



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



## XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)

Sevilla, 3-5 de junio de 2009

### Sesión 1:

Bases moleculares de la resistencia en enterobacterias

#### 001. BASE MOLECULAR DE LA RESISTENCIA A CARBAPENEMAS EN UNA CEPHA CLÍNICA DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

M.J. Barba, C. Gayoso, M. Poza, R. Villanueva y G. Bou

Servicio Microbiología. CHU. A Coruña. Red Española de Investigación Patología Infecciosa (REIPI). La Coruña.

**Introducción y objetivos:** En septiembre de 2008 se aisló en un paciente hospitalizado una cepa de *K. pneumoniae* multirresistente (*K. pneu1*) incluyendo resistencia a carbapenemas. El objetivo del trabajo es analizar el mecanismo de resistencia antibiótica a carbapenémicos.

**Material y métodos:** La identificación bacteriana fue realizada mediante Microscan Walk-Away. La sensibilidad antibiótica (CMI) fue determinada mediante tiras de E-test. Test de Matsuda para la detección de carbapenemas. Se realizaron CMI sin y con presencia de cloxacilina (CLO). Se realizaron experimentos de transformación usando como huésped *E. coli* TG1. Estudios de PCR fueron llevados a cabo para la caracterización de la  $\beta$ -lactamasa. El entorno genético fue determinado por secuenciación. Mediante QRT se determinó el nivel de expresión de los mRNA de las porinas OmpK 35 y OmpK 36. **Resultados:** El método de Matsuda dio negativo para carbapenemas. La cepa *E. coli*-TG1 fue transformada con el plásmido de la cepa

	<i>K. pneu1</i>	TG1 (pMB)	<i>E. coli</i> -TG1
AC	> 256	> 256	1
XL	> 256	> 256	2
PP	> 256	> 256	0,5
PTc	> 256	> 256	0,75
FX	> 256	6	4
CT	> 256	> 256	0,064
CT/CTL	> 16/> 1	> 16/0,016	< 0,25/< 0,016
TZ	> 256	24	0,125
PM	> 256	> 256	0,5
AT	> 256	24	0,094
IP	> 32	0,38	0,25
MP	12	0,094	0,064
ETP	> 32	0,012	0,004
DOR	3	0,016	0,012
GM	> 256	4	0,064
CI	4	0,032	0,016
TS	1	0,023	0,012

AC: amoxicilina; XL: amoxicilina/ácido clavulánico; PP: piperacilina; PTc: piperacilina/tazobactam; FX: cefoxitina; CT: cefotaxima; CT/CTL: CT/CT + XL; TZ: ceftazidima; PM: cefepime; AT: aztreonam; IP: imipenem; MP: meropenem; ETP: ertapenem; DOR: doripenem; GM: gentamicina; CI: ciprofloxacino; TS: trimetoprim-sulfametoaxazol.

clínica (con un tamaño aproximado de 35 Kpb) obteniéndose la cepa TG1 (pMB) cuyas CMI se muestran en la tabla. Mediante PCR se detectó una BLEE CTX-M grupo 1 en la cepa clínica y en el transformante. En presencia de CLO no se produjo ningún cambio en las CMI.

El análisis por QRT demostró que el nivel de expresión relativa del mRNA de OmpK 36 en el aislado clínico respecto a una cepa control disminuye significativamente.

**Conclusión:** Se ha encontrado una resistencia a carbapenemas en una cepa clínica de *K. pneumoniae* productora de BLEE CTX-M del grupo 1 que tiene un déficit de permeabilidad en su membrana.

#### 002. LA BETA-LACTAMASA OXY EN LOCALIZACIÓN PLASMÍDICA

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

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

*Klebsiella oxytoca* posee una  $\beta$ -lactamasa de clase A (*bla<sub>OXY</sub>*) de codificación cromosómica que se expresa constitutivamente a niveles bajos y le confiere resistencia a aminopenicilinas y carboxipenicilinas, manteniéndose sensible a las cefalosporinas, los monobactámicos y a los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. La hiperproducción de este enzima, debida generalmente a mutaciones en la región promotora del gen, le confiere resistencia a todas las penicilinas y a la combinación de amoxicilina con ácido clavulánico, las cefalosporinas de primera y segunda generación, el aztreonam y un nivel variable de resistencia a la ceftaxima y la ceftriaxona, sin verse afectada la sensibilidad a ceftazidima. Hasta la fecha, se han descrito hasta seis variedades de *bla<sub>OXY</sub>*, todas ellas localizadas en el cromosoma de *K. oxytoca* y nunca en localización plasmídica.

En enero de 2008, aislamos tres cepas de *K. oxytoca* y una cepa de *K. pneumoniae* de tres niños ingresados en la Unidad de Hematología del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona que presentaban un patrón de resistencia a  $\beta$ -lactámicos compatible con una hiperproducción del gen *bla<sub>OXY</sub>*.

Mediante PCR y secuenciación, se confirmó que tanto las cepas de *K. oxytoca* como *K. pneumoniae* presentaban un gen *bla<sub>OXY</sub>* perteneciente al grupo OXY-1, con una mutación en la región -10 de su promotor, responsable de la hiperproducción de dicho enzima. La digestión del ADN total con el enzima de restricción *Xba*I y la electroforesis en campo pulsado reveló que todas las cepas de *K. oxytoca* compartían un único patrón de bandas, diferente, obviamente, del patrón de *K. pneumoniae*. Mediante digestión con la nucleasa S1, transferencia por Southern e hibridación con sondas de ADN específicas para *bla<sub>OXY</sub>* se detectó la presencia de un plásmido de aproximadamente 95Kb, portador de esta  $\beta$ -lactamasa en todas las cepas estudiadas. Este plásmido no pudo ser movilizado por conjugación; pero sí por elec-

trotransformación tanto de las cepas de *K. oxytoca* como de *K. pneumoniae* a *E. coli* CSH26, observándose en las cepas transformantes un patrón de resistencia a  $\beta$ -lactámicos idéntico al observado en las cepas donadoras. Además, la cepa de *K. pneumoniae* portadora de éste plásmido fue curada, revirtiendo al fenotipo de resistencia natural de esta especie.

Este trabajo describe por primera vez la localización plasmídica de la  $\beta$ -lactamasa OXY hecho que podría facilitar la difusión horizontal entre diferentes bacterias de este mecanismo de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

### 003. BASE MOLECULAR DE LA RESISTENCIA A CARBAPENEMAS EN UNA CEPA CLÍNICA DE *ESCHERICHIA COLI*

M.J. Barba, C. Gayoso, A. Pérez, R. Villanueva y G. Bou

Servicio de Microbiología. CHU. A Coruña. Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI). A Coruña.

**Introducción y objetivos:** En mayo de 2008 se aisló en una paciente hospitalizada una cepa de *E. coli* multirresistente incluyendo resistencia a carbapenemas. El objetivo del trabajo es analizar el mecanismo de resistencia antibiótica a carbapenémicos.

