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* incluidas en el proyecto GEIH-BLEE 2000 no encontradas anteriormente en España.

Material y métodos: Se estudiaron 170 cepas de *E. coli* y 70 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de muestras clínicas entre marzo y junio de 2000, procedentes de 40 hospitales españoles, dentro del estudio multicéntrico nacional GEIH-BLEE 2000. Se realizó isoelectroenfoque de los extractos obtenidos tras sonicación de las células con el equipo PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech) en geles con rango de pI 3-9 (PhastGel). Se realizó PCR específica de BLEEs tipo TEM, SHV y CTX-M. Se seleccionó una cepa de entre las que tenían igual patrón de antibiograma (CMI +/- 1 dilución) e idéntico pI para la secuenciación de las BLEEs producidas, la cual se realizó con el aparato ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA, U.S.A.) en el Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Las secuencias recibidas fueron analizadas con la aplicación Chromas y las

herramientas de Internet BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y Traduction Multiple (Infobiogen, www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/traduc_in.pl).

Resultados: De las 24 cepas de *K. pneumoniae* seleccionadas el 58,5%, el 29% y el 12,5% producían BLEEs que fueron identificadas como TEM, SHV y CTX-M respectivamente. De las 88 cepas de *E. coli* seleccionadas el 19,3%, el 28,4% y el 52,3% producían BLEEs identificadas como TEM, SHV y CTX-M respectivamente. En *E. coli* se han detectado por primera vez en España las siguientes BLEEs (nº cepas/ciudad): TEM-3 (3/Granada), TEM-10 (1/La Coruña; 1/Zaragoza), TEM-20 (1/Sevilla), TEM-26 (1/Madrid), TEM-28 (2/Zaragoza), TEM-52 (1/Orense; 1/Vigo), TEM-116 (1/Tenerife; 1/Zaragoza). En *K. pneumoniae* se detectaron por primera vez TEM-3 (1/Alicante; 1/Madrid; 2/Toledo) y TEM-25 (1/Barcelona; 1/Madrid), así como una nueva BLEE tipo TEM (2/Tenerife), denominada TEM-133, que se diferencia de TEM-1 por las mutaciones L21F, E104K y R164S.

Conclusiones: Existe una gran diversidad de BLEEs en *E. coli* y *K. pneumoniae* en España, incluyendo TEM-3, TEM-10, TEM-20, TEM-25, TEM-26, TEM-28, TEM-52, TEM-116 y TEM-133 no descritas con anterioridad en nuestro país.

010

FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) AISLADAS EN EL ÁREA NORTE DE SEVILLA EN EL PERÍODO 1995-2003

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

Objetivos: Estudiar la frecuencia y origen de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) aisladas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla desde enero de 1995 hasta diciembre del 2003.

Material y método: El laboratorio de Microbiología de nuestro centro atiende a una población de aproximadamente 500.000 habitantes del área norte de Sevilla. La identificación preliminar de las cepas se determinó mediante WalkAway (MicroScan; EEUU) o VITEK 2 (bioMérieux; Francia). La producción de BLEE se detectó mediante la técnica de doble disco y se confirmó mediante microdilución determinando las CMI de cefalosporinas de tercera generación en ausencia y presencia de ácido clavulánico (Criterios del NCCLS). Los datos demográficos se obtuvieron de la base de datos del Departamento de Microbiología del Hosp. Univ. Virgen Macarena (Sevilla).

Resultados: Se aislaron un total de 461 cepas de *E. coli* y 125 cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Las cepas de *K. pneumoniae* fueron mayoritariamente intrahospitalarias (80%) y procedían de muestras de orina (54%), sangre (14%) y exudados de herida (11%). Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE fueron predominantemente de origen extrahospitalario (64%) y procedían de orinas (70%), exudados de herida (13%) y sangre (9%). Las cepas de *K. pneumoniae* disminuyeron a lo largo del tiempo desde 34 en 1995 a 9 en el 2003. Inversamente, los aislamientos de *E. coli* aumentaron desde 7 en 1995 a 151 en 2003. En términos de frecuencia, *K. pneumoniae* productor de BLEE pasó de un 9,7% en 1995 a un 2,7% en 2003 mientras que *E. coli* productor de BLEE se incrementó de un 0,3% a un 5,2% en el mismo periodo.

Conclusiones: En el periodo 1995-2003 los aislamientos de *K. pneumoniae* productor de BLEE en nuestro medio han cursado en forma de brotes intrahospitalarios observándose un descenso paulatino en su frecuencia a lo largo del tiempo. Los aislamientos de *E. coli* productor de BLEE se distribuyeron de forma homogénea y están aumentando progresivamente en los últimos años tanto a nivel intrahospitalario como en la comunidad.

