

(determinación RNAm *ampC* por PCR en tiempo real) en condiciones basales y tras inducción con cefoxitina. Además se determinaron en los 7 mutantes las CMIs a diversos  $\beta$ -lactámicos por Etest.

**Resultados:** Mientras que la inactivación de *ampD* en PAO1 se asoció con un fenotipo de desrepresión parcial de AmpC [CMI de ceftazima 8  $\mu\text{g/mL}$  (PAO1 1  $\mu\text{g/mL}$ ) e incremento de RNAm *ampC* respecto a PAO1 de 60 y 152 veces en condiciones basales e inducidas, respectivamente], la inactivación de *ampDh2* o *ampDh3* no produjo ningún fenotipo aparente. Sin embargo, la doble inactivación de *ampD* y uno de los homólogos, especialmente *ampDh3*, causó un notable incremento en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos y en la expresión de *ampC*, siendo ésta todavía inducible [PADDh3: CMI de ceftazima 48  $\mu\text{g/mL}$ , RNAm *ampC* 191 (basal) y 1014 (inducida) veces mayor que PAO1]. Finalmente, el mutante triple mostró fenotipo de desrepresión total (RNAm *ampC* mil veces mayor que PAO1 tanto en condiciones basales como inducidas) pero sin aumentar la resistencia a  $\beta$ -lactámicos respecto a PADDh3. La explicación para este resultado reside en que concentraciones subinhibitorias de  $\beta$ -lactámicos en teoría débiles inductores de AmpC como la ceftazidima, inducen la expresión de *ampC* en PADDh3 hasta los niveles de desrepresión total del mutante triple (1000 veces mayor que PAO1).

**Conclusión:** Los fenotipos de desrepresión parcial y total, con incremento secuencial de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, están determinados por la presencia de tres homólogos de *ampD* en *P. aeruginosa*.

## 222

### IDENTIFICACIÓN DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS DE LA CLASE TEM EN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* Y DE LAS MODIFICACIONES EN SU GEN PROMOTOR

S. García-Cobos<sup>1</sup>, C. García-Rey<sup>2</sup>, B. Aracil<sup>1</sup> y J. Campos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Antibióticos, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid;

<sup>2</sup>Laboratorios GlaxoSmithKline, Madrid.

**Objetivos:** 1) Caracterizar los genes responsables de la producción de  $\beta$ -lactamasa en cepas de *Haemophilus influenzae* y 2) estudio de la presencia de variaciones en la secuencia del promotor del gen *blaTEM*.

**Material y métodos:** La colección de estudio fue una muestra de 47 cepas procedentes del estudio multicéntrico SAUCE en el que participaron 14 hospitales españoles. Las cepas procedían de muestras respiratorias y eran productoras de  $\beta$ -lactamasa (fenotipo BLPAR). Se emplearon cebadores específicos para la amplificación y secuenciación del gen *blaTEM* y también de su promotor y se comparó con la secuencia del gen *blaTEM-1*. Además en estas cepas se secuenció el gen *ftsI* para descartar posibles alteraciones en la afinidad de la proteína PBP3 (fenotipo BLNAR).

**Resultados:** En 43 de las 47 cepas estudiadas (91,5%), se obtuvo producto de amplificación, cuya secuenciación confirmó la pertenencia al tipo TEM-1 de todas las cepas (97,6%), excepto una. En el estudio de la secuencia del promotor se observaron modificaciones en 23 cepas (53,5%); 19 de ellas (44,2%) presentaban una delección de 136 pb y 4 (9,3%) una duplicación de 54 pb; el resto de las cepas, 20 (46,5%), no contenían variaciones en el promotor. Todas las cepas (independientemente de su modificación en el promotor) eran resistentes a ampicilina y sensibles a amox-clavulánico, cefuroxima y cefotaxima; 13 (27,6%) eran resistentes a cefaclor (8 de las cuales presentaban delección en el promotor y 5 ninguna modificación), 4 (8,5%) eran resistentes a cefixima (2 de ellas con delección en promotor y 2 sin variación). De las 43 cepas positivas para el gen *blaTEM*, 9 (20,9%) presentaban además mutaciones en la proteína PBP3, 7 de las cuales contenían delección en el promotor del gen *blaTEM* y eran resistentes a cefaclor.

**Conclusiones:** 1) TEM-1 es muy predominante en las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa de *H. influenzae*. 2) Una

## 221

### Sesión 15 Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos (I)

## 221

### LA DESREPRESIÓN SECUENCIAL DE LA CEFALOSPORINASA CROMOSÓMICA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ESTÁ MEDIADA POR TRES HOMÓLOGOS DE *AMPD*

C. Juan, B. Moyá, J.L. Pérez y A. Oliver

Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca.

**Introducción:** El fenotipo de desrepresión parcial de la cefalosporinasa cromosómica AmpC es característico y frecuente en *P. aeruginosa*. De hecho, la inactivación de AmpD causa en este microorganismo a diferencia de lo que ocurre en *Enterobacteriaceae* el aumento de la expresión de AmpC pero manteniéndose su inducibilidad. En este trabajo se ha estudiado el papel en la represión de AmpC de dos homólogos adicionales de AmpD (PA5485 y PA0807, designados AmpDh2 y AmpDh3, respectivamente) detectados por nuestro grupo en el cromosoma de la cepa PAO1.