**Material y métodos:** La identificación bacteriana fue realizada mediante Microscan Walk-Away. La sensibilidad antibiótica (CMI) fue determinada mediante tiras de E-test. Se realizaron CMI sin y con presencia de cloxacilina (CLO). Test de Matsuda para detectar existencia de carbapenemas. Se realizaron experimentos de conjugación usando como huésped la cepa *E. coli* XL1-Blue. Estudios de PCR fueron llevados a cabo para la caracterización de la  $\beta$ -lactamasa según Pérez et al (JCM 2002). Se analizó por QRT el nivel de expresión de los mRNA de las porinas OmpC y OmpF.

**Resultados:** El test de Matsuda fue negativo. Las CMI de la cepa clínica *E. coli*-1 así como del conjugado XL1-Blue (pMB) y de la cepa huésped *E. coli* XL1-Blue se muestran en la tabla adjunta. En presencia de CLO se produjo una disminución de las CMI de PP, CT, TZ, AT, IP y MP, lo cual sugiere una  $\beta$ -lactamasa de clase C. El resultado de la PCR mostró que la  $\beta$ -lactamasa pertenecía al grupo CIT, y la secuenciación del plásmido reveló la presencia del gen *cmy-2* en un plásmido de aproximadamente 45Kpb. Su entorno genético mostró una alta identidad con el plásmido PTN38148 aislado previamente en *E. coli*. El análisis por QRT demostró que el nivel de expresión relativa del mRNA de OmpC en el aislado clínico respecto al control disminuye significativamente.

**Conclusión:** La resistencia a carbapenemas en una cepa clínica *E. coli* se debe a la producción de CMY-2 y a un déficit de la permeabilidad de su membrana.

	<i>E. coli</i> -1	XL1-Blue (pMB)	<i>E. coli</i> XL1-Blue
AC	> 256	> 256	4
XL	> 256	> 256	4
PP	> 256	> 256	0,38
PTc	> 256	> 256	1
FX	> 256	> 256	2
CT	> 256	> 256	0,02
CT/CTL	> 16/>1	> 16/>1	< 0,25/0,02
TZ	> 256	> 256	0,06
PM	> 256	256	0,02
AT	96	96	0,03
IP	> 32	0,75	0,12
MP	8	0,094	0,064
ETP	> 32	0,125	0,08
DOR	1	0,047	0,016
GM	2	0,75	0,19
TS	> 32	0,012	0,016

AC: amoxicilina; XL: amoxicilina/ácido clavulánico; PP: piperacilina; PTc: piperacilina/tazobactam; FX: cefoxitina; CT: cefotaxima; CT/CTL: CT/CT + XL; TZ: ceftazidima; PM: cefepime; AT: aztreonam; IP: imipenem; MP: meropenem; ETP: ertapenem; DOR: doripenem; GM: gentamicina; TS: trimetoprim-sulfametoxazol.

### 004. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE UN AISLADO DE *ESCHERICHIA COLI* MULTIRRESISTENTE PORTADOR DE LOS GENES BLACTX-M-15, QEP A1 Y AAC(6')-IB-CR EN MÉXICO

R. del C. Rocha<sup>1</sup>, E. Ruiz<sup>2</sup>, S. Romero<sup>3</sup>, P. Lozano<sup>1</sup>, S. Somalo<sup>2</sup>, J.M. Palacios<sup>4</sup>, P. Caballero<sup>5</sup> y C. Torres<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Puebla. México. <sup>2</sup>Área Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Rioja. Logroño. España. <sup>3</sup>Biomedicina. BUAP. Puebla, México.

<sup>4</sup>Hospital Universitario, BUAP. Puebla. México. <sup>5</sup>Laboratorio de Análisis Clínicos Ehrlich. Puebla. México.

**Introducción:** Existen tres mecanismos de tipo plasmídico implicados en la resistencia a quinolonas y que están mediados por los genes *qnr*, *aac*(6')-lb-cr y *qepA*. El objetivo del trabajo fue realizar la caracterización de los mecanismos de resistencia a quinolonas y a otros antibióticos en una cepa de *E. coli* con fenotipo multirresistente.

**Material y métodos:** *E. coli* C1550 fue aislada en una muestra de heces, con características normales, de una paciente ambulatoria de 50 años en Puebla (México), con sintomatología de inflamación abdominal, y con diagnóstico de probable colitis o infección gastrointestinal. Dicha cepa presentó resistencia a ampicilina, amoxicilina-clavulánico, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, ácido nalidixico (NAL), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV), trimethoprim/sulfametoazol, y tobramicina. Las CMIs para NAL, CIP y LEV fueron de > 1024, > 128 y 32  $\mu$ g/ml, respectivamente. Se observó la producción de beta-lactamasas de espectro-extendido mediante el test del doble disco. Se estudió la presencia de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac*(6')-lb-cr, *aac*(3)-II, *dfr2d* y *rmtB*, así como los posibles cambios aminoacídicos en *GyrA* y *ParC*, mediante PCR y secuenciación. Se analizó la presencia de integrones de clase 1 y de clase 2 y sus genes cassettes de resistencia, mediante PCR y secuenciación. Se estudió el grupo filogenético por PCR y el tipado molecular mediante MLST.

**Resultados:** *E. coli* C1550 contenía los genes *qepA1*, *aac*(6')-lb-cr, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1b</sub>, *aac*(3)-II y *dfr2d*, estando los dos primeros asociados con la resistencia plasmídica a quinolonas. Esta cepa pertenece al grupo filogenético D y al tipo ST205. En el estudio de integrones se ha detectado el gen *intI1* aunque la cepa carece de la región *qacEΔ-sul1* propia de la región conservada 3'de integrones de clase 1. Asimismo contiene un integrón de clase 2 con los genes cassettes *dfrA1*, *sat2* y *aadA1*. Se detectaron mutaciones en las posiciones +22, +26, +27 y +32 del promotor de *ampC*.

**Conclusiones:** Las cepas fecales de *E. coli* constituyen un reservorio de genes de resistencia para múltiples antibióticos, en algunos casos incluidos en integrones, destacando en la cepa estudiada la coexistencia de los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *qepA*, *aac*(6')-lb-cr y *aac*(3)-II, relacionados con la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, quinolonas y aminoglucósidos. Ésta es la primera vez que se detecta el gen *qepA* en México y también en Latinoamérica.

### 005. ENTORNO GENÉTICO DE LOS GENES SUL EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* DE HEMOCULTIVOS

L. Vinué<sup>1</sup>, Y. Sáenz<sup>2</sup>, S. Somalo<sup>1</sup>, B. Rojo-Bezares<sup>2</sup>, M. Zarazaga<sup>1</sup>, F. Ruiz-Larrea<sup>1</sup> y C. Torres<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Rioja.

<sup>2</sup>Unidad Microbiología Molecular. Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR). Logroño.