011

DESCRIPCIÓN DEL ENTORNO GENÉTICO DEL DETERMINANTE DE RESISTENCIA A QUINOLONAS *qnr* EN CEPAS DE *K. PNEUMONIAE*

J.M. Rodríguez-Martínez, A. Pascual, I. García, C. Velasco y L. Martínez-Martínez

Departamento de Microbiología, Hospital Univ. Virgen Macarena y Facultad de Medicina, Sevilla.

Objetivos: Varios trabajos recientes indican un aumento del número de cepas clínicas portadoras del gen plasmídico *qnr*, responsable de resistencia a quinolonas. En estas cepas, *qnr* se encuentra incluido en un elemento similar a los integrones de clase 1 (IC1), por delante de los genes *qacEΔ1* y *suII*, y a continuación de *orf513*. El objetivo de este trabajo ha sido analizar la secuencia de los genes próximos a *qnr* en tres cepas de *K. pneumoniae* y comprobar si la estructura guarda relación con los IC1.

Métodos: Se han estudiado tres cepas de *K. pneumoniae* aisladas en EEUU (estudios SENTRY – cepa KpN5- e ICARE – cepas 1960Fox y 1132Fox-) portadoras de plásmidos que codifican *qnr*. Para determinar el entorno genético de *qnr* se amplificó el ADN plasmídico de cada cepa mediante PCR, empleando cebadores que hibridan con los genes *orf513* y *suII*. El amplicón obtenido fue clonado pCR^{2.1} (TA Cloning Kit) y secuenciado. En paralelo, a partir de la cepa de *K. pneumoniae* 1132Fox, se construyó una genoteca de ADN plasmídico en *E. coli* DH5alpha empleando el vector pUC18 y se procedió a secuenciar el fragmento insertado en los transformantes en los que se detectó *qnr* mediante las técnicas de PCR y Dot-blot.

Resultados: En las tres cepas estudiadas, *qnr* se encuentra flanqueado en su extremo 5' por la fase de lectura abierta *orf513*, y en su extremo 3' por los genes *qacEΔ1* y *sull*. Esta disposición coincide completamente con lo observado en la única cepa de *K. pneumoniae* estudiada hasta ahora, y difiere de la observada en *E. coli*, donde entre *qnr* y *qacEΔ1* y *sull* se encuentra el gen regulador *ampR*.

Conclusiones: De la estructura de la secuencia obtenida se deduce que en las tres cepas de *K. pneumoniae* evaluadas *qnr* se encuentra en el interior de IC1. El entorno genético de *qnr* observado hasta ahora en *K. pneumoniae* es distinto del descrito en *E. coli*.

012

DETECCIÓN DE *H. INFLUENZAE* CON DISMINUCIÓN DE SENSIBILIDAD A ÁCIDO NALIDÍXICO, CIPROFLOXACINA, LEVOFLOXACINA Y MOXIFLOXACINA DEBIDO A MUTACIONES EN *gyrA* Y *parC*

M. Pérez-Vázquez*, F. Román*, B. Aracil*, R. Cantón**, J. Oteo* y J. Campos*

*Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. **Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivos: Estudio de una colección de aislamientos clínicos de *H. influenzae* con distintos niveles de sensibilidad a ciprofloxacino (rango de CMI: 0,007-32 µg/ml) y otras quinolonas con el fin de: determinar la asociación entre las mutaciones en las "Regiones responsables de la resistencia a quinolonas" (QRDRs) de *GyrA* y *ParC* y la disminución en la sensibilidad y proponer los valores de CMI y halos de inhibición para ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino y ácido nalidíxico para detectar las cepas con sensibilidad reducida como consecuencia de la adquisición de mutaciones en los QRDRs de *GyrA* y *ParC*.

Material y métodos: Se estudió la sensibilidad a ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino y ácido nalidíxico de 62

aislamientos clínicos de *H. influenzae* y dos cepas control por microdilución y difusión en disco y se secuenciaron las QRDRs de *gyrA* y *parC*. La selección de las CMIs y halos de inhibición para detectar la presencia del mecanismo de resistencia se basó en los datos de distribución de la población y la presencia o ausencia de mutaciones en los QRDRs de *GyrA* y *ParC*.

Resultados: Las cepas con CMIs ≤ 0,06 µg/ml (ciprofloxacina), ≤ 0,03 µg/ml (levofloxacina y moxifloxacina) o ≤ 2,0 µg/ml (ácido nalidíxico) no presentaban modificaciones en QRDR de *GyrA*. En contraste, todas las cepas con CMIs ≥ 0,5 µg/ml (ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina), y la mayoría con CMIs ≥ 32 µg/ml (ácido nalidíxico) presentaban mutaciones en *GyrA* y *ParC*.