**Métodos:** Se construyeron a partir de PAO1 los tres mutantes simples en los genes *ampD*, *ampDh2* y *ampDh3* (PAD, PADh2, y PADh3), los tres dobles (PADDh2, PADDh3, y PADh2Dh3) y el triple (PADDh2Dh3). Se cuantificó en los 7 mutantes la actividad  $\beta$ -lactamasa (nmoles de nitrocefén hidrolizados por min y mg de proteína) y la expresión de *ampC*

proporción importante de cepas muestra modificaciones en el gen promotor que no parecen asociarse con el aumento o disminución de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. 3) La resistencia a cefaclor en algunas de las cepas puede deberse a la presencia de mutaciones adicionales en la PBP3.

## 223

### INCIDENCIA DE QNR EN BACILOS GRAMNEGATIVOS

S. Lavilla, J.J. González-López, M. Sabaté y G. Prats

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

**Introducción y objetivos:** La resistencia a las quinolonas se produce fundamentalmente por mutaciones cromosómicas en los genes: *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*. En 1998, se describe por primera vez la resistencia a quinolonas trasnsmisible por un plásmido conjugativo portador del gen *qnr*. Se han descrito varios tipos de *qnr*: *qnrA1-5*, *qnrS* y *qnrB*, que confieren diferentes niveles de resistencia a las quinolonas y fluoroquinolonas. En este trabajo se presenta el estudio de la incidencia de *qnr* en bacilos gramnegativos con distintos fenotipos de resistencia a betalactámicos.

**Materiales y métodos:** Se estudiaron un total 738 cepas de las cuales 669 fueron enterobacterias y 69 pseudomonas, aisladas de diferentes tipos de muestras clínicas. La detección de los genes *qnr* se efectuó mediante PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados. En las cepas positivas para *qnr* se determinó la CMI del ácido nalidíxico y la ciprofloxacina mediante Etest.

**Resultados:** De las 738 cepas estudiadas se encontraron un total de 16 (2,1%) positivas: 8 *Klebsiella pneumoniae* (7 *qnrA1* y 1 *qnrS*), 6 *Enterobacter cloacae* (6 *qnrA-1*) y 2 *Escherichia coli* (2 *qnrA-1*). Los límites de las CMIs del ácido nalidíxico oscilaron entre 3 y  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$  y los de la ciprofloxacina entre 0,094 y 0,75  $\mu\text{g/ml}$ . Muchas de estas cepas presentaban mutaciones en las topoisomerasas.

**Conclusiones:** La existencia del gen *qnr* dentro de un elemento móvil, abre la posibilidad de una diseminación horizontal de la resistencia a las quinolonas y aunque la significación clínica de esta resistencia plasmídica a las fluoroquinolonas no se conoce en todo su detalle, es interesante estudiar su epidemiología y monitorizar su difusión.

## 224

### ACTIVIDAD COMPARATIVA DE ERTAPENEM (ERT) FRENTE A CEPAS DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) Y/O DE AMPC (ACBL) Y/O DEFICIENTES EN PORINAS (POR)

J.R. Hernández\*, M.C. Conejo y A. Pascual

Dpto. Microbiología, Universidad de Sevilla, Hospital Universitario V. Macarena, Sevilla.

**Objetivos:** Estudiar la actividad de ERT frente a cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE y/o de ACBL y/o deficientes en POR y compararla con la de otros antimicrobianos. Analizar la aparición de efecto inóculo (EI).

**Material y métodos:** Se estudiaron 50 cepas de *K. pneumoniae* incluyendo 2 cepas ACBL-BLEE-/POR-, 10 ACBL-/BLEE+/POR+, 12 ACBL-/BLEE+/POR-, 18 ACBL+/BLEE-/POR+, 1 ACBL+/BLEE-/POR-, 4 ACBL+/BLEE+/POR+ y 3 ACBL+/BLEE+/POR-. Se determinó la sensibilidad a ERT, imipenem (IMP), cefoxitina (FOX), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), amoxicilina/clavulánico (AMC), piperacilina/tazobactam (PTZ), ciprofloxacino (CIP), cotrimoxazol (Sxt), amikacina (AK) y gentamicina (GN) mediante microdilución en caldo MH (normas CLSI), utilizando inóculos de  $10^5$  (inóculo estándar) y  $10^6$  ufc/ml. Los resultados se analizaron en función de la producción de betalacta-

masas y de la expresión de POR. Se consideró EI cuando se producía un aumento en la CMI mayor de 2 diluciones con respecto al inóculo estándar.

**Resultados:** A inóculo estándar el betalactámico (BL) más activo fue IMP [94% de cepas sensibles (S)]. ERT presentó una excelente actividad, equiparable a la de IMP, frente a cepas BLEE+/POR+ (100% de S). La actividad de ambos carbapenems se redujo frente al grupo BLEE+/POR-, disminuyendo el porcentaje de S sólo en el caso de ERT (58,3%). Frente a las cepas ACBL+ los BLs con mayor actividad fueron FEP, IMP y ERT (96,2, 88,5 y 85% de S respectivamente). AK fue el más activo de los antimicrobianos no BLs ensayados (92% de S), seguido de CIP, GN y Sxt (80, 48 y 46% de S respectivamente). Todos los BLs, excepto FOX, presentaron EI, siendo más marcado con FEP, lo que supuso que el porcentaje de cepas ACBL+ resistentes a FEP pasara de un 0% con inóculo estándar al 65,4% con 106 ufc/ml. Los carbapenems sólo presentaron EI frente a cepas ACBL+, siendo más frecuente con IMP que con ERT (23 frente a 7,7% de cepas ACBL+ respectivamente). De los antimicrobianos no BLs GN fue el que presentó EI con menor frecuencia, seguido de AK, Sxt y CIP.

