

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



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

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Alberto Ortíz Perez

Bajo la dirección del doctor
Ricardo Fernández Roblas

Madrid, 2009

- **ISBN: 978-84-692-7609-9**

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

Tesis Doctoral presentada por

ALBERTO ORTIZ PÉREZ

Director de la Tesis

Dr. RICARDO FERNÁNDEZ ROBLAS

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



D. RICARDO FERNÁNDEZ ROBLAS, Jefe Asociado del Departamento de Microbiología Clínica de la Fundación Jiménez Díaz-UTE de Madrid,

CERTIFICA:

Que D. ALBERTO ORTIZ PÉREZ, Licenciado en Farmacia, ha completado bajo su dirección los trabajos convenientes a la obtención de resultados para optar al título de DOCTOR por la Universidad Complutense de Madrid, y en vista de lo adecuado de su desarrollo, se autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral para su evaluación.

Y para que conste, se firma en Madrid, agosto de 2008.

A handwritten signature in cursive script, reading 'Ricardo Fernández Roblas', written over a horizontal line.

Fdo.: Dr. Ricardo Fernández Roblas.

Desocupado lector: no puedo alcanzar a imaginar la inquietud y el desasosiego con que habrás estado esperando el final de este manuscrito, acontecimiento que se habría producido mucho tiempo ha de no haber sido por una extraordinaria aventura acaecida en tierras de la Alcarria que imposibilitó su conclusión con la premura y diligencia que yo habría anhelado. Asimismo, es menester advertirte que hubiese sido mi voluntad la de escribir el tratado más perfecto engendrado por mi modesto entendimiento, el compendio de conocimientos sobre esta materia más importante hasta ahora nunca realizado y un documento de referencia sin par como no ha habido otro en la Historia de la Ciencia. Mas el pudor me obliga a confesar que simplemente se trata de un texto sencillo, escrito con toda honestidad y honradez, cuyas disquisiciones no se salen un punto de la verdad, y que no pretende más que deleitar a la persona que lo leyere, así como mostrar alguna enseñanza que pudiese servirle de provecho en el futuro.

Del mismo modo, me hubiese gustado que, al igual que sucedía con los poetas y escritores de la Antigüedad, este libro se hubiera gestado al amparo de algún gran mecenas bajo cuya protección deseaban guarecerse los más aventajados genios de la época. Sin embargo, he de reconocer que fue una singular ayuda del Fondo de Investigación Sanitaria la que hizo posible esta creación, de la misma manera que fue toda la plantilla del Laboratorio del Departamento de Microbiología de la Fundación Jiménez Díaz y Unilabs, gente de más humilde condición pero no por ello menos valiosa personal y profesionalmente, la que facilitó la realización de este ensayo con su colaboración e inestimable ayuda.

Llegados a este punto, justo sería recordar a los insignes doctores Jaime Esteban Moreno, Ricardo Fernández Roblas e Ignacio Gadea Gironés, que junto con el doctor Francisco Soriano García, me encauzaron por el camino de la investigación y del esfuerzo personal como único hábito para lograr todo aquello que uno afana y persigue. Aunque en muchas ocasiones el transitar por esa senda suponga caminar por pedregosos barbechos, escalar escarpadas montañas o vadear caudalosos ríos, al final siempre se encuentra esperando la justa recompensa para quien la busca con afínco y no desfallece en el empeño.

Fueron mis compañeros de investigación y residencia quienes mejor comprendieron lo ingrato y dificultoso que con frecuencia se presenta este camino. Sujetos a muchas disputas y no pocas incomprensiones, todos perseveramos en nuestro ánimo de alcanzar el esperado galardón no apartándonos ni un ápice del sendero de la virtud y la honra, pues la tentación del atajo nos lleva en la mayoría de las ocasiones al oprobio y a la indignidad. De entre todos ellos, no quisiera olvidarme de que no fue sino gracias a la pericia y las buenas artes de mi compañera, y sin embargo amiga, Nieves, que se pudo llevar a buen término esta descomunal empresa y merece, por todo ello, un lugar destacado en el Parnaso de las Ciencias y las Artes.

*Para concluir, el curioso y exigente lector me permitirá tener ocasión de rendir homenaje a la persona que me enseñó por primera vez el misterioso microbio del que es objeto este discurso y que, con sus sabios consejos, me estimuló a alcanzar un mayor conocimiento en el fabuloso mundo de estos seres invisibles. Después de tantos años pareceme aún estar recordando sus palabras aquel día en el que se halló un germen de semejantes particularidades. Si mal no recuerdo decían algo así: **“como podrá observar, estas bacterias se caracterizan por ser bacilos grampositivos, rectos, con una morfología regular, uniformemente teñidos y, como algunos autores describen en sus libros, se disponen en forma de caracteres chinos o de empalizada, y hoy yo tengo el privilegio de enseñárselo a usted”**. El verdadero honor fue mío por haberle conocido, don José María Alés Reinlein, hombre docto e ilustrado, cuyas enseñanzas y dedicación han sido el más nítido y resplandeciente espejo en el que nos hemos mirado todas las generaciones que hemos permanecido bajo su tutela. Vale.*

