

Sesión 2: Mecanismos de acción y de resistencias a los antimicrobianos

017

CARACTERIZACIÓN DE LAS BETALACTAMASAS QUE CONFIEREN RESISTENCIA A CEFALOSPORINAS DE TERCERA Y CUARTA GENERACIÓN E INHIBIDORES DE BETALACTAMASA EN CEPAS DE *PROTEUS MIRABILIS* AISLADAS DESDE EL AÑO 2000 AL 2005

L.M. Aragón¹, B. Mirelis^{1,2}, E. Miró¹, L. Gómez¹,
A. Rivera^{1,2}, P. Coll^{1,2} y F. Navarro^{1,2}

¹Servicio de Microbiología.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

²Departamento de Genética y Microbiología.

Universidad Autónoma de Barcelona.

Proteus mirabilis es considerada, dentro de las enterobacterias, una de las especies más sensibles a los betalactámicos por no presentar la cefalosporinasa cromosómica AmpC descrita en la casi totalidad de especies de esta familia. La resistencia a betalactámicos en esta especie se debe principalmente a la adquisición de betalactamasas de amplio espectro tipo TEM-1 o TEM-2, y, en menor medida a las betalactamasas de espectro ampliado o de cefamicinasas plasmídicas.

Objetivo: Caracterizar las betalactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y inhibidores de betalactamasa, en cepas de *P. mirabilis* aisladas desde 2000 a 2005 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Métodos: La sensibilidad de las cepas se determinó mediante la técnica de disco difusión, confirmándose el grado de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, e inhibidores de betalactamasa, mediante el método de E-test. La caracterización de las betalactamasas se realizó mediante la técnica de isoelectrofoqueo, PCR y posterior secuenciación. Asimismo se descartó una posible relación clonal entre las cepas con un mismo mecanismo de resistencia mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Resultados: Del 2000 al 2005 se han aislado un total de 1,249 cepas de *P. mirabilis*, de las cuales 16 (1,28%) presentan una sensibilidad reducida o resistencia a la asociación amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), 5 (0,4%) presentaban un fenotipo compatible con la producción de una cefamicinasa plasmídica y 3 (0,24%) presentaban un fenotipo de cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE). Las cepas con sensibilidad reducida o resistencia a AMC y sensibles a cefalosporinas producían una betalactamasa tipo TEM: 7 cepas la betalactamasa TEM-110, 8 cepas la nueva TEM-159 (número de acceso al GenBank EF136376) y una cepa la nueva TEM-160 (GenBank EF136377); las 5 cepas con fenotipo compatible con la producción de una cefamicinasa plasmídica presentaron el enzima CMY-2; y, de las 3 cepas productoras de BLEE, dos expresaban una CTX-M-32 y una cepa la nueva VEB-4 (GenBank EF136375).

Conclusión: El estudio de las betalactamasas en *P. mirabilis* muestra que a pesar de ser una especie naturalmente sensible a los betalactámicos presenta una elevada capacidad para la adquisición de nuevos enzimas, tanto los que confieren resistencia a los inhibidores como a las cefalosporinas.

018

PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BETALACTAMASAS AMPC PLASMÍDICAS EN CEPAS DE ENTEROBACTERIACEAE AISLADAS DESDE 1999 A 2006

E. Miró¹, A. Rivera^{1,2}, K. Diestra^{1,2}, L. Gómez¹, E. García¹, B. Mirelis^{1,2} y F. Navarro^{1,2}

¹Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. ²Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona.

Introducción: Las cefalosporinas mediadas por plásmidos (AmpC plasmídicas) se han encontrado en enterobacterias, principalmente en *Salmonella*, *Proteus*, y *Klebsiella*, por no poseer la cefalosporinasa cromosómica propia de especie, y más recientemente en *E. coli*. Estas enzimas confieren resistencia a penicilinas, oximinocefalosporinas, cefamicinas y aztreonam (aunque en algunos casos la CIM está dentro del rango de sensibilidad). No son activas frente a ceftipima ni carbapenems. Son resistentes a la acción del ácido clavulánico (con la excepción de MOX-1 y ACC-1) y su expresión es constitutiva (con la excepción del tipo DHA). Este perfil de actividad las hace indistinguibles de las cepas hipero productoras de su AmpC cromosómica, hecho que dificulta el seguimiento epidemiológico. El objetivo de este estudio es determinar y caracterizar las AmpC plasmídicas presentes en cepas de enterobacterias aisladas entre 1999 y 2006.

Métodos: Se han estudiado las cepas de *Enterobacteriaceae* no portadoras de betalactamasa cromosómica de clase C indiscutible aisladas entre 1999 y 2006. Los estudios de sensibilidad se han realizado mediante la técnica de disco difusión según las recomendaciones del CLSI. Las cepas seleccionadas para este estudio presentaban resistencia a la asociación amoxicilina/ácido clavulánico y cefalosporinas de tercera generación, no excluyéndose, mediante la detección de sinergias y Etest, las cepas positivas para BLEE. También se ha realizado el test de doble disco usando cloxacilina y el examen visual de las placas del antibiograma para detectar colonias en la proximidad del borde de los halos de inhibición de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. La caracterización de las betalactamasas se realizó mediante la técnica de isoelectrofoqueo, PCR y posterior secuenciación.

Resultados: Desde 1999 a 2006, su incidencia ha incremen-

tando en *E. coli* (0,04% en 1999 a 0,63% en 2006), *K. pneumoniae* (0,4% en 2000 a 0,84% en 2006) y, principalmente, en *P. mirabilis* (0,35% en 2000 a 2% en 2006). Además, también han incrementado los diferentes tipos de AmpC plasmídicas, aunque sigue siendo mayoritaria la CMY-2, habiéndose encontrado también CMY-4, ACC-1 y DHA-1.