**Conclusiones:** Los antimicrobianos más activos frente a cepas de *K. pneumoniae* BLEE+ fueron AK, ERT e IMP. Los 2 carbapenems presentaron una excelente actividad frente a cepas BLEE+/POR+. El déficit de POR afectó más a la actividad de ERT que a la de IMP. El antimicrobiano más activo frente a cepas ACBL+ fue FEP, seguido de IMP, ERT y AK, pero presentó un marcado EI. ERT presentó EI con menor frecuencia que IMP.

## 225

### LA RESISTENCIA A MÚLTIPLES ANTIBIÓTICOS DE HAEMOPHILUS INFLUENZAE EN ESPAÑA SE DEBE A LA ADQUISICIÓN DE GENES PLASMÍDICOS Y A MUTACIONES EN GENES CROMOSÓMICOS CONSTITUTIVOS

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

Laboratorio de Antibióticos. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

**Introducción:** *Haemophilus influenzae* produce infecciones invasivas y de las mucosas en seres humanos. Además, las cepas españolas presentan importantes problemas de resistencia antibiótica. Los objetivos de este estudio fueron conocer los mecanismos de resistencia más comunes, tanto plasmídicos como cromosómicos en las cepas españolas de *H. influenzae*, tanto capsuladas como no capsuladas.

**Material y métodos:** Basándose en estudios multicéntricos previos, se seleccionaron 58 cepas de *H. influenzae* capsuladas (n: 14 del serotipo (st) b, 14 del st e y 14 del st f) y no capsuladas (n: 16). La sensibilidad antibiótica se determinó previamente mediante microdilución en caldo, siguiendo normas del NCCLS. La identificación de genes plasmídicos se determinó mediante el diseño de cebadores específicos y la secuenciación de los productos amplificados positivos de PCR para los genes *tem*, *cat*, *tet* y *sul*. Los genes cromosómicos amplificados fueron *folP* (sulfametoazol) *folA* y su promotor (trimetoprima).

**Resultados:** Los genes plasmídicos identificados fueron siempre los mismos: *tem1*, *catII*, *sul2* y *tetB* para cepas resistentes a ampicilina productoras de beta-lactamasa, cloramfenicol, sulfametoazol y tetraciclina, respectivamente, independientemente del origen clínico y geográfico de las cepas y de que presentaran cápsula o no. Dichos genes estuvieron presentes en todas las cepas resistentes y en ninguna de las sensibles. Las cepas con alto nivel de resistencia a trimetoprima (CMI 256-2048 mg/L) presentaron múltiples sustituciones de aminoácidos en la proteína FolA; de 16 posiciones polimórficas, se encontraron cepas con cambios de entre 1 y 12, así como entre 1 y 4 mutaciones puntuales en

el gen promotor de folA; en ninguna de las cepas sensibles se halló ningún cambio en el promotor.

**Conclusiones:** 1) La resistencia a múltiples antibióticos en las cepas españolas de *H. influenzae* se debe a la adquisición de genes plasmídicos y a mutaciones de genes cromosómicos constitutivos. 2) Los genes de resistencia plasmídicos identificados fueron comunes a todas las cepas resistentes, con independencia de su procedencia clínica, geográfica y de la producción o no de polisacárido capsular. 3) La resistencia a trimetoprima se debe a múltiples sustituciones en la proteína dihidrofolato reductasa (Fol A).

## 226

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS REGIONES DETERMINANTES DE LA RESISTENCIA A QUINOLONAS EN *N. GONORRHOEAE*

M. Alkorta, E. Urrea, J.L. Hernández e I. López

Servicio de Microbiología. Hospital de Cruces (Vizcaya).

**Introducción:** *N. gonorrhoeae* (NG) ha experimentado un aumento en el número de aislamientos y en la resistencia a quinolonas estos últimos años. Hemos caracterizado las cepas resistentes a quinolonas detectando las mutaciones en el QRDR (región determinante de la resistencia a quinolonas) de los genes gyrA, gyrB y parC.

**Material y métodos:** Se investigó la susceptibilidad a ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LV) y moxifloxacino (MXF) de las cepas aisladas durante los años 2003- 2005. El método utilizado para determinar la CMI fue el Etest (Biodisk), en agar GC suplementado. Las mutaciones en los genes gyrA, gyrB y parC de las 7 cepas resistentes a quinolonas y de 6 cepas sensibles se detectaron mediante PCR y posterior secuenciación de los productos amplificados que incluían las regiones QRDR de estos genes.