**Introducción:** Los genes implicados en la resistencia a sulfamidas (SUL<sup>R</sup>) pueden ser transferidos por integrones, transposones o plásmidos, facilitando su diseminación entre bacterias. El objetivo fue determinar la prevalencia de SUL<sup>R</sup> y la distribución de los genes *sul* en cepas de *E. coli* de origen hospitalario.

**Material y métodos:** 135 aislados de *E. coli* de hemocultivos de diferentes pacientes del Hospital San Pedro, Logroño, fueron recogidos durante 2007. Se estudió la sensibilidad a 16 antimicrobianos por el método de disco-placa. Se determinó por PCR la presencia de genes *sul1*, *sul2* y *sul3* en las cepas SUL<sup>R</sup> y sus entornos genéticos mediante PCR y secuenciación.

**Resultados:** Los porcentajes de resistencia a antimicrobianos encontrados fueron los siguientes (%): ampicilina (55), cefotaxima (8), amoxicilina-ácido clavulánico (7), ceftazidima (3), cefoxitina (2), aztreonam (5), imipenem (0), ácido nalidixico (40), ciprofloxacina (29), sulfamidas (53), gentamicina (15), kanamicina (14), estreptomicina (47), tetraciclina (36), trimetoprim-sulfametoazol (36) y cloranfenicol (11). De las 71 cepas SUL<sup>R</sup>, 22 presentaban el gen *sul1*, 17 *sul1+sul2*, 3 *sul1+sul3*, 17 *sul2*, 1 *sul2+sul3* y 3 *sul3*. En 36 cepas *sul1*-positivas, se detectó dicho gen asociado a integrones de clase 1 con las siguientes organizaciones (n.º cepas): *dfrA12-orfF-aadA2* (1), *aadB-aadA1-cmlA* (1), *dfrA17-aadA5* (10), *dfrA1-aadA1* (5), *dfrA15-aadA1* (1), *aadB-aadA1* (1), *dfrA17-aadA5/aadA* (1), *dfrA17* (2), *dfrA7* (1), *dfrA5* (1), *aadA* (9) y desconocidas (3). En 5 de las 7 cepas *sul3*-positivas, este gen se asoció a integrones de clase 1 no clásicos con estructuras: *dfrA12-orfF-aadA2-cmlA-aadA1-qacH-IS440-sul3* (2), *estX-psp-aadA2-cmlA-aadA1-qacH-IS440-sul3* (2), *dfrA12-orfF-aadA2-cmlA-aadA1-qacH-IS440-IS10-sul3* (1), esta última incluida en el GenBank con el número de acceso FJ587511. Veintiocho de las 35 cepas *sul2*-positivas presentaron dicho gen asociado con genes de resistencia a estreptomicina, encontrando los siguientes entornos: *repC-sul2-strA-strB-IS26Δ-ISCR2* (10), *repC-sul2-strA-strB-IS26* (3), *repC-sul2-strA-strB* (5), *sul2-strA-strB-IS26Δ-ISCR2* (2), *sul2-strA-strB* (7), *sul2-strA-strBΔΔ-IS150-ΔstrB-ISCR2Δ-IS26* incluida en el GenBank con el número FJ705354.

**Conclusiones:** Se ha observado importante prevalencia de genes *sul*, encontrándose *sul1* como parte de la región conservada del integrón de clase 1, *sul2* con genes de resistencia a estreptomicina y *sul3* en la estructura de integrones no clásicos.

## 006. FENOTIPO DE MULTIRRESISTENCIA EN UNA CEPA DE *ESCHERICHIA COLI* ASOCIADO CON UNA MUTACIÓN EN SOXR QUE CONLLEVA A UNA FORMA TRUNCADA DE LA PROTEÍNA

A. Fabrega<sup>1</sup>, J.L. Rosner<sup>2</sup>, R.G. Martín<sup>2</sup>, M.M. Tavío<sup>3</sup> y J. Vila<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Clínic. <sup>2</sup>NIDDK. NIH.

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Clínicas. Microbiología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

**Introducción:** La multirresistencia en cepas de *Escherichia coli* puede estar asociada con la adquisición de distintos genes que codifican determinantes de resistencia o con la sobreexpresión de bombas de expulsión activa, siendo AcrAB/TolC la principal bomba detectada. Altos niveles de MarA o SoxS (factores de transcripción activadores) o la reducida expresión de AcrR (represor local) suelen detectarse como causa de su sobreproducción.

El principal objetivo de este estudio fue la caracterización de los mecanismos moleculares responsables del fenotipo de multirresistencia en una cepa de *E. coli*.

**Material y métodos:** Una cepa multiresistente de *E. coli* se seleccionó *in vitro* mediante pasos sucesivos a concentraciones crecientes de norfloxacina a partir de un aislado clínico sensible al antibiótico. Se realizó un estudio comparativo de la expresión génica mediante análisis de microarrays de ADNc entre ambas cepas. Los niveles de sensibilidad a norfloxacina, tetraciclina, cloranfenicol y ampicilina fueron evaluados mediante E-tests. La sobreexpresión de las proteínas AcrB y TolC se determinó utilizando anticuerpos específicos mediante un ensayo de Western Blot. Finalmente, se secuenció y analizó el fragmento *soxRS* en busca de mutaciones.

**Resultados:** Los estudios de sensibilidad en la cepa mutante revelaron la adquisición de niveles de resistencia frente a los agentes

antibacterianos evaluados. Los resultados obtenidos mediante microarrays indicaron una sobreproducción de SoxS en la cepa resistente ocho veces superior a la de la cepa sensible, además de un incremento en la expresión de AcrA y AcrB. Los resultados del Western Blot confirmaron la sobreproducción de AcrB y TolC en la cepa resistente. La secuenciación de la región *soxRS* reveló una inserción de dos adeninas en la posición 402 del gen *soxR* en la cepa resistente, lo que conlleva a la alteración de la pauta de lectura y a la aparición de un codón STOP prematuro. La proteína truncada resultante carece de los últimos 21 aminoácidos del extremo carboxiterminal.

**Conclusiones:** Previos trabajos han relacionado mutaciones en SoxR que conllevan a una proteína truncada pero permanentemente activa con la sobreexpresión de SoxS. En este caso, la sobreproducción de AcrAB/TolC en una cepa multirresistente aparece como resultado de una mutación en SoxR; sin embargo, éste sería el primer caso en el que una mutación de este tipo conlleva a la pérdida de tantos aminoácidos terminales y permite que la proteína siga siendo activa.

## 007. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A LA RIFAXIMINA “IN VITRO” EN MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÉNICAS Y ENTEROAGREGATIVAS

M.J. Pons<sup>1</sup>, L. Mensa<sup>1</sup>, J. Vila<sup>2</sup>, J. Gascón<sup>3</sup> y J. Ruiz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Salut Internacional (CRESIB). <sup>2</sup>Servei de Microbiología.

