

Sesión 14 Resistencia antibiótica (II)

285

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A
METICILINA (SARM) QUE EXPRESAN DISTINTOS
PERFILES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA (PRA)**

M.P. González, M.A. Domínguez, C. Borraz, F. Tubau, M. Pujol,
J. Liñares y R. Martín

*Servicio de Microbiología. Servicio de Enfermedades Infecciosas.
Hospital Universitario de Bellvitge. Universidad de Barcelona.*

En el seguimiento de pacientes colonizados por SARM con frecuencia se aíslan cepas que expresan distintos PRA. En este trabajo se analizan las características fenotípicas y genotípicas de cepas SARM con distintos PRA aisladas en 40 pacientes durante un periodo de tres años (2000- 2002).

Objetivos: Analizar si las cepas con diferente PRA aisladas en cada paciente corresponden a uno o a varios genotipos y conocer la importancia de la colonización policlonal. Evaluar la utilidad del PRA para discriminar entre aislamientos y clones.

Métodos: Se incluyeron en el estudio 96 cepas aisladas en 40 pacientes que presentaron colonización o infección por cepas de SARM con distintos PRA. La sensibilidad antibiótica se determinó por disco - difusión y el genotipo se estudió mediante macrorrestricción del DNA cromosómico y electroforesis en campo pulsátil (ECP). Los genes de resistencia a macrólidos se detectaron por PCR.

Resultados: En 29 pacientes se obtuvo el mismo genotipo por ECP, independientemente de su PRA, y en los 11 pacientes restantes cada aislamiento se correspondió con un genotipo diferente. Entre los pacientes colonizados o infectados por el mismo genotipo, las variaciones en los PRA se debían mayoritariamente (72%) a cambios en la sensibilidad a eritromicina (Eri) y/o clindamicina. De 27 aislamientos resistentes a Eri en este grupo, en 17 se detectó por PCR el gen *ermC*, y en 10 el gen *msrA*. Los aislamientos isogénicos sensibles a Eri fueron negativos para ambos genes. La variación en la sensibilidad a aminoglucósidos (gentamicina y/o tobramicina) se observó en las cepas aisladas en el 21% de los pacientes. En 5 pacientes se aislaron cepas con distinto PRA en la misma muestra. El 73% de las cepas estudiadas pertenecían a dos genotipos mayoritarios (P y Q). El clon ibérico multiresistente y endémico en nuestro hospital en los años 90, fue identificado sólo en el 11% de los aislamientos estudiados.

Conclusiones: 1) La coexistencia de varios clones de SARM en la misma muestra puede estar siendo subestimada cuando no se utilizan métodos de tipificación molecular. 2) El perfil de resistencia antibiótica no es un buen marcador epidemiológico para SARM. 3) En la actualidad en nuestro hospital existen dos clones dominantes que expresan distintos PRA.

286

DETECCIÓN POR EL MÉTODO DISCO-DIFUSIÓN DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA INDUCIBLE A CLINDAMICINA EN *STAPHYLOCOCCUS* SPP. AISLADOS DE MUESTRAS CLÍNICAS

M. Elía, E. Cascales, J.M. Álvarez y G. Royo

Objetivos: Estudiar la prevalencia del fenotipo de resistencia inducible a clindamicina en cepas de estafilococos resistentes a eritromicina, aislados en muestras clínicas.

Material y métodos: Se estudiaron un total de 1225 cepas de estafilococos (249 *S. aureus* y 976 Estafilococo coagulasa negativa-SCN) procedentes de muestras de exudados, hemocultivos, puntas de catéter. El periodo de estudio fue febrero 2003-enero 2004. Se realizó la identificación y CMI por el método Wider (Soria-Melguizo, S.A.). Se seleccionaron 399 estafilococos: 12 *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM), 5 *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), 265 SCN sensibles a meticilina y 117 SCN resistentes a meticilina, que cumplían los criterios de resistencia a eritromicina CMI > 2 µg/ml y sensibles a clindamicina CMI ≤ 0,5 µg/ml. La resistencia inducible a clindamicina (RI) se detectó por el método disco-difusión descrito por el NCCLS, utilizando placas de Mueller-Hinton y la aproximación de discos de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) a 20-26 mm. Después de 18 horas de incubación a 37 °C, la presencia de achatamiento en el halo de la clindamicina adyacente al disco de eritromicina indicaba la presencia del fenotipo de resistencia inducible.

Resultados: La resistencia global a eritromicina era más frecuente en SCN (64,2%) que en *S. aureus* (11%). La distribución de fenotipos en estafilococos fue: eritromicina S-clindamicina S (46%), eritromicina R-clindamicina R (38%). La resistencia fenotípica de los 399 estafilococos eritromicina resistente, se demostró en 14 de los 17 *S. aureus* (82,3%), de estos 9 (64%) eran SASM. Todos los SARM presentaron RI. En 223 SCN de 382 (58%) tenían RI, 70 (31%) eran resistentes a meticilina. Dentro de los SCN, *S. hominis* es la especie que más frecuente presentó el fenotipo RI.

Conclusiones: El método de inducción con discos de eritromicina y clindamicina permite detectar de una forma sencilla la resistencia inducible a clindamicina en cepas de *S. aureus* y SCN, ya que la microdilución no la detecta. Dada la elevada prevalencia de RI en estafilococos en nuestro medio, pensamos que se debe de informar en el antibiograma de rutina.

287

RESISTENCIA A MACRÓLIDOS DE CEPAS INVASIVAS DE *S. AGALACTIAE* EN GIPUZKOA: 1992-2003. GENES DE RESISTENCIA Y AUSENCIA DE CLONALIDAD

A. Valiente, M. Ercibengoa, J.M. García-Arenzana, J.M. Marimón, E. Pérez-Trallero

Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián.

Introducción: Aunque el tratamiento de elección para las infecciones invasivas por *S. agalactiae* sigue siendo la penicilina o ampicilina, los macrólidos son una alternativa en pacientes alérgicos a antibióticos beta-lactámicos.

Material y métodos: Desde Enero de 1992 a Diciembre de 2003 se estudió la susceptibilidad a ampicilina y eritromicina de todos los aislamientos invasivos de *S. agalactiae* mediante la técnica de microdilución en caldo, adoptándose los métodos y criterios del NCCLS. Como cepa control se empleó el *S. pneumoniae* ATCC 49619. Mediante PCR se estudió la presencia de genes de resistencia a macrólidos (*ermA*, *B*, *C*, *ermTR*, *mef*) en cepas invasivas y en una muestra aleatoria de cepas resistentes a eritromicina procedentes de mujeres embarazadas portadoras recto/vaginales de *S. agalactiae* aisladas durante 2003. La relación clonal de las cepas invasivas se estudió mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Resultados: Se aislaron 176 cepas invasivas de *S. agalactiae* (175 hemocultivos, 1 LCR). 66 se aislaron en niños menores de 3 meses y 110 en pacientes adultos (>21 años). Todas las cepas fueron sensibles a la ampicilina y únicamente se aislaron 8 cepas resistentes a eritromicina y clindamicina (fenotipo MLSb de resistencia), no mostrando ninguna el fenotipo M de resistencia (resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, sensibilidad a macrólidos de 16 átomos de carbono y clindamicina). Mediante PCR, todas las cepas invasivas resistentes estudiadas (5/5) mostraron el gen *ermB* de resistencia, siendo negativos al resto de los genes estudiados. Por PFGE cada una de las cepas resistentes mostró un patrón diferente al resto. De las 3.629 madres estudiadas durante 2003, 657 (18,1%) fueron portadoras de *S. agalactiae*. De las 34 cepas resistentes a eritromicina seleccionadas, 32 mostraron el fenotipo MLSb (en 22 se detectó el gen *ermB*, en 10 el *ermTR*) y en las 2 únicas cepas que observó el fenotipo M se detectó el gen *mef*.

