

Sesión 12:

Mecanismos de resistencia en bacilos gramnegativos no fermentadores

166. DETECCIÓN DE LA NUEVA BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO OXA-143 EN UNA CEPHA MULTIRRESISTENTE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

X. Mulet¹, C. Juan^{1,2}, L. Zamorano¹, S. Albertí^{1,2}, J.L. Pérez¹
y A. Oliver^{1,2}

¹Servicio de Microbiología. Hospital Son Dureta. ²Área de Microbiología. Universitat de les Illes Balears (UIB). Institut Universitari en Ciències de la Salut (IUNICS). Palma de Mallorca.

Objetivo: Caracterizar una nueva variante de β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) tipo OXA en dos aislados de *P. aeruginosa* con resistencia de alto nivel a ceftazidima (CAZ) y imipenem (IMP), resistencia moderada a cefepima (FEP), aztreonam (ATM) y piperacilina (PIP), y sensibilidad a piperacilina-tazobactam (PIP-TZ), detectados en la UCI pediátrica de un hospital de Mallorca entre junio y julio de 2008.

Material y métodos: Se utilizó el ensayo de sinergia de doble disco como técnica de cribado para la detección de BLEE. Se llevaron a cabo PCR y secuenciación con cebadores específicos para los grupos más comunes de BLEE: OXA, PER, CTX-M, SHV, y TEM. Se estudió la relación clonal mediante electroforesis de campo pulsante (ECP). Para evaluar la codificación plasmídica se realizaron ensayos de electroporación en PAO1. Para determinar la presencia de la BLEE en un integrón se llevaron a cabo PCR específicas seguidas de secuenciación para el gen de la integrasa (*intI1*), definitoria de los integrones de clase I.

Resultados: Los aislados productores de BLEE se obtuvieron de una biopsia pulmonar y de un exudado cutáneo (entrada de gastrostomía), procedentes de dos pacientes ingresados en la UCI pediátrica en el mismo periodo. Ambos aislados presentaron el mismo patrón de multirresistencia, siendo además resistentes a todos los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), y mostraron idéntico patrón de ECP, perteneciendo por tanto al mismo clon. Los resultados de la secuenciación mostraron la presencia de una nueva variante (Asn148Asp) de OXA-2, designada OXA-143. El gen *bla*_{OXA-143}, así como el patrón de resistencia a β -lactámicos (con la excepción del IMP) y aminoglucósidos, pudo ser transferido a PAO1 mediante electroporación, demostrando su codificación plasmídica. Asimismo, se demostró por PCR la presencia del gen *bla*_{OXA-143} en un integrón de clase I.

Conclusión: A falta de estudios bioquímicos, la OXA-143 aparentemente confiere resistencia de alto nivel a CAZ y resistencia moderada a PIP, FEP, y ATM. La codificación plasmídica de estas BLEE tipo OXA, junto con determinantes de resistencia a aminoglucósidos, supone una importante amenaza clínico-epidemiológica emergente en España que debe ser vigilada activamente.

167. BROTE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BLAVIM-2 EN BARCELONA. EFICACIA DE IMI/IMI-EDTA EN DISCO PLACA PARA SU DETECCIÓN

M. Lowak, A. Bas, N. Loaiza, S. Lavilla, J.J. González-López,
M.N. Larrosa y R.M. Bartolomé

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

La colonización o infección por *P. aeruginosa* productora de metabetalactamasa (MBL) positiva conlleva un alto riesgo de morbilidad añadida para el paciente debido a la alta virulencia del microorganismo y a las limitaciones del tratamiento antibiótico. En los últimos cuatro años se han publicado a nivel mundial 6 brotes hos-

pitalarios producidos por *P. aeruginosa* productoras de MBL, uno de ellos en España.

Objetivo: Determinar la presencia de MBL en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona entre 16 Agosto 2004 y 03 Enero 2007 y evaluar el rendimiento de la técnica de disco-difusión mediante los discos IMI/IMI-EDTA (Rosco).

Material y métodos: En todos los aislados en cuyo antibiograma se observó una disminución del halo de inhibición frente al imipenem y/o meropenem, una alteración en el borde de dichos halos y/o disminución de la sensibilidad a las cefalosporinas de 3.^a generación con la actividad del aztreonam conservada. Se realizó el cribaje fenotípico y considerándose positivo en aquellos casos en que existía una diferencia $> = 5$ mm entre el halo del disco de IMI y el de IMI + EDTA (Rosco). El estudio genotípico se realizó mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. En caso de positividad a *bla*_{VIM} se llevó a cabo la secuenciación del amplificado. También se estudió la clonalidad de las cepas positivas mediante PFGE.

Resultados: Entre Agosto 2004 y Enero 2007 se detectaron 274 cepas de *P. aeruginosa* fenotípicamente compatibles con MBL de las cuales 20 mostraron por secuenciación la presencia de *bla*_{VIM}. Mediante PFGE de detectó un clon compuesto por 7 aislados de 5 pacientes que había causado un brote en la UCI entre Abril y Octubre de 2006. El estudio genotípico de las cepas con una diferencia significativa en el test IMI/IMI + EDTA fue positivo en tan solo 7,3% cepas estudiadas (20/274).

Conclusiones: El estudio fenotípico con IMI/IMI + EDTA es poco eficaz para discriminar MBL. Este pequeño brote se descubrió a posteriori en el estudio retrospectivo de las cepas. La evolución de los pacientes fue buena. Es necesario mantener una monitorización activa con el fin de poner de manifiesto posibles brotes ocultos.

168. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE METALO-BETALACTAMASAS (MBL) EN LA SENSIBILIDAD A IMIPENEM Y MEROPENEM DE CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DEFICIENTES EN LA PORINA OPRD O EN LA BETA-LACTAMASA AMPC

M.C. Rodríguez, C. Rodríguez-Mirones y L. Martínez-Martínez

Servicio Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Introducción: La resistencia de *P. aeruginosa* a carbapenemas depende de la producción de beta-lactamasas, de la expresión de la porina OprD y de la actividad de sistemas de expulsión activa. AmpC tiene una débil capacidad hidrolítica sobre las carbapenemas, a diferencia de lo que ocurre con las metalo-beta-lactamasas. En este estudio se analizó la sensibilidad a dos carbapenemas y dos cefalosporinas de amplio espectro en las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 deficientes en *ampC* o en *OprD* que expresan o no diferentes MBL.

Métodos: Se han utilizado las mutantes de la cepa PAO1 *ampC* (-) y *oprD* (-) de la colección de la Universidad de Washington. Los genes que codifican las MBL VIM-1, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SIM-1, SPM-1 y GIM-1 se han clonado en el vector de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5 (Gm-R), empleando la cepa *Escherichia coli* S17.1. A partir de esta, las construcciones se han introducido por conjugación en las cepas PAO1, PAO1_{ampC} (-) y PAO1_{oprD} (-). Las CMIs de imipenem (IMP), meropenem (MPM), ceftazidima (CAZ) y cefepima (FEP) se determinaron mediante microdilución en caldo (normas CLSI).