“Bienaventurado el que lee, y los que escuchan las palabras de esta profecía, y los que observan las cosas en ella escrita, pues el tiempo está próximo”

(Libro del Apocalipsis, 1:3)

INTRODUCCIÓN	1
EL GÉNERO <i>Corynebacterium</i>	3
CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	4
CLASIFICACIÓN	6
EPIDEMIOLOGÍA	9
PATOGENICIDAD DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE DIFTEROMORFOS	9
SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i> Y TRATAMIENTO	12
ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS, CETÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS	13
MECANISMOS DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS	17
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	25
CEPAS BACTERIANAS	27
Procesamiento de las cepas bacterianas	27
Almacenamiento	27
PRUEBAS FENOTÍPICAS CONVENCIONALES	28
Identificación	28
Sensibilidad antibiótica	29
Agentes antimicrobianos	29
Procedimiento	29
PRUEBAS MOLECULARES	31
Amplificación de los genes <i>erm(X)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(TR)</i> , <i>mef(A)</i> y <i>mef(E)</i> mediante PCR	31
Extracción de ADN	31
Procedimiento	31
Electroforesis y tinción del gel	33
Lectura y análisis de los geles	34
Extracción de plásmidos	34
Procedimiento	34
Electroforesis del plásmido y tinción del gel	35
Lectura y análisis de los geles	36
Secuenciación de los fragmentos amplificados <i>erm(X)</i> y <i>erm(B)</i>	36
Amplificación	36
Purificación	37
Secuenciación	37
Caracterización genotípica de la especie mediante 16S ARN	38
Extracción de ADN	38
Amplificación	38
Purificación	39
Secuenciación	40
Análisis de las secuencias	41
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ERITROMICINA	41
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
RESULTADOS	43
IDENTIFICACIÓN, SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i> Y DETERMINACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA	45
CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES <i>erm(X)</i> Y <i>erm(B)</i>	71
DETERMINACIÓN DE PLÁSMIDOS	74
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ERITROMICINA	75
DISCUSIÓN	77
SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	79
PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA	82
OTROS DETERMINANTES DE RESISTENCIA	84
PRESENCIA DE PLÁSMIDOS	86
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	93

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

INTRODUCCIÓN

EL GÉNERO *Corynebacterium*

El género *Corynebacterium* fue descrito por primera vez por Lehmann y Neuman en 1896 con el objeto de acomodar al bacilo causante de la difteria y a otras especies morfológicamente parecidas. Etimológicamente, el nombre deriva de la palabra griega “*koryne*” que significa garrote o porra y “*bacterion*” que significa bastón¹. Desde un punto de vista clínico, la especie más importante perteneciente a este género es *Corynebacterium diphtheriae*, de la que deriva el término difteromorfo, que suele utilizarse para englobar al resto de especies del género, a diferencia del vocablo corineforme, que abarca al conjunto de bacilos grampositivos con un aspecto parecido, y en el que se incluyen géneros como *Brevibacterium*, *Archanobacterium*, *Bacillus*, *Kurthia*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Rothia*, *Turicella*, *Arthrobacter*, *Erysipelothrix*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*^{2, 3}. La clasificación de estos microorganismos ha sido difícil y en ocasiones controvertida, ubicándose a algunas especies en diferentes géneros en función de los avances en taxonomía⁴. Sin embargo, esta disparidad de criterios en la caracterización de nuevas especies, se ha corregido en parte gracias a la aplicación de las nuevas técnicas de biología molecular. Estas técnicas, junto con las más tradicionales de análisis de la composición de la pared celular y los patrones de los ácidos grasos que se hallan en su estructura, permiten una continua revisión taxonómica del género y una caracterización más correcta de las especies^{2,5-7}.

Las especies de difteromorfos son organismos ubicuos que forman parte de la microbiota comensal de la piel y mucosas del ser humano y animales^{2,3,8}. Por ello, suelen aislarse con frecuencia en muestras clínicas siendo discutible su significado clínico, considerándose colonizadores o contaminantes en la mayoría de los casos. Sin embargo, en los

últimos años, a medida que se han mejorado las técnicas de diagnóstico e identificación, se ha producido una mejor caracterización de los aislamientos clínicos. Esto ha llevado a un mejor conocimiento de su potencial patógeno que, junto con el aumento de enfermos susceptibles de infectarse (pacientes quirúrgicos, inmunodeprimidos), han permitido identificar como patógenos humanos a diversas especies de difteromorfos. En este sentido, los miembros pertenecientes al género *Corynebacterium* han sido descritos como agentes causantes de infecciones graves a nivel del tracto urinario, neumonía, endocarditis, septicemia, etc., afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos, con diversas enfermedades subyacentes y de edad avanzada ⁹⁻
¹¹. El carácter patógeno oportunista observado en estos microorganismos se ha visto reforzado por el elevado número de aislamientos realizados en el medio hospitalario, concretamente en superficies y en material del equipo médico, lo que ayuda a comprender el incremento de infecciones nosocomiales producidas por este tipo de bacterias a medida que se prolonga la estancia del paciente ¹².