Conclusiones: Todas las cepas invasivas fueron sensibles a la ampicilina. El porcentaje de cepas resistentes a eritromicina en cepas invasivas fue del 4,5%, todas ellas con el fenotipo MLSb de resistencia debido a la presencia el gen *ermB*. No hubo relación clonal entre ellas. En cepas de madres portadoras se observaron los fenotipos de resistencia MLSb y M, y los correspondientes genes de resistencia *ermB*, *ermTR* y *mef*.

288

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A MACRÓLIDOS EN *STREPTOCOCCUS PYOGENES* AISLADOS DE PACIENTES ADULTOS

C. Ardanuy, F. Tubau, E. Cardenosa, M. Martínez Veña, R. Verdager, J. Liñares y R. Martín.

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona.

Introducción: La prevalencia de cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina en España varía entre un 15% y un 20%, siendo el fenotipo M el mayoritario.

Objetivo: Caracterizar fenotípica y genotípicamente la resistencia a macrólidos de los aislamientos de *S. pyogenes* procedentes de muestras clínicas de pacientes adultos.

Métodos: Durante el periodo 1998-2003 se aisló *S. pyogenes* de muestras clínicas de 221 pacientes adultos. La sensibili-

dad antibiótica a penicilina, eritromicina y clindamicina se estudió por microdilución (NCCLS). El fenotipo de resistencia a macrólidos se caracterizó mediante discos de eritromicina (ERI), clindamicina y estreptogramina B. Los genes de resistencia a macrólidos *ermA*, *ermB* y *mefA* se detectaron por PCR.

Resultados: El origen de las muestras fue: 26% sangre, 18% cutáneo, 17% heridas, 14% orofaríngeo y 25% otros orígenes. No se encontró resistencia a penicilina. El porcentaje global de resistencia (R) a ERI fue del 25%, y la distribución de los fenotipos de resistencia de las 56 cepas ERI-R fue 43% fenotipo M, 34% MLS-B constitutivo (c) y 23% MLS-B inducible (i). El porcentaje de ERI-R en el trienio 1998-2000 fue del 16% y la distribución de los fenotipos de resistencia fue 68% M y 32% MLS-B (i+c), mientras que en el trienio 2001-2002 el porcentaje de ERI-R aumentó de forma significativa hasta el 36% y la distribución de los fenotipos de resistencia fue 30% M y 70% MLS-B (i+c). Por PCR se estudiaron 17 aislamientos con fenotipo M [*mefA* (+), *ermA*(-) y *ermB*(-)]; 9 aislamientos con fenotipo MLS-B(c) [*mefA* (-), *ermA*(-) y *ermB*(+)]; y 5 aislamientos con fenotipo MLS-B(i) de los que 4 fueron [*ermA*(-), *ermB*(+) y *mefA* (-)] y 1 [*ermA*(+), *ermB*(-) y *mefA* (-)].

Conclusión: La resistencia a ERI de las cepas de *S. pyogenes* de pacientes adultos ha experimentado un aumento importante en los últimos años a expensas del fenotipo MLS-B codificado por el gen *ermB*. Estos hallazgos limitan el uso de los macrólidos y la clindamicina como alternativas al tratamiento oral en pacientes alérgicos a beta-lactámicos.

289

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A MACRÓLIDOS EN AISLAMIENTOS DE *STREPTOCOCCUS GRUPO MITIS*

F. Tubau, C. Ardanuy, M.A. Domínguez, E. Cardeñosa, L. Calatayud, J. Ayats, R. Pallarés, J. Liñares y R. Martín
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona.

Objetivo: Estudiar la sensibilidad antibiótica y caracterizar la resistencia a macrólidos de *Streptococcus* grupo *mitis* de diferentes orígenes.

Métodos: Se estudiaron 415 cepas de *Streptococcus* grupo *mitis* aisladas en el periodo 1998-2002: 259 aisladas en sangre y 156 en muestras orofaríngeas. La sensibilidad antibiótica a penicilina, cefotaxima, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol y rifampicina se estudió por microdilución. En todas las cepas resistentes a eritromicina se caracterizaron los fenotipos por disco difusión. La detección por PCR de los genes de resistencia a macrólidos (*ermB* y *mefA*) se realizó en 222 cepas.

Resultados: Los porcentajes de resistencia (I+R) según los criterios del NCCLS de las cepas aisladas de sangre/orofaríngeo a los diferentes antibióticos fueron los siguientes: penicilina (40/51), cefotaxima (12/6), eritromicina (51/69), clindamicina (15/29), tetraciclina (23/31), cloranfenicol (0,4/3) y rifampicina (0,4/0,6). El 69% de las cepas resistentes a eritromicina aisladas en sangre presentó fenotipo M de resistencia a macrólidos y el 31% el MLS-B, mientras que entre los aislamientos orofaríngeos el 57% mostraron fenotipo M y el 43% MLS-B. Los 150 aislamientos fenotipo M estudiados por PCR fueron *mefA* (+) y *ermB* (-), mientras que la detección de genes de 72 cepas MLS-B estudiadas fue: 54 cepas [*ermB* (+) y *mefA* (-)], 16 cepas [*ermB* (+) y *mefA* (+)], 1 cepa [*ermB* (-) y *mefA* (+)] y 1 cepa [*ermB* (-) y *mefA* (-)].

Conclusión: Un elevado porcentaje de las cepas de *Streptococcus* grupo *mitis* aisladas en sangre presenta resistencia a múltiples antibióticos, y este porcentaje es aún mayor en las cepas orofaríngeas. El fenotipo M codificado por el gen *mefA* es el mayoritario entre los aislamientos resistentes a eritro-

micina de ambos orígenes. Es importante resaltar que la presencia de ambos genes (*mefA* y *ermB*) se detectó en un 22% de las cepas con fenotipo MLS-B.

290

EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI) DE CIPROFLOXACINO (CIP) EN LA DETECCIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A FLUORQUINOLONAS (FQ) EN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* (SPN)

J. Liñares, C. Ardanuy, A.G. de la Campa, M.J. Ferrándiz, A. Fenoll, F. Tubau, R. Pallarés, R. Martín y Red Española de Estudio de la Infección Neumocócica (G03/103)

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona. Centro Nacional de Microbiología. ISCIII Madrid.

Introducción: La prevalencia de cepas de Spn resistentes (R) a CIP en España varía entre un 2% y un 7%. Aunque la CIP tiene una actividad mucho menor que las nuevas FQs frente a Spn, su utilización facilita la detección de cepas con mutaciones de resistencia a FQs.

Objetivos: 1) Comparar la actividad *in vitro* de 5 FQs frente a 200 cepas de Spn (100 con CMI de CIP \leq 2 μ g/ml aisladas en nuestro hospital en 2003 y 100 cepas CIP-R del periodo 1991-03 con mecanismos de resistencia a FQs caracterizados). 2) Determinar si los puntos de corte del NCCLS para nuevas FQs detectan las cepas con mecanismos de resistencia a FQs.

Métodos: Se estudió por microdilución la sensibilidad antibiótica de 200 cepas de Spn a levofloxacino (LEV), moxifloxacino (MOX), gatifloxacino (GAT), garenoxacino (GRN), gemifloxacino (GEM) y CIP. Se estudiaron 27 cepas con mutaciones en *parC* (CMIs de CIP: 4-8 μ g/ml) y 73 cepas con mutaciones en *gyrA* y *parC* y/o *parE* (CMIs de CIP: 16-128 μ g/ml). Una selección de 20 cepas de las 100 con CMI de CIP \leq 2 μ g/ml no presentaron mutaciones en *parC*, *parE* ni *gyrA*.