Resultados: Las CMIs (mg/l) de IMP, MPM, CAZ y FEP frente a PAO1 fueron de 1, 1, 1 y 2. Estos valores, para PAO1_{oprD} (-) fueron de 16, 4, 1 y 2 y para PAO1_{ampC} (-) de 0,25, 0,5, 1 y 2. La expresión de las MBL en las tres cepas (PAO1 y sus dos mutantes) incrementó los valores de CMI, con respecto a la correspondiente cepa parental, entre 2 y $> = 64$ veces. Al comparar las CMIs frente a las cepas derivadas de PAO1 con las distintas MBL y las correspondientes construcciones en PAO1_{oprD} (-) se observó un incremento de las CMIs de IMP o MPM

entre $>= 2$ y $>= 64$ veces, pero no se observó variación para CAZ o FEP. Al realizar la misma comparación con PAO1ampC (-), no se observaron diferencias de CMI para CAZ, FEP o MPM, pero se obtuvo una disminución en la CMI de IMP de entre 2 y 16 veces.

Conclusiones: El sistema desarrollado en este estudio permite evaluar la interacción entre genes cromosómicos y plasmídicos en la resistencia de *P. aeruginosa* a los antimicrobianos. Se ha confirmado la contribución de OprD a la resistencia a IMP y MPM, pero no a CAZ o FEP. AmpC contribuye a la resistencia IMP y su acción se potencia en presencia de MBL.

169. DETECCIÓN DE METALO-BETA-LACTAMASAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTES A CARBAPENEMES EN LA CLÍNICA UNIVERSIDAD DE NAVARRA (2004-2008)

M. Íñigo¹, M. Fernández-Alonso¹, M.E. Portillo¹, I. Razquin², G. Martínez de Tejada² y J Leiva¹

¹Servicio de Microbiología. ²Departamento de Microbiología. Clínica Universidad de Navarra.

Introducción y objetivos: El empleo de antimicrobianos así como los tratamientos antibióticos prolongados ha conducido a un considerable aumento del número de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemas. Son muchos los mecanismos de resistencia implicados, destacando la presencia Metalo-beta-lactamasas (MBL) que confieren un amplio espectro de resistencia. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de MBL en aislamientos de *P. aeruginosa* en nuestro hospital.

Material y métodos: Se estudiaron 72 cepas de *P. aeruginosa* resistentes o con sensibilidad intermedia a Imipenem (IMP) y/o Meropenem (MPM) en el periodo Enero 2004 y Diciembre 2008. La identificación y estudios de sensibilidad preliminares se realizaron con el sistema automatizado VITEK-2 (BioMérieux). Para la detección fenotípica de la producción de MBL se emplearon técnicas de E-test (IMP/IMP+EDTA) y microdilución, que permite comparar las CMIs de IMP y MPM solos y en combinación con una mezcla de EDTA 0.4mM y 1,10-fenantrolina 0,04 mM (EDTA.Ph). Se consideró positivo un cociente de CMIs de IMP/IMP+EDTA.Ph (o MPM/MPM + EDTA.Ph) igual o superior a 8. Los genes que codifican para M β L fueron detectados mediante PCR múltiple (Mendes R. Et al, JCM 2007) y secuenciación de los productos de amplificación.

Resultados: Las técnicas de detección fenotípica indicaron la presencia de MBL en 3 aislamientos (CN3, CN52 y CN71). Sin embargo, usando PCR múltiple y secuenciación se detectó el gen bla_{VIM} en 3 aislamientos no relacionados clonalmente (CN3, CN5 y CN52) y el gen bla_{IMP} en un aislamiento (CN71). La presencia del gen bla_{VIM} en CN5 fue detectado utilizando tanto PCR múltiple como PCR simple con los iniciadores específicos para el gen bla_{VIM}. Los cocientes obtenidos en el método de microdilución para las cepas CN3, CN5, CN52 y CN71 fueron respectivamente 64 (128/2), 1(64/64), 128 (256/2) y 128 (128/1) para el IMI, y 32 (64/2), 1 (32/32), 128 (256/2) y 64 (256/4) para el MPM.

Conclusiones: Durante estos 4 años de estudio se detectó la presencia de MBL en 4 aislamientos clínicos *P. aeruginosa*. Los métodos fenotípicos y genotípicos presentaron una adecuada concordancia de resultados, a excepción de la cepa CN5 en la que se ha demostrado que la resistencia a los carbapenemas es debida a otros mecanismos. Así, un 5,6% de las cepas resistentes a carbapenemas aisladas tenían gen codificante para enzimas MBL; sin embargo sólo un 4,2% lo expresa.

170. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS MECANISMOS RESPONSABLES DEL PATRÓN DE MULTIRRESISTENCIA EN UNA CEPA EPIDÉMICA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

L. Zamorano¹, C. Juan^{1,2}, E. Viedma Moreno³, J. Acosta Barriga³, J.R. Otero³, F. Chaves³, y A. Oliver^{1,2}

¹Servicio de Microbiología. Hospital Son Dureta. ²Área de Microbiología. Universitat de les Illes Balears. Palma de Mallorca.

³Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

Objetivo: Caracterización genética de los mecanismos responsables del patrón de multirresistencia (únicamente sensible a colistina) en una cepa epidémica de *P. aeruginosa* ampliamente diseminada en un hospital de Madrid.

Material y métodos: Se estudiaron 3 aislados representativos, obtenidos en distintos períodos (de abril 2007 a junio 2008), de un clon epidémico resistente a penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Para caracterizar los mecanismos de resistencia cromosómicos se realizó PCR y secuenciación de oprD, gyrA, gyrB, parC y parE, y se cuantificó la expresión, por RT-PCR en tiempo real, de mexB, mexD, mexY, y ampC. Para detectar y caracterizar las posibles β-lactamasas adquiridas se realizaron ensayos fenotípicos (Etest-MBL, y test de sinergia de doble disco), se determinaron los pI mediante isoelectroforesis, y se realizó PCR, seguida de secuenciación, de los genes de las β-lactamasas más frecuentes (PSE, OXA, PER, TEM, CTX-M, y SHV). Asimismo, se evaluó la presencia de integrones de clase 1, portadores de determinantes de resistencia horizontal, mediante PCR específicas seguidas de secuenciación.

Resultados: Los ensayos fenotípicos y genotípicos de producción de metalo-β-lactamasas (MBL) fueron negativos, siendo el mecanismo responsable de la resistencia a carbapenemas, en los 3 aislados, la interrupción de oprD por una secuencia de inserción (IS1001). La resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas se debió a las mutaciones Thr83Ile en GyrA y Ser87Leu en ParC. No se detectó modificación de la expresión de AmpC ni de MexCD-OprJ, aunque los 3 aislados presentaron cierta hiperexpresión de las bombas de expulsión MexAB-OprM (1,8-2,4 veces) y MexXY-OprM (5,4-6,6 veces) respecto a la cepa de referencia PAO1. Mediante el isoelectroforesis se detectaron 2 β-lactamasas adquiridas, una de pI = 8,6 y otra de pI = 6. La β-lactamasa de pI = 8,6 se correspondió con la OXA-2, presente en un integrón de clase 1 junto con determinantes de resistencia a aminoglucósidos, mientras que la de pI = 6 no pudo ser identificada con la batería de PCR utilizada.

