

## Sesión 23

### Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos (II)

337

#### ACTIVIDAD *IN VITRO* DE TIGECICLINA FRENTE AISLADOS CLÍNICOS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE BLEES

A. Sorlózano<sup>1</sup>, J. Gutiérrez<sup>1</sup>, A. Salmerón<sup>4</sup>, J.D. Luna<sup>2</sup>, F. Martínez<sup>1</sup>, J. Román<sup>3</sup>, O. Santiago<sup>1</sup> y G. Piédrola<sup>1</sup>

Departamentos de Microbiología<sup>1</sup> y Bioestadística<sup>2</sup>, Universidad de Granada. Servicios de Microbiología<sup>3</sup> y Farmacia<sup>4</sup>, Hospital Universitario San Cecilio. Granada.

**Introducción y objetivos:** Tigeciclina es una gliciliciclina derivada de la minociclina, con excelente actividad *in vitro* frente a un amplio grupo de patógenos: cocos grampositivos (incluyendo multirresistentes), enterobacterias (incluyendo las productoras de BLEEs), *Acinetobacter* spp. y anaerobios, entre otros. No se ha mostrado eficaz frente a *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* o *Providencia* spp. Entre los microorganismos productores de BLEEs es frecuente encontrarnos un patrón de multirresistencia, que limita de forma importante las opciones terapéuticas. El objetivo de este estudio fue describir la actividad de tigeciclina frente aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs.

**Material y métodos:** Se evaluó la actividad de tigeciclina en 115 aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs mediante E-test y difusión con discos de 15 µg. 67 aislados fueron productores de enzimas CTX-M9 y 48 de SHV. Para estudiar la relación entre el valor de CMI obtenido por E-test y el diámetro del halo de inhibición, se llevó a cabo una regresión lineal ponderada, transformando los datos de CMI por el logaritmo neperiano, y así se obtuvo la ecuación que ligaba las dos variables. Para medir la fuerza de la relación entre ellas, se empleó el coeficiente de correlación.

**Resultados:** El 100% de los aislados se mostraron sensibles, considerando el punto de corte establecido por la FDA para *Enterobacteriaceae* (CMI ≤ 2 µg/ml). El rango fue 0,047-1 µg/ml (0,047-0,75 µg/ml para CTX-M9; 0,064-1 µg/ml para SHV). Para los 115 aislados los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> fueron, respectivamente, 0,125 y 0,38 µg/ml (0,125 y 0,38 µg/ml para CTX-M9; 0,19 y 0,38 µg/ml para SHV). El rango de los halos de inhibición en la difusión con discos fue 19-29 mm (media 24,7 mm y desviación estándar 2,04). Para las enzimas CTX-M9 los resultados fueron: rango 21-29 mm; media 25 mm; desviación estándar 2,02; y para SHV: rango 19-29 mm; media 24,4 mm; desviación estándar 2. La ecuación que relaciona los valores de CMI con los diámetros del halo de inhibición fue, en términos de exponencial,  $CMI = e^{(4,393 - 0,253 \times \text{disco})}$  y el coeficiente de correlación fue  $r = -0,834$  que muestra una relación importante entre ambas variables (el descenso de CMI conforme aumenta el diámetro del halo es claramente lineal, asemejándose a un descenso exponencial).

**Conclusión:** Tigeciclina muestra una excelente actividad frente a aislados de *E. coli* productores de BLEEs, no existiendo diferencias entre los enzimas CTX-M9 y SHV.

## 338

**GENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS MLS<sub>B</sub> EN *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* DE DISTINTOS SEROTIPOS**

M.E. Llana, C. Seral, E. Durán, F.J. Castillo, D. Pérez, D. Álvarez, M.C. Rubio, J.A. Sáez-Nieto y R. Gómez-Lus

Servicio de Microbiología, HCU Lozano Blesa (Zaragoza), ISCIII (Madrid).

**Objetivos:** Estudiar los genotipos/fenotipos de resistencia a antibióticos MLS<sub>B</sub> en *Streptococcus agalactiae* (SA) y su relación con los distintos serotipos.

**Materiales y métodos:** Entre mayo de 2002 y abril de 2004 se seleccionaron los SA de frotis vaginales y vaginales/rectales de mujeres gestantes y no gestantes, así como los aislados de hemocultivos desde 1993 hasta 2004. Se estudiaron los fenotipos MLS<sub>B</sub> y las CMI a eritromicina, josamicina, clindamicina, linezolid, quinupristina/dalfopristina y telitromicina. La caracterización genotípica se realizó mediante PCR de los genes de resistencia *erm*(B), *erm*(TR) y *mef*(A/E); para el serotipado se utilizaron antisueros Ia, Ib, II, III, IV y V. Se estudió la clonalidad de las cepas pertenecientes al V y las no tipables mediante PFGE (*Sma*I).