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

En función de la apariencia al microscopio, y de unas pocas propiedades fenotípicas de la colonia en el medio de cultivo, se puede obtener una identificación presuntiva del género. Las especies del género *Corynebacterium* se caracterizan por ser bacilos grampositivos, pleomórficos, no productores de esporas, inmóviles y ser ácido sensibles ¹³. Presentan una gran diversidad de aspectos en la tinción de Gram, apareciendo en forma de porra o de cocobacilo, según en la fase del ciclo vital en la que se encuentren, siendo típica la disposición de los bacilos en forma de “caracteres chinos” o de alineación en “empalizada”. Otros rasgos distintivos como la morfología, pigmentación, olor y presencia de hemólisis de las colonias, pueden resultar útiles en una primera caracterización ².

En los últimos años, debido a la creciente descripción de nuevas especies, así como la reclasificación de las ya existentes, se ha hecho necesaria una mejor identificación, a nivel de

especie, de los aislamientos encontrados en las muestras clínicas por parte de los laboratorios asistenciales. Existen en la actualidad sistemas automatizados como la tarjeta Vitek ANC que permite la identificación de las especies más importantes del género en 6 horas ¹⁴. A pesar de todo, no siempre se consigue una correcta tipificación a nivel de especie en el género *Corynebacterium* ¹⁵. En este sentido, el sistema API CORYNE, basado en la identificación mediante pruebas bioquímicas convencionales, es uno de los más utilizados ^{16, 17}, siendo perfeccionado periódicamente hasta llegar a conseguir que más de un 90% de las especies analizadas tengan una correcta identificación ¹⁸. En este aspecto, el sistema API CORYNE se ha mostrado como el mejor método identificativo para los laboratorios asistenciales, aunque en ocasiones para lograr una adecuada diferenciación entre algunas especies es necesario el desarrollo de pruebas complementarias, como la capacidad de asimilación de carbono a partir de diversos sustratos glucídicos, ácidos orgánicos y aminoácidos ^{19, 20}. Paralelamente, otros sistemas, como el RapID CB Plus System, se han ido desarrollando como una alternativa fiable en la caracterización fenotípica, con la ventaja de no requerir pruebas bioquímicas adicionales en la identificación de más especies del género *Corynebacterium*, y otros bacilos grampositivos, y conseguir los resultados en 4 horas ²¹.

Con el objetivo de mejorar la eficacia de las técnicas tradicionales en identificación, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares basadas en el empleo de diversas tecnologías. De esta suerte, existen protocolos para la identificación de difteromorfos mediante el estudio de los ácidos grasos de la pared bacteriana, bien mediante cromatografía gas-líquido ^{22, 23}, o mediante la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) ^{24, 25}. Estas técnicas se han empleado como complemento para la descripción de nuevas especies ^{26, 27} o reclasificación de las mismas ²⁸. A pesar de todo, las dificultades técnicas que presentan estas tecnologías para la mayoría de laboratorios asistenciales han minimizado su importancia en la práctica clínica diaria.

Sin embargo, en los últimos años, el protagonismo en la caracterización, identificación y clasificación de las especies corresponde a las técnicas basadas en el estudio del ADN, mediante la utilización de técnicas de amplificación genómica, fundamentalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De todas las técnicas basadas en la amplificación genómica, la ribotipia ha sido una de las más empleadas en la identificación de especies del género *Corynebacterium*. Esta técnica se basa en el empleo de sondas de genes ribosomales que codifican el 16S ARNr y una digestión posterior con enzimas de restricción como *BstEII*, *SmaI*, *SphI*, *HindIII* y *EcoRI* entre otras. El análisis de la longitud de los fragmentos de restricción permitirá la caracterización de estos microorganismos a nivel de especie ²⁹. Por otra parte, la secuenciación del gen 16S ARNr se ha convertido en la técnica de referencia para la identificación de las diferentes especies y el establecimiento de relaciones filogenéticas entre las mismas ³⁰⁻³². En este mismo sentido, se ha demostrado que la secuenciación del gen *rpoB* también puede ser útil para la identificación a nivel de especie ³³. Además, se ha ido extendiendo el uso de estas técnicas y otras similares en diversos estudios realizados sobre muestras clínicas en las que se ha podido determinar el agente causante de la infección, aun siendo los diferentes cultivos negativos ³⁴.

CLASIFICACIÓN

En la actualidad existen 93 especies pertenecientes al género *Corynebacterium* ³⁵ de las que un pequeño porcentaje ha sido descrito como causante de infecciones en el ser humano (Tabla 1). Tradicionalmente, estas especies han sido clasificadas en función de los aportes nutritivos que son necesarios para un mejor desarrollo de la colonia en los medios habituales de crecimiento. A este respecto, están las especies lipofílicas, que se caracterizan por un crecimiento lento, de tres o más días, y que requieren la presencia de lípidos, como el Tween 80, para un mejor desarrollo en los medios habituales de aislamiento ³⁶. En este grupo destacan *Corynebacterium urealyticum* y *Corynebacterium jeikeium* como las dos especies con mayor