Conclusión: La multirresistencia extrema (únicamente sensible a colistina) del clon epidémico de *P. aeruginosa* ampliamente diseminado en un hospital de Madrid se debe a la combinación de múltiples mecanismos de resistencia mutacionales y transferibles. La diseminación de este tipo de clones supone un problema epidemiológico notable, que debe ser controlado estrictamente.

171. MULTIRRESISTENCIA EN CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUCTORAS DE METALO-BETA-LACTAMASAS (MBL): COMBINACIÓN DE MECANISMOS TRANSFERIBLES Y MUTACIONALES

C. Juan^{1,2}, L. Zamorano¹, A. Mena¹, S. Albertí², J.L. Pérez¹ y A. Oliver^{1,2}

¹Servicio de Microbiología. Hospital Son Dureta. ²Área de Microbiología. Universitat de les Illes Balears. Institut Universitari en Ciències de la Salut (IUNICS). Palma de Mallorca.

Objetivo: Estudiar la epidemiología molecular de *P. aeruginosa* productora de MBL en un hospital de Mallorca durante un período de 4 años (2005-2008). Determinar la contribución de los mecanismos de resistencia mutacionales y transferibles al patrón de multirresistencia.

Material y métodos: Se utilizó el Etest MBL como técnica de cribado para la detección de aislados productores de MBL. La relación clonal

se estudió por electroforesis de campo pulsante (ECP). Para caracterizar los mecanismos de resistencia cromosómicos se realizó PCR y secuenciación de *oprD*, *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, y se cuantificó la expresión, por RT-PCR en tiempo real, de *mexB*, *mexD*, *mexY* y *ampC*. La composición de los integrones portadores de los genes MBL se determinó mediante PCR específicas seguidas de secuenciación. La codificación plasmídica o cromosómica se evaluó mediante Southern blot con la sonda *bla_{VIM}* correspondiente.

Resultados: En el período de estudio se registraron 13 casos de infección por *P. aeruginosa* productora de MBL (0,35% del total de infecciones por *P. aeruginosa*). El ECP reveló la existencia de 1 clon portador de VIM-13 (PAV13, en 2 pacientes), y 2 clones portadores de VIM-2 (PAV2-1, en 2 pacientes, y PAV2-2, en 9 pacientes). El clon PAV13 mostró hiperexpresión de MexXY-OprM, y los 9 aislados de PAV2-2, distintos grados de hiperexpresión de MexAB-OprM y MexXY-OprM. Uno de los aislados de PAV2-2 mostró, además, hiperproducción de AmpC, y en otro de ellos se detectó un OprD inactivado por un codón stop prematuro. Todos los aislados de los 3 clones menos 1 de PAV2-2 presentaron las mutaciones de resistencia a quinolonas Thr83Ile en Gyra y Ser87Leu en ParC. En los 3 clones se demostró la codificación de los genes *bla_{VIM}* en integrones de clase 1. En el integrón de VIM-13 se detectó un variante del gen *aacA4* a continuación del gen de la MBL, mientras que los integrones de VIM-2 mostraron la presencia del mismo gen *aacA4*, pero en este caso precediendo a *bla_{VIM-2}*. La localización de los genes MBL fue cromosómica en todos los casos, aunque un aislado de PAV2-2 mostró además una copia de localización plasmídica.

Conclusión: Los clones de *P. aeruginosa* productora de MBL presentan un patrón de multirresistencia extrema (únicamente sensibles a amikacina y/o colistina), debido a la combinación de los determinantes cotransferidos en los integrones con múltiples mutaciones cromosómicas de resistencia. La diseminación de este tipo de clones supone un problema epidemiológico notable, que debe ser controlado estrictamente.

172. ESTUDIO DE BOMBAS DE EXPULSIÓN ACTIVA Y DE SUS REGULADORES EN CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CON MENOR SENSIBILIDAD A CEFEPIMA QUE A CEFTAZIDIMA

A.B. Campo-Esquível, M.C. Rodríguez, C. Rodríguez y L. Martínez-Martínez

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

Introducción: La menor sensibilidad de *P. aeruginosa* a cefepima (FEP) que a ceftazidima (CAZ) se ha relacionado con la sobreexpresión de bombas de expulsión activa, que puede ocurrir por mutaciones en genes reguladores. En este estudio hemos analizado los sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY-OprM y los reguladores: *mexR*, *nalC*, *nalD* (MexAB-OprM), *nfxB* (MexCD-OprJ) y *mexZ* (MexXY-OprM).

Material y métodos: Se estudiaron ocho aislados clínicos de *P. aeruginosa* con menor sensibilidad a FEP que a CAZ, de diferentes pacientes. La identificación de los aislados se realizó con el sistema MicroScan. La CIM de FEP y CAZ se determinó por microdilución en caldo (CLSI), y la relación clonal mediante REP-PCR. Se utilizó la PCR en tiempo real para estudiar el nivel de expresión de *mexB*, *mexD* y *mexY*. Se consideró que existía sobreexpresión cuando los valores de expresión de estos genes fueron al menos 4 veces superiores a los de la cepa PAO1. Se secuenciaron los genes reguladores *mexR*, *nalC*, *nalD*, *nfxB* y *mexZ*. Mediante PCR se determinó la presencia de oxacilinasas (grupos I, II y III) y de la penicilinasa PSE-1.

Resultados: Las CIMs (mg/l) de CAZ fueron: 1 (n = 1 cepas), 2 (n = 2), 4 (n = 2), 8 (n = 2) y 16 mg/L (n = 1), y las de FEP: 4 (n = 2), 8 (n = 1), 16 (n = 4) y 64 mg/L (n = 1). Los aislamientos no estaban clonalmente relacionados. En todos los casos se observó sobreexpresión de

mexY (18,3 a 186,8 veces respecto a PAO1). Tres cepas también sobreexpresaron *mexD* (4, 18,1 y 150,5) y otras 2, *mexB* (5,41 y 5,64). No se observó correlación entre la CIM de FEP y el grado de sobreexpresión de los genes estudiados. Una de las 2 cepas que sobreexpresan MexAB-OprM presentó una mutación puntual en la región "helix-turn-helix", tanto de la proteína PA3721 (*nalC*) como de PA3574 (*nalD*). En una cepa sobreproductora de MexCD-OprJ se encontró una mutación en el gen *nfxB* que implicó un cambio de fase en el marco de lectura a partir de Asn180. En 6 aislamientos, *mexZ* estaba mutado: región amino-terminal delecionada (n = 3), inserción de 24 aminoácidos a partir Leu106 (n = 1), mutaciones puntuales (n = 1) y cambios que afectaban al extremo carboxilo (n = 2); no se consiguió amplificación de *mexZ* en un aislamiento. No se detectaron oxacilinasas en ninguna cepa. Se detectó PSE-1 en los 2 aislados que sobreexpresan *mexB* (CIM de FEP 4 y 16 mg/l, respectivamente).