<sup>3</sup>Medicina Tropical. Hospital Clínic de Barcelona. Barcelona.

**Introducción:** Uno de los problemas más habituales a la hora de tratar una diarrea del viajero es la elevada tasa de resistencia a antimicrobianos que presentan las cepas, y la poca variedad de estos antibióticos. Por eso se ve la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, como podría ser la rifaximina (Rfx).

**Objetivo:** El objetivo principal del estudio era analizar la implicación de las bombas de expulsión y las mutaciones puntuales en el gen *rpoB* en la aparición de *Escherichia coli* resistentes a rifaximina (Rfx).

**Material y métodos:** Las cepas parentales de *E. coli* del estudio fueron aisladas en pacientes con diarrea del viajero en la unidad de Medicina tropical del Hospital Clínic de Barcelona. Concretamente 2 enterotoxigenicas y 2 enteroaggregativas. Se seleccionaron quince mutantes resistentes a rifaximina mediante siembra en medio que contenía Rfx. 1. bombas de expulsión- La susceptibilidad a la Rfx fue determinada por medio de dilución en agar, en presencia y ausencia de Phe-Arg-β-naphthylamide (PAβN), un inhibidor de bombas de expulsión. 2. La presencia de mutaciones en el gen *rpoB* fueron determinadas por técnica de PCR, amplificando un fragmento de 848pb, usando los primers y condiciones siguientes “5’-AAG CTC ATC GAT ATC CGT AAC G-3’ y “5’- GCT TAT CAG CAC GCA GAG TCG GAA-3”, 30 ciclos a 94 °C durante 30”, 60 °C durante 30” y 72 °C durante 30”, con una elongación final a 72 °C durante 10’). El producto de la PCR se purificó y secuenció siendo analizado con herramientas bioinformáticas con el fin de observar la existencia de mutaciones.

**Resultados:** Los resultados obtenidos muestran que los dos mecanismos (bombas de expulsión y mutaciones en el gen *rpoB*) están implicados en la resistencia adquirida a la Rfx en las cepas del estudio. Substituciones aminoacídicas en las posiciones 516 y 526 de la subunidad β de la RNA polimerasa, descritas previamente en resistencia a la rifampicina, son las sustituciones obtenidas en mayor número. Además, se han encontrado nuevos puntos de mutación no descritos anteriormente en las posiciones 512, 525 y 574. A pesar de ello, los resultados sugieren que algunas de ellas (512 y 525) no juegan un rol relevante en la adquisición de resistencia a la Rfx. Excepto en 4 cepas, la presencia de PAβN muestra un efecto inhibitorio, observando descensos en los valores de CMI a la Rfx de 4 a 16

Cepas	CMI inicial	Efecto inhibidor	Posición aminoácido	Cambio aminoácido
23.233 parental	16			
19.769 parental	16			
19.768 parental	32			
21.835 parental	4			
19.768-32*	128	8X		
19.768-64*	> 128	≥ 16X	526	H → N
19.768-128*	> 128		516	D → N
19.769-16*	> 128	≥ 16X	525	T → R
19.769-64*	> 128		516	D → N
19.769-32*	> 128	≥ 8X	525	T → R
19.769-128*	> 128	≥ 16X	512	S → F
21.835-16*	> 128	≥ 8X		
21.835-32*	> 128	≥ 4X	574	S → Y
21.835-64*	> 128		516	D → G
21.835-128*	> 128		526	H → L
23.233-16*	> 128	≥ 4X	516	D → G
23.233-32*	> 128	≥ 4X	516	D → G
23.233-64*	> 128	≥ 4X	516	D → N
23.233-128*	> 128	≥ 4X	516	D → G

\*Concentración del aminoácido donde se aislaron las cepas

X. En 6 mutantes la implicación de las bombas de expulsión podría explicar la resistencia total a la Rfx, mientras en 4 cepas esta se asocia a la presencia de mutaciones en el gen *rpoB*. En el resto de las cepas se detectaron los dos mecanismos de manera simultánea.

**Conclusiones:** La totalidad de las cepas presentan al menos un mecanismo de resistencia a la Rfx, mutaciones en el gen *rpoB* y bombas de expulsión inhibibles por PAβN, contribuyen a la resistencia de Rfx (ya sea de forma concomitante o no). El posible rol de otros mecanismos implicados que confieran resistencia a la Rfx, como por ejemplo la alteración en los niveles de expresión de las porinas, podría jugar un rol importante.

#### 008. ANÁLISIS MEDIANTE MICROARRAYS DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A CIPROFLOXACINO EN *ESCHERICHIA COLI*: DIFERENCIA ENTRE CEPAS PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE BLEE

O. Noguera<sup>1</sup>, S. Belda<sup>2</sup>, J.C. Rodríguez<sup>2</sup>, M. Candela<sup>2</sup>, N. López<sup>2</sup>, M. Ruiz<sup>2</sup>, L. Álvarez<sup>2</sup>, R. Cremades<sup>2</sup>, R. Ferrari<sup>2</sup>, E. López<sup>2</sup>, P. López<sup>2</sup> y G. Royo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Vega Baja. Orihuela. Alicante.

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología. Universidad Miguel Hernández. Hospital General Universitario de Elche. Elche. Alicante.

**Objetivos:** Se ha descrito que el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino en aislados clínicos de *Escherichia coli* productoras de BLEE es mucho mayor que en no productoras de esta enzima. Pretendemos caracterizar genéticamente este fenómeno mediante el análisis de la expresión del genoma completo de este microorganismo

**Material y métodos:** 1. Se analizaron dos cepas de *Escherichia coli* resistentes a ciprofloxacino, una de ellas productora de BLEE (CTX-9). 2. Extracción del RNA y realización de los microarrays: Cada cepa se cultivó en un medio con antibióticos y otro con 1 ug/ml de ciprofloxacino. Tras incubación de 8 h, se centrifugaron los tubos y las bacterias recogidas en el sedimento se introdujeron en nitrógeno líquido para preservar el RNA sintetizado por las bacterias en cada situación. Tras la extracción del RNA, se puso en contacto con microarrays que presentan sondas representativas de todo el genoma de este microorganismo (Affymetrix, USA).

**Resultados:** Se consideró que había una variación significativa en la expresión génica si el *signal-low-ratio* (SLR) era  $\geq 2$  en valores absolutos, o sea, que el gen se sobreexpresa o reprime 4 veces. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Genes	Productoras del BLEE (MSA/MC)	No productoras de BLEE (MSA/MC)
Sobreexpresados	886 (8,81%)	438 (4,35%)
Sobreexpresados SLR $\geq 2$	25 (0,24%)	9 (0,08%)
Reprimidos	1.361 (13,53%)	628 (6,24%)
Reprimidos SLR $\geq 2$	108 (1,07%)	29 (0,28%)
Sin cambios	7.805 (77,64%)	8.986 (89,39%)
N	10.052	10.052

**Conclusiones:** En las cepas productoras de BLEE se sobreexpresan o reprimen más genes que las cepas no productoras de este enzima (143 genes frente a 38), lo que puede estar relacionado con la puesta en marcha de sistemas diferentes para que la bacteria pueda sobrevivir en presencia de ciprofloxacino. Con objeto de conocer mejor estos sistemas, hay que caracterizar los genes implicados y confirmar su importancia mediante el estudio de más cepas y mediante la utilización de RT-PCR.