Resultados: Las concentraciones (μ g/ml) que inhibieron a la totalidad de las cepas con CMI de CIP \leq 2 μ g/ml fueron: GEM (0,06), GRN (0,12), MOX (0,25), GAT (0,5) y LEV (1). Las CMI-90 de las FQ frente a cepas CIP-R fueron: GEM (0,5), GRN (1), MOX (4) GAT (8) LEV (32) y CIP (64). Según los criterios del NCCLS un 26% de cepas con mutaciones serían sensibles a LEV, el 27% a GAT y el 33% a MOX. Aunque no existen criterios NCCLS para GEM y GRN, considerando el punto de corte \leq 1 μ g/ml, el 93% de las cepas con mutaciones serían sensibles a GRN y el 99% a GEM.

Conclusiones: El orden de mayor a menor actividad *in vitro* de las FQ estudiadas fue GEM > GRN > MOX > GAT > LEV. Los puntos de corte del NCCLS para nuevas FQ no detectan la cuarta parte de las cepas de Spn con mutaciones, por lo que es aconsejable para su detección utilizar el criterio de CMI de CIP \geq 4 μ g/ml. Las FQs estudiadas son una alternativa terapéutica en el tratamiento de las infecciones neumocócicas causadas por cepas sensibles a CIP, sin embargo no deberían utilizarse en infecciones causadas por cepas CIP-R, ya que la presencia de mutaciones únicas o dobles en estas cepas, puede facilitar la selección de cepas más resistentes que conduzcan a un fallo terapéutico.

291

MECANISMOS DE RESISTENCIA A ERITROMICINA EN NEUMOCOCOS INVASIVOS Y NO INVASIVOS

I. Martí, J.L. Hernández, M. Alkorta, B. Vilar, B. Ullibarri e I. López

Objetivo: Estudiar los diferentes mecanismos de resistencia de neumococos a macrólidos y lincosamidas, metilación del RNA ribosomal (cMLS: resistencia constitutiva, o iMLS: re-

sistencia inducible) y bomba de eflujo (M), según se trate de infecciones invasivas o no invasivas.

Material y métodos: Se estudiaron 146 neumococos escogidos correlativamente por su resistencia a eritromicina, entre los años 1998 y 2003; 75 fueron aislados de hemocultivos y 71 de muestras no invasivas (22 conjuntivales, 22 óticos, 20 esputos, 4 heridas, 2 faríngeos y una quemadura). Técnica de Seppälä: se estudia la interacción entre un disco de eritromicina y otro de clindamicina a 15-20 mm de distancia en una placa de Müller-Hinton sangre sembrada con cada cepa a estudio. El serotipado de las cepas se realizó en el Centro de Referencia de Majadahonda.

Resultados: El 33,3% de las cepas aisladas de hemocultivos y el 4,2% de las aisladas de muestras no invasivas presentaron el fenotipo M. El fenotipo cMLS lo presentó el 66,7% de las cepas invasivas y el 95,8% de las no invasivas. No se aisló ninguna cepa con fenotipo iMLS. Clasificadas por serotipos, 43 cepas pertenecían al serotipo 19, de las que sólo una mostró el fenotipo M y 42 el cMLS; 34 al serotipo 6, una M y 33 cMLS; 29 al 14, 22 M y 7 cMLS; 17 al 23, una M y 16 cMLS; y 23 a otros serotipos menos frecuentes o no tipables, 3 M y 20 cMLS.

Conclusiones: A pesar de que el fenotipo cMLS predomina en todas las cepas (invasivas o no), se observa un porcentaje significativamente mayor del fenotipo M en las cepas invasivas. Además, parece haber una relación entre el serotipo 14 y el fenotipo M, ya que el 75,9% de las cepas pertenecientes a ese serotipo presentaron el fenotipo M (la mayoría de ellas aisladas de hemocultivos). Estos datos, sugieren que el serotipo 14 y/o el fenotipo M están relacionados con la invasividad de la cepa, pero se requieren estudios más amplios y con el apoyo de las técnicas moleculares para confirmarlo.

292

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A CIPROFLOXACINO EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *CORYNEBACTERIUM STRIATUM* Y *CORYNEBACTERIUM AMYCOLATUM*

J.M. Sierra*, L. Martínez-Martínez**, F. Vázquez*** y J. Vila*

*Servicio de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Clínic de Barcelona. **Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. ***Servicio de Microbiología. Hospital Monte Naranjo. Oviedo.

Objetivos: Caracterizar los mecanismos de resistencia de *C. striatum* y *C. amycolatum* frente a ciprofloxacino (CIP).

Material y métodos: Se evaluó la CIM de CIP, en 17 aislamientos clínicos de *C. striatum* más una cepa control ATCC 6940 y 10 aislamientos de *C. amycolatum*, mediante E-test en placas de agar Müller-Hinton. La lectura se efectuó a 24 y 48h. Se amplificó, mediante el diseño de primers específicos, la región determinante de resistencia a quinolonas (RDRQ) del gen *gyrA*, y se secuenciaron los fragmentos amplificados. Se buscó del gen de la subunidad A de la topoisomerasa IV de *Corynebacterium* comparando la secuencia del gen *parC* a nivel de ADN y proteína de varios organismos Gram-positivos con el genoma *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, en el genbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Resultados: Ocho de los 10 aislamientos de *C. amycolatum* presentaron resistencia a CIP con una CMI > 32 µg/ml, estos presentaban una mutación en la posición equivalente al aminoácido 84 en *S. aureus* originando un cambio de Ser a Arg, mientras que las dos cepas sensibles presentaban una CMI de CIP de 0,032 y 0,047 µg/ml respectivamente sin ningún tipo de mutación. Las cepas de *C. striatum* presentaban diferentes CMI a CIP dependiendo de la/s mutación/es encontradas. Tres cepas eran sensibles con un rango de CMI de CIP de 0,094 a 0,125 µg/ml y no presentaban ninguna mutación en la RDRQ del gen *gyrA*, 4 cepas presentaban una mutación en la posición equivalente a la 84 de *S. aureus* que cambió de Ser a Phe, estas cepas presentaban una CMI de

CIP de 1 a 3 µg/ml. Dos cepas presentaban una mutación en la posición equivalente a la 88 en *S. aureus* cambiando de Asp a Tyr y de Asp a Gly y presentaban unas CMI de 3 y 6 µg/ml respectivamente. El resto, 9 cepas, presentaban CMI >32 µg/ml, 3 poseían una única mutación en la posición 84 cambiando de Ser a Val, las 6 restantes mostraron una doble mutación, de Ser a Phe en la posición 84, y de Asp a Ala en la posición 88. No hubo diferencias en cuanto a la lectura de CMI en los diferentes tiempos. No se pudo amplificar mediante primers degenerados, ni se encontró en el genbank ninguna secuencia de *parC* en *Corynebacterias*.

Conclusión: Por primera vez se secuenció *gyrA* de *C. striatum* y *C. amycolatum*. Se relacionan el aumento de las CMI a CIP con las diferentes mutaciones encontradas. Parece ser que igual que *Helicobacter pylori*, y *Campylobacter* sp, el Género *Corynebacterium* no posee la topoisomerasa IV, por lo que mutaciones en el gen *gyrA* son suficientes para ocasionar un elevado nivel de resistencia a CIP.