Conclusiones: La disminución de sensibilidad a quinolonas en *H. influenzae* se asocia a mutaciones en las QRDRs de *GyrA* y *ParC*. Se presentan los valores de CMIs y halos de inhibición que permiten separar los aislamientos completamente sensibles a las quinolonas estudiadas de aquellos con disminución de sensibilidad debido a la adquisición de un mecanismo de resistencia. Los halos de inhibición del ácido nalidíxico y las fluorquinolonas orales pueden utilizarse para detectar la presencia de un mecanismo de resistencia en *H. influenzae* (modificaciones en *GyrA* y *ParC*) con una sensibilidad > 95% y especificidad > 80%.

013

CARACTERIZACIÓN DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* CON RESISTENCIA DE ALTO NIVEL A FLUORQUINOLONAS

L. López, J.M. Rodríguez-Martínez, E. Perea y A. Pascual

Objetivos: Estudiar los mecanismos de resistencia a fluorquinolonas (FQR) en una cepa clínica de *H. influenzae*.

Material y métodos: La cepa se aisló de un esputo de un paciente de 80 años con bronquiectasias y lesiones residuales de tuberculosis, sin antecedentes previos de tratamiento con fluorquinolonas. La identificación se realizó mediante catalasa, requerimiento de factores X y V (MAST), API NH (bioMérieux) y antisueros a-f (Difco). El estudio de sensibilidad se efectuó mediante el método de difusión con discos (Oxoid) de: 30 µg ácido nalidíxico (NAL), 5 µg ciprofloxacino (CIP), 5 µg levofloxacino (LEV), 5 µg moxifloxacino (MOX) y 1,25/23,75 µg trimetropim/sulfametoxazol (SXT). La producción de betalactamasa se determinó con nitrocefina 0,5 mg/ml (Oxoid). Se efectuaron CMIs de fluorquinolonas y SXT por microdilución en caldo HTM (BBL) según las recomendaciones del NCCLS. Se analizaron las regiones QRDR de *gyrA* y *parC* mediante amplificación y secuenciación.

Resultados: Se trataba de un aislamiento de *H. influenzae* no tipable, no productor de betalactamasa, resistente (<6 mm de halo) a NAL, CIP, LEV y SXT, que presentaba las siguientes CMIs en mg/L: > 256 NAL, 32 CIP, 8 LEV, 2 MOX y ≥ 4/76 SXT. Este aislado resistente a quinolonas representó el 1% del total de *H. influenzae* en nuestro medio (1 de 99 aislados en 2003). La prevalencia de estas cepas en diferentes estudios epidemiológicos es muy baja (0,15% en el estudio SENTRY y 0,14-0,37% en el estudio ALEXANDER). Los aislados FQR analizados en la literatura no producen betalactamasa, pero no se ha estudiado la asociación con la resistencia a SXT. Se detectaron 2 sustituciones en *gyrA* (Ser84Tyr y Asp88Ala) y 2 en *parC* (Ser84Arg y Glu88Ala) no descritas previamente, además de otras no asociadas a la resistencia.

Conclusiones: La aparición de cepas de *H. influenzae* FQR es un fenómeno infrecuente. La combinación de sustituciones encontrada no había sido observada con anterioridad, aunque no podemos descartar el papel de otros mecanismos de resistencia. Es importante destacar la diferencia en la CMI de CIP y MOX.

014

SENSIBILIDAD A AMOXICILINA-CLAVULÁNICO (AMC) EN CEPAS CLÍNICAS DE *ESCHERICHIA COLI* RESISTENTE A CEFOTAXIMA (FOX)

F. Fernández-Cuenca, L. Martínez-Martínez, G. Amblar, D.J. Biedenbach, R.N. Jones y A. Pascual

Objetivo: El 34,4% de las cepas de *E. coli* resistentes a FOX que se aíslan en el área norte de Sevilla son sensibles a AMC. El objetivo de este estudio es determinar la frecuencia de este fenotipo de resistencia en cepas de *E. coli* aisladas en diferentes hospitales europeos incluidos en el programa SENTRY.

Material y métodos: Los valores de CMI de FOX y AMC correspondientes a 8337 cepas clínicas de *E. coli* se obtuvieron de la base de datos del programa de vigilancia SENTRY-Europa (1997-2002). Las CMIs se determinaron mediante la técnica de microdilución en caldo siguiendo la normativa del NCCLS. Se consideraron 2 categorías clínicas: sensible y resistente (en la que se incluyen cepas resistentes y con sensibilidad intermedia). El análisis de los datos se realizó determinando la frecuencia de todos los fenotipos de sensibilidad/resistencia a FOX y AMC.

Resultados: La resistencia a FOX para los años de estudio fue: 2,7% (1997), 5,2% (1998), 9,8% (1999), 6,8% (2000), 6,4% (2001) y 6,3% (2002). El porcentaje de cepas resistentes a FOX y AMC fue: 81,8% (1997), 75,6% (1998), 60,4% (1999), 71,4% (2000), 65,3% (2001) y 67,0% (2002). El porcentaje de cepas resistentes a FOX y sensibles a AMC fue: 18,2% (1997), 24,4% (1998), 39,6% (1999), 28,6% (2000), 34,7% (2001) y 33,3% (2002).