importancia clínica y epidemiológica. *C. urealyticum* fue denominada como grupo CDC D2 hasta el año 1992 en el que fue reclasificada con su nombre actual ³⁷. Fenotípicamente, se caracteriza por poseer una potente actividad ureasa que le confiere una capacidad especial para provocar infecciones a nivel del tracto urinario. Por otro lado, *C. jeikeium* se diferencia de la especie anterior en la capacidad para fermentar la glucosa y carecer de actividad ureasa, siendo considerado un patógeno oportunista causante de infecciones nosocomiales, la mayoría de ellas relacionadas con cuerpos extraños ³⁸. Otras especies lipofílicas destacables son *Corynebacterium macginleyi*, que ha sido frecuentemente aislado en infecciones oculares ³⁹, *Corynebacterium bovis*, de importancia clínica en veterinaria ³¹, *Corynebacterium accolens* ⁴⁰ y *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum* ^{2, 13, 41}.

Tabla 1. Especies más importantes del género *Corynebacterium* que producen infecciones en humanos ^{2, 8, 13} (entre paréntesis las infecciones asociadas a cada especie).

No lipofílicas	Lipofílicas
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i> (bacteriemia)	<i>C. accolens</i> (endocarditis)
<i>C. amycolatum</i> (infecciones de catéteres vasculares, abscesos, infección de heridas, infección urinaria)	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>lipophilum</i> (endocarditis, sepsis por catéter, absceso cerebral, absceso de pulmón)
<i>C. argentoratense</i> (infección respiratoria)	<i>C. diphtheriae</i> ^(b)
<i>C. aurimucosum</i> (infección genitourinaria en mujeres)	C. grupo F-1 (infección urinaria)
<i>C. auris</i> (otitis media)	C. grupo G (bacteriemia, endocarditis, infección de heridas)
<i>C. confusum</i> (bacteriemia, infección de heridas)	<i>C. jeikeium</i> (sepsis en pacientes con neutropenia, infecciones de heridas quirúrgicas)
<i>C. coyleae</i> (bacteriemia y empiema pleural)	<i>C. kroppenstedtii</i> (abscesos de mama, bacteriemia, infección de heridas)
<i>C. diphtheriae</i> ^(a) (difteria)	<i>C. lipophiloflavum</i> (vaginosis bacteriana)
<i>C. durum</i> (infección respiratoria)	<i>C. macginleyi</i> (infección ocular)
<i>C. freneyi</i> (bacteriemia)	<i>C. resistens</i> (bacteriemia)
<i>C. glucuronolyticum</i> (uretritis y prostatitis)	<i>C. urealyticum</i> (cistitis alcalina incrustante, pielonefritis)
<i>C. imitans</i> (faringitis, cuadro difteroiide)	
<i>C. minutissimum</i> (eritrasma)	
<i>C. propinquum</i> (endocarditis, bacteriemia, infección respiratoria)	
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (neumonía)	
<i>C. pseudotuberculosis</i> (linfadenitis supurativa, neumonía eosinofílica)	
<i>C. riegelii</i> (infección urinaria)	
<i>C. simulans</i>	
<i>C. striatum</i> (neumonía, bacteriemia, endocarditis, peritonitis, conjuntivitis, infecciones de heridas, catéteres y urinarias)	
<i>C. ulcerans</i> (faringitis, cuadro difteroiide, infecciones dérmicas, granulomas necróticos, nódulos pulmonares)	
<i>C. xerosis</i> (endocarditis)	

^(a) Variedades *gravis*, *mitis* y *belfanti*.

^(b) Variedad *intermedius*.

Un segundo grupo lo forman las especies no lipofílicas. Éstas poseen menos exigencias nutritivas, mostrando un crecimiento abundante en los medios de cultivo convencionales. Además, este grupo de especies se subdivide en fermentadoras, si son capaces de producir ácido a partir de algún azúcar, y no fermentadoras, si carecen de dicha capacidad ². Al grupo de especies no lipofílicas con capacidad fermentadora pertenece *Corynebacterium striatum* cuya característica bioquímica más destacable es la de ser sensible al factor vibriostático O/129 y tener capacidad para hidrolizar la tirosina ¹⁵, facultad esta última que la diferencia de *Corynebacterium xerosis*, muy similar a la anterior aunque mucho menos frecuente. También sobresale en este mismo grupo *Corynebacterium amycolatum* que, al igual que las anteriores especies, es parte integrante de la microbiota de la piel. Esta especie posee la particularidad, respecto al resto de difteromorfos, de carecer de ácidos micólicos en su estructura, cualidad que es empleada en la identificación de la especie junto con la presencia del acilfosfatidilglicerol como el fosfolípido más abundante ^{42, 43}. Su caracterización, a través de sistemas convencionales, ha sido muy complicada, por lo que la mayoría de los aislamientos han sido erróneamente tipificados como *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium striatum* y *Corynebacterium minutissimum* ^{13, 44}, circunstancia esta que ha provocado que en los últimos años, y a medida que se han perfeccionado los métodos de identificación, haya sobresalido como un patógeno emergente ⁴⁵. Especies de menor importancia clínica son *Corynebacterium pseudotuberculosis* ^{2, 3}, *Corynebacterium minutissimum* ⁴⁶, *Corynebacterium rieglíi* ⁴⁷, *Corynebacterium glucuronolyticum* ², *Corynebacterium aurimucosum* ⁴⁸, *Corynebacterium freneyi* ⁴⁹ y *Corynebacterium coyleae* ⁵⁰.