#### 009. PRODUCCIÓN DE BETALACTAMAS TIPO AMPC EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) RESISTENTES A CEFOTAXIMA

J. Calvo<sup>1</sup>, M.E. Cano<sup>1</sup>, J. Agüero<sup>1,2</sup>, A. Galar<sup>3</sup> y L. Martínez-Martínez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. <sup>2</sup>Departamento Microbiología Molecular. Universidad de Cantabria. <sup>3</sup>Servicio de Microbiología. Clínica Universidad de Navarra.

**Introducción:** Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE son sensibles a cefotaxima (FOX) cuando no existen otros mecanismos de resistencia, entre los que se incluyen la hiperproducción de la AmpC cromosómica y la producción de una cefamicinasa plasmídica (pAmpC). El papel de las porinas y de las bombas de expulsión activa en esta resistencia no está suficientemente aclarado. El objetivo de este estudio fue evaluar la importancia de la producción de pAmpC para explicar el fenotipo de cepas de *E. coli* productoras de BLEE resistentes a FOX (FOX-R).

**Material y métodos:** Se han estudiado las cepas de *E. coli* productoras de BLEE y FOX-R aisladas en nuestro centro entre Junio 2005 y Enero 2008. La identificación de *E. coli* y la determinación de la resistencia a FOX y de la producción de BLEE se realizaron inicialmente con el sistema WalkAway (MicroScan; Siemens); la producción de BLEE se confirmó mediante lectura interpretada del antibiograma y difusión con disco [normas CLSI, más discos (Oxoid) de cefepima con o sin ácido clavulánico]. Se determinó la CMI de FOX y cefotetan (CTT) por Etest en Mueller-Hinton sin suplementar o suplementado con cloxacilina (CLOX, 250 mg/l) o con ácido fenil-borónico (AphB, 300 mg/l). Se identificaron las BLEEs mediante amplificación por PCR de genes que codifican enzimas TEM, SHV y CTX-M y secuenciación de los amplicones. La presencia de pAmpC se determinó mediante PCR multiplex. La relación clonal de las cepas se estableció por Rep-PCR.

**Resultados:** Durante el período de estudio se identificaron 25 cepas de *E. coli* BLEE FOX-R (CMI: 32-> 256 mg/l), correspondientes a 14 patrones Rep-PCR. Los discos de CTX, CAZ y FEP con/sin ácido clavulánico permitieron inferir la producción de BLEE (aumento del diámetro del halo en al menos 5 mm cuando contienen el inhibidor) en 15, 5 y 18 de las 25 cepas. Las BLEEs producidas fueron: CTX-M del grupo 9 (n = 18), CTX-M del grupo 1 (n = 3), SHV-12 (n = 3) y 1 SHV-2 (n = 1). Sólo se identificaron pAmpC en 5 cepas, que producían pAmpC del grupo CIT (de ellas 4 con CTX-M-Grupo 9; 1 con SHV-12). Las CMIs (mg/l) de CTT fueron: < = 16 (n = 20); 32 (n = 2) ó > = 64 (n = 3). En presencia de CLOX las CMIs de FOX y de CTT se redujeron 8 ó más veces en 19 y 18 aislados, respectivamente. En presencia de AphB las CMIs de FOX y de CTT se redujeron al menos 8 veces en 9 y en 15 aislados.

**Conclusiones:** La resistencia a FOX dificulta el reconocimiento de la producción de BLEEs en *E. coli* mediante difusión con disco, resultando para ello más útiles los discos de FEP con/sin ácido clavulánico que los recomendados por el CLSI. En este estudio, la resistencia a FOX frecuentemente no se ha acompañado de resistencia a CTT. Aunque la disminución de las CMIs de FOX o de CTT en presencia de CLOX en 19 cepas sugiere la presencia de un enzima AmpC, sólo se ha detectado una variante plasmídica del enzima (grupo CIT) en una minoría de cepas.

## 010. PREVALENCIA DEL CLON O25B:H4-ST131 ENTRE *E. COLI* PRODUCTOR DE BLEE EN CUATRO HOSPITALES DE GALICIA

M.P. Alonso<sup>1,2</sup>, M. Blanco<sup>1</sup>, A. Mora<sup>1</sup>, R. Mamani<sup>1</sup>, C. López<sup>1</sup>, G. Dahbi<sup>1</sup>, J.E. Blanco<sup>1</sup>, B. Puentes<sup>1</sup>, A. Herrera<sup>1</sup>, F. García-Garrote<sup>2</sup>, B. Fernández<sup>3</sup>, J.A. Agulla<sup>4</sup>, G. Bou<sup>5</sup> y J. Blanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Referencia de *E. coli*. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultade de Veterinaria. Universidade de Santiago de Compostela. Lugo. <sup>2</sup>Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo. <sup>3</sup>Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Hospitalario de Ourense. <sup>4</sup>Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Hospitalario Arquitecto Marcide-Prof. Novoa Santos de El Ferrol. <sup>5</sup>Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Universitario Juan Canalejo. A Coruña.

**Introducción:** Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactams, pero no a las cefamicinas o los carbapenemes. En las décadas de los años 80 y 90 del siglo pasado predominaban las BLEEs de los tipos SHV y TEM, pero en la actualidad las más prevalentes son las de la familia CTX-M. Hasta hace poco se creía que las cepas productoras de BLEEs generalmente no estaban relacionadas clonalmente y que los plásmidos con los genes *bla* estaban presentes en un amplio abanico de cepas huésped pertenecientes a clones no relacionados. No obstante, recientemente se ha identificado el clon O25b:H4-ST131 productor de CTX-M-15 que tiene una amplia difusión a nivel mundial.

**Objetivos:** Como hemos observado que el clon O25b:H4-ST131 productor de CTX-M-15 estaba ampliamente introducido en el Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo (2006-2007), decidimos estudiar su prevalencia en otros 3 hospitales de Galicia para ver si también estaban afectados y comparar las características de las cepas aisladas en los distintos hospitales.