293

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

E. Camacho, G. Reina, J.D. Turiño, R. Yeste, M.F. Bautista, C. Miranda, M. de la Rosa

Servicio Microbiología. Hospital Virgen de las Nieves. Granada.

Objetivo: Conocer las características fenotípicas, sensibilidad antibiótica y mecanismos de resistencia de *Haemophilus influenzae*.

Material y métodos: Se han estudiado 280 aislamientos de *Haemophilus influenzae*, aislados en nuestro hospital de muestras invasivas y no invasivas entre enero 1996 y diciembre de 2003, para determinar biotipo, serotipo y sensibilidad antibiótica a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima, cotrimoxazol, cloranfenicol y ciprofloxacina. El test de β-lactamasa se realizó a todas las cepas aisladas (nitrocefin, Becton-Dickinson). El estudio de biotipo y serotipo se realizó en el Centro de Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

Resultados: La mayoría de los aislamientos procedían de muestras respiratorias (76,4%) o estructuras anejas, conjuntivales (11,4%) y óticos (4,6%). El 93,9% de las cepas fueron no tipificables y el 6,1% capsuladas (nueve aislados del serotipo b, cuatro del e, dos del f, uno del c y uno del d). El estudio del biotipo fue realizado sobre los 280 aislamientos, siendo el más frecuente el biotipo II (44,4%), seguido del biotipo III (24,6%) y biotipo I (20%). Los biotipos IV, V, y VI, se aislaron con menor frecuencia (3,5%, 5,7% y 1,7% respectivamente). El test de β-lactamasa resultó positivo para 72 (25,7%) aislamientos con una proporción ligeramente mayor entre las cepas capsuladas (7 de 17). Hubo 3 cepas (1,1%) β-lactamasa negativas resistentes a ampicilina (BLNAR). Todos los aislados fueron sensibles a ciprofloxacino y cefotaxima. El cotrimoxazol y el cloranfenicol presentaron unas resistencias del 44,6% y del 5,7% respectivamente. La mayoría de los aislados 184 (65,7%) se recuperaron de pacientes adultos (edades comprendidas entre 17 y 93 años), mientras que 56 aislamientos (20,0%) fueron aislados de pacientes menores de cinco años, perteneciendo 4 de estos aislamientos (2 de LCR, 1 de sangre y 1 de oído) al serotipo b. Los dos aislamientos procedentes de líquido cefalorraquídeo y uno de sangre fueron del serotipo b, biotipo I y productos de β-lactamasa y se aislaron de tres niños, menores de 2 años.

Conclusiones: El nivel de cepas productoras de β-lactamasa en nuestro hospital fue del 25,7%, cifra similar a la obtenida en otros estudios, y la proporción de cepas BLNAR (1,1%), fue algo menor al expresado en otros trabajos. Entre las cepas capsuladas, el serotipo b fue el más frecuentemente aislado (52,9%). La sensibilidad antibiótica fue elevada frente a amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima, ciproflo-

xacino y cloranfenicol. Mientras que el cotrimoxazol presentó las mayores tasas de resistencia. No se observó tropismo etario ni anatómico de ningún biotipo.

294

MECANISMOS DE RESISTENCIA A TRIMETOPRIM EN EL GÉNERO *HAEMOPHILUS*

M.B. Aracil, M.P. Vázquez, F. Román y J. Campos

Objetivos: Estudiar los determinantes de resistencia (genes implicado/s en la resistencia y sus posibles mutaciones) a trimetoprim en una colección de 70 cepas de *Haemophilus influenzae* capsulados (e, f y b), no capsulados y *Haemophilus parainfluenzae* cuya sensibilidad ya era conocida a éste y otros 12 antibióticos.

Material y métodos: Se seleccionaron 14 cepas multirresistentes y 4 sensibles de cada uno de los grupos de *Haemophilus* citados con sensibilidad conocida previamente. Mediante PCR se amplificó el gen presumiblemente implicado en la resistencia a trimetoprim, el gen constitutivo Fol A. El producto amplificado y purificado se secuenció y las secuencias obtenidas de las distintas cepas se introdujeron en una base de datos y se compararon entre sí y con cepas de referencia de cada uno de los grupos de *Haemophilus* estudiados. Se analizaron las mutaciones obtenidas obteniéndose dendogramas de las secuencias de nucleótidos y de proteínas.

Resultados: Las secuencias de nucleótidos y de proteínas de las cepas sensibles de los 4 grupos de *Haemophilus* estudiados sólo presentaban uno o ningún cambio aminoacídico, mientras que las pertenecientes a las cepas resistentes a trimetoprim y multiresistentes, tenían varias mutaciones implicadas con cambios de aminoácidos en posiciones fijas y comunes a los 4 grupos. Las cepas sensibles se agrupaban entre sí y las resistentes entre sí en el dendograma, sin diferencias entre grupos.

Conclusiones: Existen una serie de mutaciones en el gen Fol A que parecen ser las responsables de la resistencia a trimetoprim en todo el género *Haemophilus*. Es la primera vez que se obtienen resultados concluyentes con este gen en este género de bacterias.

295

ESCHERICHIA COLI MULTIRRESISTENTE PRODUCTORA DE UNA METALO-BETA-LACTAMASA

M.N. Larrosa*, E. Miró**, R.M. Bartolomé*, I. Planeáis*, F. Navarro**, T. Tortola*, S. Lavilla*, M. Palomar*** y G. Prats*
*Servei de Microbiologia. **Medicina Intensiva. Hospital Vall d'Hebron. ***Servei de Microbiologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona.

Objetivos: Caracterizar el mecanismo de resistencia a los betalactámicos de una cepa de *Escherichia coli* con un patrón compatible con la presencia de carbapenemasa.

Métodos: La identificación bioquímica del microorganismo se realizó mediante el sistema API 20 E (bioMérieux®) y su biotipado por técnicas convencionales. La sensibilidad a los antimicrobianos se determinó por la técnica de disco-difusión en agar Mueller-Hinton. Para el screening de la producción de metalo-beta-lactamasas se utilizó el método disco-difusión y el método de E-test con imipenem (IMP) e IMP más EDTA. Se determinó la presencia del gen bla_{VIM} mediante técnica de PCR con iniciadores específicos de esta familia de enzimas.

Resultados: La cepa de *E.coli* fue aislada de la orina de un paciente de 27a ingresado desde hacia 3m por una descompensación de una cirrosis hepática secundaria a VHC. Durante este periodo había recibido diversos tratamientos con antibióticos (cefotaxima, imipenem, piperacilina-tazobactam

y vancomicina). El aislamiento presentaba en el cultivo dos fenotipos diferentes: colonias secas y mucosas. Los dos tenían el mismo biotipo. El primer morfotipo (seco), era resistente a ampicilina y cefalosporinas de 1ª G, mientras que el segundo (mucoso) era resistente además al resto de cefalosporinas siendo sensible al aztreonam; el diámetro del halo de IMP se hallaba dentro de los límites de sensibilidad, su CIM fue de 0,75 mg/L. Se observó un incremento de la sensibilidad a IMP en presencia de EDTA en las dos técnicas utilizadas, presentando en la doble tira de E-test (IMP-IMP+EDTA) una zona fantasma de inhibición. En la PCR se observó una banda de 519 pb. La cepa sensible es probablemente una isogénica y presentaba una CIM de IMP de 0,094 mg/L

Conclusiones: Esta es la primera cepa de *E.coli* productora de imipenemasa aislada en nuestro medio. Ante un aislamiento de *E.coli* con un patrón de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación pero sensible al aztreonam, se debe pensar en la posibilidad de la existencia de este tipo de enzimas independientemente de que el halo del IMP se mantenga dentro de los límites de sensibilidad.