Conclusiones: Existe un elevado porcentaje de cepas de *E. coli* resistentes a FOX y sensibles a AMC en los que debe existir otro mecanismo de resistencia distinto de la hiperproducción de AmpC

015

PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* CON DISMINUCIÓN DE SENSIBILIDAD A CEFALOSPORINAS DE 3ª GENERACIÓNB. Bailo¹, G. de la Peña¹, J. Oteo¹, J. Campos¹, E. Cercenado², A. Delgado³, C. Raya⁴, C. Fuster⁴¹Centro Nacional de Microbiología, ²Instituto de Salud Carlos III, ³Hospital Gregorio Marañón, ⁴Fundación de Alcorcón, Madrid.⁴Hospital del Bierzo, Ponferrada, León.

Objetivos: Estudiar la sensibilidad a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* con disminución de sensibilidad a cefotaxima y/o ceftazidima y clasificar su posible mecanismo según los patrones de resistencia encontrados. Estudiar el mecanismo molecular en las cepas compatibles con hiperproducción de una cefalosporinasa cromosómica AmpC.

Material y métodos: Durante el 2003 se recogieron cepas de *E. coli* que presentaron un halo de inhibición < 27 mm para cefotaxima y/o < 22 mm para ceftazidima en tres hospitales españoles. Se estudió la sensibilidad a 8 antibióticos β -lactámicos y a 4 no β -lactámicos mediante la técnica de difusión disco-placa según las recomendaciones del NCCLS. La sensibilidad a cefalosporinas de 3ª se confirmó por E-test. Según el perfil de resistencia a β -lactámicos encontrado se clasificaron como productoras de BLEE con predominio de actividad cefotaximasa, BLEE con actividad ceftazidimasa o hiperproductoras de cefalosporinasa cromosómica AmpC. En 15 cepas compatibles con hiperproducción de AmpC se procedió a la amplificación y secuenciación del promotor de *ampC* con cebadores específicos.

Resultados: Se recogieron 133 cepas, 103 de orina, 11 de exudados de heridas, 10 de sangre y 9 de otras localizacio-

nes. La disminución de sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico, cefazolina, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacino, cotrimoxazol, gentamicina e imipenem fue 66,9%; 99,2%; 21%; 89,5%; 37,6%; 76,7%; 56,4%; 21% y 0%. Se consideraron BLEE con predominio de actividad cefotaximasa al 64,4% y ceftazidimasa al 16,5%, e hiperproductoras de AmpC al 19,1%. La resistencia a ciprofloxacino, gentamicina y cotrimoxazol fue más prevalente en cepas productoras de BLEE con actividad cefotaximasa que en las de actividad ceftazidimasa. Se detectaron mutaciones en el promotor de *ampC* en las siguientes posiciones: -88 (C pasa a T); -82 (A a G); -42 (C a T); -18 (G a A); -1 (C a T) y +58 (C a T).

Conclusiones: 1) En este estudio, las BLEE más prevalentes en *E. coli* fueron con diferencia las de actividad cefotaximasa. 2) Se observó una mayor resistencia asociada a antibióticos no β -lactámicos en cepas productoras de BLEE con actividad cefotaximasa que en las de actividad ceftazidimasa. 3) Las mutaciones encontradas en el promotor de *ampC* en las cepas estudiadas fueron las mismas en todas ellas e idénticas a algunas de las descritas previamente.

016

EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA DE *E. COLI* A LO LARGO DE OCHO AÑOS (1996-2003)

M.M. Gallardo, M.V. García, R. Rodríguez, E. Granados, E. Martín, I. Viciano, M.A. Sánchez, A. Pinedo

Servicio de Microbiología Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria. Málaga.

Objetivos: Este estudio analiza las variaciones de la sensibilidad en aislamientos de *E. coli* en el total de muestras del laboratorio, y las compara con los valores de sensibilidad de este microorganismo en muestras invasivas.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de la sensibilidad de *E. coli* desde 1996-2003. El número de cepas estudiadas han sido 2444, 3052, 2728, 2885, 2716, 2866, 2616, 2905 desde el año 1996 a 2003 respectivamente. La identificación y los estudios de sensibilidad se llevaron a cabo por el sistema automatizado MicroScan Walkway® (Dade Behring). El estudio estadístico se realizó con el programa EpiInfo 6.0.