Conclusión: El incremento de la incidencia de las AmpC plasmídicas, no sólo en número sino también en diversidad, muestra la emergencia de un nuevo problema de gran relevancia clínica.

019

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PLÁSMIDOS PORTADORES DE BLEE Y CMY-2 EN CEPAS DE *E. COLI* AISLADAS DE GRANJAS DE ANIMALES

V. Blanc¹, P. Cortés^{1,2}, R. J. Mesa¹, E. Miró³, F. Navarro^{1,3} y M. Llagostera^{1,4*}

¹Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. ²Servei d'Anàlisis i d'Aplicacions Microbiològiques, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. ³ Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. ⁴ Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Barcelona.

Introducción: Las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las β-lactamasas plasmídicas de clase C, se consideran actualmente unos de los principales mecanismos de

resistencia con gran importancia clínica. La mayoría de estas β-lactamasas están localizadas en plásmidos que además de codificar resistencia a otros antimicrobianos, son capaces de diseminar dichas resistencias entre diferentes especies bacterianas.

Objetivos: Evaluar la transmisibilidad de los plásmidos portadores de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y de β-lactamasas plasmídicas de clase C en 24 cepas de enterobacterias, no relacionadas epidemiológicamente, aisladas en granjas de animales. Caracterizar el grupo de incompatibilidad plasmídica y tamaño de los plásmidos conjugativos presentes en dichas cepas.

Material y métodos: 24 cepas de enterobacterias aisladas de granjas de animales, fueron sometidas a estudios de conjugación. La caracterización del grupo de incompatibilidad de los plásmidos conjugativos se realizó mediante las técnicas de hibridación de DNA (*Dot blot* y *Southern blot*), PCR y secuenciación. Igualmente, se determinó su tamaño mediante digestión con la endonucleasa S1 y posterior electroforesis en campo pulsante (PFGE).

Resultados: La resistencia a los antibióticos β-lactámicos se transfirió en un 83% de las cepas. Un 46% de las cepas transconjugantes resultaron ser portadoras de más de un plásmido. La identificación del grupo de incompatibilidad reveló que los plásmidos conjugativos de las cepas aisladas de granjas de cerdos pertenecían al grupo IncN, estando asociados a la enzima CTX-M-1 en un 75% de los casos. En las cepas procedentes de granjas de aves, se encontró una gran diversidad de enzimas y de grupos Inc. No obstante, los plásmidos portadores de replicones IncN codificaron, de igual forma, enzimas del grupo CTX-M-1. Las β-lactamasas CTX-M-9 (1 cepa) y CTX-M-14 (4 cepas) se detectaron en plásmidos IncK, tanto en cepas aisladas de granjas de cerdos como de conejos, con la excepción de una cepa portadora de un plásmido IncFII que contenía la enzima CTX-M-14. Las enzimas CMY-2 resultaron estar contenidas en plásmidos de alto peso molecular portadores de los replicones Q y A/C.

Conclusiones: El enfoque experimental llevado a cabo ha permitido determinar el grupo de incompatibilidad plasmídica de los plásmidos portadores de BLEE y CMY-2, sugiriéndose una alta correlación entre el grupo Inc al cual se asocian los plásmidos, la enzima que codifican y su tamaño. Además, esta relación es independiente del tipo de granja a partir de la cual han sido aislados los plásmidos.

020

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METALOBETALACTAMASAS TIPO VIM EN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AISLADAS A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS EN EL HOSPITAL INFANTIL DE LA PAZ

E. Cendejas, R. Gomez-Gil, J. Mingorance, A. Martín y A. Gutiérrez

Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica del Hospital Universitario La Paz.

Objetivo: Caracterizar el mecanismo de resistencia a carbapenemes de tres cepas de *Klebsiella pneumoniae*, que presentaban un fenotipo de resistencia compatible con la presencia de una metalobetalactamasa.

Material y métodos: Entre diciembre de 2005 y diciembre de 2006 se aislaron en tres pacientes pediátricos, tres cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Las muestras, dos de sangre y una de líquido ascítico, procedían de pacientes ingresados en diferentes plantas, uno transplantado hepático, otro con síndrome de intestino corto y el tercero de la UCI de pediatría. La identificación y el estudio de sensibilidad se realizaron mediante el sistema Wider®, panel MIC/ID GRAM NEGATIVOS y el sistema Vitek®, tarjetas GN y AST-N020. Se utilizaron puntos de corte CLSI 2006. Para la confirmación de sensibilidad a los carbapenemes se utilizó el sistema E-Test® de imipenem y meropenem. Para la identificación del fenoti-

po, se utilizó E-Test® de imipenem/ imipenem-EDTA con inóculos de Mcfarlan 5. La caracterización molecular de la metalobetalactamasa se realizó mediante PCR, con iniciadores específicos de los tipos IMP y VIM, y posterior revelado en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Resultados: Las tres cepas con CMI para imipenem entre 2-8 µg/ml, y para meropenem con CMI entre 4-8 µg/ml. Dos cepas fueron sensibles al aztreonam. Todas resistentes a los betalactámicos y cotrimoxazol y una asoció resistencias a gentamicina y tobramicina. El enzima era inhibible por EDTA en más de tres diluciones en los tres casos. La PCR para la diferenciación de la clase de metaloenzima, dio como resultado un producto de amplificación en la reacción con iniciadores para VIM que no dio en la reacción con iniciadores para IMP.

Conclusiones: La resistencia a carbapenemes en enterobacterias mediante metalobetalactamasas está emergiendo en nuestro medio, y en particular en pacientes pediátricos donde hemos aislado estas cepas por primera vez en 2006. Se debería descartar este mecanismo de resistencia sistemáticamente en aislamientos donde la CMI para imipenem sea mayor de 1 µg/ml.