#### Resultados:

Cepa	CMI (μg/ml)			gyrA		gyrB			parC		
	CIP	LV	MXF	Ser91	Asp95	Asp86	Ser87	Tyr104	Leu131		
1	8	8	4	Phe	Gly	-	Asn			Leu	
2	> 32	32	4	Phe	Gly	-		Arg	Tyr	Leu	
3	16	16	4	Phe	Gly	-	Asn			Leu	
4	4	4	1	Phe	Ala	-		Asn		Leu	
5	4	8	4	Phe	Gly	-				Leu	
6	8	4	3	Phe	Gly	-		Arg	Tyr	Leu	
7	4	3	3	Phe	Gly	-		Arg	Tyr	Leu	
8-13 ≤ 0,004	≤ 0,008	≤ 0,012	-	-	-	-	-	-	-	Leu	

**Conclusiones:** 1) Todas las cepas de NG resistentes a quinolonas presentan resistencia de alto nivel, no se ha aislado ninguna cepa con resistencia intermedia. 2) Todas las cepas presentan mutaciones en las regiones QRDR del gyrA o parC, pero ninguna presenta mutación en el gyrB. 3) El patrón de mutaciones de las cepas resistentes ha sido muy uniforme en el gyrA con las 7 cepas con doble mutación en Ser91 y Asp95. En parC los patrones han sido más variables, 3 cepas con mutaciones en Ser87, Tyr104 y Leu131, 2 cepas en Asp86 y Leu131, 1 cepa en Ser87 y Leu131 y 1 cepa sólo en Leu131.

## 227

### DETECCIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A CLINDAMICINA MEDIADA POR EL GEN LNU (B)

J.J. González-López, A.M. Planes, N. Larrosa, R. Bartolomé, A. Andreu y G. Prats

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

**Introducción:** Los macrólidos y lincosamidas constituyen dos familias de antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S del ribosoma. En *Staphylococcus* la resistencia a macrólidos y lincosamidas es

mediada principalmente por las metilasas Erm y por las bombas de expulsión activa Msr (A) y Mef (A) que afectan únicamente a los macrólidos. Un mecanismo poco frecuente de resistencia a las lincosamidas pero que no afecta a los macrólidos es el mediado por las nucleotidiltransferas como Lnu (A), descrito en *Staphylococcus*, o Lnu (B), detectado únicamente en *Enterococcus faecium* y *Streptococcus agalactiae*.

**Objetivo:** Determinar el mecanismo de resistencia a la clindamicina y lincomicina en una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a eritromicina aislada por hemocultivo.

**Material y métodos:** El estudio de la sensibilidad se realizó mediante disco difusión y se confirmó por Etest. La presencia de los genes de resistencia a macrólidos y/o lincosamidas erm (A), erm (B), mef (A) y lnu (B) se estudió mediante PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados.

**Resultados:** La cepa de *S. aureus* fue resistente a penicilina, clindamicina y gentamicina manteniéndose sensible a oxacilina, cotrimoxazol, vancomicina y eritromicina. La CMI a la eritromicina fue de 0,25 mg/L y a la clindamicina de 32 mg/L. De los genes de resistencia a los macrólidos y/o lincosamidas estudiados, únicamente se detectó la presencia del gen lnu (B) cuya secuencia presentaba un 100% de identidad con las secuencias descritas anteriormente en *E. faecium* y *S. agalactiae*.

**Conclusiones:** Este trabajo describe el primer caso de resistencia a clindamicina y lincomicina en el género *Staphylococcus* (*S. aureus*) debido a la presencia del gen lnu (B).

## 228

### EFICACIA DE LA COLISTINA INTRAVENOSA EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR BACILOS GRAMNEGATIVOS MULTIRRESISTENTES

V. Pintado, L.G. San Miguel, F. Grill, B. Megía<sup>1</sup>, J. Cobo, J. Fortún, P. Martín-Dávila y S. Moreno

Servicios de Enfermedades Infecciosas y <sup>1</sup>Farmacia. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

**Introducción:** La colistina es una polimixina cuyo uso fue abandonado en los años 80 debido a su toxicidad renal y neurológica. El incremento progresivo de infecciones por bacilos gramnegativos multirresistentes (BGN-MR) ha motivado su reciente reintroducción en la práctica clínica.

**Métodos:** Estudio retrospectivo (1995-2004) para evaluar la eficacia y toxicidad de la colistina intravenosa en el tratamiento de infecciones por BGN-MR.

**Resultados:** 40 pacientes fueron tratados con colistina (dosis media 4,3 mg/kg/día, 2-5 mg) por un periodo mediano de 15 días (3-46). Las principales infecciones fueron neumonía o tráqueobronquitis (72,5%), intraabdominal (12,5%), herida quirúrgica (7,5%), bacteriemia primaria (2,5%), partes blandas (2,5%) y urinaria (2,5%) y fueron causadas por *Acinetobacter* spp. (65%), *Pseudomonas aeruginosa* (20%), *Enterobacter* (12,5%) y *S. maltophilia* (2,5%). La mayoría de pacientes estaban en estado crítico y presentaban sepsis (55%), sepsis grave (7,5%), shock séptico (5%) o fracaso multiorgánico (12,5%); 13 (32,5%) presentaban bacteriemia. La colistina se utilizó en monoterapia en 5 casos (12,5%), en combinación con aminoglucósidos en 10 (25%), con beta-lactámicos en 8 (20%), con ambos antibióticos en 14 (35%) y con quinolonas en 3 (7,5%). La respuesta clínica fue favorable en 27 casos (67,5%) y la mortalidad global fue de 25% (10/40). Aunque la colistina se utilizó asociada a aminoglucósidos en un 60% de los pacientes, sólo se presentó toxicidad renal en un 8% (5/36) de los casos, todos con insuficiencia renal previa. No se observó ningún caso de toxicidad neurológica.