Resultados: Las variaciones en la sensibilidad fueron: ampicilina pasó de 38,8% (en el 1996) a 35,8% (en el 2003); las cefalosporinas de 1ª gen. (cefazolina de 92,8% a 77,8%); las de 2ª gen. (cefuroxima de 95,1% a 89,5% y cefoxitina de 96,9% a 90,1%); las de 3ª gen. (cefotaxima de 96,9% a 92,1% y ceftazidima de 99,5% a 95,1%); cambios todos ellos estadísticamente significativos ($p < 0,05$). El cefepime disminuye de 99,4% a 94,7% (1999-2003), ($p < 0,05$). Todos estos aumentos de resistencia también aparecen en las muestras invasivas, incluso de forma más acentuada. En el caso de los inhibidores de la β -lactamasa, el amoxicilina/clavulánico disminuyó del 94,3% en el 96 al 87,2% en el 2003 mientras que piperacilina/tazobactam se mantuvo en torno al 90% (a diferencia con los aislamientos de muestras invasivas donde piperacilina-tazobactam aumenta su resistencia de 17,7% a 23,4% en los cinco últimos años). En cuanto la sensibilidad a aminoglucósidos, gentamicina y tobramicina disminuyen un 4% y 6% respectivamente (gentamicina 89,8% a 86% - tobramicina 92,1% a 86,2%), manteniéndose la sensibilidad a amikacina en un 98,4%. En cuanto a quinolonas, las resistencias se han mantenido en los 7 últimos años (del 73% al 71%), no siendo así en las muestras invasivas que han pasado de 90% a 62%. Por último la sensibilidad a los carbapenems se mantiene en todo el período (imipenem 99,6% - meropenem 99,5%).

Conclusiones: 1) El aumento de resistencia a β -lactámicos fue del 15% en cefalosporinas de 1ª generación, un 6% en las de 2ª generación y un 4% en las de 3ª. 2) El mayor aumento

de resistencia en las quinolonas aparece en las muestras invasivas (90% a 62%). 3) La sensibilidad de los carbapenems se mantiene en todo el periodo de estudio.

017

DISEMINACIÓN DE INTEGRONES DE CLASE 1 ENTRE CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* PRODUCTORAS DE DIFERENTES TIPOS DE β -LACTAMASAS AISLADAS EN LA REGIÓN SANITARIA DE TORTOSA

M.M.O. Pérez Moreno, M. Carulla Pont, M. Pérez Moreno, X. Tejedor Ganduxer, M.I. Llovet Lombarte, A.M. Jardí Baiges y J.J. Zaragoza López

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

Objetivo: Estudiar la frecuencia de aparición de integrones de clase 1 entre cepas de *Salmonella enterica* productoras de diferentes tipos de β -lactamasas (β lac) aisladas en nuestra región sanitaria.

Material y métodos: Se estudió la sensibilidad a cloramfenicol (C), estreptomicina (Str), sulfamidas (Su), tetraciclina (Tet), cotrimoxazol (T/S), gentamicina y tobramicina (Gen-Tob), nalidixico (Nal) y colistina (Col) de 100 cepas de *S. enterica* (30 *S. Enteritidis*, 55 *S. Typhimurium* y 15 de otros serotipos) resistentes a ampicilina (Amp), aisladas en nuestro laboratorio entre junio de 2000 y octubre de 2001. En todas las cepas se caracterizaron las β lac por IEF y PCR y se investigó la presencia de integrones de clase 1 mediante PCR, empleando los iniciadores 5'CS- 3'CS. Se estudió, mediante una segunda PCR, la presencia de los genes *aadA1*, *aadA2*, *dfrA1*, *tem-1*, *oxa-1* y *pse-1* en los productos generados por la primera PCR, para intentar identificar los genes de resistencia incluidos en la región variable de los integrones.

Resultados: a) 57 cepas producían **TEM-1** (30 *S. Enteritidis*, 13 *S. Typhimurium*, 4 *S. Hadar*, 2 *S. Panama*, 1 *S. Virchow*, 1 *S. Give*, 1 *S. Grumpensis*, 3 serotipo [4,5,12:i:-], 1 *S. Mbdanka*). El 20% de las cepas de *S. Enteritidis*, el 62% de las de *S. Typhimurium* y el 100% de los restantes serotipos fueron resistentes a 4 o más antibióticos, aunque se observó una gran variedad en los perfiles de resistencia (PR) de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. De las 57 cepas sólo 6 (10,5%) poseían integrones: la única *S. Grumpensis* (PR AmpStrSuTetT/SGen-Tob), en que se detectaron 2 amplicones de aprox. 1500 y 1700 pb y las 2 *S. Panama*, 2 *S. Enterica* y 1 *S. Typhimurium*; en éstas 5 últimas cepas el PR era AmpStrSuTetT/S [C;Kan;Col;Nal] y se obtuvo 1 amplicón de aprox. 1600 pb (*dfrA1-aadA2* en 1 *S. Panamá* y *dfrA1-aadA1* en los 4 aislados restantes). En ningún caso se localizó el gen *tem-1* dentro de un integrón b) 20 cepas producían **OXA-1**; todas eran *S. Typhimurium* (la mayoría no tipificables), mostraban el PR AmpCStrSuTet [T/S;Nal] y portaban 1 integrón [amplicón aprox. 2000 pb (*oxa-1-aadA1*)]. c) 23 cepas (una serotipo [4,5,12:i:-] y 22 *S. Typhimurium* no tipificables, con patrón de fagotipo no reconocido o pertenecientes a los fagotipos 104, 104-b y 11302) producían **PSE-1**; todas ellas presentaban el mismo PR que las cepas OXA-1 y 2 integrones de regiones variables de aprox. 1000 (*aadA2*) y 1200 pb (*pse-1*).