Las especies no lipofílicas sin capacidad de fermentación no producen ácido a partir de los azúcares, forman parte de la microbiota de la piel y del tracto respiratorio, y son patógenos aislados con muy poca frecuencia. A este grupo pertenecen las especies *Corynebacterium auris*, aislado del oído medio ²⁸, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, agente causante de infecciones a nivel del tracto respiratorio ⁵¹, *Corynebacterium afermentans* subsp. *afermentans* ² y *Corynebacterium propinquum* ^{2, 13}.

EPIDEMIOLOGÍA

La mayoría de las especies de difteromorfos se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza formando parte de la microbiota del agua y suelo ^{8, 52, 53}. Además de estos medios, se encuentran formando parte de la leche ²⁰, tejidos animales ^{20, 54, 55} y plantas ⁵⁶. En el ser humano son componentes habituales de la microbiota saprofita de piel, mucosas y membranas ^{2, 57, 58}. Tanto en animales como en el ser humano pueden producir diversas infecciones, siempre que se den condiciones favorables para ello ^{45, 59-61}.

En algunos estudios se ha hecho referencia a la capacidad de algunas especies de colonizar determinadas zonas cutáneas ⁵⁷, así como de su capacidad de adherirse al material del que están fabricados los diferentes dispositivos de uso hospitalario tales como catéteres y sondas urinarias ⁶². En este mismo sentido la presencia de diferentes cuerpos extraños se ha revelado como un elemento favorecedor de procesos infecciosos causados por estos microorganismos ⁶³. Por otro lado, se ha comprobado una diferente predisposición, por parte de algunas especies, en la colonización de hombres y mujeres, mostrando una mayor afinidad por alguno de los sexos ⁵⁷.

PATOGENICIDAD DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE DIFTEROMORFOS

Al margen de *C. diphtheriae*, clínicamente casi todos los casos de infección causados por este tipo de microorganismos se deben a un reducido grupo de especies entre las que destacan *C. urealyticum*, *C. jeikeium*, *C. amycolatum* y *C. striatum*, de las cuales se han descrito un gran número de casos en el ser humano ⁶⁴, así como en animales ^{20, 65, 66}. El espectro de síndromes clínicos causados por estas especies es muy amplio, abarcando desde infecciones relativamente leves como es el caso de ciertos cuadros localizados en piel ^{67, 68} y en partes blandas ^{69, 70} hasta cuadros particularmente graves, como septicemias ⁴⁵, endocarditis ^{11, 71}, pericarditis ⁷², osteomielitis ⁷³ e infecciones del tracto urinario complicadas ⁷⁴⁻⁷⁸.

En el caso de las endocarditis, los casos descritos se han asociado frecuentemente con pacientes portadores de algún dispositivo intravascular, como las válvulas cardíacas protésicas^{41, 79-81}, aunque también hay casos descritos de infección sobre válvula nativa^{82, 83}. A veces, ha habido situaciones concretas en las que el diagnóstico de la endocarditis se ha demorado a causa de una anormal presentación del cuadro clínico⁸⁴. En otras ocasiones, la endocarditis ha sido un factor predisponente en el origen de otras secuelas infecciosas⁸⁵. Estos cuadros de endocarditis pueden ser extremadamente graves, a pesar del tratamiento tanto antibiótico como quirúrgico, cursando con una elevada tasa de mortalidad^{11, 71}. Asimismo, la pericarditis puede ser otra complicación localizada a nivel cardíaco donde se ha visto la implicación de estas especies⁷².

En el caso de osteomielitis, la infección suele producirse como consecuencia de traumatismo por herida quirúrgica⁸⁶. La infección se localiza en la cavidad medular metafisaria con desarrollo de supuración, y los síntomas con los que cursa son dolor local, fiebre y malestar general. Habitualmente, en este tipo de infecciones, el tratamiento antibiótico se debe combinar con el quirúrgico para lograr la completa curación del paciente^{87, 88}.

La enfermedad respiratoria suele aparecer como el típico cuadro de neumonía aguda con infiltrado pulmonar alveolar, disnea, fiebre y tos productiva con secreción de esputo purulento¹⁰. El cuadro suele aparecer en pacientes con factores de riesgo tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, cáncer, diabetes, tuberculosis, inmunosupresión y alteraciones cardiovasculares^{10, 89}. *C. pseudodiphtheriticum* ha sido el agente con mayor implicación en este tipo de infecciones^{51, 90, 91}. Otras especies como *C. striatum* y *C. xerosis* también se han postulado como agentes productores de neumonía, especialmente, en pacientes inmunocomprometidos^{89, 92}, aunque en el caso de *C. xerosis*, posteriormente, se demostró que la mayoría de sus aislamientos correspondían a la especie *C. amycolatum*⁹³. Finalmente, se han dado casos en los que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica se ha revelado como un factor predisponente para la colonización respiratoria por *C. striatum* hasta el punto de originar brotes infecciosos⁹⁴.