**Conclusiones:** La colistina es un fármaco eficaz y seguro en el tratamiento de infecciones graves por BGN-MR. A pesar de su empleo en combinación con aminoglucósidos en una elevada proporción de los pacientes, la toxicidad renal fue un efecto adverso poco frecuente.

## 229

### MECANISMOS DE RESISTENCIA A AMPICILINA EN CEPAS RESPIRATORIAS DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* EN ESPAÑA: EMERGENCIA DE CEPAS CON DOBLE MECANISMO DE RESISTENCIA

S. García-Cobos<sup>1</sup>, C. García-Rey<sup>2</sup>, F. Román<sup>1</sup>, E. Cercenado<sup>3</sup>, B. Orden<sup>4</sup>, E. Moguel<sup>1</sup>, B. Aracil<sup>1</sup> y J. Campos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Antibióticos, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid;

<sup>2</sup>Laboratorios GlaxoSmithKline, Madrid; <sup>3</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Gregorio Marañón, Madrid;

<sup>4</sup>Laboratorio de Microbiología, Centro de Especialidades Argüelles, Madrid.

**Objetivos:** 1) Estudiar de la resistencia a ampicilina en cepas de *Haemophilus influenzae* no productoras de beta lactamasa (fenotipo BLNAR, mediado por mutaciones en el gen *ftsI* que codifica el dominio transpeptidasa de la proteína PBP3 implicada en la síntesis de la pared bacteriana) y 2) determinar la posible sobreexpresión de la bomba de expulsión AcrAB en la adquisición de CMIs más altas a ampicilina en cepas BLNAR.

**Material y métodos:** La colección de estudio fue una muestra de 326 cepas procedentes del estudio multicéntrico español SAUCE, en el que participaron 14 hospitales, y del laboratorio de Referencia del CNM; de ellas, 89 (27,3%) eran productoras de β-lactamasa y resistentes a ampicilina (BLPAR), 153 (47%) no productoras de β-lactamasa y resistentes a ampicilina (BLNAR) y 84 (25,7%) no productoras de β-lactamasa y sensibles a ampicilina (BLNAS). La mayoría eran de origen respiratorio. Se analizó la secuencia del gen *ftsI* en todas las cepas y se comparó con la secuencia estándar del mismo gen de la cepa control Rd (ATCC 51907). Además, se seleccionaron 66 cepas de la misma colección (62,2% BLNAR y 37,9% BLNAS) para el análisis de la secuencia del gen *acrR* que codifica el represor de la bomba de expulsión AcrAB.

**Resultados:** En la proteína PBP3 se encontraron 27 perfiles de mutaciones, con sustituciones de aminoácido en 22 posiciones diferentes; 204 cepas (62,5%) presentaron mutaciones, de ellas, 31 (9,5%) eran BLNAS, 137 (42%) BLNAR y 36 (11%) BLPAR. En el estudio de la proteína represora se observaron sustituciones de aminoácido en todas las cepas estudiadas, incluidas las sensibles a ampicilina; en 6 de ellas los cambios en la secuencia del gen *acrR* predecían la terminación prematura de la proteína.

**Conclusiones:** 1. La resistencia asociada a mutaciones en la proteína PBP3 está ampliamente diseminada en España. 2. Parte de las cepas resistentes, asocian simultáneamente los dos mecanismos de resistencia (BLNAR y BLPAR). 3. La proteína represora de la bomba de expulsión AcrAB presenta gran variabilidad genética y la aparición de codones de terminación prematuros, tanto en cepas con CMIs a ampicilina altas (8 µg/ml), como en cepas con CMIs bajas (0,5 µg/ml), lo cual sugiere que la ausencia de represor no está relacionada con la resistencia a ampicilina en *H. influenzae*.

## 230

### ACTIVIDAD IN VITRO DE LINEZOLID FRENTES A CEPAS DE *CORYNEBACTERIUM AMYCOLATUM*, *CORYNEBACTERIUM STRIATUM*, *CORYNEBACTERIUM JEIKEIUM* Y *CORYNEBACTERIUM UREALYTICUM* MEDIANTE MODELOS EXPERIMENTALES DE CURVAS DE MUERTE

J. Tamayo, J.I. Alós y J.L. Gómez-Garcés

Servicio de Microbiología, Hospital de Móstoles, Madrid.

**Introducción y objetivos:** Linezolid, pertenece a una nueva clase de antimicrobianos (oxazolidinonas), cuya actividad

consiste en la inhibición de la síntesis proteica, impidiendo la formación del complejo de iniciación 70S. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad del linezolid frente a cepas de diferentes especies de corinebacterias mediante la realización de modelos experimentales de curvas de muerte, para así poder valorar su efecto en la cinética de crecimiento bacteriano.

**Material y métodos:** Se estudiaron un total de 16 cepas (4 *C. amycolatum*, 4 *C. striatum*, 4 *C. jeikeium* y 4 *C. urealyticum*). Las curvas de muerte se realizaron siguiendo las recomendaciones del CLSI. En cada experimento, se partió de un inóculo bacteriano de  $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$  UFC/ml, utilizando caldo de Mueller-Hinton. La concentración de linezolid fue 2 veces la CMI de cada cepa probada (previamente calculada mediante método de dilución en agar). Se realizó un recuento bacteriano a las 0, 2, 6 y 24 horas de incubación a 37°C mediante diluciones seriadas en suero fisiológico y posterior inoculación en agar sangre. El recuento en estas placas se realizó a las 72 horas de incubación a 37°C. En paralelo y como control, a todas las cepas se les realizó la misma metodología pero sin añadir el antimicrobiano. La variación del número de bacterias viables a lo largo cada experimento se cuantificó mediante el cálculo del log<sub>10</sub> UFC/ml.