Conclusiones: a) Los genes de resistencia *oxa-1* y *pse-1*, al contrario de lo que sucedió con *tem-1*, siempre se localizaron en integrones y sólo se identificaron en aislados con el PR AmpCStrSuTet que, excepto en un caso, pertenecían al serotipo *Typhimurium*. La coexistencia de este perfil de resistencia y del patrón de integrones que hemos descrito como típico de las cepas productoras de PSE-1 (1000pb *-aadA2* + 1200pb *-pse-1*) no se limitó a *S. Typhimurium* DT104, sino que se constató en otros fagotipos e incluso en el serotipo [4,5,12:i:-]. b) La frecuencia de aparición de integrones entre cepas que albergaban la β lac TEM-1 y, en especial, entre las del serotipo *Enteritidis*, fue muy baja.

018

MECANISMOS DE DISMINUCIÓN DE SENSIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS EN MUTANTES DE *SALMONELLA ENTERITIDIS*

L. Cebrián, I. Escribano, E. Cáscales, M. Ruiz, J.C. Rodríguez y G. Royo

Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Elche.

Objetivos: Caracterizar los mecanismos de disminución de sensibilidad a fluoroquinolonas en mutantes de *S. enteritidis* obtenidas tras exposición repetida a concentraciones bajas y constantes de fluoroquinolonas.

Material y métodos: *Cepas:* Una cepa de *S. enteritidis* sensible a ácido nalidixico y 6 mutantes de dicha cepa.

Generación de mutantes: En caldo MH, esta cepa se puso en contacto con concentraciones bajas (1/8 de su CMI) de ciprofloxacino, ofloxacino, moxifloxacino, sparfloxacino, trovafloxacino y gatifloxacino de forma repetida (media 11,2 pases) hasta que se consiguió un incremento de su CMI de al menos dos diluciones (1).

Caracterización de las mutaciones del gen gyrA: Se realizó mediante secuenciación del fragmento QRDR.

Caracterización de los sistemas de transporte activo del fármaco: Mediante la inhibición de estos sistemas por el compuesto MC 207.110

Resultados: Los mutantes generados presentan disminución de sensibilidad a todas las fluoroquinolonas estudiadas. La cepa salvaje sensible a nalidixico no presentó mutaciones en el fragmento QRDR del gen *gyrA*, mientras que en dos de las seis mutantes, se detectó la presencia de una mutación única en el codón 87 (mutante sparfloxacino: Asp.Tyr y mutante gatifloxacino: Asp.Ala). La comparación de la CMI a ácido nalidixico y ciprofloxacino de las cepas en presencia y en ausencia del inhibidor de los sistemas de transporte activo empleado muestra que las cepas mutantes son capaces de eliminar una cantidad media de ácido nalidixico de 7,49 veces superior a la cepa salvaje. La cepa salvaje elimina nalidixico en escasa cantidad (52,42 ug frente a 7 ug). En cambio, ciprofloxacino no es eliminada por la cepa salvaje, mientras que se observa que las cepas mutantes eliminan 1,66 ug.

Conclusiones: La exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de fluoroquinolonas produce una disminución de la sensibilidad de *S. enteritidis* a estos antibióticos. En esta disminución de la sensibilidad están siempre implicados los sistemas de transporte activo y en algunos mutantes también se observa alteraciones del gen *gyrA*. Aunque los criterios establecidos por la NCCLS consideran como sensible a una cepa con CMI a fluoroquinolonas menor de 1 ug/ml, detectamos la presencia de mecanismos de resistencia en la bacteria, por lo que consideramos que se debe aplicar el criterio establecido por MENSURA. La generación de mutantes con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas tras exposición repetida a concentraciones bajas de estos fármacos, sugieren la necesidad de controlar el uso de fluoroquinolonas en veterinaria y como aditivos alimentarios en animales, ya que existen resistencia cruzadas entre estos compuestos.