021

CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS PORTADORES DE CARBAPENEMASAS EN CEPAS DE PSEUDOMONAS AISLADAS EN MALLORCA

O. Gutiérrez, C. Juan, J.L. Pérez y A. Oliver

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

Objetivo: Caracterizar los elementos genéticos portadores de carbapenemasas de clase B (4 VIM-2 y 1 VIM-13) detectadas en 5 clones multirresistentes diferentes de *Pseudomonas* (4 *P. aeruginosa* y 1 *P. putida*) aislados en 2 hospitales de Mallorca entre julio de 2004 y diciembre de 2005, así como los determinantes de resistencia co-transferidos.

Métodos: Para evaluar la codificación plasmídica de los genes *bla_{VIM}* se realizaron ensayos de conjugación con las 5 cepas, utilizando como receptor tanto *P. aeruginosa* (PAO1 rifR) como *E. coli* (HB101 rifR). Asimismo, se evaluó la codificación plasmídica mediante experimentos de electroporación en PAO1. Se determinaron por E-test las CMI de ticarcilina, piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, amikacina y ciprofloxacino para los transformantes obtenidos. Para determinar la composición genética de los integrones se llevaron a cabo PCR específicas seguidas de secuenciación para el gen de la integrasa (*intI1*), el gen *bla_{VIM}* correspondiente y los genes potencialmente situados entre ambos y a continuación de la propia carbapenemasa.

Resultados: En ningún caso se pudo transferir la resistencia a carbapenemas por conjugación, aunque tres de los plasmidos sí pudieron transferirse por electroporación. En los tres transformantes se documentó la co-transferencia de la resistencia a aminoglucósidos (gentamicina y tobramicina ± amikacina). En las 5 cepas se demostró por PCR y secuenciación la presencia de *intI1* ligado al gen *bla_{VIM}* correspondiente. En el caso del integrón de VIM-13 se determinó la presencia de un variante del gen *aacA4* a continuación del gen de la carbapenemasa. Tres de los 4 integrones de VIM-2 presentaron genes de enzimas modificantes de aminoglucósidos (2 un variante de *aacA4* y 1 *aacA7*) entre los genes *intI1* y *bla_{VIM-2}*.

Conclusión: En todos los casos analizados, las carbapenemasas en *Pseudomonas* se encuentran formando parte de integrones junto con determinantes de resistencia a aminoglucósidos. Al menos 3 de los 5 integrones están además localizados en plasmidos, lo cual puede facilitar la diseminación de este problema emergente. Se caracteriza por primera vez el integrón portador de la carbapenemasa VIM-13.

022

RESISTENCIA A CEFOXITINA (FOX) Y SENSIBILIDAD A AMOXICILINA (AMX)/ÁCIDO CLAVULÁNICO (CV) EN AISLADOS CLÍNICOS DE *ESCHERICHIA COLI* (EC) NO HIPERPRODUCTORES DE AMPC (NOHYP- AMPC) RELACIONADA CON LA AUSENCIA DE OMPF Y ALTERACIONES EN ACRR (REPRESOR DE ACRAB)

F. Fernández-Cuenca^{1,2}, G. Amblar¹, C. Velasco¹ y A. Pasqual^{1,2}

Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla¹ y Hospital Universitario Virgen Macarena², Sevilla.

Objetivos: Determinar el papel de la hyp-AmpC, la ausencia de porinas y alteraciones de acrR, sobre la resistencia a FOX en aislados clínicos de Ec sensibles a AMX/CV.

Material y métodos: Se incluyen 11 cepas de Ec resistentes a FOX y sensibles a AMX/CV (Vitek-2), aisladas de muestras de orina de pacientes no hospitalizados (año 2000. Hosp. Univ. Virgen Macarena, Sevilla). Las cepas se tiparon mediante REP-PCR. Las CMIs de FOX, cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), AMX y AMX/CV se determinaron por microdilución. El punto isoeléctrico (pI) de las β-lactamasas y sus perfiles de inhibición en presencia de CV o cloxacilina (CLX) se determinaron mediante isoelectrofoque. La hidrólisis de FOX se determinó mediante espectrofotometría y bioensayo. Se determinaron las secuencias nucleotídicas del promotor/operador de *ampC* y *acrR*, y del gen *acrR* mediante secuenciación de ADN. Se realizaron estudios de complementación con *acrR* salvaje de Ec TG100. Los perfiles de OMPs se analizaron mediante SDS-PAGE.

Resultados: Se observaron 7 patrones REP-PCR diferentes. Los aislados fueron resistentes a FOX (CMI: 32-128 mg/L) y sensibles a AC (4-16 mg/L), CTX, (< 0,5-1) y CAZ (0,5-2). Siete Ec fueron resistentes a AMX (512- > 1024) y 6 sensibles (8-16). En todos los Ec se observó una banda de pI ≥ 9 compatible con AmpC (inhibición con CLX, pero no con CV). Los Ec resistentes a AMX presentaron, además, otra banda de pI 5,4 compatible con TEM-1 inhibición con CV, pero no con CLX). En ningún caso se detectó hidrólisis de FOX. Se observaron 3 patrones de mutaciones puntuales en la región reguladora de *ampC*, no relacionados con la hyp-AmpC: -76, -56, +22, +26, +27, +32, +70, +80 (n = 4); -88, -82, -18, -1, +58, +80 (n = 4); and -56, +80 (n = 3). No se observaron mutaciones en el promotor/operador de *acrR*. Diez Ec presentaron de 1 a 3 mutaciones puntuales en *acrR*. Cinco Ec tuvieron mutaciones en los codones 213 (Thr por Ile) y 214 (Asn por Thr) de *acrR*. Las CMIs de FOX de los transformantes obtenidos por complementación con *acrR* salvaje fueron inferiores (16 mg/L) a la de la cepa parental (128 mg/L). Se observaron 6 perfiles de OMPs (movilidad variable de OmpA y OmpC) que se caracterizaron por la ausencia de OmpF.