**Resultados:** Del total de 609 cepas (354 de gestantes, 208 de no gestantes y 47 hemocultivos) la resistencia a antibióticos MLS<sub>B</sub> fue de 24,29, 36,06 y 6,38% respectivamente, siendo el fenotipo MLS<sub>Bc</sub> (79,27, 69,01 y 100%) el predominante en los tres grupos. El genotipo/fenotipo más frecuente fue *erm*(B)/MLS<sub>Bc</sub> (gestantes: 55,38%, no gestantes: 46,94% y hemocultivos: 75%) y el que presenta CMI más elevadas a eritromicina y josamicina, seguido de *erm*(TR)/MLS<sub>Bc</sub> (gestantes: 36,92%, no gestantes: 30,61% y hemocultivos: 25%). El rango de CMI a la CMI90 fue: eritromicina ( $\leq 0,25$ ->128, >128), josamicina ( $\leq 0,25$ ->128, >128), clindamicina ( $\leq 0,12$ ->64, >64), quinupristina/dalfopristina (0,12-2, 0,5), linezolid (0,25-2, 1) y telitromicina ( $\leq 0,01$ -1, 1). La distribución de los serotipos de 151 cepas estudiadas fue: Ia: 14,6%; Ib: 7,9%; II: 20,5%; III: 42,4%; IV: 0,7%; V: 8,6% y no tipable: 5,3%. El gen *erm* (B) fue el más frecuente en los serogrupos II, III, y V y *erm* (TR) fue predominante serogrupos Ia Ib y IV. Entre las 12 cepas del serotipo V y las 8 no tipables, encontramos mediante PFGE 7 y 8 grupos distintos respectivamente (grado de similitud del 80%).

**Conclusiones:** Los fenotipos/fenotipos más frecuentes fueron *erm* (B)/MLS<sub>Bc</sub> y *erm* (TR)/MLS<sub>Bc</sub>. Los serotipos más frecuentes fueron III>II>Ia>V>Ib, presentando amplia variedad de fenotipos/genotipos de resistencia. Encontramos una elevada diversidad genética en las cepas del serotipo V y las no tipables.

## 339

**DETECCIÓN DE CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PRODUCTORAS DE LA CARBAPENEMASA VIM-2 EN CANTABRIA**

I. Monteagudo, M. Romo, J. Calvo, J. Agüero y L. Martínez Martínez

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

**Objetivo:** Describir tres aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemas y productores de VIM-2, detectados en nuestro hospital.

**Material y métodos:** Se han estudiado 91 aislados de *P. aeruginosa* procedentes de muestras clínicas recogidas en el periodo 2003-2005, en los que se obtuvo una categoría clínica de intermedio o resistente para imipenem (IP) o meropenem (MP) con MicroScan WalkAway (paneles Combo Neg 1S y Combo Orina 1S). El estudio de sensibilidad se

confirmó mediante la técnica de microdilución en caldo, siguiendo las normas de la CLSI, para los siguientes antibióticos: IP, MP, carbenicilina (CB), piperacilina/tazobactam (P/T), ceftazidima (TZ), aztreonam (AT), gentamicina (GM), tobramicina (TO), amikacina (AK), ciprofloxacino (CP) y colistina (CS). La posible presencia de carbapenemasas se estudió mediante microdilución en caldo con quelantes (EDTA 0,4 mM + 1,10-fenantrolinea 0,04 mM), difusión en disco con imipenem e imipenem + EDTA 0,5M y el test de Hodge. La detección genética de metalobetalactamasas (MBL) se realizó por PCR, utilizando cebadores específicos para enzimas tipo VIM, IMP y SPM. Los amplicones fueron secuenciados y analizados en la base de datos del GeneBank. La relación clonal entre las cepas se estableció mediante REP-PCR.

**Resultados:** Los ensayos realizados para la detección fenotípica de carbapenemasas sugirieron la presencia de MBL en tres aislados para los que se obtuvo: test de Hodge positivo; disminución de  $\geq 64$  veces la CMI de imipenem en presencia de quelantes, e incremento del halo de inhibición en  $\geq 19$  mm con discos de IM + EDTA frente a IM. Los aislados se obtuvieron de muestras de tres pacientes distintos a partir de exudado de herida (P1), orina (P2) y sangre (P3). Las CMI ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) para los tres aislados fueron: P1 (IP 32, MP 16, CB > 512, P/T 64, TZ 32, AT 8, GM 16, TO 128, AK 64, CP 32, CS 2), P2 (IP 32, MP 32, CB > 512, P/T 64, TZ 32, AT 8, GM 16, TO 128, AK 64, CP 64, CS 2) y P3 (IP 128, MP > 128, CB > 512, P/T 512, TZ 64, AT 16, GM 32, TO 8, AK 0,5, CP 8, CS 2). En los tres aislados se obtuvieron amplicones con cebadores para enzimas tipo VIM, que por secuenciación fueron identificados como VIM-2. La REP-PCR mostró dos patrones distintos, perteneciendo P1 y P2 al mismo patrón.

**Conclusiones:** Hemos identificado, por primera vez en nuestro hospital, cepas de *P. aeruginosa*, productoras de la metalobetalactamasa VIM-2.

## 340

**VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PREVENTIVA DE MUTACIONES A FLUOROQUINOLONAS TRAS EXPOSICIÓN DE *SALMONELLA* A FLUOROQUINOLONAS Y BETALACTAMICOS**

L. Cebrián, I. Escribano, J.C. Rodríguez, P. López, E. Pastor y G. Royo

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

**Objetivo:** Conocer la modificación de la concentración preventiva de mutaciones (CPM) de cepas de *Salmonella* tras ser sometidas experimentalmente a exposición repetida de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino, ofloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, amoxicilina y cefotaxima.