Conclusiones: En las ocho cepas de *P. aeruginosa* con menor sensibilidad a FEP que a CAZ analizadas se ha observado una sobreexpresión de MexXY-OprM que en seis casos coincide con una mutación en el represor *mexZ*. También se ha observado sobreexpresión de MexCD-OprJ en tres cepas y de MexAB-OprM en dos. Las mutaciones en los genes reguladores no se correlacionaron con el nivel de sobreexpresión de las bombas ni con los valores de CIMs de FEP, lo que apoya la hipótesis de la existencia de otros mecanismos implicados en el fenotipo estudiado.

173. AMPC CEFALOSPORINAS CON ESPECTRO DE HIDRÓLISIS EXTENDIDO HACIA CEFEPIME Y CARBAPENEMAS EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

J.M. Rodríguez-Martínez, L. Poirel y P. Nordmann

Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914. Hôpital de Bicêtre. Paris. Francia.

Objetivos: Beta-lactamasas de tipo AmpC con espectro extendido (ESAC) que contribuyen a reducir la sensibilidad a imipenem se han descrito recientemente en *Enterobacteriaceae*. El propósito de este estudio fue evaluar el posible papel y contribución de las beta-lactamasas de tipo AmpC cromosómicas de *Pseudomonas aeruginosa* en la resistencia a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenemas.

Material y métodos: Treinta y dos aislados clínicos no repetitivos de *P. aeruginosa* recuperados del hospital de Bicetre en 2007 se incluyeron en este estudio, siendo la mayoría de ellos multirresistentes. El criterio de selección fue sensibilidad intermedia o resistencia a ceftazidima y sensibilidad intermedia o resistencia a imipenem. Los valores de CIM se determinaron tanto por dilución en agar como mediante el uso de tiras Etest. El nivel de expresión de AmpC se evaluó mediante ensayos de actividad específica. Mediante PCR, secuenciación y clonación se caracterizaron los genes *bla_{ampC}*. Las ESACs identificadas se purificaron y los valores K_m y k_{cat} se determinaron mediante espectrofotometría. Por último, se evaluaron mecanismos adicionales de resistencia a carbapenemas.

Resultados: Usando placas con cloxacilina (inhibidor de AmpC), la sensibilidad a ceftazidima se recuperó en 25 de los 32 aislados sugiriendo superproducción de la AmpC cromosómica. Además, en presencia de cloxacilina, los valores de CIM se redujeron para ceftazidime, cefepime e imipenem en 21 de estos 25 aislados. Diez variantes diferentes de AmpC se encontraron entre estos 32 aislados. Plásmidos recombinantes que expresan estas AmpCs se transformaron en *P. aeruginosa* y se observó sensibilidad reducida a cefepime e imipenem sólo en el caso de las variantes que presentaron un residuo de Alanina en la posición 105. La eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de las variantes AmpC con esta sustitución incrementaron frente a oxyiminocefalosporinas e imipenem. En el 65% de los aislados se detectó al mismo tiempo ESACs y pérdida de la porina OprD, siendo todos ellos resistentes a imipenem.

Conclusiones: Las AmpCs beta-lactamasas de *P. aeruginosa* con actividad extendida hacia carbapenemas puede contribuir, como un mecanismo adicional, a la resistencia frente a este grupo de antimicrobianos.

174. ESTUDIO DE NUEVAS VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE ACINETOBACTER BAUMANNII PANRESISTENTE EN CÉLULAS EPITELIALES PULMONARES HUMANAS

Y. Smani, F. Docobo y J. Pachón

Servicio de Enfermedades Infecciosas. Instituto de Biomedicina de Sevilla. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

Acinetobacter baumannii (Ab), es un patógeno nosocomial implicado en infecciones graves como neumonía, bacteriemia y meningitis. Aunque existe controversia sobre su virulencia, pocos estudios de interacciones patógeno-huésped se han realizado. Recientemente, se ha mostrado la muerte de células epiteliales (Cep) humanas inducida por Ab, pero esto nunca se ha estudiado con cepas panresistentes. Nuestro objetivo fue determinar las vías moleculares caspasa-dependiente e independiente implicadas en la actividad citotóxica de una cepa panresistente de Ab sobre Cep humanas.

Se han utilizado dos cepas de Ab: una cepa clínica panresistente (113-16) y otra estándar ATCC 19606. Sus actividades citotóxicas se han investigado en una línea de Cep A549 utilizando dos ensayos: a) MTT, que caracteriza el porcentaje de células viables valorando la actividad mitocondrial; b) Live/Dead, que permite la determinación simultánea de la viabilidad y la muerte celular. El tipo de muerte celular se ha evaluado con la existencia de apoptosis usando el DAPI y el ensayo de necrosis que mide la liberación celular de lactato deshidrogenasa (LDH). Además, se ha estudiado la implicación de dos vías caspasa-dependiente e independiente en la actividad citotóxica de Ab panresistente. En la primera vía, se ha estudiado el impacto de la liberación de diferentes agentes: las citocinas (TNF- α y IL-6) por ELISA, el anión superóxido (O_2^-) por reducción de ferricitocromo-c y, posteriormente, la activación de caspasa-3 por Western blot (WB). En la segunda vía, se ha estudiado la liberación del calcio intracelular (Ca^{2+}_i) por el Fura-2 y, posteriormente, la activación de calpaína por WB.

El cultivo de A549 incubado 24 h con ATCC 19606 ó 113-16 (10⁸ ufc/mL) ha mostrado, respectivamente, una disminución de la viabilidad celular relativa al control de 29,42 y 60,5%. Usando el kit Live/Dead se ha demostrado que A549 incubadas con estas cepas han sido marcadas con homodímero-1 de etidio, indicador de la muerte celular. Esta muerte celular es de tipo apoptótico con condensación de la cromatina y de tipo necrótico con una elevada liberación de LDH. Además, la incubación de A549 con ATCC 19606 ó 113-16 durante 6 y 24 h ha mostrado un aumento significativo de la liberación de IL-6 y del O_2^- a 24 h, mientras el aumento de TNF- α ha sido solo a 6 h. El uso de talidomida (100 μ g/mL), inhibidor de la liberación de TNF- α , el PD098059 (20 μ g/mL), inhibidor de la liberación de IL-6, y el Trolox (1 mM), antioxidante, redujeron la muerte celular inducida por las dos cepas de Ab. El análisis de la expresión proteica de caspasa-3, mostró su activación en A549 incubadas con ATCC 19606 ó 113-16. También, estas dos cepas de Ab aumentaron la liberación del Ca^{2+}_i y la activación de calpaína.