Por otro lado, entre todos los procesos infecciosos producidos por los miembros de este género, es muy característico el cuadro de infección urinaria producido por la especie *C. urealyticum*. Normalmente, este microorganismo se encuentra formando parte de la microbiota de la piel y se caracteriza por una alta actividad ureasa. Esta actividad genera una alcalinización de orina provocada por el aumento del amonio y la producción de cristales de estruvita (fosfato amónico magnésico: NH_4MgPO_4), lo que favorece la adherencia a las células uroepiteliales y la colonización de los tejidos ⁹⁵⁻⁹⁸. Por este motivo, *C. urealyticum* ha sido tradicionalmente relacionado con infecciones del tracto urinario, produciendo una serie de cuadros clínicos distintos tales como la cistitis incrustrante alcalina ^{59, 60, 76, 77, 99}, a veces asociada a otros patógenos ¹⁰⁰, la cistitis aguda ^{59, 76} y pielonefritis ¹⁰¹. Estos cuadros generalmente se encuentran relacionados con una serie de factores de riesgo como son la inmunosupresión del paciente, síndromes genitourinarios, procedimientos quirúrgicos, sondas vesicales y trasplantes de riñón ^{100, 102}. Dada su importancia clínica, y debido a su lento crecimiento en los medios convencionales, se han desarrollado una serie de medios selectivos con el fin de conseguir un rápido aislamiento e identificación del patógeno en pacientes con alguna alteración urológica de base, infección crónica o colonización de la piel ¹⁰²⁻¹⁰⁵.

Las bacteriemias y septicemias son otros cuadros clínicos donde se ha documentado la presencia de estos organismos. Estas infecciones no son muy frecuentes y se suelen observar en pacientes con una serie de factores de riesgo tales como una patología de base grave, ser portadores de catéter intravascular, tener heridas o haber sido sometidos a algún tipo de cirugía, y permanecer hospitalizados durante un tiempo prolongado ^{43, 45, 46, 49, 106, 107}. Habitualmente, este tipo de infecciones cursan de forma grave, pero con un adecuado tratamiento la evolución de la enfermedad suele ser buena ^{49, 106}, aunque en algunas ocasiones el resultado de la sepsis ha sido letal ¹⁰⁸.

Otras infecciones en las que están implicados estos microorganismos son la meningitis ¹⁰⁹, otitis media ¹¹⁰, conjuntivitis ¹¹¹, endoftalmitis ¹¹², mastitis granulomatosa ⁴⁰, artritis ¹¹³ y

peritonitis asociada a pacientes con diálisis peritoneal ^{114, 115}. Muchos de estos casos son infecciones en las que existe el antecedente de intervenciones quirúrgicas, presencia de cuerpos extraños u otro tipo de antecedentes médicos, por lo que se podría considerar que se trata de infecciones nosocomiales.

SENSIBILIDAD *IN VITRO* Y TRATAMIENTO

Los diferentes protocolos de tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos van a estar basados tanto en la localización de la patología como en la especie difteromorfa que está causando la misma. En este sentido, es importante destacar los diferentes patrones de sensibilidad antibiótica *in vitro* que van a presentar los diferentes miembros del género *Corynebacterium* ¹¹⁶⁻¹¹⁹, e incluso los que se pueden producir entre diferentes cepas pertenecientes a la misma especie ⁵⁴, lo que obligará a realizar un estudio individualizado de cada caso.

Dentro del conjunto de los antibióticos β -lactámicos, la sensibilidad va a estar en función de la especie difteromorfa. En este sentido, *C. xerosis*, *C. striatum* y *C. minutissimum* suelen ser sensibles a los distintos antibióticos de este grupo ^{86, 120}, aunque en los últimos años están aumentando las resistencias ^{92, 117}, mientras que *C. urealyticum*, *C. jeikeium* y *C. amycolatum* son resistentes ^{121, 122}. Del mismo modo las quinolonas presentan una sensibilidad variable ¹²³, con una mejor actividad para el levofloxacino y gemifloxacino en comparación con otros miembros como el norfloxacino, ofloxacino y ciprofloxacino ^{124, 125}. Sin embargo, son los glicopéptidos los que van a mostrar la mejor eficacia llegando a una sensibilidad del 100% frente a estos microorganismos ^{126, 127}, de modo similar al linezolid ¹¹⁹. Por el contrario, los aminoglucósidos se muestran poco activos frente a las especies más habituales, por lo que no es recomendable su uso en las infecciones causadas por estos microorganismos ¹¹⁷, aunque pueden ser útiles en regímenes de monoterapia para las conjuntivitis ^{39, 111} o para la obtención de un

efecto sinérgico en combinación con vancomicina o β -lactámicos en el tratamiento de infecciones más graves como endocarditis ^{128, 129}, peritonitis ¹¹⁴ y endoftalmitis ¹¹². Lincosamidas y macrólidos pueden ser alternativas terapéuticas, pero el numeroso porcentaje de resistencias que han aparecido entre las especies de difteromorfos hace que su uso sea limitado ^{118, 130}. La telitromicina (HMR 3647), perteneciente al grupo de antibióticos cetólidos, surge de una modificación estructural de los macrólidos y supone la principal alternativa a estos últimos en neumonías debido a una mejor actividad frente al género *Corynebacterium* ^{130, 131}. Otros antibióticos con actividad frente a alguno de estos organismos incluyen la quinupristina-dalfopristina, tetraciclinas y rifampicina ^{71, 127, 129}, así como nuevos antibióticos que se encuentran en fase de desarrollo ¹³².