**Material y métodos:** *Cepas:* 2 de cada uno de los tres serotipos más prevalentes en nuestro área (Enteritidis, Hadar y Typhimurium), uno sensible y otro resistente a ácido nalidixico. *Generación de mutantes tempranos:* Se generaron tras exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de los fármacos (1/8 de la CMI) hasta que aparecieron mutantes con CMI aumentada en dos diluciones. *Generación de mutantes tardíos:* Se inocularon en placas con concentraciones crecientes de antibióticos (0,03-256 mg/L). Este proceso se repitió 60 veces utilizando como inóculo los microorganismos que crecían en la mayor concentración del pase anterior. *Calculo de la CPM:* Tras la inoculación de un elevado inóculo ( $10^{10}$  ufc/ml de microorganismos) en placas con diluciones seriadas de antibióticos, se determinó la dilución a la que crecían las subpoblaciones más resistentes.

**Resultados:** *Mutantes generados tras exposición a fluoroquinolonas:* Los mutantes generados a partir de cepas resistentes presentan una mayor CPM que los generados a partir de cepas sensibles (4,6 mg/L frente a 1,6 mg/L).

Tanto para cepas sensibles como resistentes, los valores de CPM se incrementan tras exposiciones repetidas a los antibióticos (1,46 mg/L y 1,86 mg/L (mutantes precoces) versus 1,76 mg/L y 7,46 mg/L (mutantes tardíos). *Mutantes generados tras exposición a betalactámicos*: La exposición repetida a betalactámicos también provoca una elevación de la CPM a fluoroquinolonas. Este incremento es mayor tras exposición a amoxicilina (pasa de 0,20 mg/L a 1,04 mg/L) que a cefotaxima (pasa de 0,20 mg/L a 0,62 mg/L).

**Conclusiones:** Tras la exposición repetida de fármacos, se produce una activación de los sistemas pump efflux que genera resistencias cruzadas a varias familias de fármacos. Si comparamos los datos de la CPM con los niveles de los fármacos en el organismo, se observa que los mutantes generados a partir de cepas resistentes a ácido nalidíxico presentan un cociente AUC/CPM bajo y esto puede ayudar a explicar los fracasos terapéuticos descrito en el tratamiento con fluoroquinolonas de estas cepas.

## 341

### HIPERPRODUCCIÓN DE AMPC ASOCIADA A LA SECUENCIA DE INSERCIÓN ISABA1 EN UNA CEPA DE ACINETOBACTER GENOESPECIE 3 (AG3)

A. Beceiro<sup>\*1</sup>, M. Tomás<sup>1</sup>, S. Mallo<sup>1</sup>, F. Fernández-Cuenca<sup>2</sup>, A. Pascual<sup>2</sup>, L. Martínez-Martínez<sup>3</sup>, J. Vila<sup>4</sup>, J.M. Cisneros<sup>5</sup>, J. Rodríguez-Baño<sup>6</sup>, J. Pachón<sup>5</sup>, G. Bou<sup>1</sup> y GEIH

<sup>1</sup>CHU Juan Canalejo, La Coruña; <sup>2</sup>S. Microbiología y <sup>6</sup>U. E. Infecciosas, H. Virgen Macarena, Sevilla; <sup>3</sup>H. Marqués Valdecilla, Santander; <sup>4</sup>H. Clinic, Barcelona; <sup>5</sup>H. Virgen de Rocío, Sevilla.

**Introducción:** Una cepa de AG3 (AJC68081) aislada en el CHU Juan Canalejo, y productora únicamente de un enzima AmpC codificado cromosómicamente presentó mayor resistencia a los  $\beta$ -lactámicos que la mayoría de los aislamientos de esta especie. El objetivo fue caracterizar el mecanismo responsable de esta elevada resistencia en esta cepa.

**Material y métodos:** AJC68081 (CMI ampicilina 512 mg/L) y 15 cepas no relacionadas de AG3 (CMI<sub>90</sub> ampicilina 48 mg/L) fueron estudiadas. CMIs por E-test y microdilución. Clonación de los genes  $\beta$ -lactamasas AmpC cromosómicos y expresión en *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) según protocolo previo (Beceiro y col. AAC. 2004). Estudios de expresión génica por RT-PCR y Western Blot. Identificación de regiones adyacentes al gen *bla*<sub>ampC</sub> (promotor y 3' no traducido) mediante PCR inversa.

**Resultados:** Los genes de las *ampC* de la cepa AJC68081 y 8 de los controles fueron clonados bajo un promotor común y secuenciados, obteniéndose una identidad aminoacídica de un (94,3 -96,3) % respecto a la de la cepa estudio AJC68081. La expresión de estas AmpC en *E. coli* no mostró diferencias significativas en las CMIs a los  $\beta$ -lactámicos entre ellas. Se observó una mayor expresión del gen *ampC* en la cepa AJC68081 respecto a los 15 controles AG3. La CMI frente a ampicilina descendió a 12 mg/L en presencia de cloxacilina en la cepa AJC68081. Por PCR inversa se observó que la cepa AJC68081 portaba en la zona 5' del gen una secuencia de inserción denominada IS *Aba1*, la cual incluye un potente promotor, que se encontraría reemplazando al promotor génico *ampC* original. Por PCR se determinó que esta secuencia IS *Aba1* únicamente se encontraba en la región 5' en la cepa estudio, no encontrándose en los otros 15 aislamientos de AG3 estudiados.

**Conclusiones:** 1) La variabilidad genética en la secuencia de las *ampC* no se asoció a diferencias en las CMIs a  $\beta$ -lactámicos; 2- La  $\beta$ -lactamasa AmpC se encuentra hiperexpresada en esta cepa de AG3 (AJC68081), dando lugar a mayor CMIs a los  $\beta$ -lactámicos debido al cambio en el promotor por la inclusión de IS *Aba1* en la zona inmediatamente anterior al gen *bla*<sub>ampC</sub>

## 342

### CARACTERIZACIÓN DE ENTEROBACTERIAS PORTADORAS DE BLEE AISLADAS DE MUESTRAS INVASIVAS

M.I. Millán, C. Seral, M. Pardos, M.P. Macipe, M.A. Arias, E. Durán, C. Pitart, M.C. Rubio y F.J. Castillo

Servicio de Microbiología del H.C.U. Lozano Blesa, Zaragoza.