296

ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* (Kp) PRODUCTOR DE B-LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN SUPERFICIE DE POLIESTIRENO

Y. Guerrero, E. Ramírez de Arellano, J. Rodríguez Baño, E.J. Perea y A. Pascual

Objetivo: Los reservorios ambientales pueden ser relevantes en los brotes de infecciones nosocomiales por *A. baumannii* (Ab) por su capacidad para sobrevivir en superficies inertes y secas. Para Kp BLEE+ no existen datos que apoyen que los reservorios ambientales tengan relevancia en la epidemiología de brotes nosocomiales. El objetivo es estudiar la supervivencia de Kpn BLEE+ en una superficie de poliestireno.

Material y métodos: Se han estudiado 9 cepas de Kp: 7 Kp BLEE+ procedentes de muestras clínicas y ambientales de un brote nosocomial en la Unidad de Neonatología de nuestro hospital y pertenecientes a 2 clones (PFGE) diferentes: clon A (predominante; 6 cepas) y clon B (1 cepa). Como controles se utilizaron Kp ATCC 27799 (BLEE-) y ATCC 700603 (BLEE+). Adicionalmente se utilizaron Ab ATCC 49139 y 1 cepa de Ab multirresistente. Las bacterias cultivadas durante 4 horas en caldo HIB se lavaron 3x solución salina a 4° C y se prepararon suspensiones bacterianas de 10⁵ ufc/ml y 10³ ufc/ml en solución salina. Se inocularon 100ml en pocillos de 1,5 cm de diámetro de fondo plano (10⁴ y 10² ufc/pocillo) de una placa de poliestireno. Las placas se incubaron durante 30 días a temperatura y humedad ambiente. La viabilidad bacteriana se determinó a diferentes intervalos de tiempo arrastrando las bacterias de la superficie inoculada con una torunda de algodón previamente humedecida en HIB y posteriormente sembrando en placas de Columbia Agar para recuento.

Resultados: El tiempo máximo de supervivencia de las cepas de Kp BLEE+ fue de 10 días (clon B) y de 25 días (clon A predominante), alcanzándose el pico máximo de crecimiento a las 72 horas (>10³ ufc/pocillo para el inóculo 10²/pocillo). La supervivencia de Kp ATCC 27799 fue de 20 días. Para Ab, la supervivencia máxima fue de 10 días alcanzándose el pico máximo de supervivencia a las 48 horas (media: 321ufc/pocillo para el inóculo 10²/pocillo).

Conclusiones: La viabilidad de Kp BLEE+ en superficie de poliestireno y en ausencia de nutrientes puede prolongarse durante varias semanas. Sorprendentemente, el tiempo de supervivencia de Ab fue inferior al observado en el clon predominante de Kp BLEE+. La supervivencia prolongada de Kp BLEE+ en superficies inertes, sugiere que los reservorios ambientales podrían tener mayor relevancia epidemiológica que la hasta ahora considerada en la producción de brotes nosocomiales.

297

CARBAPENEMASA VIM-1 PRODUCIDA POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

M.T. Tórtola*, S. Lavilla*, E. Miró**, F. Navarro**, B. Mirelis**, G. Prats*

*Servicios de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron.

**Hospital de Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona.

Objetivo: En el contexto de un estudio dirigido a la vigilancia de las enterobacterias portadoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (CP), detectamos una cepa de *Klebsiella pneumoniae* portadora de una carbapenemasa. Se describe la caracterización del enzima.

Métodos: Durante el año 2003 se efectuaron un total de 1043 coprocultivos de pacientes ingresados en el Hospital Vall d'Hebron, con el objetivo de detectar si eran portadores de BLEE o de CP. Las muestras se sembraron en dos placas de MacConkey, una con una concentración de 2 mg/L de imipenem y otra con 8 mg/L de cefotaxima, con la finalidad de seleccionar microorganismos productores de CP y BLEE, respectivamente. Los aislamientos obtenidos en agar MacConkey con cefotaxima y/o imipenem fueron identificados por métodos convencionales y se les practicó un antibiograma por técnica de disco-difusión. A los aislados resistentes al imipenem se determinó la CIM mediante E-test, practicándose posteriormente un test de sinergia imipenem-EDTA. En caso de observarse sinergia, se determinó la presencia de los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* mediante PCR con iniciadores específicos de cada familia de enzimas, procediéndose a la secuenciación en caso de obtener amplificado.

Resultados: En uno de los 1043 pacientes estudiados se detectó una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de VIM-1. Su perfil de resistencia a betalactámicos incluía amoxiclavulánico, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefepime e imipenem y era sensible a aztreonam. Se obtuvo una CIM a imipenem de 1mg/L. El test de sinergia imipenem-EDTA fue positivo. En la PCR se observó una banda de 519 pb, cuya secuenciación presenta una homología del 100% con VIM-1.

Conclusiones: VIM-1 es una carbapenemasa que ha sido detectada en *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y otros microorganismos no fermentadores. La betalactamasa VIM-1 está codificada por el gen *bla_{VIM-1}* que se encuentra en elementos genéticos móviles lo que permite su transmisión entre bacterias. Es la primera vez que se describe en nuestro medio la presencia de VIM-1 en *Klebsiella pneumoniae*. Aunque la prevalencia de este enzima en aislados clínicos es baja, es importante su estudio debido a la repercusión que puede tener en el tratamiento así como en la vigilancia de la difusión de estos genes entre enterobacterias.

298

DETECCIÓN DE ENTEROBACTER AEROGENES PRODUCTOR DE SHV-12 EN CANTABRIAM.E. Cano, J. Calvo Montes, J. Agüero y L. Martínez-Martínez
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

Objetivos: Caracterizar el mecanismo de resistencia en dos aislamientos clínicos de *Enterobacter aerogenes* (Ea) con fenotipo compatible con la producción de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE).

Material y métodos: Se han estudiado dos aislamientos de Ea obtenidos de una misma paciente en un periodo de 4 meses, a partir de una úlcera en miembro inferior (Ea1) y del muñón post-amputación (Ea2), respectivamente. La identificación y la posible presencia de BLEE se realizó con el sistema WalkAway 96 (paneles Combo Neg 1S) y con tiras de E-test de cefepima (FEP) y FEP+ ácido clavulánico (AC). La transferencia de la posible BLEE se realizó por conjugación

[receptor: *E. coli* J53-Rif-R; selección: ceftazidima (CAZ, 2 mg/L) y rifampicina (100 mg/L)]. En los dos aislamientos de Ea y en los transconjugantes (TC) se determinó la CMI de cefotaxima (CTX), CTX-AC, CAZ, CAZ-AC, FEP, cefotetan (CTT), imipenem (IMP), meropenem (MPM), gentamicina (GEN), amicacina (AK) y levofloxacino (LVF) mediante microdilución (normas NCCLS). La presencia de genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M-9}* y *bla_{CTX-M-10}* se investigó mediante PCR, y los correspondientes productos de amplificación se secuenciaron. La posible relación clonal de los dos aislamientos de Ea y de representantes del clon de Ea productor de *bla_{TEM-24}* circulante en Europa se estudió mediante análisis de macrorestricción de ADN en electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Resultados: Las CMIs (mg/L) para Ea1-Ea2 fueron: 8-8 (CTX), $\leq 0,5/4-2/4$ (CTX-AC), 32-64 (CAZ), $\leq 0,5/4-2/4$ (CAZ-AC), 0,5-1 (FEP), 16->16 (CTT), 1-1 (IMP y GEN), 0,03-0,03 (MPM), 1-2 (AK) y 0,5-0,5 (LVF). Para los TC de Ea1 y Ea2 las CMIs fueron de 8 y 16 (CTX), 16 y 32 (CAZ) y $\leq 0,5/4$ (CTX-AC y CAZ-AC). No hubo variación de la resistencia en los TC para CTT, IMP, GEN, AK y LVF con respecto a *E. coli* J53 Rif-R. Los dos aislamientos de nuestro centro presentaron un patrón similar de PFGE, diferente del correspondiente al clon europeo. En Ea1 y sus transconjugantes se detectó SHV-12. En Ea2 y sus transconjugantes se detectó SHV-12 y TEM-1.