Uno de los problemas que se plantea en los laboratorios asistenciales es la variabilidad metodológica a la hora de estudiar la sensibilidad. Los diversos procedimientos para determinar la sensibilidad antibiótica, como la técnica de microdilución en caldo, E-test y difusión disco-placa, muestran discrepancias en los resultados obtenidos, por lo que se hace necesario obtener unos criterios más específicos a la hora de realizar estos estudios y lograr una normalización para definir una técnica de referencia ^{133, 134}.

ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS, CETÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOGRAMINAS

Los antibióticos macrólidos son conocidos desde 1952 cuando la eritromicina se aisló del hongo *Streptomyces erythreus*. Desde entonces se han ido desarrollando diversos derivados semisintéticos y sintéticos con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas, aumentar la actividad y disminuir los efectos secundarios de los primeros macrólidos ¹³⁵.

Estructuralmente, los macrólidos poseen un anillo lactónico macrocíclico unido a uno o varios desoxiazúcares o aminoazúcares. La clasificación se realiza en función del número de átomos que posee la estructura lactónica comprendiendo tres grupos:

- Macrólidos con anillo de 14 átomos de carbono y dos azúcares (uno de estos es un aminoazúcar). En este grupo se encuentran la eritromicina, claritromicina, roxitromicina y diritromicina.
- Macrólidos con anillo de 15 átomos de carbono, aunque uno ha sido sustituido por un nitrógeno y dos azúcares. Al tener un átomo de nitrógeno en el anillo lactónico, también se conoce a los miembros de este grupo como azálidos. El representante más destacado es la azitromicina.
- Macrólidos con anillo de 16 átomos de carbono y dos o más azúcares (al menos uno es un aminoazúcar). A este grupo pertenecen la espiramicina, josamicina, midecamicina, rosaramicina y rokitamicina.

Los macrólidos actúan inhibiendo la síntesis proteica de los microorganismos sensibles al unirse reversiblemente al sitio P en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Los de 14 y 15 átomos de carbono bloquean la translocación del peptidil-ARNt del ribosoma. Por el contrario, los de 16 átomos de carbono inhiben la formación del enlace peptídico previo al proceso de translocación. Esto es debido a que la unión se produce en un sitio de fijación distinto: la eritromicina se une a la proteína L22, y la espiramicina a la proteína L27. Ambas proteínas pertenecen a la compleja estructura de la subunidad 50S del ribosoma. En función de la concentración que alcancen en el lugar de la infección van a desarrollar una actividad bacteriostática o bactericida, y además van a poseer efecto postantibiótico ¹³⁵.

El espectro de acción abarca cocos y bacilos grampositivos y bacterias intracelulares. Los macrólidos no son efectivos frente a la mayoría de bacilos gramnegativos porque no son capaces de atravesar la membrana externa. Una de sus principales aplicaciones va a ser el tratamiento de las neumonías comunitarias originadas por *Legionella pneumophila*,

Mycoplasma pneumoniae y *Chlamydia pneumoniae*. La eritromicina es útil en la erradicación en personas adultas del estado de portador del bacilo diftérico y en la profilaxis y tratamiento de la tos ferina. La claritromicina es empleada en las infecciones intestinales causadas por *Campylobacter* y *Helicobacter*, en este último caso en asociación con otros fármacos. Por otra parte, los macrólidos van a ser la principal alternativa a los antibióticos β -lactámicos en aquellas personas que sean alérgicas a los mismos, así como a las tetraciclinas en mujeres embarazadas o en niños que padezcan infecciones por *Chlamydia* sp¹³⁶. Además, estos antibióticos producen una serie de modificaciones en los factores de virulencia de determinados patógenos^{137, 138}, al mismo tiempo que poseen un efecto inmunomodulador y antiinflamatorio^{139, 140}, particularidades especialmente relevantes en la evolución de determinadas enfermedades respiratorias. Todas estas características hacen de los macrólidos uno de los grupos de antibióticos con mayor significación y trascendencia en la práctica clínica.

Los antibióticos del grupo de los cetólidos surgen como alternativa a los macrólidos, de los que derivan estructuralmente, debido a su menor porcentaje de resistencias. El principal representante es la telitromicina que posee un anillo lactónico con 14 átomos con un grupo ceto en la posición 3 y otro metoxi en la posición 6. Estas modificaciones proporcionan una mayor eficacia y un menor poder de inducción de resistencias. Actúan a nivel de la peptidiltransferasa del 23S ARNr de la subunidad 50S, inhibiendo la traslación del ARNr. Debido a su buena actividad frente a microorganismos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* sp., y *Moraxella catharralis*, son útiles en infecciones respiratorias causadas por los mismos, así como por otros patógenos respiratorios atípicos como *Bordetella* sp., *Legionella* sp., *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*^{135, 141}.