**Resultados y conclusiones:** Las curvas de muerte mostraron, que a una concentración de 2 veces la CMI, el linezolid se comportó como bacteriostático en todas las cepas testadas, con una tasa de muerte de alrededor del 90% (disminución de entre 0,8-1,7 logaritmos a las 24 horas respecto al inóculo inicial). Esta disminución fue algo más acusada en las cepas de *C. amycolatum* y *C. striatum* (1,3 y 1,7 logaritmos respectivamente) en comparación con la producida en cepas de *C. jeikeium* y *C. urealyticum* (1 y 0,8 logaritmos respectivamente).

## 231

### CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA RESISTENCIA A CARBAPENEMAS EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DE LOS HOSPITALES ESPAÑOLES

O. Gutiérrez<sup>1</sup>, E. Cercenado<sup>2</sup>, F. Navarro<sup>3</sup>, E. Bouza<sup>2</sup>, P. Coll<sup>3</sup>, J. L. Pérez<sup>1</sup>, A. Oliver<sup>1</sup> y la Red Española de Investigación e Patología Infecciosa (REIPI)

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, H. Son Dureta, Palma de Mallorca.

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, H. Gregorio Marañón, Madrid.

<sup>3</sup>Servicio de Microbiología, H. Sant Pau, Barcelona.

**Objetivo:** Estudio de la epidemiología molecular y de los mecanismos implicados en la resistencia a carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa* de los hospitales españoles.

**Métodos:** Se estudiaron todos los aislamientos resistentes al imipenem y/o meropenem (236, 18,9%) procedentes de un estudio multicéntrico realizado en noviembre de 2003 en el que se recogieron 1248 aislamientos de *P. aeruginosa* de 160 hospitales. La relación clonal se determinó por electroforesis de campo pulsado (PFGE) y se seleccionó un aislamiento por clon y hospital para los estudios posteriores. Para la detección de carbapenemases, se determinó la CIM del imipenem con y sin EDTA (Etest MBL), se cuantificó espectrofotométricamente la actividad hidrolítica de imipenem y se realizó una PCR del gen de las carbapenemases tipo VIM e IMP, seguida de secuenciación. Adicionalmente, se detectó la presencia de β-lactamasas distintas de AmpC por ensayo de inhibición por cloxacilina y, en su caso, se caracterizaron por PCR. Para la caracterización de los mecanismos de resistencia cromosómicos, se cuantificó la actividad de AmpC en todos los clones, y se secuenció oprDy se cuantificó la expresión de MexAB-OprM y de MexEF-OprN en 10 clones seleccionados aleatoriamente.

**Resultados:** Mediante PFGE se detectaron 165 clones distintos. La diseminación inter e intrahospitalaria fue baja, aunque 6 clones se detectaron en más de un hospital y, en algunos, se documentó una elevada diseminación clonal. Sólo

uno de los 236 aislamientos fue positivo por el Etest MBL ( $\geq$  3 diluciones de diferencia) e hidrolizó el imipenem, determinándose por PCR y secuenciación la presencia de VIM-2. Se documentó hiperproducción de AmpC en el 51,3% de los clones, asociándose significativamente con resistencia a meropenem. El 4,7% de los clones presentó otra  $\beta$ -lactamasa, además de AmpC, en todos los casos del grupo PSE-1 sin aparente relación con resistencia a las carbapenemas. De los 10 clones caracterizados, 9 presentaron mutaciones inactivantes en *oprD*.

**Conclusión:** El mecanismo más frecuente de resistencia a las carbapenemas sigue siendo la inactivación de OprD +/- hiperproducción de AmpC o hiperexpresión de bombas de expulsión. Si bien la prevalencia de cepas productoras de carbapenemas es todavía baja (0,4% y 0,08% de las cepas resistentes a carbapenemas y totales, respectivamente) es necesario mantener una vigilancia activa de este mecanismo emergente de resistencia dadas sus implicaciones epidemiológicas y terapéuticas.

## 232

### ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS Y LINCOSAMIDAS EN ESTREPTOCOCOS $\beta$ HEMOLÍTICOS AISLADOS DE MUESTRAS CLÍNICAS

L. Merino\*, M.J. Torres, J. Aznar, A. Cantos y A. García  
Servicio de Microbiología. HH. UU Virgen del Rocío. Sevilla.

**Objetivos:** Estudiar los diferentes mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas, en cepas de Estreptococos  $\beta$  hemolíticos procedentes de distintas muestras clínicas.

**Material y métodos:** Durante un periodo de un año se aislaron un total de 171 Estreptococos  $\beta$  hemolíticos grupo A, G y C. De estos, 42 (24,6%), fueron resistentes a eritromicina y 2 cepas sensibles a eritromicina y resistente a clindamicina (35 grupo A, 6 grupo G y 3 grupo C). El origen de las muestras fue; 24 faríngeos, 8 heridas, 4 úlceras, 4 óticos, 2 hemocultivos, 1 nasal y 1 líquido articular. La caracterización fenotípica se realizó por el método de disco difusión. La sensibilidad antibiótica a eritromicina y clindamicina se realizó por el método de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones del CLSI. Utilizando técnicas de PCR en tiempo real se determinó la presencia de los genes de resistencia a macrólidos *mefA*, *ermB*, y *ermTR*.