Conclusiones: la resistencia a FOX en los Ec estudiados se relaciona con la ausencia de OmpF y con mutaciones en *acrR*, pero no con la hyp- AmpC.

023

RESISTENCIA PLASMIDICA A QUINOLONAS MEDIADA POR LOS GENES QNR: UN MECANISMO DE RESISTENCIA EMERGENTE EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS EN NUESTRO MEDIO

M.J. Goyanes, M. Marín, E. Bouza y E. Cercenado
Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Introducción: Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas mediada por plasmidos y codificado por los genes de la familia *qnr*. El objetivo de este estudio fue investigar la presencia de este mecanismo en aislados clínicos de diferentes enterobacterias obtenidas entre 2004 y 2006 en nuestro hospital.

Material y métodos: Se seleccionaron 87 aislados tanto de adquisición comunitaria como nosocomial con diferentes fenotipos de resistencia, incluyendo hiperproducción de AmpC (hAmpC), producción de BLEEs, resistencia o sensibilidad disminuida a quinolonas y/o resistencia a aminoglucósidos. Los aislados estudiados fueron *E. coli* (34 aislados BLEE+ de las familias TEM, CTX-M y OXA); *E. cloacae* (7 aislados BLEE+ y 21 hAmpC); *E. aerogenes* (8 aislados BLEE+); *K. pneumoniae* (8 aislados BLEE+) y *K. oxytoca* (9 aislados BLEE+). Para la detección de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* se realizó una PCR múltiple con iniciadores específicos (*qnrAF*: 5'-ATT TCT CAC GCC CAG GAT TTG-3'; *qnrAR*: 5'-GAT CGG CAA AGG TTA GGT CA-3'; *qnrBF*: 5'-GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG-3'; *qnrBR*: 5'-ACG ATG CCT GGT AGT TGT CC-3'; *qnrSF*: 5'-ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA-3'; *qnrSR*: 5'-TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC-3') y posterior detección mediante electroforesis y tinción con bromuro de etidio. Como controles positivos se incluyeron un transconjugante derivado de la cepa *E. coli* J53 resistente a azida que contiene el plásmido pMG252 que codifica QnrA, una cepa de *E. coli* con el gen *qnrB* y otra de *E. cloacae* con el gen *qnrS*. Se estudió la relación clonal de los aislados mediante electroforesis en campo pulsado.

Resultados: Se detectó la presencia del gen *qnrB* en 17 aislados de *E. cloacae* hAmpC y en 3 aislados BLEE+. Asimismo, se detectó la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en 5, 1 y 1 aislados de *K. oxytoca*, respectivamente. No se detectó ningún gen de la familia *qnr* en ninguno de los aislados de *E. coli* ni de *K. pneumoniae*. Tres aislados de *E. cloacae* estaban relacionados clonalmente.

Conclusiones: Se detecta la presencia de los genes *qnrB* en *E. cloacae*, y de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en *K. oxytoca*. Estos genes están presentes tanto en aislados de origen comunitario como nosocomial y se asocian con diferentes mecanismos de resistencia a beta-lactámicos.

024

ACTIVIDAD IN VITRO DE TIGECICLINA Y DE OTROS ANTIMICROBIANOS FRENTE A 101 ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) AISLADAS EN MUESTRAS CLÍNICAS NO URINARIAS

M.S. Salvo, E. Duran, J. Gil, F.J. Castillo, I. Millán y M.C. Rubio

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza.

Objetivos: Evaluar la actividad de Tigeciclina frente a 101 enterobacterias productoras de BLEE y compararla con la de otros antimicrobianos.

Material y métodos: Estudiamos retrospectivamente 101 enterobacterias productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas de pacientes diferentes durante los años 2004-2006: 94 cepas de *E. coli*, 3 de *Klebsiella pneumoniae*, 1 de *Klebsiella oxytoca*, 2 de *Enterobacter aerogenes* y 1 *Enterobacter cloacae*. El 70% presentaban fenotipo CTX®-CAZ^(S). Procedencia: Sangre (27), LCR (1), Catarer central (6), Exudados y Líquidos intraabdominales (10), Exudados de piel y tejidos blandos (56) y Exudado osteitis (1). Origen: Hospitalario en el 85% de los casos y comunitario en el 15%. La sensibilidad a Ácido nalidíxico, Ciprofloxacino, Amoxicilina-Clavulánico, Piperacilina-Tazobactam, Imipenem, Meropenem, Gentamicina, Tobramicina, Amikacina, Fosfomicina y Trimetoprim/Sulfametoaxazol se estudió por el método de microdilución Wide® (Soria Melguizo). Ertapenem y Tigeciclina mediante E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) según las directrices del CLSI.

Resultados: El 100% de las cepas fueron sensibles a Tigeciclina (CIM50 = 0,19, CIM90 = 0,50, Moda = 0,125 mcgr/ml).

Imipenem, Meropenem, Ertapenem y Piperacilina-Tazobactam fueron activas en el 100% de las cepas. El 97,02% fueron sensibles a Fosfomicina, 96,06% a Amikacina, y a Gentamicina el 84,15%.

La resistencia a Ácido nalidíxico, Ciprofloxacino y Trimetoprim/Sulfametoaxazol fué del 83,16%, 65,35% y 59,40% respectivamente.

Conclusiones: Tigeciclina muestra una actividad comparable a la de los Carbapenémicos de los grupos I y II y podría constituir una alternativa en el tratamiento de infecciones debidas a cepas portadoras de BLEE. Amikacina y Fosfomicina se muestran eficaces. La elevada resistencia a Ciprofloxacino y a Trimetoprim/Sulfametoaxazol desaconsejan el empleo de estos antibióticos en nuestro medio.