1. L. Cebrian et al. Int. J. Antimicrob Agent 2003;22:134-9.

019

CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA ENZIMA AAC(3)I PRESENTE EN UN INTEGRON CLASE I, EN *SALMONELLAS* CAUSANTES DE DIARREA DEL VIAJERO

R. Cabrera, J. Ruiz, P. Goñi, R. Gómez-Lus, M.T. Jiménez de Anta, J. Gascón y J. Vila

Objetivo: Detección de integrones clase I presentes en *Salmonella enterica* causantes de diarrea del viajero y caracterización de una nueva enzima codificada por el gen AAC(3)I.

Materiales y métodos: 16 cepas de *Salmonella* con resistencia a antibióticos fueron recuperadas de heces de viajeros de diferentes áreas. La presencia de integrones clase I fue determinada por PCR con cebadores específicos. Los productos amplificados fueron recuperados y secuenciados con el objetivo de establecer los genes implicados. Las secuencias fueron comparadas con las presentes en el GeneBank. El análisis de los plásmidos, así como la conjugación fue llevada a cabo con todos los aislamientos que presentaban integrones. Adicionalmente la susceptibilidad a gentamicina C1a, gentamicina C1, sisomicina, neomicina, dibekacina, kanamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, apramicina, dactimicina, espectinomicina, estreptomycin, lividomicina y butirosina fue determinada en la cepa portadora del gen AAC(3)I.

Resultados: 4 de las 16 cepas aisladas (25 %) presentaron al menos un integron clase I y contenían genes de resistencia a antibióticos. Tres de las cepas presentaron un integron que contenía los genes *aadB* mas *catB3*, *dfrA17* mas *aadA5*, y *aac(3)I-like* mas *aadA7*, mientras que la cepa restante portaba dos integrones conteniendo los genes *carb2* y *aadA2*, respectivamente. Solo una cepa portaba plásmidos pero fue negativa a la conjugación tanto esta como las demás cepas. La homología entre el ADN y la secuencia de aminoácidos de la enzima AAC(3)I-like y la de la enzima AAC(3) fueron de 59% y 62%, respectivamente. La susceptibilidad antimicrobiana a diferentes aminoglicosidos en estas cepas mostró resistencia o susceptibilidad disminuida a gentamicina C1a, gentamicina C1, dactimicina, y sisomicina, en correspondencia con la presencia de una AAC(3)I. La resistencia a estreptomycin y espectinomicina fue también mostrada, probablemente debido a la presencia del gen *aadA7*.

Conclusiones: Una alta frecuencia de integrones clase I ha sido detectada en aislamientos de *Salmonella* causantes de diarrea del viajero resistentes a antibióticos. Estos integrones presentaron una alta variabilidad de genes de resistencia, principalmente asociada con aminoglicosidos. En esta línea, un nuevo gen que codifica para una enzima AAC(3)I fue identificado dentro del integron.

020

CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A QUINOLONAS EN CEPAS CLÍNICAS DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O:3

S. Capilla*, J. Ruiz**, P. Goñi*, J. Castillo*, M.C. Rubio*, M.T. Jiménez de Anta**, R. Gómez-Lus* y J. Vila**

*Departamento Microbiología, Facultad Medicina, Universidad Zaragoza, Zaragoza. **Servicio Microbiología, Institut Clínic Infeccions i Immunologia, I.D.I.B.A.P.S, Facultad Medicina, Universidad Barcelona, Barcelona.

Y. enterocolitica O:3 es un patógeno entérico causante de infecciones gastrointestinales, que se transmite a través de aguas o alimentos. Aunque en la mayoría de los casos los antibióticos no son necesarios para tratar estas infecciones, su uso puede requerirse para el tratamiento de infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. El objetivo de este estudio es determinar los mecanismos de resistencia a quinolonas en una serie de cepas de *Y. enterocolitica* O:3 resistentes al ácido nalidixico (NAL) aisladas en el área de Zaragoza.

Material y métodos: Se han estudiado 44 cepas de *Y. enterocolitica* O:3 aisladas entre los años 1996 y 2001 (41 resistentes y 3 sensibles a NAL) y una cepa resistente a NAL (CIM de 512 mg/L) obtenida *in vitro* a partir de una cepa sensible a dicho antibiótico (CIM de 8 mg/L). Se han estudiado las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* mediante PCR de la región (RDQR). Paralelamente se ha estudiado la susceptibilidad a NAL y ciprofloxacino (CIP) en presencia y ausencia de 20 mg/L del inhibidor de bombas de eflujo Phe-

Arg- β -naphthylamide (PAN) mediante el método de dilución en agar.