**Resultados:** De los 24 exudados faríngeos, en 23 se aisló el grupo A y en 1 el grupo G, de estos 20 cepas mostraron el fenotipo por bomba de expulsión activa (M), 3 cepas mostraron un fenotipo constitutivo de resistencia (cMLSB) y 1 cepa mostró un fenotipo inducible de resistencia (iMLSB). En el caso de las muestras no faríngeas, de las 20 cepas aisladas: 12 cepas fueron del grupo A, 5 cepas del grupo G y 3 cepas del grupo C. De estas 20 cepas, 8 mostraron el fenotipo por bomba de expulsión activa (M), 4 cepas mostraron un fenotipo constitutivo de resistencia (cMLSB), 6 cepas mostraron un fenotipo inducible de resistencia (iMLSB) y 2 cepas fueron sensibles a eritromicina y resistentes a clindamicina. Independientemente del grupo de estreptococo, todas las cepas con fenotipo de bomba de expulsión tenían el gen *mefA*, las cepas con fenotipo constitutivo de resistencia (cMLSB) tenían el gen *ermB* y las cepas con fenotipo inducible de resistencia (iMLSB) tenían el gen *ermTR*. Las 2 cepas sensibles a macrólidos pero resistentes a clindamicina no amplificaron a ninguno de los genes probados.

**Conclusiones:** 1) La mayoría de las cepas procedentes de exudados faríngeos fueron sensibles a clindamicina. 2) El 80% de las cepas del grupo G mostraron un fenotipo inducible de resistencia (iMLSB). 3) El 100% de las cepas del grupo C procedían de muestras invasivas. 4) Las 2 cepas sensibles a macrólidos pero resistentes a clindamicina eran del grupo C.

## 233

### CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA EN CEPAS DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* RESISTENTES A MACRÓLIDOS Y LINCOSAMIDAS

L. Merino\*, M.J. Torres, R. Terrones y J. Aznar  
Servicio de Microbiología. HH.UU Virgen del Rocío. Sevilla.

**Objetivos:** Estudiar los diferentes mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas, en cepas de *Streptococcus agalactiae*, por métodos fenotípicos y genotípicos, correlacionándolos con los niveles de resistencia antibiótica.

**Material y métodos:** Se estudiaron todas las cepas de *S. agalactiae* procedentes de exudados vaginales y orina (645 cepas; 575 de exudados vaginales y 70 de orina) aisladas en nuestro laboratorio durante un periodo de 6 meses, así como todas las cepas de *S. agalactiae* procedentes de hemocultivos y líquidos céfalo-rraquideos durante un periodo de 3 años (44 cepas: 39 de hemocultivos y 5 de LCR). La caracterización fenotípica se realizó por el método de disco difusión. La sensibilidad antibiótica a eritromicina y clindamicina se realizó por el método de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones del CLSI. Se determinó la presencia de los genes de resistencia a macrólidos *mefA*, *ermB*, y *ermTR*, mediante técnicas de PCR en tiempo real.

**Resultados:** El 11,8% de las cepas aisladas de muestras no invasivas y el 11,4% de las cepas invasivas presentaron un fenotipo constitutivo de resistencia (cMLSB). El 73,7% de las cepas no invasivas tenían el gen *ermB*, 21% *ermB* + *ermTR*, 2,6% *ermTR* y 2,6% *ermB* + *mefA*. El 80% de las cepas invasivas tenían *ermB* y el 20% el *ermTR*. El fenotipo inducible de resistencia (iMLSB) lo presentó el 3,6% de las cepas no invasivas y el 2,3% de las invasivas. En el 91,3% de las cepas no invasivas se amplificó el gen *ermTR*, en el 4,3% *ermTR* + *mefA* y en el 4,3% *ermTR* + *ermB*. Todas las cepas invasivas presentaron el gen *ermTR*. El fenotipo por bomba de expulsión activa (M) sólo lo presentó el 0,5% de las cepas no invasivas, (presentado todas ellas el gen *mefA*). En 5 cepas (0,8%) procedentes de muestras no invasivas sensibles a macrólidos pero resistentes a clindamicina, no amplificaron a ninguno de los genes probados.

**Conclusiones:** El porcentaje de resistencia a eritromicina y clindamicina fue superior en las cepas no invasivas (15,8% y 16,12% respectivamente) que en las procedentes de hemocultivos y LCR (13,6% y 13,6% respectivamente). La distribución de los fenotipos de resistencia, así como de los genes encontrados fue similar tanto en las cepas invasivas como en las no invasivas.

## 234

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN BROTE POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* MULTIRRESISTENTE PRODUCTORA DE CTX-M-1 EN UNA UCI

A. Mena\*, V. Plasencia\*, L. García\*\*, O. Hidalgo\*\*\*,  
J.I. Ayestarán\*\*\*\*, S. Alberti\*\*, N. Borell\*, J.L. Pérez\* y A. Oliver\*  
\*Servicio Microbiología, \*\*Unidad de Investigación, \*\*\*Servicio Medicina Preventiva, \*\*\*\*Servicio Medicina Intensiva, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca.