025

ACTIVIDAD IN VITRO DE TIGECICLINA FRENTE ACINETOBACTER BAUMANNII: VARIACIONES DE CMIS POR E-TEST DEPENDIENTES DEL TIPO DE MEDIO MUELLER-HINTON II UTILIZADO EN RUTINA

J.J. Camarena¹, R. González¹, R. Zaragoza², J.C. Navarro¹,

S. Sancho² y J.M. Nogueira¹

Servicio de Microbiología¹ y Medicina Intensiva². Hospital Universitario Dr. Peset. Universitat de València.

Objetivo: Las IN por *A. baumannii* multiresistente (AbMR) persisten como reto terapéutico en nuestras UCIs. La introducción de tigeciclina como alternativa válida conlleva la determinación de su CMI en rutina, pudiendo utilizar E-Test que proporcione al clínico datos rápidos sobre la actividad "in vitro" del fármaco en cada paciente. La disponibilidad de distintos medios de Mueller-Hinton II (MH) nos lleva a comparar los resultados de la CMI en cada caso según el medio utilizado para valorar las posibles variaciones intra-interensayo.

Métodos: Determinación de CMIs de tigeciclina, doxiciclina y minociclina por método E-Test® (AB BioDisk) frente a 100 casos de *A. baumannii* seleccionados en base a su resistencia (80 carbapenem resistentes AbCR y 20 AbCS-sensibles), resistotipo y genotipado (8 clones distintos) por REP-PCR. El estudio de sensibilidad se realizó en tres medios de MH II distintos: medio A (BBL® MH II Agar preparado en el laboratorio para su uso en 24 horas), B (Biomedics® SL MH) y C (BioMérieux® Agar MH 2). Interpretación según CLSI utilizando las cepas patrón recomendadas.

Resultados: Aunque todos los medios mostraron CMIs dentro del rango establecido por el CLSI para cada cepa patrón, se observó un incremento de 1-4 puntos en tira E-Test en medio C respecto a A y B. Frente a las cepas estudiadas, AbCR y AbCS, las CMI₅₀₋₉₀ no mostraron diferencias al comparar los resultados para los tres antimicrobianos con los medios A y B. Sin embargo, el medio C mostró incrementos de 1 a 6 puntos de sus CMIs, pasando de cepa sensible a resistente "in vitro". En concreto, en el caso de la tigeciclina el rango de CMIs con A y B de 0,25-3 mg/L pasó a 4-16 mg/L con el medio C. Se observó además un mayor incremento de la CMI frente a doxiciclina y tigeciclina en aquellas cepas AbMR solo sensibles a colistina, pertenecientes a clones concretos.

Conclusiones: El estudio de la CMI por E-Test para informe de la actividad "in vitro" de la tigeciclina parece una herramienta útil para el abordaje terapéutico de pacientes críticos con infección por *A. baumannii*. Sin embargo, debido a la variabilidad que presentan los resultados según el medio de cultivo utilizado, con cepas que pasan de sensibles a resistentes "in vitro", resulta necesario unificar los criterios de tipo de Mueller-Hinton a utilizar y CMIs a considerar en cada caso.

026

TIGECICLINA. ACTIVIDAD IN-VITRO FRENTE A ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

A. Tenorio, S. Rojo, S. García, C. Merino, J.M. Eiros, B. Nogueira, I. Gracia, C. García-Loygorri, L. Barrio, M. Domínguez-Gil

Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Introducción: La aparición de patógenos multirresistentes, tales como enterobacterias productoras de BLEEs, crea la necesidad de disponer de nuevas opciones terapéuticas para aumentar las posibilidades de actuación y disminuir la presión selectiva ejercida por otros antibióticos que pudieran dar lugar a nuevas resistencias. Tigeciclina, es el primer antibiótico aprobado de una nueva clase de glicilciclinas. Se trata de una nueva molécula desarrollada para superar los mecanismos clave de resistencia que afectan al uso de otros antibióticos.

Objetivos: Evaluar la sensibilidad *in-vitro* de la tigeciclina frente a cepas de enterobacterias productoras de BLEEs aislados en el ámbito asistencial.

Material y métodos: Se ha estudiado la actividad *in-vitro* de la tigeciclina en un total de 55 cepas de enterobacterias productoras de BLEEs (38 *K. pneumoniae* y 17 *E. coli*) recogidas entre Marzo y Diciembre del 2006, en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Estas cepas fueron seleccionadas en función de la resistencia a cefotaxima y cefazidima, y sensibilidad a estos mismos antibióticos con adición de clavulánico, ensayados por el método de Kirby Bauer. La sensibilidad a la tigeciclina se estudió mediante la técnica de E-Test en agar Müller Hinton. Los puntos de corte para la sensibilidad fueron los recomendados por el CLSI ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$).

Resultados: Todas las cepas analizadas resultaron sensibles a tigeciclina, hallándose una CMI media de 1,434 $\mu\text{g/ml}$ con una desviación estándar (DE) de 0,420 $\mu\text{g/ml}$ para *K. pneumoniae*, con valores que oscilaron entre 0,5 y 2 $\mu\text{g/ml}$. Para *E. coli*, la CMI media fue de 0,332 $\mu\text{g/ml}$ y la DE de 0,203 $\mu\text{g/ml}$, con valores que oscilaron entre 0,125 y 1 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusiones: La tigeciclina ha demostrado presentar una buena actividad frente a los microorganismos estudiados en nuestra serie, lo que apunta a la utilidad de esta nueva molécula como una buena alternativa para el tratamiento de infecciones producidas por estos patógenos.

027

ACTIVIDAD IN VITRO DE TIGECICLINA FRENTE A ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS SIMULTÁNEAS DE DOS O MÁS BLEES

M. Fernández, O. Cores y J.L. Muñoz

Departamento de Microbiología. H. Universitario de Salamanca.