**Objetivos:** Determinar la incidencia y caracterización de enterobacterias portadoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en nuestro laboratorio de muestras invasivas (hemocultivos y líquidos biológicos) durante 4 años (2001-2005).

**Material y métodos:** De enero de 2001 a marzo de 2005 se estudió la sensibilidad de las enterobacterias procedentes de hemocultivos y líquidos biológicos mediante el sistema de microdilución Wider®. Las cepas que según criterios de CLSI podían ser portadoras de BLEE, se confirmaron mediante doble difusión con discos de cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, aztreonam y amoxicilina/clavulánico y con tiras de E-test®: CTX- CTX/C, CAZ-CAZ/C. También se estudió la sensibilidad a ertapenem. Las BLEE se caracterizaron mediante PCR de los genes: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-10</sub>.

**Resultados:** Se obtuvieron un total de 20 cepas portadoras de BLEE: 19 *E. coli* y 1 *K. oxytoca*. Fueron: 13 hemocultivos (65%), 2 bilis (10%), 3 abscesos (15%), 1 líquido ascítico (5%) y 1 LCR (5%). Todas las muestras fueron de origen hospitalario, de los siguientes servicios: 35% de servicios médicos, 30% quirúrgicos, 20% de pediatría y 15% de UCI. Su distribución según fenotipos fue: 14 CTX<sup>R</sup>-CAZ<sup>S</sup>, 4 CTX<sup>R</sup>-CAZ<sup>R</sup> y 2 CTX<sup>S</sup>-CAZ<sup>I</sup>. El rango de CMIs y la CMI<sub>90</sub> para estos antibióticos fue: CTX (1->16 mg/L, >16 mg/L), CAZ (<0,5->32 mg/L, >32 mg/L). Todas fueron sensibles a ertapenem (rango 0,008-0,5 mg/L, CMI<sub>90</sub> 0,047 mg/L). Las  $\beta$ -lactamasas detectadas fueron: TEM (50%), grupo CTX-M-9 (55%), grupo CTX-M-10 (5%) y SHV (30%). Por especie, encontramos las siguientes enzimas: en *K. oxytoca*: 1 cepa SHV. En *E. coli*: 6 cepas CTX-M-9; 4 cepas TEM; 1 cepa CTX-M-9+CTX-M-10; 4 cepas TEM+SHV; 1 cepa CTX-M-)+SHV; 1 cepa CTX-M-9+TEM y 1 cepa CTX-M-9+TEM+SHV. 1 cepa pendiente de PCR.

**Conclusión:** Se ha detectado un progresivo aumento de enterobacterias portadoras de BLEE en hemocultivos y líquidos biológicos en nuestro medio. La enterobacteria portadora de BLEE en muestras invasivas predominante era *E. coli*. El grupo CTX-M-9 es la BLEE más frecuente en hemocultivos y líquidos biológicos, coexistiendo en 4 de los casos con otras enzimas.

## 343

### EFFECTO INHIBITORIO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y NO PROBIÓTICOS SOBRE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *HELICOBACTER PYLORI*

J. Díaz-Regañón, T. Alarcón, D. Domingo, J.A. García y M. López-Brea

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

**Objetivos:** Determinar el efecto de 33 microorganismos probióticos y no probióticos sobre 40 aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*.

**Métodos:** Se estudiaron 40 cepas de *Helicobacter pylori* (Hp) procedentes de biopsias gástricas de pacientes adultos e infantiles sometidos a endoscopia. El procesamiento y la identificación se llevaron a cabo según metodología habitual. Se obtuvieron 33 microorganismos probióticos y no probióticos de productos comerciales (leche y yogurt) y de muestras clínicas (hemocultivos, heridas y exudados vaginales). Se procesaron según los requerimientos propios de cada microor-

ganismo y se identificaron mediante tinción de Gram, MicroScan (Dade-Behring), Api (bioMérieux) y AuxaColor (Bio-Rad) obteniéndose 15 microorganismos probióticos (3 *Lactobacillus* spp., 2 *Lactococcus* spp., 4 *Streptococcus* spp., 3 *Enterococcus* spp., 2 *Bacillus* spp. y 1 *S. cerevisiae*) y 18 no probióticos (9 *Staphylococcus* spp., 2 *E. coli*, 1 *P. aeruginosa*, 2 *Klebsiella* spp., 1 *Salmonella* spp., 1 *A. baumannii*, 1 *E. cloacae* y 1 *S. maltophilia*). Para determinar el posible efecto inhibitorio de estos microorganismos frente a Hp se realizó el método de la "gota". Se inoculó una placa de agar sangre con el máximo de colonias crecidas de Hp y se depositó una gota de 10 µl conteniendo al microorganismo (concentración 0,5 MacFarland). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera microaerofílica durante 3-5 días. La lectura se realizó midiendo el halo de inhibición alrededor de la gota.