**Objetivo:** Estudio de epidemiología molecular de un brote por *K. pneumoniae* multirresistente desde febrero hasta octubre de 2005 en una UCI y caracterización de los mecanismos de resistencia asociados.

**Material y métodos:** La identificación y el estudio preliminar de sensibilidad de los aislados se realizó mediante el sistema WIDER. Se confirmó la producción de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) mediante el test de sinergia de doble disco y se determinaron las CMI de los aislados seleccionados mediante E-test. Se realizaron estudios de colonización mediante la siembra de exudados rectales en medio selectivo (cefotaxima 2  $\mu$ g/ml, gentamicina 10  $\mu$ g/ml). La relación clonal se determinó por electroforesis de campo pulsado.

do (PFGE) tras digestión con XbaI y la caracterización de las BLEE se realizó mediante isoelectrofoque y PCR para  $\beta$ -lactamasas tipo TEM, SHV y CTX-M y posterior secuenciación. Finalmente se realizaron experimentos de conjugación para comprobar la transferibilidad de las BLEE y se estudió la presencia de porinas por electroforesis de las proteínas de membrana externa en gel de poliacrilamida y PCR.

**Resultados:** Entre febrero y octubre de 2005 se aisló *K. pneumoniae* multirresistente en 41 pacientes de UCI; en 36 de los casos en muestras clínicas, mientras que en 5 casos únicamente se aisló en el exudado rectal. Mediante PFGE se comprobó la clonalidad de todos los aislados, caracterizándose la BLEE producida por esta cepa como una CTX-M-1, que no pudo transferirse mediante conjugación. Además de a las penicilinas y cefalosporinas, esta cepa presentó resistencia uniforme a la gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, co-trimoxazol y tetraciclina. La sensibilidad a amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam fue variable, siendo únicamente sensible a imipenem, meropenem y amikacina. En dos de los pacientes se desarrolló resistencia a todas las carbapenemas en el curso del tratamiento, por pérdida de la expresión de la única porina presente en la cepa epidémica.

**Conclusión:** se describe por primera vez un brote epidémico de *K. pneumoniae* productora de CTX-M-1 en España. Se trata, además, de una cepa con múltiples resistencias asociadas y con capacidad de desarrollar resistencia a las carbapenemas.

aislados productores de SHV y ceftazidima frente a los CTX-M9 ( $p < 0,001$  en ambos casos). También hubo diferencias significativas para cefepime ( $p = 0,003$ ), siendo las CMIs más bajas entre los productores de SHV.

**Conclusiones:** 1. Ertapenem fue el antibiótico que mostró las CMIs más bajas. 2. Hubo un elevado porcentaje de resistencias asociadas a quinolonas. 3. No hubo diferencias clínicamente relevantes en la actividad de los antibióticos en presencia de las enzimas CTX-M9 o SHV.

## 235

### ACTIVIDAD IN VITRO DE ANTIÓTICOS BETALACTÁMICOS Y NO BETALACTÁMICOS FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE BLEES

A. Sorlázano<sup>1</sup>, J. Gutiérrez<sup>1</sup>, J. Román<sup>2</sup>, M. Damas<sup>3</sup>, A. Salmerón<sup>3</sup>, E. Román<sup>3</sup>, O. Santiago<sup>1</sup> y G. Piérola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.

Universidad de Granada, <sup>2</sup>Servicios de Microbiología y

<sup>3</sup>Farmacia. Hospital Universitario San Cecilio. Granada.

**Introducción y objetivos:** Los microorganismos productores de BLEEs constituyen un importante problema sanitario, pues es frecuente encontrarnos un patrón de multirresistencia asociado a la producción de estas enzimas, limitando las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por estos microorganismos. El objetivo de este estudio fue determinar, en aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs, la actividad de diferentes antibióticos, betalactámicos y no betalactámicos, y compararla en función del tipo de BLEE producido.

**Material y métodos:** Se evaluó la actividad de 11 antibióticos en 115 aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs mediante un ensayo de microdilución en caldo, siguiendo las directrices del CLSI. Los aislados fueron identificados en el laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital San Cecilio de Granada mediante el sistema WIDER a partir de muestras de procesos infecciosos. El 86,1% de los aislados procedieron de muestras de orina, y el 77,4% fueron de origen comunitario. La presencia de BLEEs se confirmó mediante el procedimiento de difusión con discos de cefotaxima (30  $\mu$ g), cefotaxima/clavulánico (30/10  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g) y ceftazidima/clavulánico (30/10  $\mu$ g) aconsejado por el CLSI. Tras la confirmación fenotípica se determinó la betalactamasa presente mediante estudios bioquímicos (determinación del punto isoelectrónico) y moleculares (mediante técnica de PCR). 67 aislados fueron productores de enzimas CTX-M9 y 48 de SHV.

**Resultados:** Los porcentajes de sensibilidad a cada antibiótico (CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> en  $\mu$ g/ml) fueron: a imipenem, 100% (0,125, 0,25); a ertapenem, 100% (0,03, 0,125); a amikacina, 100% (1, 4); a piperacilina-tazobactam, 95,7% (2/4, 8/4); a cefoxitina, 91,3% (4, 8); a tobramicina, 87% (0,5, 8); a cefepime, 80% (4, 32); a ceftazidima, 67,8% (2, 64); a ciprofloxacino, 27,8% (16, 64); a levofloxacino, 27% (8, 16); y a ceftriaxona 13% (16, 512). Ceftriaxona se mostró más activa frente a los