De estos datos, se extrae, por primera vez, que una cepa de Ab panresistente induce la muerte celular, estando implicadas dos vías caspasa-dependiente e independiente.

175. ASOCIACIÓN ENTRE RESISTENCIA FENOTÍPICA HETEROGÉNEA A CARBAPENEMS Y PRODUCCIÓN DE OXACILINASAS, SECUENCIAS DE INSERCIÓN TIPO ISABA Y PORINAS CARO Y OPRD-LIKE EN AISLADOS CLÍNICOS DE ACINETOBACTER BAUMANNII

M. Carmen Gómez^{*1}, F. Fernández-Cuenca¹, J. Vila², G. Bou³, L. Martínez-Martínez⁴ y A. Pascual¹

¹Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Universidad de Sevilla. ²Hospital Clínic. Barcelona. Servei de Microbiologia. ³Servicio de Microbiología-Unidad de Investigación. Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. La Coruña.

⁴Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

Objetivo: Conocer si la resistencia fenotípica heterogénea (RFH) a imipenem (IMP) y meropenem (MPM) en *Acinetobacter baumannii* se asocia con producción de oxacilinasas, secuencias de inserción de tipo ISAbA y las porinas CarO y OprD-like.

Material y métodos: Se seleccionaron 44 aislados de Ab representativos de todos los clones del proyecto GEIH-Ab-2001 y con valores de CMI de IMP y/o MPM de 2, 4, 8, 16 o 32 mg/L. La detección de RFH se realizó mediante difusión en agar con discos de IMP y MPM. La detección de genes de oxacilinasas (subgrupos bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-51} y bla_{OXA-58}) se realizó mediante PCR múltiple con cebadores específicos de cada subgrupo y visualización en gel de agarosa. La detección de ISAbA1, ISAbA2, ISAbA3, ISAbA4 y de los genes de las porinas carO y oprD-like se realizó mediante PCR con cebadores específicos de cada gen. Las diferencias entre porcentajes se analizaron mediante el test de la Chi cuadrado o el test exacto de Fisher. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con valores de $p < = 0,05$.

Resultados: El 43% de los aislados presentó RFH a IMP y el 61% a MPM ($p = 0,01$). La distribución de las CMIs de IMP fue la siguiente: < = 2 (5%), 4 (5%), 8 (21%), 16 (47%) y 32 mg/L (21%) en los aislados con RFH a IMP; < = 2 (68%), 4 (28%) y 8 mg/L (4%) en los aislados sin RFH a IMP. En los aislados con RFH a MPM las CMIs de MPM fueron 4 (4%), 8 (48%), 16 (41%) y 32 mg/L (7%), mientras que en los aislados sin RFH a MPM fueron < = 2 (76%) y 4 mg/L (24%). En todos los aislados se detectó bla_{OXA-51}, ISAbA1 y carO, mientras que bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24} e ISAbA4 no se detectó en ningún aislado. En el 56% de los aislados con RFH a MPM y el 6% de los aislados sin RFH a MPM se detectó bla_{OXA-58} ($p = 0,001$). En cambio, en el 84% de los aislados con RFH a IMP y el 0% de los aislados sin RFH a IMP se detectó bla_{OXA-58} ($p < = 0,0001$). ISAbA3 se detectó en el 84% de los aislados con RFH a IMP y el 0% de los aislados sin RFH a IMP ($p < = 0,0001$); el 56% de los aislados con RFH a MPM y el 6% (un aislado) de los aislados sin RFH a MPM ($p = 0,001$). ISAbA2 se detectó en el 89% de los aislados con RFH a IMP y el 24% de los aislados sin RFH a IMP ($p < = 0,0001$); el 62% de los aislados con RFH a MPM y el 35% de los aislados sin RFH a MPM ($p = 0,085$). oprD-like se detectó en el 100% de los aislados con RFH a IMP y el 67% de los aislados sin RFH a IMP ($p = 0,005$); el 96% de los aislados con RFH a MPM y el 56% de los aislados sin RFH a MPM ($p = 0,001$).

Conclusiones: La RFH a IMP se asocia con la producción de bla_{OXA-58}, ISAbA3, ISAbA2 y oprD-like, mientras que el RFH a MPM se asoció con las mismas variables que el RFH a IMP, excepto la presencia de ISAbA2.

176. CARACTERIZACIÓN DE LA BOMBA DE EXPULSIÓN MDFA EN ACINETOBACTER BAUMANNII

P. Espinal¹, S. Martí¹, I. Roca^{1,2}, I. Gibert² y J. Vila¹

¹Servicio de Microbiología. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic. Barcelona. ²Institut de Biotecnología i de Biomedicina. Universitat Autònoma de Barcelona.

Introducción: *Acinetobacter baumannii* es un patógeno asociado a brotes epidémicos entre los pacientes de las unidades de cuidado in-

tensivo debido al elevado grado de multirresistencia que presentan la mayoría de cepas de este microorganismo. Se considera que *A. baumannii* posee una resistencia intrínseca a una amplia variedad de antibióticos gracias a la baja permeabilidad de su membrana externa. La expresión constitutiva de sistemas de expresión activa contribuye a la resistencia antibiótica y en *A. baumannii* se han descrito varias bombas de expulsión pertenecientes a las familias RND (AdeABC, AdeJK) y MFS (TetA, TetB). El objetivo de este trabajo fue caracterizar una nueva bomba de expulsión de la familia MFS en *A. baumannii* y determinar su especificidad de sustrato.

Material y métodos: El gen *mdfA* fue identificado y secuenciado en la cepa ATCC 19606 por PCR y se utilizó una "nested" PCR en dos etapas para generar un fragmento del gen *mdfA* interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina. Este fragmento de DNA se clonó en un plásmido móvil no replicativo en *A. baumannii* y se transfirió por conjugación biparental. Los transconjugantes se seleccionaron en placas con kanamicina y se analizó su sensibilidad frente a distintos antimicrobianos. Posteriormente se complementó la mutación *mdfA* con un plásmido replicativo en *A. baumannii* que contenía el gen *mdfA* intacto.

Resultados: En este trabajo se ha identificado en *A. baumannii* ATCC 19606 un ortólogo (42,7%) del gen *mdfA* descrito en enterobacterias y que codifica una bomba de expulsión activa de la familia MFS. Se ha construido un mutante *knock-out* del gen *mdfA* en esta cepa y se ha analizado su susceptibilidad a varios antibióticos, observándose una dramática reducción en la resistencia frente a cloramfenicol en la cepa mutante ($CMI > 256 \mu\text{g ml}^{-1}$ en la cepa ATCC 19606 frente a $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ en la cepa *MdfA*⁻). La transformación de la cepa *MdfA*⁻ con un plásmido que contenía el gen *mdfA* intacto bajo control de su propio promotor restauraba parcialmente los niveles de resistencia de la cepa salvaje ($CMI 192 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Conclusión: Nuestros resultados indican que el gen *mdfA* de *A. baumannii* podría constituir una bomba de expulsión activa capaz de transportar cloramfenicol a través de la membrana. *A. baumannii* presenta resistencia intrínseca frente a cloramfenicol y es probable que dicha resistencia tenga su origen en la expresión constitutiva del gen *mdfA*, aunque es necesario realizar estudios adicionales para confirmarlo.