**Resultados:** 2 cepas de *Lactobacillus* spp. inhibieron el crecimiento de 6 y 9 cepas de Hp respectivamente. 1 cepa de *E. faecium*, 1 de *E. coli*, *Bacillus* spp., *S. cerevisiae*, *E. cloacae* y *S. maltophilia* inhibieron 1, 1, 11, 7, 9 y 12 cepas respectivamente. Las 9 cepas de *Staphylococcus* spp. inhibieron a 10, 40, 1, 1, 4, 7, 40, 6 y 40 cepas de Hp. Los halos de inhibición oscilaron entre 25 y 30 mm. Por el contrario 1 cepa de *Lactobacillus* spp., 1 de *E. faecium*, las 4 cepas de *Streptococcus* spp., *L. lactis*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. y *A. baumannii* no inhibieron a ninguna cepa. **Conclusiones:** 1) El género *Lactobacillus*, principal microorganismo probiótico, ejerce un efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Helicobacter pylori*. 2) En nuestro estudio 1 cepa de *S. auricularis* y 2 de *S. epidermidis* fueron capaces de inhibir todas las cepas de *Helicobacter pylori*. 3) Algunos microorganismos gramnegativos y enterobacterias también inhiben el crecimiento de *Helicobacter pylori*.

## 344

### DISMINUCIÓN EN LA ACTIVIDAD UREÁSICA DE *HELICOBACTER PYLORI* AL ENFRENTARSE A DIFERENTES MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y NO PROBIÓTICOS

J. Díaz-Regañón, T. Alarcón, D. Domingo y M. López-Brea  
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

**Objetivo:** Estudiar el efecto de diferentes microorganismos probióticos y no probióticos sobre la actividad ureásica de 3 cepas de *Helicobacter pylori*.

**Métodos:** Se estudiaron 3 cepas de *H. pylori* (A, B y C) procedentes de biopsias gástricas. El procesamiento y la identificación se llevaron a cabo según metodología habitual. 21 microorganismos probióticos y no probióticos (1-21) se aislaron de productos comerciales (leche y yogurt) y muestras clínicas (hemocultivos, heridas y exudados vaginales). El procesamiento se realizó según los requerimientos propios de cada microorganismo y se identificaron mediante tinción de Gram, MicroScan (Dade-Behring), Api (bioMérieux) y AuxaColor (Bio-Rad) con el resultado de 3 *Lactobacillus* spp., 2 *Lactococcus* spp., 4 *Streptococcus* spp., 2 *Bacillus* spp., 1 *S. cerevisiae* y 9 *Staphylococcus* spp. El efecto inhibitorio sobre la actividad ureásica se determinó mediante el método de rojo fenol modificado. En pocillos de BHI suplementado con suero fetal bovino y extracto de levadura, se añadió *H. pylori* en suspensión y el microorganismo probiótico o no probiótico a probar. Se obtuvieron alícuotas de 100 µl de esta suspensión y en los tiempos 0, 3 h., 20 h. y 24 h. se añadieron 100 µl de buffer ureasa (20% de urea y 0,012% de rojo fenol diluidos en buffer fosfato con pH final de 6) en una placa microtiter que se incubó durante 2 horas a 37°C. La lectura se realizó midiendo la absorbancia a 550 nm. Se consideró 100% de actividad ureásica la absorbancia producida por la cepa de *H. pylori* sin microorganismo probiótico o no probiótico.

**Resultados:** Al cabo de 24 horas de incubación la actividad ureásica de la cepa A de *H. pylori* disminuyó en un 22,96 -

99,76% con 20 de los 21 microorganismos probados, la de la cepa B en un 35,7 - 99,98% con 17 de los 21 microorganismos probados y la de la cepa C en un 61,54 - 99,85% con 20 de los 21 microorganismos probados. El microorganismo no probiótico 1 (*S. auricularis*) no ejerció efecto sobre la actividad ureásica de ninguna de las 3 cepas de *H. pylori*. Los microorganismos identificados como *S. warneri*, *S. hominis* y *S. cerevisiae* tampoco fueron capaces de disminuir esta actividad en la cepa B de *H. pylori*.

**Conclusiones:** 1) Microorganismos probióticos y no considerados probióticos son capaces de inhibir la actividad ureásica de *H. pylori*. 2) Este efecto puede explicar la acción coadyuvante de estos microorganismos en la terapia anti-*H. pylori*.

## 345

### SENSIBILIDAD A TIGECICLINA Y OTROS SEIS ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS HOSPITALARIAS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

C. Martín de la Escalera, J.L. García López, S. Bernal, P. Morales, E. López Oviedo, C. Castro A.I. Martos y E. Martín Mazuelos

Servicio de Microbiología H.U. Valme. Sevilla.

**Objetivos:** Las infecciones por *A. baumannii* han experimentado un considerable aumento en los pacientes hospitalizados y además su resistencia a antimicrobianos no ha dejado de aumentar. Nosotros hemos estudiado la actividad de Tigeciclina (TG), un nuevo antimicrobiano de la familia de las Gliciliclinas, frente a *A. baumannii* comparándola con la de otros antimicrobianos comúnmente usados en su tratamiento.

**Material y método:** Estudiamos 21 cepas de *A. baumannii* procedentes de muestras clínicas de otros tantos pacientes. Las cepas se identificaron mediante la tarjeta GN de Vitek 2 (bioMérieux). La sensibilidad a TG se realizó con el sistema E-test® (AB, Biodisk, Solna, Suecia), la de Colistina con discos de 10 µg (bio Disc) y la del resto de los antimicrobianos mediante microdilución en caldo usando placas de Sensititre EMIZA9EF (Izasa SL).