Introducción: Tigeciclina es una nueva glicilciclina que no se ve afectada por la mayor parte de los mecanismos de resistencia que afectan a las tetraciclinas clásicas. Su amplio espectro abarca a enterobacterias, anaerobios y Gram positivos, incluyendo MRSA. La creciente frecuencia de enterobacterias productoras de BLEEs, y la frecuente inclusión de estos genes en integrones que portan genes de resistencia a diversos grupos de antimicrobianos, aconseja estudiar cómo se comporta este tipo de aislados frente a tigeciclina.

Material y métodos: Se ha estudiado la actividad *in vitro* de tigeciclina, mediante E-test, frente a 28 aislamientos diferenciados mediante PFGE (18 *E. coli*, 9 *K. pneumoniae* y 1 *K. oxytoca*), productores simultáneos de 2 o más BLEEs. Las BLEEs fueron detectadas preliminarmente mediante técni-

cas fenotípicas habituales, y posteriormente caracterizadas mediante IEF, PCR y secuenciación.

Resultados: La mayor parte de los aislamientos fueron de origen urinario (18 aislamientos, 64,3%). La combinación de BLEEs más frecuente en *E. coli* fue CTX-M 14 + TEM-116 (8 aislados, 44,4%), y la más frecuente en *K. pneumoniae* fue CTX-M 14 + SHV-2 + TEM-116 (4 aislados, 44,4%). La actividad de tigeciclina frente a *E. coli* fue: CIM50: 0,25 mg/l; CIM90: 1 mg/l; intervalo: 0,25-2 mg/l. Su actividad frente a *K. pneumoniae* fue: CIM50: 1 mg/l; CIM90: 4 mg/l; intervalo: 0,5-4 mg/l. La única *K. oxytoca* estudiada tuvo una CIM de 0,5 mg/l. 19 cepas producían 2 BLEEs, y 8 cepas producían 3 BLEEs. La actividad frente a cepas productoras de 2 BLEEs (15 *E. coli*, 3 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*) fue: CIM50: 0,5 mg/l; CIM90: 2 mg/l; intervalo: 0,25-4 mg/l. La actividad frente a cepas productoras de 3 BLEEs (6 *K. pneumoniae*, 3 *E. coli*) fue: CIM50: 0,5 mg/l; CIM90: 1 mg/l; intervalo: 0,25-1 mg/l.

Conclusiones: Tigeciclina mantiene buenos niveles de actividad frente a enterobacterias productoras de varias BLEEs, no habiéndose observado resistencias. Tigeciclina puede por tanto ser una buena alternativa frente a infecciones en que puedan estar implicadas enterobacterias en áreas con alta prevalencia de cepas productoras de BLEEs, donde el uso de la mayor parte de los beta-lactámicos de manera empírica puede ser menos seguro.

028

DETECCIÓN DE LOS GENES LUKS, LUKF Y MEC A EN *S. AUREUS*

M.E. Álvarez-Argüelles, F. Pérez, P. Mejuto, P. Alonso, L. Alba, E. Valdés y M. Lantero

Servicio Microbiología. HUCA.

Objetivos Determinar la presencia de los genes lukS -PV y lukF-PV que codifican la leucocidina de Panton- Valentine (PVL) y el gen mecA que confiere resistencia a la meticilina en los aislados de *S. aureus*.

Material y métodos Se analizaron 183 aislados de *S. aureus* procedentes de otras tantas muestras (pertenecientes a 149 pacientes) remitidas al servicio de Microbiología durante Diciembre 2006 y Enero 2007. Los tipos de muestras se agruparon de la siguiente manera: piel y tejidos blandos: 91, respiratorios: 31, abscesos: 22, sangre y catéteres I.V: 18, otros: 21. La identificación y sensibilidad de los aislados fue realizada mediante el sistema automatizado MicroScan (Dade-Behring), el punto de corte para resistencia a oxacilina fue $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ según las normas del CLSI vigentes, además de la realización del test de la coagulasa y detección de la resistencia a meticilina con disco de cefoxitina (30 μg), siendo el punto de corte para la resistencia $\leq 19 \text{ mm}$. La liberación del material genómico se realizó mediante extracción térmica, se amplificó mediante una PCR simple múltiple descrita por Mc Clure y col. utilizando cebadores específicos para los genes que codifican la PVL y el gen mecA, los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa.

Resultados: De las 183 cepas estudiadas, una (0,5%) portaba los genes que codifican las 2 subunidades de la PVL, dicha cepa fue aislada en un absceso supraescapular de procedencia comunitaria, no era portadora del gen mec A, y fenotípicamente era sensible a meticilina. No se encontró ninguna cepa productora de PVL en muestras respiratorias. Se encontraron 49 aislados (26,8%) resistentes a meticilina (MRSA), de los cuales 4 no portaban el gen mec A, a pesar de expresar resistencia a meticilina, tanto por el método discoplaca como por microdilución. Los MRSA procedían en su mayoría (98%) de piel y tejidos blandos, respiratorios y muestras de sangre/catéteres I.V. Todos los aislados procedentes de los abscesos eran meticilín sensibles.

Conclusiones: El número de *S. aureus* productores de leucocidina de Panton- Valentine fue bajo, solo uno, procedente de un absceso de origen comunitario. Es necesario realizar las pruebas tradicionales de sensibilidad ya que hay otros

mecanismos de resistencia a meticilina no debidos al gen *mec A*. Las técnicas fenotípicas mostraron una sensibilidad absoluta para la detección del gen *mec A*.

029

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES A METICILINA (SARM) PRODUCTORAS DE LEUCOCIDINA DE PANTON-VALENTE (LPV)

M.A. Domínguez¹, M. Pujol², F. Tubau¹, A. García¹, A. Manzur², R. Fernández¹, M.P. González¹, C. Ardanuy¹ y R. Martín¹

¹Servicio de Microbiología. ²Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital de Bellvitge. IDIBELL.

La producción de LPV en cepas de SARM es característica de la adquisición de éstas en el ámbito comunitario. Esta toxina favorece la necrosis tisular y es causa de morbilidad añadida en las infecciones por SARM.