Resultados: Todas las cepas resistentes a NAL presentaban mutaciones en el gen *gyrA* afectando al codon Ser 83 (37 cepas) o Asp 87 (3 cepas) y sólo una tenía una doble mutación produciendo cambios de Ser-83 a Ile y Val-85 a Ile. En ningún caso se ha observado mutación en el gen *parC*. La mutación en Ser 83 ha generado un cambio a Arg en 30 cepas (16 a AGG y 14 a AGA), a Ile (ATC) en 6 cepas y a Cys (TGC) en una cepa. La mutación en Asp 87 ha supuesto un cambio a Gly (GCG) en dos cepas y Asn (AAC) en una cepa. El mutante obtenido "in vitro" presentaba una mutación en la posición 81 cambiando a Cys (TGT). La presencia del inhibidor disminuyó la CIM de NAL entre dos y seis diluciones en 37 de las 41 cepas resistentes a NAL. Por otro lado, la CIM de CIP se vio afectada en tres cepas produciendo un descenso de 3 diluciones (de 0,25 a 0,03 mg/L; de 0,5 a 0,06 mg/L; y de 2 a 0,5 mg/L). El mutante obtenido "in vitro" ha sido afectado por el inhibidor disminuyendo la CIM a NAL en tres diluciones (de 512 a 64 mg/L) mientras que las cepas sensibles a NAL no han sido afectadas.

Conclusiones: Los resultados muestran que un mecanismo de resistencia por bomba de eflujo contribuye a incrementar la resistencia a NAL y el uso del inhibidor PAN no consigue producir el cambio de resistente a sensible en la mayoría de los aislados analizados. Los resultados muestran que aunque una mutación en el gen *gyrA* es la responsable de generar la resistencia a NAL, en la mayoría de las cepas de *Y. enterocolitica* O:3, la sobreexpresión de bombas de eflujo puede modular la CIM final de este agente antimicrobiano.

021

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA NUEVA β -LACTAMASA AMPC EN UN AISLAMIENTO CLÍNICO DE UNA CEPA DE *ACINETOBACTER* GENOESPECIE 3

A. Beceiro*, X. Moralejo*, L. Domínguez*, A. Ribera**, J. Vila**, R. Villanueva* y G. Bou*

*C.H.U. Juan Canalejo, A Coruña. **H. Clinic, Barcelona.

Introducción: Se aisló en nuestro hospital una cepa de *Acinetobacter* Genoespecie 3 (AG3) con un patrón de resistencia que sugería la presencia de una β -lactamasa de clase C. El principal objetivo fue la caracterización molecular de esta β -lactamasa de AG3.

Métodos: Se realizó una identificación genotípica de la especie por ARDRA. La presencia de β -lactamasas se estudió mediante IEF. Se realizó CMI por microdilución y confirmación por E-test, según criterios NCCLS. Purificación del cromosoma y plásmidos mediante técnicas convencionales. Identificación del gen *ampC* mediante PCR, utilizando iniciadores específicos para *ampC* de *A. baumannii* (Ab). Posterior clonación del amplicón en el plásmido pGEM-T (Promega, USA). Se estudió la diseminación del gen mediante PCR, en 7 aislamientos genéticamente no relacionados de AG3 tipados por REP-PCR. Para estudios microbiológicos y bioquímicos se clonó el gen *ampC* AG3 en los vectores pBG518 y pGEX-6p-1 respectivamente. La inducibilidad del enzima se estudió mediante ensayos con cefoxitina.

Resultados: El enzima tiene un pI > 8,5. No se pudo obtener ningún plásmido de la cepa clínica. Se obtuvo por PCR un producto génico de 1321 pb, con una homología de un 95% con *ampC* de Ab. La proteína presentaba 9 cambios aminoacídicos con respecto a la AmpC de Ab (entre los que se encuentran Pro167Ser y Asp240Gly, implicados ambos en el aumento de CMI a ceftazidima en β -lactamasas CTX-M) y dos cambios en el promotor, en las regiones -21 y -53. CMIs (mg/L) del *E. coli* TG1 portador del gen: ampicilina (AMP): 128; amoxicilina-clavulánico (XL):12; piperacilina (PP): > 256; cefalotina (CE): > 256; cefoxitina (FX): > 256; ceftazidima (TZ): 0,5; cefotaxima (CT):1 e imipenem (IP):1. Parámetros cinéticos (valor relativo Km/Vmx): AMP: 100, CE: 10605,

FX: 482, XM: 47. Tasas de hidrólisis relativas con 100 μ M de cada antibiótico: AMP: 100, CE: 6770, FX:26, XM: 15, CT:4, IP:2. No fue inducible en presencia de cefoxitina. El gen se encontró en los 7 aislamientos no relacionados de AG3.

Conclusiones: Los cambios de Aa así como los cambios en el promotor de los genes de ambas proteínas (AmpC AG3 y Ab) son posiblemente los causantes de las diferencias en las CMI, así como de las características bioquímicas que presentan. Estudios estructura-función con un promotor común se están llevando a cabo, así como mutagénesis dirigida sobre los Aa discordantes entre ambas enzimas. Describimos la caracterización molecular de un nuevo gen *ampC* detectado en una cepa clínica de AG3.