**Resultados:** El 81% de las cepas fueron sensibles a TG (CMI 2 µg/ml), el 14,3% tuvieron sensibilidad intermedia (CMI 4 µg/ml) y 4,7% fueron resistentes (CMI ≥8 µg/ml), para Ampicilina/sulbactam (S: 23,8%, I: 33,3%, R: 42,9%); Imipenem: (S: 33,3%, R: 66,7%); Gentamicina: (S: 23,8%, I: 4,7%, R: 71,5%); Tobramicina: (S: 23,8%, I: 9,5%, R: 66,7%); Amikacina: (S: 33,3%, R: 66,7%). Todas las cepas fueron sensibles a Colistina.

**Conclusiones:** 1) El 81% de las cepas estudiadas fueron sensibles a Tigeciclina. 2) *A. baumannii* presentó un alto grado de resistencia a la mayoría de los antimicrobianos usados habitualmente para su tratamiento. 3) Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a Colistina.

## 346

### RESISTENCIA A CEFEPIMA EN *ESCHERICHIA COLI* SENSIBLE A CEFALOSPORINAS DE 3ª GENERACIÓN: DISPERSIÓN CLONAL DE UNA CEPA PRODUCTORA DE OXA-30

C. García-Estébanez<sup>1</sup>, S. Migueláñez<sup>1</sup>, C. Navarro<sup>1</sup>, V. Bautista<sup>1</sup>, B. Aracil<sup>1</sup>, S. García-Cobos<sup>1</sup>, E. Cercenado<sup>2</sup>, J. Oteo<sup>1</sup> y J. Campos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. Madrid, <sup>2</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

**Objetivos:** Estudio de las cepas clínicas de *Escherichia coli* (ECO) resistentes a cefepima (CFP) pero sensibles a cefotaxima y ceftazidima aisladas en el Hospital Gregorio Marañón entre enero de 2004 y marzo de 2005.

**Material y métodos:** Se recogieron todas las cepas de ECO (la 1ª por paciente) con CMI a CFP > 2 mg/L y con una CMI a cefotaxima y ceftazidima < 1 mg/L aisladas entre enero/2004 y marzo/2005 en el Gregorio Marañón. Se estudio la sensibilidad a antibióticos por microdilución. Además, la CMI de CFP y de CFP/ácido clavulánico se obtuvo por E-test. Se estudio la epidemiología molecular por PFGE (enzima *XbaI*). Se caracterizaron las posibles  $\beta$ -lactamasas mediante IEF, amplificación y secuenciación con iniciadores específicos. Se estudio la presencia de mecanismos de resistencia a otros antibióticos no  $\beta$ -lactámicos.

**Resultados:** Se aislaron 20 cepas con el patrón de resistencia mencionado. La mayoría se aislaron en mujeres (60%), entre 15 y 64 años de edad (40%), en ITU (75%), y en infecciones comunitarias (65%). La resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefazolina y cefuroxima fue del 100%; 100%; 10% y 50%; respectivamente. No se detectó resistencia a aztreonam, ceftazidima ni imipenem. Las CMIs a CFP variaron según se utilizara microdilución (CMI<sub>50</sub> > 16 mg/L; CMI<sub>90</sub> > 16 mg/L; Intervalo: 4->16) o E-test (CMI<sub>50</sub> = 2 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 8 mg/L; Intervalo: 0,5->16). Todas las cepas recuperaron la actividad de CFP con ácido clavulánico. La resistencia a otros antibióticos fue del 95% a tetraciclina, 40% a cloramfenicol, 25% a cotrimoxazol, 15% a ciprofloxacino y 5% a gentamicina. Mediante PFGE se demostró que 12 de las cepas pertenecían al mismo clon. El estudio por IEF y secuenciación demostró la presencia de una única  $\beta$ -lactamasa, OXA-30. Además, se detectaron los siguientes genes: *tetA* (en 19 cepas), *sul1* (4), *sul2* (3), *dhfr17* (2) y *dhfr5* (1).

**Conclusiones:** 1) Se detectó la presencia de ECO resistente a CFP y sensible a cefotaxima y ceftazidima en un hospital de Madrid, lo que podría tener implicaciones tanto para el diagnóstico microbiológico como para el tratamiento clínico. 2) Se observó la diseminación clonal de una cepa con este perfil de sensibilidad a cefalosporinas. 3) En las cepas estudiadas, dicho patrón se asoció a la producción de una OXA-30.

## 347

### CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS EN DIFTEROMORFOS AISLADOS DE MUESTRAS CLÍNICAS

R. Fernández-Roblas<sup>1</sup>, I. Fernández-Natal<sup>2</sup>, A. Ortiz<sup>1</sup>, N. Zamora<sup>1</sup>, S. Valdezate<sup>3</sup>, J.A. Sáez-Nieto<sup>3</sup> y J. Esteban<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología Clínica. Fundación Jiménez Díaz-UTE. Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología. Hospital de León. (Sacyl). <sup>3</sup>Laboratorio de Taxonomía Bacteriana. Servicio de Microbiología. Centro Nacional de Microbiología. ISCIII.

**Objetivo:** Estudiar la presencia de genes que confieren resistencia a macrólidos (*ermX*, *ermA*, *ermB*, *ermTR* y *mefA-E*) en aislados clínicos del género *Corynebacterium*.