Conclusiones: Se ha detectado por primera vez en Cantabria una cepa de Ea productora de SHV-12. Esta cepa no se relaciona epidemiológicamente con el clon europeo productor de TEM-24 identificada en otros hospitales españoles.

299

DESARROLLO DE TÉCNICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS DE DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE A. BAUMANNII Y P. AERUGINOSA RESISTENTES A IMIPENEM

E. Sevillano, M.J. Canduela, F. Calvo, A. Umanan y L. Gallego

Objetivo: El objetivo de este trabajo fue la detección mediante técnicas fenotípicas y genotípicas de carbapenemasas de clase D tipo OXA-40, previamente caracterizada en cepas de nuestro medio, y metalobetalactamasas de tipo IMP y VIM.

Materiales y métodos: Se estudiaron 33 aislamientos de *P. aeruginosa* y 59 de *A. baumannii* resistentes a imipenem procedentes del hospital de Sta. Marina. Cepas control: *E. coli* 434 (Hodge); *A. baumannii* SM28 (OXA40); A327 (IMP); ACRS 41 (VIM1); y P4824 (VIM2). La CMI frente a imipenem y meropenem se realizó siguiendo las indicaciones de la NCCLS. La detección de carbapenemasas y metalobetalactamasas se realizó mediante los test de Hodge y EDTA respectivamente. La detección de los genes se realizó mediante la técnica de PCR con los siguientes iniciadores: *bla_{OXA}* (P2:5'-TTCCCCTAACATGAATTTGT-3' y P1:5'-GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3'), *bla_{IMP}* (IMP-R:5'-AACCAGTTTGCCTTACCAT-3' e IMP-F:5'-CTACCCGACGACAGTCTTTG-3'), *bla_{VIM}* (VIM-DIA/f:5'-CAGATTGCCGATGGTGTGG-3' y VIM-DIA/r:5'-AGGTGGGCCATTACAGCCAGA-3', VIM1-upv: 5'-GTCGCAAGTCCGTTAGCCCAT-3' y VIM2-upv: 5'-GATTCTAGCGGTGAGTATCCG-3'). Los resultados dudosos para el gen VIM se aseguraron mediante hibridación con sonda marcada con digoxigenina- dUTP.

Resultados: En las cepas de *P. aeruginosa* se obtuvieron los siguientes resultados: Hodge: 13 aislamientos +, 9 -, y 11 no legibles debido a la producción de pigmentos y/o a la inhibición del crecimiento de la cepa de *E. coli*; EDTA: 14 cepas +, 7 - y 12 no legibles. El gen OXA40 se detectó en 2 aislamientos. Todos los experimentos fueron negativos para *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}*. La hibridación con la sonda VIM mostró una banda débil en uno de los aislamientos. En las cepas de *A. baumannii* los resultados fueron: 54 Hodge + y 9 EDTA +. 52 cepas fueron OXA +, 1 IMP + y todos VIM -.

Conclusiones: Los test fenotípicos no ofrecieron buenos resultados entre las cepas de *P. aeruginosa* ya que en la mitad de los casos resultó imposible su lectura. La presencia del gen OXA40 está ampliamente generalizada entre los aislamientos de *A. baumannii*. El hallazgo de este gen en 2 cepas de *P. aeruginosa* resulta muy importante ya que indicaría la transmisibilidad de este gen entre ambas especies.

300

LOS PÉPTIDOS CECROPINA A-MELITINA SON ACTIVOS FRENTE A RESISTENCIAS A COLISTINA EN ACINETOBACTER BAUMANNII. ¿UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA?

J.M. Saugar, M.E. Pachón-Ibáñez, C. Pichardo, D. Andreu, J. Pachón y L. Rivas

Introducción/Objetivos: En un trabajo previo se demostró que los péptidos híbridos cecropina-melitina (CAMEs) eran bactericidas sobre aislados multirresistentes de *A. baumannii* en rango micromolar, cuyo mecanismo difiere de la polimixina B, a pesar de su similitud estructural (Saugar, 2002. AAC 46:875), lo que abre posibilidades de actuación terapéutica sobre aislados resistentes a colistina. El objetivo principal es demostrar dicha posibilidad así como sus bases moleculares.

Material y métodos: Se ensayaron 4 CAMEs de diferente número de residuos sobre 13 aislados clínicos de *A. baumannii* resistentes a colistina, determinándose sus CMI₅₀ y CMB₅₀. El resto del estudio se realizó sobre los aislados 208628, 201630, 183280 lisa y rugosa, con diferente susceptibilidad a colistina (CMI₅₀: 8-64 µg/ml, y ATCC19606 como control. La interacción péptido-LPS, aislado de cada una de las cepas se midió por desplazamiento de dansil-polimixina, la permeabilización de la membrana externa por sensibilización a detergente, y de la interna por entrada de la sonda vital SYTOX. La lisis de protoplastos se determinó mediante la disminución en la dispersión de luz tras adición del reactivo.

Resultados: Todos los péptidos son activos sobre las 13 cepas, con CMI₅₀ y CMB₅₀ entre 2 y 8 µg/ml (CMI₅₀ y CMB₅₀ entre 4 y 8 µg/ml). Todos ellos mostraron una mayor afinidad que colistina por el LPS de las diferentes cepas. También son más eficaces que colistina en la sensibilización a la lisis por detergente y en la permeabilización a la membrana interna, realizada a su CMI correspondiente. La resistencia a colistina de los aislados es debida a su membrana externa, ya que no existe diferencia en la lisis de protoplastos de la cepa control y de aislados resistentes a colistina.

Conclusiones: 1) Los péptidos híbridos cecropina A-melitina son activos frente a aislados clínicos de *A. baumannii* resistentes a colistina. 2) La acción letal se realiza por permeabilización de la membrana interna. 3) Las diferencias de las cepas respecto a la susceptibilidad a colistina y a los péptidos es debido exclusivamente a modificación de la membrana externa, ya que no existe en protoplastos. 4) Los péptidos interaccionan con LPS de la membrana externa con mayor afinidad que colistina. 5) Los péptidos cecropina A-melitina constituyen una nueva estrategia frente a la creciente resistencia de *A. baumannii* a colistina.

301

IMPLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE ACTIVO EN LA DISMINUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS EN AEROMONAS SPP

E. Cascales, L. Cebrián, M. Ruiz, J.C. Rodríguez y G. Royo
S. Microbiología. Hospital General Universitario de Elche.

Objetivo: Caracterizar la influencia de los sistemas de transporte activo en la disminución de sensibilidad a fluoroquinolonas de aislados clínicos de *Aeromonas spp.*

Material y métodos: Cepas: 702 aislados de *Aeromonas spp.* La sensibilidad antibiótica se determinó mediante Winder (criterios NCCLS). Mecanismos de transporte activo: Se estudiaron 33 cepas, 21 resistentes y 12 sensibles a ácido nalidíxico. Se comparó la sensibilidad a ácido nalidíxico (AN), ciprofloxacino (C) y moxifloxacino (M) en presencia y en ausencia de tres inhibidores de estos sistemas: MC-207110, salicilato y reserpina.