**Materiales y métodos:** Se estudiaron 318 aislados de *E. coli* productores de BLEEs obtenidos en el año 2008 de pacientes internos y externos del Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo (n = 76), Complexo Hospitalario de Ourense (n = 100), Complexo Hospitalario Arquitecto Marcide-Prof. Novoa Santos de Ferrol (n = 79), y Complexo Universitario Juan Canalejo de A Coruña (n = 63). La mayoría de las cepas procedían de urocultivos. La detección del clon O25b:H4-ST131 productor de CTX-M-15 se realizó por una PCR múltiple desarrollada por el LREC y basada en la detección de los genes: *rfbO25b*, *blaCTX-M-15* gene 3'end y operon *afa* FM955459. El tipo de BLEE producido se determinó por PCR y secuenciación del genoma amplificado. También por PCR se determinaron los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) y los genes de virulencia (*papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *hlyA*, *cnf1*, *iucD*, *neuC*, *ibeA*). El tipado molecular se realizó por la técnica de electroforesis en campos pulsantes (PFGE) con el enzima *Xba*I y los perfiles obtenidos se compararon con el programa BioNumerics. Se empleó la técnica de *multi-locus sequence typing* (MLST) para el tipado de los siete genes altamente conservados: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*. Los MLST tipos se obtuvieron en la página MLST Databases at the ERI, University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). El serotipado de las cepas se realizó empleando todos los antisueros O (O1 a O185) y H (H1 a H56).

**Resultados:** Un total de 50 (16%) de los 318 aislados estudiados perteneció al clon O25b:H4-ST131. La prevalencia varió mucho entre los cuatro hospitales estudiados, siendo mucho más alta en Lugo (33%) y Ourense (17%) que en Ferrol (6%) y A Coruña (5%). La mayoría de los aislados del clon fueron productores de CTX-M-15, pero también se encontraron aislados CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14 y CTX-M-32. Casi todas las cepas CTX-M-15 positivas presentaron el operon *afa* FM955459 y se englobaron dentro del mismo PFGE-cluster (> 85% de identidad).

**Conclusiones:** El clon O25b:H4-ST131 productor de CTX-M-15 se ha detectado en los 4 hospitales gallegos examinados. No obstante, su prevalencia varía significativamente entre los distintos hospitales.

## 011. IDENTIFICACIÓN DEL CLON DE *E. COLI* O20-ST354 PRODUCTOR DE CTX-M-14

A. Mora<sup>1</sup>, M. Blanco<sup>1</sup>, C. López<sup>1</sup>, R. Mamani<sup>1</sup>, J.E. Blanco<sup>1</sup>, G. Dahbi<sup>1</sup>, B. Puentes<sup>1</sup>, A. Herrera<sup>1</sup>, A. Cordero<sup>1</sup>, F. García-Garrote<sup>2</sup>, J.M. Pita<sup>2</sup>, A. Coira<sup>2</sup>, M.P. Alonso<sup>1,2</sup> y J. Blanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC). Departamento de Microbiología e Parasitología. Facultade de Veterinaria. Universidade de Santiago de Compostela. Lugo. <sup>2</sup>Unidade de Microbiología Clínica. Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo (SERGAS).

**Introducción:** La aparición de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ha dificultado enormemente el tratamiento de numerosas infecciones. Inicialmente se ha producido una rápida expansión de las BLEE de los tipos SHV y TEM, pero en la actualidad predominan las CTX-M. Los primeros estudios indicaban una usencia de clonalidad entre las cepas productoras de los distintos tipos de BLEE, pero recientemente se ha identificado el clon O25b:H4-ST131 productor de CTX-M-15 que tiene una amplia difusión a nivel mundial. Además, se han identificado dos clones (O25b:H4-ST131 y O86:H18-ST38) productores de CTX-M-14 expandidos por varias regiones de Japón.

**Objetivos:** Como en el Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo predomina entre los aislados productores de BLEEs el enzima CTX-M-14, hemos decidido estudiar la clonalidad de las cepas que producen este enzima con el objetivo de identificar la posible existencia de nuevos clones.

**Materiales y métodos:** Se estudiaron 325 aislados de *E. coli* productores de BLEEs obtenidos entre los años 2006 y 2008 de pacientes internos y externos del Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo. La mayoría de las cepas procedían de urocultivos. El tipo de BLEE producido se determinó por PCR y secuenciación del genoma amplificado. También por PCR se determinaron los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) y los genes de virulencia (*papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *hlyA*, *cnf1*, *iucD*, *neuC*, *ibeA*). El tipado molecular se realizó por la técnica de electroforesis en campos pulsantes (PFGE) con el enzima *Xba*I y los perfiles obtenidos se compararon con el programa BioNumerics. Se empleó la técnica de *multi-locus sequence typing* (MLST) para el tipado de los siete genes altamente conservados: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*. Los MLST tipos se obtuvieron en la página MLST Databases at the ERI, University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). El serotipado de las cepas se realizó empleando todos los antisueros O (O1 a O185) y H (H1 a H56).

**Resultados:** Los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 pertenecieron a una amplísima gama de serotipos O:H diferentes. Por PFGE se comprobó que presentan una enorme diversidad genética y que la mayoría de las cepas no estaban clonalmente relacionadas. No obstante, se han identificado varios clones que poseen genes de virulencia de *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) que por el momento no están ampliamente difundidos en nuestro hospital. En esta comunicación mostramos los resultados de la caracterización

del clon O20-ST354 perteneciente al grupo filogenético D y con los genes de virulencia *ibeA* e *iucD*. Los 9 aislados detectados se englobaron por PFGE en dos clusters (IA y IB) con un 77% de identidad. En el cluster IA (80% identidad) se englobaron 6 aislados del serotipo O20:H34, mientras que en el cluster IB (96% identidad) se englobaron 3 cepas O20:HNM (no móviles). Los 9 aislados del clon O20-ST354 productores de CTX-M-14 presentaron únicamente un 49% de identidad con dos aislados del clon O20:HNM-ST156 productores de TEM y CTX-M-1 que poseían únicamente el gen de virulencia *iucD*.

**Conclusiones:** Según nuestro conocimiento se identifica por primera vez a nivel mundial el clon de ExPEC O20-ST354 productor de CTX-M-14.

## 012. IDENTIFICACIÓN DE DOS CLONES DE E. COLI O1-D PRODUCTORES DE CTX-M-14

C. López<sup>1</sup>, M. Blanco<sup>1</sup>, A. Mora<sup>1</sup>, R. Mamani<sup>1</sup>, G. Dahbi<sup>1</sup>, J.E. Blanco<sup>1</sup>, B. Puentes<sup>1</sup>, A. Herrera<sup>1</sup>, M.P. Alonso<sup>1,2</sup>, F. García-Garrote<sup>2</sup>, B. Fernández<sup>3</sup>, J.A. Agulla<sup>4</sup>, G. Bou<sup>5</sup> y J. Blanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Referencia de E. coli (LREC). Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultade de Veterinaria. Universidade de Santiago de Compostela. Lugo. <sup>2</sup>Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo. <sup>3</sup>Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Hospitalario de Ourense. <sup>4</sup>Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Hospitalario Arquitecto Marcide-Prof. Novoa Santos de El Ferrol. <sup>5</sup> Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Universitario Juan Canalejo. A Coruña.