**Material y métodos:** Se analizaron 254 aislados pertenecientes a las siguientes especies: *C. urealyticum* (n = 120), *C. amycolatum* (66), *C. striatum* (20), *C. jeikeium* (17), *C. coyleae* (12), *C. aurimucosum* (11) y *C. afermentans* (8) clínicamente significativos, identificados mediante caracterización bioquímica convencional y técnicas moleculares (RAPD-PCR y secuenciación 16S rDNA). La detección de los genes de resistencia se realizó siguiendo el protocolo de Rosato et al. Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y su peso molecular se calculó mediante el software PhotoCapt, BioGenes, USA.

**Resultados:** Noventa de los aislados de *C. urealyticum* fueron resistentes a macrólidos, en 82 (91%) de los cuales se detectó el gen *ermX* y en 2 (2,2%) el gen *ermB*. En un aislado de *C. urealyticum* se detectó simultáneamente los genes *ermX* y *ermB*.

En el resto de las especies, el número de aislados resistentes a macrólidos y el porcentaje de los mismos en los que se de-

tectó el gen *ermX* fue como sigue: *C. amycolatum* 58 (84,4%), *C. striatum* 11 (90,9%), *C. jeikeium* 13 (76,9%), *C. coyleae* 10 (80%), *C. aurimucosum* 8 (100%) y *C. afermentans* 8 (87,5%). Los genes *ermTR*, *ermA* y *mefA-E* no se detectaron en ninguno de los microorganismos analizados. El fenotipo de resistencia más habitual fue el MLSB. Siete aislados de *C. amycolatum* y 2 de *C. afermentans* presentaron fenotipo M.

**Conclusiones:** El fenotipo predominante de resistencia a macrólidos en las especies del género *Corynebacterium* estudiadas ha sido el MLSB y ha sido mediada fundamentalmente por el gen *ermX* y excepcionalmente por el *ermB*. En algunos casos otros determinantes o mecanismos de resistencia a macrólidos pueden estar implicados.

**Financiación:** Fondo de Investigaciones Sanitarias (03/0220 y 03/0534). Nieves Zamora es beneficiaria de una beca predoctoral concedida por la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

## 348

### ADQUISICIÓN Y DIFUSIÓN DEL GEN *bla*<sub>CTX-M-9</sub> MEDIANTE UN PLÁSMIDO DERIVADO DEL R478-INCII2

A. García<sup>1,2</sup>, E. Miró<sup>1</sup>, L. Villa<sup>3</sup>, B. Mirelis<sup>1,2</sup>, P. Coll<sup>1,2</sup>, A. Carattoli<sup>3</sup> y F. Navarro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. <sup>2</sup>Unidad de Microbiología, Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra. <sup>3</sup>Department of Infectious, Parasitic and Immune-mediated, Instituto Superiore di Sanità, Roma, Italia.

**Introducción:** Es sabida la variabilidad del entorno genético del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, así como del tamaño de los plásmidos que lo vehiculan. Es por ello que nos planteamos caracterizar estos plásmidos mediante el estudio de los grupos de incompatibilidad (*inc/rep typing*).

**Material y métodos:** Se han estudiado 12 cepas de *Escherichia coli* y una de *Salmonella enterica* serovar Virchow portadoras del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y sus transconjugantes. Las cepas se seleccionaron por presentar diferentes organizaciones en la estructura relacionada con el integrón *In60* o diferentes tamaños en los plásmidos que lo transportaban. Se utilizó la PCR para la detección de los replicones (*inc/rep*) de los principales grupos de incompatibilidad relacionados con la familia *Enterobacteriaceae*, como son FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-alpha, I1-gamma, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F y FII. Se utilizaron 18 pares de cebadores mediante los cuales se efectuaron cinco PCR-múltiplex y tres simples (*inc/rep typing*). Posteriormente, el DNA total de todas las cepas fue digerido con las enzimas BglI y S1 transfiriéndose e hibridando con las sondas HI2, FIB y CTX-M-9. Así mismo, se analizó la presencia de diferentes genes característicos del plásmido de referencia R478-IncII2.

**Resultados:** Al realizar el *inc/rep typing* se observó como la mayoría de cepas (10 de 13) fueron positivas para múltiples replicones, como son HI2, FIB y FII. En todas las cepas positivas para el replicón HI2, la digestión con BglI e hibridación con la sonda HI2 demostró la presencia de un fragmento de aproximadamente 9,5kb, que también se encuentra en el plásmido R478. La digestión con S1 y posterior hibridación con las sondas CTX-M-9 y HI2, demostró la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> en un plásmido HI2 en la mayoría de cepas, con la excepción de dos, en las que se encontraba situado en un plásmido FIB y en uno FII. Se observó la presencia de cointegrados entre los plásmidos HI2 y FIB dando un plásmido de un tamaño superior en una cepa donadora y en cuatro cepas transconjugantes. Se observó también la presencia de los genes *arsB* y *terF*, característicos del plásmido de referencia R478, en los plásmidos HI2 portadores del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>.

**Conclusiones:** Si bien el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> se encuentra situado mayoritariamente en un plásmido derivado del R478-In-

chI2, el hecho de que en dos cepas se encuentre en otros plásmidos corrobora la hipótesis de que este gen se encuentra localizado en un transposón que lo moviliza.

## 349

### DOBLE ORIGEN DE LA $\beta$ -LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO CTX-M-14

F. Navarro<sup>1,2</sup>, R.J. Mesa<sup>1,2</sup>, E. Miró<sup>1</sup>, L. Gómez<sup>1</sup>, A. Rivera<sup>1,2</sup>, B. Mirelis<sup>1,2</sup> y P. Coll<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. <sup>2</sup>Departamento de Genética y Microbiología, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Objetivo:** Describir la existencia de dos secuencias nucleotídicas distintas del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, así como sus respectivas regiones colindantes.