Objetivos: Determinar las propiedades de las cepas SARM productoras de LPV, analizar su composición clonal y sus determinantes genéticos más característicos.

Métodos: Se estudiaron 24 cepas productoras de LPV aisladas de pacientes distintos. La detección de LPV se hizo por PCR. La sensibilidad antibiótica se estudió por el método de disco-difusión a los siguientes antibióticos: cefoxitina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, cotrimoxazol, cloramfenicol, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, rifampicina, teicoplanina, vancomicina, ciprofloxacin, fosfomicina, ácido fusídico, sinercid y linezolid. La capacidad hemolítica de las cepas se analizó mediante su siembra en placas de agar sangre y observación a las 48 horas. La caracterización genética se realizó mediante: electroforesis en campo pulsátil (ECP) del DNA cromosómico tras restricción con *SmaI*, análisis de la región del *Staphylococcal Chromosomal Cassette meC* (SCC-mec) por PCR y estudio del *Multilocus Sequence Typing* (ST) mediante PCR y secuenciación.

Resultados: Siete cepas se aislaron de muestras nasales y el resto de exudados o infecciones de partes blandas. Todas las cepas mostraron una intensa hemólisis en agar sangre; 16 cepas mostraron resistencia sólo a meticilina, 7 además presentaban también resistencia a tetraciclina (una de ellas a ácido fusídico) y una a ciprofloxacin. El estudio mediante ECP se llevó a cabo en 21 cepas, detectándose 7 genotipos distintos, de ellos uno fue mayoritario agrupando 15 aislamientos (5 pacientes de este grupo pertenecían a la misma familia). Este genotipo dominante se identificó como ST-8, portador de SCCmec tipo IV. Entre las 6 cepas con genotipos esporádicos, 2 eran portadoras de SCCmec tipo IV, 3 SCC-mec tipo I (ST-5) y una fue no tipable por PCR (ST-15).

Conclusiones: Las cepas SARM productoras de LPV fueron hemolíticas en los medios de cultivo y presentaron sensibilidad a la mayoría de los grupos antibióticos no beta-lactámicos, a diferencia de otras poblaciones de SARM de adquisición hospitalaria. Destaca la detección de un clon mayoritario cuyo genotipo está relacionado con la cepa USA300, una de las más prevalentes como causa de infección comunitaria en los Estados Unidos.

030

RESISTENCIA A MACRÓLIDOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE *ENTEROCOCCUS spp.* INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A TELITROMICINA EN PRESENCIA DE OTROS MACRÓLIDOS

J. Pérez, E. Culebras, M. Gómez y J.J. Picazo
Servicio de Microbiología Clínica. H. Clínico San Carlos. Madrid.

Introducción: La resistencia a macrólidos de *Enterococcus spp.* es un fenómeno bien conocido. Se han identificado va-

rios genes implicados en esta resistencia. En este estudio tratamos de determinar la presencia de los más significativos en diferentes especies de enterococos procedentes de diferentes muestras clínicas. Asimismo tratamos de analizar la influencia que distintos macrólidos tienen sobre la actividad de la telitromicina.

Material y métodos: De los 791 *Enterococcus spp.* aislados en nuestro Servicio a lo largo del primer semestre del año 2006, se seleccionaron un total de 34 resistentes a eritromicina; 24 *E. faecalis*, 8 *E. faecium*, 1 *E. avium* y 1 *E. casseliflavus*. Los microorganismos fueron identificados por métodos comercializados (paneles Wider®) y la resistencia a eritromicina se comprobó mediante tiras de E-test. Mediante microdilución se determinaron las CMIs para eritromicina, claritromicina, azitromicina, telitromicina, clindamicina y quimupristina/dalfopristina (Q/D). La presencia de ermB, ermA y vatD (para resistentes a Q/D) se llevó a cabo mediante PCR con los cebadores y las condiciones que aparecen en la literatura. Mediante la difusión en disco se determinó la sensibilidad a linezolid, así como la influencia que los anteriores macrólidos pudieran tener sobre la telitromicina.

Resultados: Todos los aislados fueron sensibles a linezolid. 18 de los 34 aislados tuvieron una CMI = 4 para telitromicina, además en varios de ellos se pudo ver un claro achatamiento del halo de telitromicina en presencia de los otros macrólidos. De todos los genes estudiados sólo para ermB obtuvimos resultados positivos: se detectó en 11 de los 24 *E. faecalis*, 7 de los 8 *E. faecium* y en el único *E. avium*. En las cepas restantes no encontramos ninguno de los genes estudiados.

Conclusiones: 1. ermB fue el gen responsable de la resistencia en la mayor parte de los aislados. 2. Linezolid y telitromicina fueron los antibióticos más efectivos, si bien observamos la inducción de resistencia a telitromicina en presencia de distintos macrólidos. 3. La telitromicina no parece una buena alternativa para el tratamiento de estos microorganismos, no sólo por los valores de CMI que presentan, sino además por la inducción de resistencia que parece que provocan sobre ella otros macrólidos.

031

SENSIBILIDAD A DAPTOMICINA EN *S. AUREUS* RESISTENTE A OXACILINA

L. Martínez, M. Treviño, A. Gómez-Rial, L. Rodríguez-Otero y B.J. Regueiro

Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

Introducción: Las tasas de infección por *S. aureus* resistente a oxacilina (SAMR) han incrementado sustancialmente en los últimos años llegando a constituir más del 40% de los aislamientos clínicos. La resistencia a oxacilina suele estar asociada a mecanismos de resistencia que afecta a otros antibióticos (macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos y quinolonas) dejando así muy reducidas las opciones terapéuticas para este patógeno multirresistente. **OBJETIVOS** Estudiar, prospectivamente, la susceptibilidad de aislamientos clínicos de SAMR frente a la daptomicina, representante de una nueva clase de antibióticos con amplio espectro frente a gram positivos.