**Introducción:** La aparición de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ha dificultado enormemente el tratamiento de numerosas infecciones. Inicialmente se ha producido una rápida expansión de las BLEE de los tipos SHV y TEM, pero en la actualidad predominan las CTX-M. Los primeros estudios indicaban una usencia de clonalidad entre las cepas productoras de los distintos tipos de BLEE, pero recientemente se ha identificado el clon O25b:H4-ST131 productor de CTX-M-15 que tiene una amplia difusión a nivel mundial. Además, se han identificado dos clones (O25b:H4-ST131 y O86:H18-ST38) productores de CTX-M-14 expandidos por varias regiones de Japón.

**Objetivos:** Como entre los aislados de *E. coli* productores de BLEE obtenidos en los hospitales de Galicia predomina el enzima CTX-M-14, hemos decidido estudiar la clonalidad de las cepas que producen este enzima con el objetivo de identificar la posible existencia de nuevos clones.

**Materiales y métodos:** El tipo de BLEE producido se determinó por PCR y secuenciación del genoma amplificado. También por PCR se determinaron los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) y los genes de virulencia (*papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *hlyA*, *cnf1*, *iucD*, *neuC*, *ibeA*). El tipado molecular se realizó por la técnica de electroforesis en campos pulsantes (PFGE) con el enzima *Xba*I y los perfiles obtenidos se compararon con el programa BioNumerics. Se empleó la técnica de multi-locus sequence typing (MLST) para el tipado de los 7 genes altamente conservados: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*. Los MLST tipos los obtenemos en la página MLST Databases at the ERI, University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). El serotipado de las cepas se realizó empleando todos los antisueros O (O1 a O185) y H (H1 a H56).

**Resultados:** Los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 pertenecieron a una amplísima gama de serotipos O:H diferentes. Por PFGE se comprobó que presentan una enorme diversidad genética y que la mayoría de las cepas no estaban clonalmente relacionadas. No obstante, se han identificado varios clones que poseen genes de virulencia de *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) que por el momento no están ampliamente difundidos. En esta comunicación

mostramos los resultados de la caracterización 14 aislados productores de CTX-M-14 pertenecientes al serogrupo O1 y al grupo filogenético D. Los 14 aislados se englobaron en cuatro clusters por PFGE. Tres de los clusters (IA, IB, IC) presentaron un 76% de identidad entre ellos y únicamente un 57% con el cluster II. Los 11 aislados englobados en los clusters IA, IB y IC presentaron el serotipo O1:HNM y los genes de virulencia *papC*, *neuC-K1* e *iucD*. En contraste, los 3 aislados del cluster II tenían el serotipo O1:H34 y los genes *iucD* e *ibeA*. En el momento de redactar este resumen estamos pendientes de los resultados del tipo de MLST de los aislados que se presentarán en el congreso. Los aislados de los clusters IA, IB y IC se encontraron en los cuatro hospitales participantes, mientras que los del cluster II únicamente se encontraron en el Hospital de A Coruña.

**Conclusiones:** Según nuestro conocimiento se identifica por primera vez a nivel mundial dos clones de ExPEC del serogrupo O1 y del grupo filogenético D productores de CTX-M-14.

## 013. IDENTIFICACIÓN DEL CLON DE E. COLI O1-D PRODUCTOR DE CTX-M-14

R. Mamani<sup>1</sup>, M. Blanco<sup>1</sup>, A. Mora<sup>1</sup>, C. López<sup>1</sup>, J.E. Blanco<sup>1</sup>, G. Dahbi<sup>1</sup>, B. Puentes<sup>1</sup>, A. Herrera<sup>1</sup>, A. Cordero<sup>1</sup>, F. García-Garrote<sup>2</sup>, J.M. Pita<sup>2</sup>, A. Coira<sup>2</sup>, M.P. Alonso<sup>1,2</sup> y J. Blanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Referencia de E. coli (LREC). Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultade de Veterinaria. Universidade de Santiago de Compostela. Lugo. <sup>2</sup>Unidad de Microbiología Clínica. Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo (SERGAS).

**Introducción:** La aparición de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ha dificultado enormemente el tratamiento de numerosas infecciones. Inicialmente se ha producido una rápida expansión de las BLEEs de los tipos SHV y TEM, pero en la actualidad predominan las CTX-M. Los primeros estudios indicaban una usencia de clonalidad entre las cepas productoras de los distintos tipos de BLEEs, pero recientemente se ha identificado el clon O25b:H4-ST131 productor de CTX-M-15 que tiene una amplia difusión a nivel mundial. Además, se han identificado dos clones (O25b:H4-ST131 y O86:H18-ST38) productores de CTX-M-14 expandidos por varias regiones de Japón.

**Objetivos:** Como en el Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo predomina entre los aislados productores de BLEE el enzima CTX-M-14, hemos decidido estudiar la clonalidad de las cepas que producen este enzima con el objetivo de identificar la posible existencia de nuevos clones.

**Materiales y métodos:** Se estudiaron 325 aislados de *E. coli* productores de BLEE obtenidos entre los años 2006 y 2008 de pacientes internos y externos del Complejo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo. La mayoría de las cepas procedían de urocultivos. El tipo de BLEE producido se determinó por PCR y secuenciación del genoma amplificado. También por PCR se determinaron los grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) y los genes de virulencia (*papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *hlyA*, *cnf1*, *iucD*, *neuC*, *ibeA*). El tipado molecular se realizó por la técnica de electroforesis en campos pulsantes (PFGE) con el enzima *Xba*I y los perfiles obtenidos se compararon con el programa BioNumerics. Se empleó la técnica de multi-locus sequence typing (MLST) para el tipado de los 7 genes altamente conservados: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*. Los MLST tipos se obtuvieron en la página MLST Databases at the ERI, University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). El serotipado de las cepas se realizó empleando todos los antisueros O (O1 a O185) y H (H1 a H56).

**Resultados:** Los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 pertenecieron a una amplísima gama de serotipos O:H diferentes. Por PFGE se comprobó que presentan una enorme diversidad genética

y que la mayoría de las cepas no estaban clonalmente relacionadas. No obstante, se han identificado varios clones que poseen genes de virulencia de *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) que por el momento no están ampliamente difundidos en nuestro hospital. En esta comunicación mostramos los resultados de la caracterización del clon ONT del grupo filogenético B1 y con los genes de virulencia *papC* y *sfa/focDE*. Los 6 aislados detectados se englobaron por PFGE dentro del mismo cluster (> 85% de identidad). En el momento de redactar este resumen estamos pendientes de los resultados del tipo de MLST de los aislados que se presentarán en el congreso.

**Conclusiones:** Segundo nuestro conocimiento se identifica por primera vez a nivel mundial el clon de ExPEC ONT-B1 productor de CTX-M-14.