Resultados: La sensibilidad a AN ha variado desde el 100% en 1992 hasta el 83,3% en 2003; la sensibilidad a C es constante (98-100%). Resistentes a AN: Al analizar la capacidad de expulsión del AN, los sistemas inhibidos por el MC 207110, salicilato y reserpina se muestran activos en el 61,90%, 9,52% y 80,95% de las cepas respectivamente, con expulsión de 77,5, 64 y 99,7 µg. Frente a M, están activos en el 61,9%, 28,5% y 9,5% (0,5, 0,6 y 0,9 µg). Frente a C solo se muestran activos los sistemas inhibidos por el salicilato: 61,9% de las cepas (0,34 µg). Sensibles a AN: Los inhibidos por el MC 207110, salicilato y reserpina son activos en el 75%, 58,3% y 41,6% de las cepas respectivamente, pero con menor actividad (0,1, 0,2 y 0,1 µg). Frente a M, están activos en el 91,6%, 58,3% y 8,3% de las cepas (0,03, 0,07 y 0,03 µg). Frente a C solo se muestran activos los inhibidos por salicilato: 41,6% de las cepas (0,024 mcg/ml).

Conclusiones: La implicación de los mecanismos de transporte activo es variable en función del antibiótico y de la cepa, pero en general está mucho más activada en cepas resistentes a AN y su actividad es complementaria a las mutaciones de los genes de la girasa (1). Debe ser evaluado más profundamente la importancia clínica de la resistencia a AN en el tratamiento de este microorganismo con fluoroquinolonas, tal y como se está postulando para otros patógenos.

1. Oppegaard et al. Antimicrob Agents Chemother. 1994 Oct;38(10):2460-4.

302

MUTACIONES EN GEN GYRA DE AISLADOS NALIDÍXICO RESISTENTES DE SALMONELLA ENTERICA SUBESPECIE ENTERICA DE ORIGEN CLÍNICO Y ALIMENTARIO

I. Escribano*, V. Pertegás**, L. Cebrián**, J.C. Rodríguez*, M. Ruiz* y G. Royo*

*Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Alicante. **Laboratorio de Microbiología de Salud Pública. Alicante.

Objetivos: Detección de mutaciones en QRDR (región determinante de resistencia a quinolonas) del gen *gyrA*, en aislados ácido nalidíxico resistentes de *Salmonella enterica* subs. enterica, de origen clínico y alimentario.

Material y métodos: Aislados clínicos humanos. 61 aislados de *S. enterica* nalidíxico resistentes: 21 *S. enteritidis*, 18 *S. hadar*, 13 *S. virchow*, 7 *S. typhimurium*, 1 *S. brandenburg* y 1 *S. monofasica*. 7 controles nalidíxico sensibles: 2 *S. enteritidis*, 1 *S. virchow*, 2 *S. typhimurium* y 2 *S. brandenburg*. Aislados alimentarios. 10 aislados de *S. enterica* nalidíxico resistentes: 9 *S. enteritidis* (pollo, pavo, otras aves y salmón ahumado), y 1 *S. hadar* (ternera). 7 controles nalidíxico sensibles: 3 *S. enteritidis* (huevo, mayonesa), 2 *S. typhimurium* (carne), 1 *S. bredeney* (carne) y 1 *S. cerro* (huevo). Sensibilidad antibiótica. A ácido nalidíxico y ciprofloxacino mediante el método de dilución en agar (criterios de la NCCLS). Secuenciación de QRDR del gen *gyrA*. Los cebadores usados en la primera PCR son STGYRA1 (5'- TGTCCGAGATGGCCTGAAGC-3') Y STGYRA12 (5'- CGTTGATGACTTCCGTCCAG-3') [1]. Una segunda PCR obtiene la secuencia comprendida entre los a.a 54 y 171 que comparamos con la de *S. typhimurium* NCTC 74 [2]. Random amplified polymorphic DNA (RAPD). Determinación de la relación epidemiológica entre los aislados. PCR utilizando los cebadores 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3'), 1283 (5'-GC-GATCCCA-3') and 1247 (5'-AAGAGCCCGT-3') [3].

Resultados: Mutaciones en aislados nalidíxico resistentes. Humanos: Asp87-Asn: *S. Enteritidis* (9%), *S. Hadar* (100%), *S. Typhimurium* (72%) Asp87-Tyr: *S. Enteritidis* (86%), *S. Typhimurium* (14%) Ser83-Phe: *S. Typhimurium* (14%), *S. Virchow* (100%), *S. Monofasica* (100%). No mutadas: *S. Enteritidis* (5%), *S. Brandenburg* (100%). Alimentos: Asp87-Tyr: *S. Enteritidis* (100%) Asp87-Asn: *S. Hadar* (100%). No hemos encontrado mutaciones dobles ni silentes en nuestros aislados, ni relación epidemiológica.

Discusión: De los aislados clínicos y alimentarios nalidíxico resistentes, los mutados presentan sensibilidad disminuida a ciprofloxacino (MIC = 0,125-1 mg/L), y los no mutados son sensibles a ciprofloxacino (MIC < 0,125 mg/L). La mutación más prevalente en aislados humanos es Asp87-Asn (43%) y en alimentarios Asp87-Tyr (90%). Ser83-Phe encontrada sólo en aislados humanos (25%) se ha descrito también en aislados de origen animal [4]. La coincidencia de mutaciones entre los aislados humanos y alimentarios, sin relación epidemiológica, indica la similitud de los mecanismos de resistencia a estos compuestos a pesar de que su origen sea distinto.

Bibliografía

- 1) Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2131-7.
- 2) Antimicrob Agents Chemother 1996;40:1009-13.
- 3) Letters in Applied Microbiology 1997;24: 243-8.
- 4) J Clinical Microbiol 2002;4:1481-6.

303

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL PATRÓN DE RESISTENCIA A C,G,K,S,SU,SXT,TE,NX ASOCIADO A SALMONELLA SER. TYPHIMURIUM FAGOTIPO 204C

S. Herrera-León*, R. González-Sanz*, M.M. Ramírez**, A. Aladueña*, S. Valdezate* y A. Echeita*

*LNRSS Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella*. Servicio de Bacteriología. C.N.M. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid. **Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Cuba.

Introducción: *Salmonella* ser. *typhimurium* constituye uno de los dos serotipos más frecuentes en muestras de origen humano y animal. En los años del estudio, el aislamiento del fagotipo (FT) 204c aumentó considerablemente pasando a formar parte de los diez más frecuentes. Este fagotipo parece estar asociado con patrones de multirresistencia a distintos antimicrobianos por lo que es necesario establecer una vigilancia epidemiológica de estas cepas.

Objetivo: Caracterizar los mecanismos moleculares de resistencia en una selección de cepas de *Salmonella* ser. *typhimurium* FT 204c aisladas en cerdos destinados al consumo humano.

Material y métodos: Se estudiaron las cepas de *Salmonella* ser. *typhimurium* FT 204c recibidas en el LNRSS durante los años 1998-99. Se determinó la sensibilidad a 29 antimicrobianos mediante la técnica de difusión en disco (NCCLS) y se consideraron para posteriores estudios aquellas que presentaron un patrón de resistencia característico: A,C,G,K,S,Su,SxT,Te,Nx. Mediante PCR y secuenciación se llevó a cabo la detección e identificación de los distintos genes implicados en la codificación de dichas resistencias. La localización plasmídica o cromosómica, se determinó mediante la utilización de la enzima Plasmid-Safe® y posterior amplificación por PCR de los genes investigados. En el caso de resultar un gen plasmídico, se realizó Southern Blot para determinar en cuál de los plásmidos presentes en estas cepas se localizaban los genes de resistencia.