Material y métodos: Se determinó el valor de la CMI a daptomicina en setenta y seis cepas de aislamientos clínicos (54 de pacientes hospitalizados y 22 de ambulatorios) de SAMR mediante Etest (Abbioidisk, Suecia). Siete aislamientos presentaban fenotipo de sensibilidad disminuida a la teicoplanina (TISA). La identificación y el antibiograma se realizó mediante el sistema Vitek 2 (BioMérieux, Francia). En todos los aislamientos se confirmó la resistencia a oxacilina mediante el método y criterios propuestos por el CLSI. El fenotipo TISA fue determinado por Etest de acuerdo con las especificaciones propuestas por el fabricante.

Resultados: El rango de CMI a daptomicina fue (0,064-0,75) y el valor de la CMI90 0,5 µg/ml tanto para las cepas

de origen comunitario como para las hospitalarias y las de baja sensibilidad a teicoplanina.

Conclusión: En nuestro medio, la daptomicina demuestra una gran eficacia "in vitro" frente a SAMR.

032

ACTIVIDAD IN VITRO DE TIGECICLINA Y OTROS 10 ANTIMICROBIANOS FRENTE A AISLADOS CLÍNICOS DEL GÉNERO *CORYNEBACTERIUM*

A.I. Fernández, R. Fernández-Roblas, I. Gadea, H. Adames, N. Zamora y J. Esteban

Departamento de Microbiología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Introducción: En los últimos años se han descrito nuevas especies del género *Corynebacterium* relacionadas con infecciones en pacientes inmunodeprimidos o asociadas a cuerpos extraños como catéteres, prótesis, etc. Por otra parte, entre los nuevos fármacos disponibles frente a gram positivos se encuentra la tigeciclina, cuya actividad frente a difteromoros no ha sido ampliamente estudiada. Objetivos. Estudiar la actividad in vitro de tigeciclina, doxiciclina, penicilina, eritromicina, claritromicina, azitromicina, clindamicina, quinupristina/dalfopristina, linezolid, vancomicina y rifampicina frente a aislados clínicos del género *Corynebacterium*.

Material y métodos: El estudio de sensibilidad se realizó utilizando placas de agar sangre Mueller Hinton, y tiras de E-test con lectura de la CIM a las 48 horas. Los aislados y el número de cada especie estudiados fueron *Corynebacterium urealyticum* (34), *C. amycolatum* (33), *C. jeikeium* (25), *C. coyleae* (13), *C. striatum* (11), y *C. aurimucosum* (11) y *C. afermentans* (8).

Resultados: Las CIMs 50% y 90% (mg/l) de tigeciclina fueron: *C. urealyticum* 0,094-0,125, *C. amycolatum* 0,125-2, *C. jeikeium* 0,094-0,75, *C. coyleae* 0,064-0,064, *C. striatum* 0,064-1, *C. aurimucosum* 0,094-0,125, *C. afermentans* 0,064-0,094. La actividad del resto de antimicrobianos, salvo vancomicina que fue activo frente al 100% de los aislados, fue variable.

Conclusiones: Tigeciclina es un nuevo antibiótico con buena actividad in vitro frente a aislados del género *Corynebacterium*, por lo que puede constituir una alternativa para las infecciones producidas por los mismos.

033

ANIDULAFUNGINA: ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE ORGANISMOS LEVADURIFORMES

M.J. Linares, F. Solís, F. Rodríguez y M. Casal

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Introducción: Anidulafungina es un nuevo antifúngico, derivado semisintético del núcleo de la equinocandina, que inhibe la beta-1,3 glucano sintetasa con amplio espectro de acción, incuyendo a los aislamientos resistentes a Anfotericina B y Fluconazol.

Objetivos: Estudiar la actividad antifúngica de Anidulafungina frente a diferentes especies de organismos levaduriformes siguiendo el método de microdilución en caldo.

Material y métodos: Se estudiaron un total de 387 cepas de organismos levaduriformes, aisladas de diferentes muestras clínica y correspondientes a las siguientes especies: *Candida albicans* (132), *C. glabrata* (85), *C. parapsilosis* (42), *C. tropicalis* (38), *C. krusei* (37), *C. guillermorandi* (11), *Cryptococcus neoformans* (8), *C. lusitaniae* (7), *C. rugosa* (6), *Saccharomyces cerevisiae* (5), *C. lipolytica* (4), *C. famata* (3), *Rhodotorula glutinis* (3), *C. sake* (2), *Trichosporon asahii* (2), *C. valida* (2). Se utilizó el método de microdilución en caldo siguiendo las indicaciones del CLSI (NCCLS, M27-A2). Se incluyeron las cepas: *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis*

ATCC 22019 como control de calidad. Se consideró CMI la concentración a la que se produce el 80% de inhibición del crecimiento.

Resultados: Los resultados de la CMI90 ($\mu\text{g/ml}$) de Anidulafungina frente a las distintas especies fueron: *C. albicans* (0,03), *C. galbarata* (0,03), *C. parapsilosis* (4), *C. tropicalis* (0,12), *C. krusei* (0,12), *C. guillermorandi* (2), *Cr. neoformans* (16), *C. lusitaniae* (0,25), *C. rugosa* (0,25), *S. cerevisiae* (2), *C. lipolytica* (1), *C. famata* (0,06), *R. glutinis* (0,03), *C. sake* (0,12), *T. asahii* (16), *C. valida* (16). Algunas de las cepas testadas presentaban resistencia a fluconazol.

Conclusiones: *In vitro*, Anidulafungina presenta una muy buena actividad sobre la mayoría de las diferentes especies de los géneros ensayados. Se detecta más activo sobre *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. Presenta poca actividad sobre *C. parapsilosis* y *C. guillermorandi*. Manifiesta nula actividad sobre *Cryptococcus* y *Trichosporon*.