#### 014. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *E. COLI* PRODUCTORA DE BLEE DE LOS GRUPOS CTX-M-9, CTX-M-1 Y SHV (ESTUDIO GEIH-BLEE 2006)

M. Díaz<sup>1,3,5</sup>, J.R. Hernández<sup>1,3,5</sup>, J. Calvo<sup>2,3</sup>, L. Martínez-Martínez<sup>2,3</sup>, J. Rodríguez-Baño<sup>1,4</sup> y A. Pascual<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. <sup>2</sup>Hospital Marqués de Valdecilla. Santander. <sup>3</sup>Servicio de Microbiología. <sup>4</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas. <sup>5</sup>Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla.

**Introducción:** Las infecciones debidas a *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son un problema emergente. Las enzimas que se observan con más frecuencia pertenecen a la familia CTX-M seguidas de SHV. La epidemiología de estas infecciones es compleja.

**Objetivos:** Comparar las características clínico-epidemiológicas de pacientes con infección por *E. coli* BLEE en función de que contengan enzimas de los grupos CTX-M-9, CTX-M-1 o SHV.

**Material y método:** Se seleccionaron 249 aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE de los grupos CTX-M-9, CTX-M-1 y SHV de un estudio nacional en el que participaron 44 centros españoles en el año 2006 (Estudio GEIH-BLEE 2006). La caracterización de las BLEE se realizó por PCR y posterior secuenciación. Se recogieron datos demográficos, existencia de enfermedad de base, antibioterapia previa, presencia de sonda urinaria, localización de la infección, lugar de adquisición, relación con la asistencia sanitaria y necesidad de ingreso hospitalario, y se compararon en función de los distintos grupos de BLEE. Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SPSS.

**Resultados:** De los 249 aislados productores de BLEE seleccionados, 131 (52,6%) producían enzimas del grupo CTX-M-9, 55 (22,0%) del grupo CTX-M-1 y 63 (25,4%) del grupo SHV. El número total de datos analizados de cada grupo fue similar, descartando un sesgo de selección. Entre los datos comparados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, salvo las siguientes: el 67% de los pacientes con infección por *E. coli* BLEE del grupo CTX-M-9 fueron mujeres frente al 51% de los infectados por *E. coli* productor de CTX-M-1 ( $p < 0,05$ ); el 24% y el 39% ( $p < 0,05$ ) de los pacientes del grupo CTX-M-9 y CTX-M-1, respectivamente, eran portadores de sonda urinaria; el 9% de los pacientes con infección por cepas del grupo SHV eran menores de un año frente al 0% ( $p < 0,05$ ) de los infectados por *E. coli* productor de CTX-M-9; el 25% de los pacientes con infección por *E. coli* BLEE tipo CTX-M-9 tenían diabetes frente al 9% de los del grupo SHV ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** Se han encontrado escasas diferencias estadísticamente significativas en las características clínico-epidemiológicas de las infecciones causadas por *E. coli* BLEE del grupo CTX-M-9 compa-

radas con las infecciones causadas por las del grupo SHV. Las infecciones producidas por cepas del grupo CTX-M-1 se asocian con mayor frecuencia que las del grupo CTX-M-9 al sexo masculino y presencia de sonda urinaria.

#### 015. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS CLÍNICAS DE *SALMONELLA ENTERICA* CON RESISTENCIA A AMOXICILINA-ÁCIDO CLAVULÁNICO O A CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN

M. de Toro<sup>1,2</sup>, Y. Saenz<sup>1</sup>, B. Rojo-Bezares<sup>1</sup>, I. Riaño<sup>2</sup>, E. Undabeitia<sup>3</sup>, M. García-Campello<sup>4</sup>, M. Lantero<sup>5</sup>, C. Aspiroz<sup>6</sup> y C. Torres<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unidad Microbiología Molecular. Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR). <sup>2</sup>Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Rioja. <sup>3</sup>Laboratorio de Microbiología. Hospital San Pedro. Logroño.

<sup>4</sup>Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Pontevedra. <sup>5</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Central Asturias. Oviedo.

<sup>6</sup>Laboratorio de Microbiología. Hospital Royo Villanova. Zaragoza.

**Introducción:** *Salmonella enterica* es un patógeno zoonótico implicado en infecciones gastrointestinales en humanos. En los últimos años se observa la emergencia de cepas con resistencia a beta-lactámicos (entre ellos, amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) y cefalosporinas de tercera generación), así como de estructuras genéticas de tipo integrones.

**Material y métodos:** Se estudiaron 28 cepas de *S. enterica* [serovares *typhimurium* (24), *enteritidis* (1) y *Salmonella* spp. (3)] resistentes o con resistencia intermedia a AMC (AMC<sup>IR</sup>, 25 cepas) o a cefalosporinas de tercera generación (C3G<sup>R</sup>, 3 cepas), obtenidas de muestras fecales de pacientes de cuatro hospitales españoles. Se estudió la sensibilidad a 19 antimicrobianos por difusión en agar y la producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante el test de doble disco. La presencia de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>C<sub>M</sub>Y</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>PSE</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> y los entornos genéticos del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, así como la detección y caracterización de integrones tipo 1, 2 y 3 se analizaron mediante PCR y secuenciación.

**Resultados:** Las 3 cepas C3G<sup>R</sup> exhibieron un fenotipo BLEE-positivo detectándose en dos de ellas los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> y en una cepa se observó la presencia de los genes *bla*<sub>OXA-1</sub>, *tet*(A) y un integrón de tipo 1 (región variable, RV, 2000pb). El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se encontró en el entorno genético de *ISEcp1* y *orf477* en ambas cepas. En la tercera *S. enterica* productora de BLEE se detectó el gen *bla*<sub>SHV-12</sub> y la presencia de un integrón de tipo 1 (RV, 1000pb). Las 25 cepas AMC<sup>IR</sup> presentaron un fenotipo BLEE-negativo y albergaban los genes *bla*<sub>PSE</sub> (14 cepas), *bla*<sub>OXA</sub> (7), *bla*<sub>TEM</sub> (5), y *bla*<sub>C<sub>M</sub>Y</sub> (2). Se detectó integrasa de tipo 1 en 22 cepas AMC<sup>IR</sup> (88%), destacando que las 14 cepas *bla*<sub>PSE</sub>-positivas incluían este gen en su región variable asociado, a su vez, a otro integrón con el gen *aadA*, estructura característica de la isla genómica SG11. Se observó que una de las cepas C3G<sup>R</sup> (33%) y 22 de las AMC<sup>IR</sup> (88%) presentaban fenotipo de multirresistencia (al menos a cuatro familias de antimicrobianos).

**Conclusiones:** La producción de BLEE es un mecanismo emergente en *S. enterica* y es de destacar la detección de CTX-M-15 en dos de las cepas. Diferentes beta-lactamasas pueden estar involucradas en el fenotipo AMC<sup>IR</sup>, destacando la frecuente detección de la enzima PSE entre nuestras cepas.