**Material y métodos:** Se ha estudiado la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en un total de 2.440 cepas de *Escherichia coli* aisladas durante el 2003 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. La caracterización de estos enzimas se realizó mediante isoelectroenfoco, PCR y posterior secuenciación. Los entornos genéticos de los genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se estudiaron mediante PCR.

**Resultados:** Sesenta y tres de las 2.440 cepas de *E. coli* (2,6%) fueron productoras de BLEE. De estas, 47 (74,6%) expresaron una enzima del tipo CTX-M: 36 CTX-M-14, (57,1%), cuatro CTX-M-15 (6,3%), tres CTX-M-9 (4,7%), dos CTX-M-32 (3,1%), una CTX-M-3 (1,6%) y una CTX-M-10 (1,6%). Catorce de las 63 cepas productoras de BLEE (22,2%) expresaron una enzima del tipo SHV: 10 SHV-12 (15,8%) y cuatro SHV-2 (6,3%). Por último, se han encontrado dos cepas productoras de TEM: TEM-10 y TEM-52. En el análisis de la secuencia nucleotídica de las 36 cepas portadoras del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se han evidenciado dos secuencias distintas. En 32 de las 36 cepas la secuencia nucleotídica fue 100% homóloga a la ya descrita para CTX-M-14 (AF252622) y, todas ellas presentaron como entorno genético las secuencias de inserción *ISEcp1y IS903*, en las regiones colindantes 5' y 3' del gen, respectivamente; mientras que, las cuatro cepas restantes mostraron una secuencia nucleotídica idéntica a la del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, excepto en un nucleótido, que es el que confiere el cambio aminoacídico que diferencia a CTX-M-9 de CTX-M-14. En estas cuatro cepas, el entorno genético encontrado para *bla*<sub>CTX-M-14</sub> es el descrito para *bla*<sub>CTX-M-9</sub>; el integrón In60.

**Conclusión:** La secuencia aminoacídica de CTX-M-14 puede provenir de dos genes diferentes, los genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

viamente (Florence Depardieu y col., 2004). Cepas tipadas mediante PGFE con *Sma*I. CMIs por E-test®. Estudio de caso- controles, análisis univariante y de regresión logística múltiple, para determinar las variables significativas asociadas a colonización/infección por *E. faecium* resistentes a Glu. Los resultados fueron considerados como estadísticamente significativos para  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Todas las cepas fueron positivas para el gen *ddl*<sub>*E. faecium*</sub>. 8 cepas fueron positivas para el gen *Van A* y 3 cepas para el gen *Van B*. El campo pulsado reveló 5 distintos genotipos de *E. faecium* resistente (A, B, C, D, y E), siendo el mayoritario el A. Las cepas portadoras del gen *Van A* presentaron CMIs resistentes a vancomicina (Va) y Teicoplanina (Te), y las cepas *Van B* presentaron CMIs resistentes o intermedio a Va y sensibles a Te. En el análisis univariante, las variables asociadas a colonización/infección por *E. faecium* fueron la edad y el tratamiento previo con vancomicina, aminoglucósidos o cefalosporinas (O.R = 17,5, 4.667 y 7.875 y C.I.= 1.879-163.013, 0,956-22.792, 1.531-40.514, respectivamente). En el modelo de regresión las variables relevantes para la infección/colonización por *E. faecium* resistentes a Glu fue la administración previa de vancomicina y aminoglucósidos.

**Conclusiones:** 1. Las cepas de *E. faecium* portadoras del gen *Van A*, fueron no relacionadas epidemiológicamente (predominio del genotipo A). Un paciente presentó 2 cepas con 2 subtipos diferentes (A1 y A2), siendo la A2 sensible a ambos Glu y no portadora de ninguno de los genes de resistencia. 2. En nuestro estudio, el factor de riesgo asociado a la colonización/infección por *E. faecium* resistente a Glu fue la administración previa de vancomicina asociada a aminoglucósidos.

## 350

### ENTEROCOCCUS SPP. RESISTENTES A GLUCOPEPTIDOS (GLU) EN UN HOSPITAL DEL NOROESTE ESPAÑOL: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR. ESTUDIO DE FACTORES DE RIESGO

E. Torres<sup>\*1</sup>, D. Velasco<sup>1</sup>, A. Vindel<sup>2</sup>, S. Pertega<sup>3</sup>, P. Trincado<sup>2</sup>, R. Villanueva<sup>1</sup> y G. Bou<sup>1</sup>

Servicio de Microbiología y Parasitología clínica<sup>1</sup>; Unidad de Epidemiología clínica<sup>3</sup> CHU Juan Canalejo, La Coruña; ISC III, Majadahonda<sup>2</sup>, Madrid.

**Objetivos:** 1. Caracterización molecular de las cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a Glu aisladas durante Mayo 04 - Dic 05 en nuestro hospital. 2. Implicación de la antibioterapia previa en el riesgo de colonización/infección por dichas cepas.

**Material y métodos:** 11 cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a Glu. Cepas ATCC control de *E. faecalis* y *E. faecium*. Pares de oligonucleótidos que amplifican el gen *Van A*, *Van B*, *Van C1*, *Van C2/C3* y *ddl*<sub>*E. faecalis*</sub>, descritos previamente (Dutka-Malen y col, 1995) y el gen *ddl*<sub>*E. faecium*</sub> descrito pre-