177. EVOLUCIÓN DE LOS MARCADORES DE MULTIRRESISTENCIA EN EL REGISTRO ENVIN-UCI. DATOS 2005-2008

F. Álvarez Lerma¹, M. Palomar², P. Olaechea³, J.J. Otal⁴, M.J. López Pueyo⁵, J. Insaurt⁶, M.P. Gracia Arnillas¹ y Grupo ENVIN-UCI

¹Servicio de Medicina Intensiva. Hospital del Mar. Barcelona. ²Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. ³Servicio de Medicina Intensiva. Hospital de Galdakao. Vizcaya. ⁴Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. ⁵Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Yagüe. Burgos. ⁶Servicio de Medicina Intensiva. Hospital de Navarra. Pamplona.

Objetivo: Presentar la evolución de los marcadores de multirresistencia (MMR) en las infecciones adquiridas en UCI, entre los años 2005-2008.

Material y métodos: Estudio de incidencia, prospectivo y multicéntrico. Se han incluido los pacientes ingresados en las UCIs participantes en los años 2005-2008. El seguimiento se ha realizado hasta el alta de UCI o hasta un máximo de 30 días. Las infecciones monitorizadas han sido: neumonías relacionadas con VM (N-VM), infección urinaria relacionada con SU (IU-SU), y bacteriemias primarias (BP). Los MMR identificados han sido definidos por el CDC (1). La recogida de datos se ha realizado utilizando un programa propio, desarrollado con la base Acces 97. Las tasas de resistencias se expresan como el % de aislamientos resistentes a los antibióticos seleccionados, respecto al total de aislamientos de cada patógeno evaluado.

	2005	2006	2007	2008
<i>Staphylococcus aureus</i> R a meticilina	37,1	42,2	24,4	25
<i>Staphylococcus aureus</i> R vancomicina	0,6	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> R meticilina	85,2	83,6	80,9	84,1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> R vancomicina	0	0	0,7	1,9
<i>Escherichia coli</i> R ciprofloxacino	32,1	34,4	34,4	32,4
<i>Escherichia coli</i> R ceftazidima	10	13,1	16,8	13,2
<i>Acinetobacter</i> spp R a imipenem	58,3	54,6	76,4	66,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R amikacina	11,4	13	12,9	17,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R ceftazidima	29	27,9	27,2	26,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R ciprofloxacino	30,2	33,1	35,2	38,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R imipenem	28,6	36,3	32	34,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R pipera/tazob.	22,4	18,7	18,9	14,5
<i>Enterococcus</i> spp R vancomicina	1	0	0	0

Resultados: Se han incluido 46.930 pacientes en las UCI participantes, de los que 4.300 (9,2%) han presentado 6.245 infecciones (13,3%) durante su estancia en UCI en las que se han identificado 6.559 microorganismos patógenos, de los que 3.606 (55,0%) eran BGN, 2.189 (33,4%) CGP, 722 (11,0%) hongos y 42 (0,6%) de otras familias. La evolución de los MMR se incluye en la siguiente tabla:

En el año 2008 se han identificado dos cepas de *P. aeruginosa* y tres cepas de *A. baumannii* R a colistina.

Conclusiones: Disminución de las cepas SARM, por segundo año consecutivo. Estabilización de las cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporina y ciprofloxacino. Persistencia elevada de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem. Aumento de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a ciprofloxacino. Ausencia de cepas de CGP resistentes a vancomicina.

Center for Infectious Diseases Control. Am J Infect Control 1999;27:27.

178. CARACTERIZACIÓN DE BLADIM-1, UNA NUEVA BETA-LACTAMASA DE CLASE B LOCALIZADA EN UN INTEGRÓN DE CLASE 1 EN UN AISLADO CLÍNICO MULTIRESISTENTE DE *PSEUDOMONAS STUTZERI*

J.M. Rodríguez-Martínez¹, L. Poirel¹, N. Al Naiemi², Y. Debets-Ossenkopp² y P. Nordmann¹

¹Service de Bactériologie-Virologie. INSERM U914. Hôpital de Bicêtre, Paris. Francia. ²Department of Medical Microbiology and Infection Control Comunicación. VU University Medical Center. Amsterdam. Holanda.

Objetivos: Caracterización de los mecanismos implicados en la resistencia a carbapenemas en un aislado de *Pseudomonas stutzeri*, la cual es poco frecuente en esta especie, desde un paciente de un hospital de Holanda con osteomielitis crónica de tibia. Esta cepa fue resistente a ticarcilina, piperacilina-tazobactam, imipenem y meropenem, y presentó sensibilidad intermedia a ceftazidima y cefepime, y fue sensible a aztreonam. Por último, el aislado fue resistente a fluoroquinolonas.

Material y métodos: La determinación de producción de metalo-beta-lactamasas (MBL) se realizó utilizando tiras de E-test combinando imipenem e imipenem-EDTA. El gen responsable de la resistencia a carbapenemas se clonó, a partir de ADN genómico de la cepa de *P. stutzeri*, en el vector pBK-CMV usando el enzima de restricción XbaI y la cepa receptora *Escherichia coli* TOP10. La selección se realizó sobre placas con kanamicina y amoxicilina. La nueva MBL se caracterizó bioquímicamente.

Resultados: Los clones recombinantes *E. coli* TOP10 (pDIM-1) obtenidos manifestaron resistencia a penicilinas y ceftazidima, sensibilidad reducida a cefepime, imipenem y meropenem, y sensibilidad total a aztreonam. El análisis de las secuencias identificó una nueva beta-lactamasa de clase B de acuerdo a la clasificación de Ambler que se denominó DIM-1 ("Dutch IMipenemase") (pI 6.1) la cual no mos-

tró alta homología con el resto de MBLs descritas. DIM-1 compartió el 52% de identidad aminoácida con GIM-1, siendo la MBL más próxima, y el 45 y 30% de identidad con los subgrupos IMP y VIM, respectivamente. DIM-1 hidroliza muy eficientemente imipenem y meropenem, cefalosporinas de espectro extendido, pero no aztreonam. El gen *bla_{DIM-1}* se encontró en la primera posición de un integrón de clase 1 fusionado, debido a la perdida de su elemento de 59pb, al gen *aadB* el cual codifica una adeniltransferasa.

Conclusiones: Una nueva MBL ha sido identificada en *P. stutzeri*. Estos resultados muestran nuevos datos sobre i) la diversidad de genes que codifican MBLs adquiridos horizontalmente, especialmente entre microorganismos no fermentadores, ii) que *Pseudomonas* sp. puede ser reservorio de estos genes y iii) la posibilidad de diseminación de estos determinantes en la parte norte de Europa.

179. RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS DE BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES AISLADOS DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR EN EL ÁREA DE REUS

M. Barreda, I. Pujol, C. Maestre-Martínez, S.B. Alí, O. Villuendas, L. Rus, V. Palau y F. Ballester

Laboratorio de Microbiología. Hospital Universitari Sant Joan de Reus. Tarragona.

Introducción: Los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF) se relacionan frecuentemente con infecciones del tracto respiratorio inferior, especialmente en pacientes críticos o con alguna enfermedad de base (EPOC, fibrosis quística, etc.). Dichos microorganismos tienen una elevada capacidad para desarrollar multirresistencia y precisan a menudo asociación de distintos antibióticos para su tratamiento. Nuestro objetivo es analizar la resistencia (R) *in vitro* a los antibióticos más utilizados en el tratamiento de los BGNNF aislados de muestras respiratorias.

Material y métodos: Se realizó un análisis retrospectivo de todos los BGNNF aislados de muestras respiratorias en nuestro laboratorio durante dos años, 2007 y 2008. La R a amicacina (AK), cefepima (CEP), ceftazidima (CAZ), piperacilina-tazobactam (PTZ), imipenem (IMP), levofloxacino (LEV) y colistina (CL) se determinó mediante el método de disco-difusión (Becton Dickinson®) de acuerdo con el CLSI 2007.

Resultados: De un total de 1.123 microorganismos aislados, el 30,1% (338 cepas) se clasificaron como BGNNF. Un 67,2% se identificó como *Pseudomonas aeruginosa* (PA) y el resto (32,8%) como otros no fermentadores (ONF) tales como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., etc. La R global a los antibióticos ensayados fue del 15,4% para AK, 19,3% para CEP y PTZ, 18,3% para CAZ, 34,4% para IMP, 39,0% para LEV y 6,8% para CL. En general, el grupo de ONF mostró mayor R que el grupo de PA para todos los antibióticos ensayados, excepto para LEV e IMP que fue similar en los dos grupos (tabla).

El total de multirresistencia (resistencia a 2 o más grupos distintos de antibióticos) fue de 41,7% para todo el conjunto de BGNNF, observándose mayor multirresistencia en el grupo de ONF que en el grupo de PA (58,5 y 33,5%, respectivamente).

Conclusiones: El alto nivel de R detectado tanto en PA como en ONF, especialmente frente a IMP y LEV, junto con la alta posibilidad de

Resistencia (%)	<i>Ps.aeruginosa</i>	Otros no fermentadores
Antibióticos		
AK	1,8	43,3
CEP	6,6	45,9
CAZ	11,9	34,5
PTZ	14,2	31,8
IMP	33,2	36,9
LEV	39,8	38,0
CL	0,4	19,8

mahirresistencia y limitada disponibilidad de antibióticos activos hace indispensable la vigilancia microbiológica en infecciones por este tipo de microorganismos.

180. EVOLUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE DETERMINADAS BACTERIAS DE INTERÉS ESPECIAL

M.C. Domínguez y N. Chueca

Unidad de Microbiología. Hospital de la Merced. Osuna. Sevilla.

Introducción: Dado los cambios que se observan en la sensibilidad de determinadas bacterias a los agentes antimicrobianos, se hace necesaria una revisión periódica de dicha susceptibilidad en cada Centro Hospitalario, con la finalidad de conocer y poder realizar recomendaciones de tratamiento empírico más ajustadas a la realidad de cada laboratorio.

Objetivos: Evidenciar si ha habido cambios en la sensibilidad antimicrobiana de determinadas bacterias aisladas en nuestro laboratorio en el año 2008, respecto de las aisladas en 2005.

Material y métodos: Se estudió por microdilución en caldo (panel PC 22 de MicroScan, Siemens) la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* a la cloxacilina y a los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina); el porcentaje de Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), utilizando para ello los paneles NC 36 y de confirmación de BLEE de MicroScan (Siemens) y la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* a Imipenem, empleando los paneles de No Fermentadores (NC 38) de la misma casa comercial, durante los años 2005 y 2008.

Resultados: El porcentaje de cepas de *S.aureus* resistentes a Cloxacilina en los dos años estudiados fue de 21% en 2005 y de 18% en 2008; no se aisló ni en 2005 ni en 2008 ningún *S.aureus* resistente a los glucopéptidos. El porcentaje de *Escherichia coli* productoras de BLEE sí ascendió de 2% en 2005 a 6% en 2008 y el de *Klebsiella pneumoniae* de 0% a 2% respectivamente. En cuanto a Imipenem, el 13% de las cepas de *P.aeruginosa* aisladas en 2005 fueron resistentes a este antimicrobiano y el 9% en 2008. *A.baumannii* mostró un porcentaje de resistencias a Imipenem del 11% en 2005 y del 38% en 2008.

Conclusión: En vista de la elevación en el porcentaje de resistencias de las bacterias anteriormente señaladas, se hace necesaria una vigilancia y búsqueda activa de las mismas, con la finalidad de prevenir su transmisión nosocomial, principalmente de las Enterobacterias productoras de BLEE y de los aislamientos de *A.baumannii*.

181. ESTUDIO DE CLONALIDAD DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MULTIRRESISTENTE DE ORIGEN INTRAHOSPITALARIO EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL

R. Rodríguez¹, L. Mora², A. Gutiérrez², M.V. García², A. Vindel³, A. Infantes², M.M. Gallardo², F. Ropero² y A. Pinedo²

¹Departamento de Microbiología (Bioclinic, General Lab). Hospital Xanit Benalmádena. Málaga. ²Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga. ³Laboratorio de Intrahospitalarias. CMVIS del ISCIII Mjadhonda. Madrid.

Introducción: Del 10 al 30% de las Infecciones nosocomiales son producidas por *Pseudomonas aeruginosa* con unas tasas de morbilidad que pueden ser superiores al 20%. A esto hay que añadirle la preocupante aparición cada vez más frecuentes de cepas multirresistentes.

Objetivos: Conocer la relación clonal de la cepas de *P. aeruginosa* multirresistente (PAMR) intrahospitalarias, así como la importancia de las técnicas de tipificación molecular.

Material y métodos: Diseñamos un estudio longitudinal retrospectivo desde octubre de 2002 a diciembre de 2004 a partir de los aislamientos de PAMR intrahospitalarios. La identificación y sensibilidad

se realizó mediante sistema automatizado MicroScan (Siemens®) y E-test (BioMerieux®) según las normas de la CLSI. La tipificación se realizó mediante serotipia y fagotipia y como método definitivo se utilizó PFGE (Bio rad®).