Resultados: Todas las cepas poseían un integrón de clase I de aproximadamente 1600 pb, que transportaba el gen *dhfr*-1, responsable de la resistencia a trimetoprim y el gen *aadA*2, responsable de la resistencia a estreptomycin. Asociado a este integrón se detectó el gen *sul*1, codificando la resistencia a sulfonamidas. Además, se amplificaron y secuenciaron los siguientes genes: *tem*1, responsable de la resistencia a ampicilina; *cat*, responsable de la resistencia a cloranfenicol; *aacC*2, responsable de la resistencia a gentamicina; *tetA*, responsable de la resistencia a tetraciclina y *ahp*(3')-I, responsable de la resistencia a kanamicina. Estas resistencias se localizaron en un plásmido de alto peso molecular. Las cepas analizadas presentaron una única mutación en la posición 87 del gen *gyrA* (Asp-Gly) responsable de la resistencia a ac. nalidíxico.

Conclusión: El aislamiento en animales destinados a consumo humano de cepas multirresistentes pertenecientes a serotipos y fagotipos frecuentemente aislados en humanos, hace necesario establecer una vigilancia epidemiológica que evite su diseminación especialmente cuando estas resistencias se encuentran localizadas en elementos genéticos intercambiables como son los plásmidos.

Conclusión: El aislamiento en animales destinados a consumo humano de cepas multirresistentes pertenecientes a serotipos y fagotipos frecuentemente aislados en humanos, hace necesario establecer una vigilancia epidemiológica que evite su diseminación especialmente cuando estas resistencias se encuentran localizadas en elementos genéticos intercambiables como son los plásmidos.

304

ACTIVIDAD DE MOXIFLOXACINO, LEVOFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE CAMPYLOBACTER SPP

J. Ruiz, A. Moreno, M.T. Jiménez de Anta y J. Vila.

Hospital Clinic, Barcelona, España.

Objetivo: Evaluar la actividad de tres fluoroquinolonas frente a aislamientos clínicos de *Campylobacter* spp., determinando los mecanismos responsables de conferir elevados niveles de resistencia a moxifloxacino.

Métodos: La CMI de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino de 88 aislamientos clínicos de *Campylobacter* spp. se analizó mediante E-test, tanto en presencia, como en ausencia de Phe-Arg-β-naphtylamide. La presencia de mutaciones en *gyrA* se estableció mediante PCR y secuenciación.

Resultados: Moxifloxacino fue la quinolona más activa de las analizadas, con una CMI₅₀ de 0,75 µg/ml y una CMI₉₀ de 2 µg/ml, mientras levofloxacino y ciprofloxacino presentaron una CMI₅₀ de 6 y > 32 µg/ml respectivamente y una CMI₉₀ > 32 µg/ml en ambos casos. Cuando se analizó la presencia de mutaciones en *gyrA*, se vio que las cepas poseedoras de un gen salvaje eran uniformemente sensibles a las tres quinolonas analizadas, que aquellas que presentaban una sustitución en el codón 86 (resultando en la sustitución de Thr-86 a Ile), fueron altamente resistentes a ciprofloxacino (CMI > 32 µg/ml), resistentes a levofloxacino (CMI de 2 a > 32 µg/ml) sensibles o moderadamente resistentes a moxifloxacino (CMI de 0,38 a 2 µg/ml). Sólo 2 cepas presentaron una doble sustitución en *GyrA* (Thr-86 a Ile y Asp-90 a Asn), siendo altamente resistentes a las 3 quinolonas analizadas (CMI > 32 µg/ml en todos los casos). Al adicionar Phe-Arg-β-naphtylamide, no se detectó ningún efecto en la CMI de las quinolonas estudiadas.

Conclusiones: Moxifloxacino es altamente activo contra *Campylobacter* spp., inclusive ante aquellas cepas que presentan una sustitución en *GyrA*, cepas que son resistentes a las otras quinolonas analizadas. El desarrollo de elevados niveles de resistencia a moxifloxacino se correlaciona con la presencia de una doble sustitución en *GyrA*.

305

ESTUDIOS DE ESTRUCTURA FUNCIÓN EN β-LACTAMASAS DEL GRUPO CTX-M-9

L. Domínguez, M. Cartelle, D. Canle, M. Tomás, R. Villanueva y G. Bou

C. H. U. Juan Canalejo. A Coruña.

Introducción: Las β-lactamasas tipo CTX-M están incrementando su aparición desde que se detectó la primera en 1992 (MEN-1). Se caracterizan por poseer alta capacidad hidrolítica sobre cefotaxima (CTX). El mecanismo bioquímico

implicado en la hidrólisis de CTX permanece desconocido, aunque se ha descrito el cambio S130G en este grupo, como implicado en la hidrólisis

Objetivos: Realizar estudios de estructura función en β -lactamasas del grupo CTX-M-9 usando la CTX-M-14 como modelo, elucidando los aminoácidos implicados en la hidrólisis de CTX. Localizar espacialmente los aminoácidos en la estructura 3D de la CTX-M-14 que está siendo cristalizada en nuestro laboratorio.

Material y métodos: Se ha clonado el gen de la CTX-M-14 en la diana *Bam*HI del vector pBGS18⁺. Transformaciones sobre *E. coli* TG1. Se realizó mutagénesis aleatoria de este gen siguiendo las recomendaciones del fabricante (Kit Mutazymme, Stratagene) para obtener una tasa de mutación 7-12 nt/1 Kb. La librería obtenida se clonó en pBGS18⁺ en la diana *Bam*HI. Los transformantes obtenidos, fueron seleccionados mediante estudios de CMI (mg/L) a CTX, ceftazidima (TZ), aztreonam (AT) y cefepime (PM) con disco-difusión y E-test, siguiendo los criterios de la NCCLS. Se secuenció el ADN por métodos convencionales. La mutagénesis dirigida confirmatoria, se realizó según Ho SN. y col, 1989. Se estudió la orientación de los genes CTX-M obtenidos, respecto al promotor *LacZ* del pBGS18⁺ mediante PCR con iniciadores específicos.

Resultados: Se obtuvieron 70 clones recombinantes en la librería de CTX-M-14; de ellos 3 clones mostraron disminución en la CMI a CTX y la CMI a ampicilina se mantuvo como > 256 en todos ellos. CMI control CTX-M-14 wt AT 64, CTX >256, TZ 3, PM >256. Las CMI de los genes CTX- M-14 mutagenizados: A51T (S1), AT 16, CTX 16, TZ 1,5 y PM 1,5; N109K (H3) AT 0,5, CTX 0,75, TZ 0,125 y PM 0,25; D236N (S5-H11) AT 1, CTX 24, TZ 0,19 y PM 8 (tomando como patrón la estructura 3D de un consenso de β -lactamasas de clase A, S es lámina B y H hélice alfa).

Conclusiones: La mutación A51T ha mostrado su importancia en la hidrólisis de CTX en distintas subfamilias de enzimas CTX-M. N109K y D236N disminuyen la CMI a CTX, pero también afectan a otros antibióticos. Se requieren nuevos experimentos de mutagénesis así como experimentos cinéticos, para identificar todos aquellos aminoácidos implicados en la hidrólisis de CTX. Como en el grupo CTX-M-1, no sólo los tres dominios catalíticos y el omega-loop están asociados en las propiedades bioquímicas de las CTX-M sobre los β -lactámicos, sino que cambios aminoacídicos en otras posiciones pueden afectar al plegamiento de la enzima dificultando o favoreciendo el paso de antibióticos al centro activo.