Resultados: Se aislaron 2.336 *P. aeruginosa*, siendo 843 de origen intrahospitalarias y 81 con un patrón de PAMR, estas pertenecían a 67 pacientes. La UCI fue el servicio de procedencia más frecuente, y la neumonía nosocomial el cuadro clínico más relevante. La serotipia las agrupó en 8 serogrupos siendo el O: 4 el más frecuente (23,5%), seguido del O: 3 y O: 12 (22,2%). Los mayores niveles de resistencia estaban asociados al serotipo O: 12 (75%). Con la fagotipia ampliamos hasta 55 tipos distintos de PAMR, siendo el O: 12 el que mayor relación epidemiológica tenía. Tras la realización del PFGE obtuvimos 49 pulsotipos (PT), encontrando 5 clones mayoritarios con uno predominante (clon A) que incluía a 13 pacientes, ingresados en UCI, la mayoría varones, con una edad media de 61 años que habían sido sometidos a procedimientos invasivos y a antibioterapia de amplio espectro. El resto de los aislamientos tenían cada uno un PT diferente. La mayoría de las cepas presentaban una distancia genética mayor del 80% (40-80%). En 10 pacientes se aislaron PAMR con fenotipo de resistencia distinta entre ellas, que tras el análisis del PFGE, en 6 enfermos se trató de la misma cepa. Además en 12 pacientes, previo al aislamiento de las cepas PAMR, se obtuvieron otras sensibles que en todos los casos menos en una se trataba de la misma cepa.

Conclusiones: Existe una gran heterogeneidad (CS: < 80%) de los aislamientos de PAMR en nuestro hospital lo que revela que no tenemos ninguna cepa acantonada. Las cepas panresistentes presentaban una mayor homogeneidad, la mayoría asociadas al serogrupo O: 12. La antibiotipia, es poco fiable pues hasta en un 80% de los pacientes con aislamientos repetidos de PAMR con diferente fenotipo, se trataba de la misma cepa. El PFGE es importante en la detección de brotes epidémicos, pues fue capaz de encontrar 5 brotes que habían pasado desapercibido en un primer momento.

182. COMBINACIONES DE TIGECICLINA E IMIPENEM FRENTE A CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CON DIFERENTES MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

J. Gómez-Garcés*, Y. Gil, A. Burillo y F. López-Fabal

Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario de Móstoles. Móstoles. Madrid.

Introducción y objetivos: *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno habitual en infecciones nosocomiales graves que además puede afectar a pacientes inmunocomprometidos. Este microorganismo acumula frecuentemente distintos mecanismos que le confieren un amplio patrón de resistencia.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el posible efecto aditivo de la combinación de tigeciclina (TGC) con imipenem (IMP) frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con mecanismos de resistencia a betalactámicos previamente conocidos.

Material y métodos: Se eligieron 7 cepas de *P. aeruginosa* cuyos mecanismos de resistencia a betalactámicos se habían caracterizado molecularmente: producción de metalobetalactamasa (MBL), hiperproducción de AmpC, pérdida de la porina OprD y/o presencia de bombas de expulsión MexEF-OprN. Se determinó la CMI a imipenem por microdilución en caldo. El posible efecto bactericida y la posible sinergia se determinaron mediante curvas de muerte a una concentración fija de 2 mcg/ml de TGC y a la correspondiente a la CMI de IMP de cada una de las cepas.

Resultados: En 2 cepas productoras de MBL la combinación de IMP a 64 mcg/ml y TGC a 2 mcg/ml presentó un efecto sinérgico o restaurador de la actividad del betalactámico. En 3 cepas cuyo mecanismo de resistencia predominante fue la pérdida o alteración de la porina OprD y/o la sobreexpresión de la bomba de expulsión MexEF-OprN,

la actividad del carbapenem en solitario a concentraciones similares a su CMI presentó efecto bactericida. La actividad de la combinación con TGC a 2 mcg/ml no resultó antagonista. En 2 cepas con hiperexpresión de AmpC no se alcanzó actividad bactericida con IMP en solitario, ni en combinación con TGC.

Conclusiones: 1. La combinación de tigeciclina e imipenem podría restaurar la actividad de este último frente a cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas. 2. En cepas con otros mecanismos de resistencia diferentes, la asociación es indiferente o ligeramente aditiva.

Sesión 13:

SARM: actividad *in vitro* y tratamiento

183. ACTIVIDAD IN VITRO DE DAPTOOMICINA (D) Y SUS COMBINACIONES CON RIFAMPICINA (R) Y LINEZOLID (L) FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A METICILINA (SARM)

C. Garrigós¹, O. Murillo¹, G. Euba¹, R. Verdaguer², F. Tubau², C. Cabellos¹, J. Liñares² y J. Ariza¹

¹Laboratorio de Infección Experimental. Servicios de Enfermedades Infecciosas y de ²Microbiología. DIBELL. Hospital Universitari de Bellvitge. Barcelona.

Introducción/Objetivos: SARM supone un importante problema clínico con limitadas alternativas terapéuticas; entre ellas D despierta un interés creciente en los últimos años. D es un antibiótico bactericida que por su estructura de lipopéptido catiónico permeabiliza la membrana bacteriana y podría facilitar la entrada de otros antibióticos con dianas intracelulares. Nuestro objetivo fue estudiar la actividad de D en combinación con R y L frente a SARM en distintas condiciones *in vitro*.

Material y métodos: Se utilizó la cepa SARM HUSA 304 con CMIs ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (D 1, R 0,03, L 2). Se realizaron curvas de letalidad en fase exponencial, con inóculos de 10^5 (FX5) y 10^8 UFC/ml (FX8), y en fase estacionaria (FE). Las concentraciones de antibióticos estudiadas incluyeron los rangos 32-1/2X MIC (D); 256-1/2X MIC (R), y 8-1/2 X MIC (L). La actividad final se consideró bactericida si lograba una reducción ≥ 3 log UFC/ml del inóculo inicial. En los estudios de las combinaciones se definió como sinergia el aumento ≥ 2 log UFC/ml, antagonismo el descenso ≥ 2 log UFC/ml e indiferencia al cambio (aumento o descenso) < 2 log UFC/ml en la letalidad de la combinación respecto del antibiótico más activo en solitario.

Resultados: CMBs ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en FX5, FX8 y FE fueron 4, 16, 32 (D); 0,5, > 8 , > 8 (R); > 16 , > 16 , > 16 (L). La combinación D + R no presentó nunca antagonismo ampliando el rango de concentraciones (1-3 diluciones) de D con efecto bactericida, especialmente en FE. Se obtuvo incluso sinergia en algunas combinaciones D2X-1/2X+R. No se observó recrecimiento por resistencia a R en ninguna situación con concentraciones mayores de D1X. D + L en ambas fases no mostró antagonismo y obtuvo mayoritariamente un efecto indiferente; la combinación mejoró la actividad de D en las concentraciones entre su MIC y MBC sólo con L8X.

Conclusiones: Daptomicina fue bactericida en todas las situaciones requiriendo CMBs más altas al aumentar el inóculo y en FE. Daptomicina con Rifampicina mejoró el rango de concentraciones de Daptomicina con efecto bactericida en ambas fases. Con Daptomicina asociada a Linezolid se obtuvo un efecto indiferente. Las combinaciones de Daptomicina con Rifampicina y Linezolid podrían ser consideradas alternativas válidas para ser estudiadas *in vivo*.