Por otro lado, las lincosamidas constituyen un grupo de antibióticos entre los que se encuentran la lincomicina, derivado natural de *Streptomyces lincolnensis* y cuya estructura resulta de la unión del aminoácido metilprolina y un azúcar, y su derivado semisintético, la clindamicina, a la que se le ha introducido un grupo cloro en sustitución de un hidroxilo. El

mecanismo de acción es similar al de los macrólidos, afectando a la síntesis de proteínas por su capacidad para unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano e inhibir la acción de la peptidiltransferasa. La clindamicina es el miembro más empleado en la práctica clínica y su espectro de acción abarca bacterias grampositivas y anaerobias. Suele ser el tratamiento de elección en infecciones producidas por estos microorganismos en hueso, piel y tejidos blandos, debido a su buena distribución en estos tejidos. Otros usos de la clindamicina es la de servir como alternativa a β -lactámicos en pacientes alérgicos en osteomielitis, celulitis, abscesos, etc., y su empleo en profilaxis de endocarditis tras extracción dentaria ¹⁴².

Las estreptograminas son producidas por diversas especies de *Streptomyces* y constituyen un amplio conjunto de péptidos cíclicos con características muy peculiares. Estructuralmente, se dividen en dos grupos: las estreptograminas del grupo A, que se relacionan estructuralmente con macrolactonas y cuyos representantes naturales son la pristinamicina IIA y la pristinamicina IIB, y las estreptograminas del grupo B, que son hexadepsipéptidos cíclicos y sus prototipos son la pristinamicina IA y la virginamicina S1. Existen derivados semisintéticos como la quinupristina y la dalfopristina que en combinación (denominada Synercid[®]), y en una proporción 30:70 respectivamente, alcanzan una mayor actividad ¹⁴². Este efecto sinérgico es debido a que actúan de forma complementaria en la síntesis proteica. En este sentido, las estreptograminas del grupo A alteran la unión del aminoacil-ARNt al sitio A y al peptidil-ARNt evitando la elongación, mientras que las del tipo B impiden la formación del enlace peptídico, interfiriendo la correcta colocación del peptidil-ARNt en el sitio P, lo que se traduce en la liberación de cadenas peptídicas incompletas ^{142, 143}. El espectro antibacteriano abarca diferentes especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium* y *Clostridium*, empleándose como fármacos de segunda elección cuando la terapia ha fracasado frente a los anteriores microorganismos ¹⁴¹.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS

La resistencia que presentan los microorganismos a los diferentes miembros de la familia de los macrólidos se debe a una serie de mecanismos muy variados entre los que se encuentran la alteración de la diana, degradación y expulsión del antibiótico ¹⁴⁴. La mayoría de estos mecanismos van a estar mediados por una serie de genes que codifican diversas proteínas cuya función será la de participar en alguna de estas formas de resistencia, aunque otras variables, como la terapia antibiótica o la hospitalización, también pueden influir en el patrón de resistencia a estos antibióticos ¹⁴⁵.

La modificación del sitio de unión de los macrólidos al ribosoma constituye el mecanismo de resistencia más importante. En la mayoría de los casos estos cambios estructurales son debidos a la presencia de los genes *erm* (erythromycin ribosome methylation) que se encuentran presentes tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas y de los que existen una gran variedad ¹⁴⁶. Estos genes codifican las proteínas ARNr metilasas cuya función es introducir un grupo metilo en la adenina de la posición 2058 del ARN ribosómico. Esta modificación va a conferir resistencia cruzada macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B, originando el fenotipo de resistencia MLS_B ^{144, 147}. Este fenotipo puede aparecer de manera constitutiva, cuando el gen se expresa independientemente de la presencia del antibiótico, o inducible, cuando se produce con la presencia del macrólido. En este último caso, la eritromicina suele ser la responsable de este fenotipo de resistencia en los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, mientras que en el género *Enterococcus* la inducción puede estar producida por macrólidos de 16 átomos ¹⁵¹. La prevalencia de los diferentes genes *erm* depende de las diferentes especies bacterianas. Así, por ejemplo, los genes *erm(A)* y *erm(C)* predominan en las especies del género *Staphylococcus* ^{152, 153}, mientras que el gen *erm(B)*, es el más habitual en *S. pneumoniae* ¹⁵⁴, *Streptococcus pyogenes* ¹⁵⁵ y en el género *Enterococcus* ¹⁵¹. En *Streptococcus agalactiae* y en *S. pyogenes*, aparte del *erm(B)*, se ha encontrado el gen *erm(TR)*, gen englobado dentro de la clase *erm(A)*, como uno de los genes

más prevalentes en estas especies ^{148, 156}. Por otro lado, el gen *erm(X)* ha sido el más detectado en las especies del género *Corynebacterium* ^{157, 158}, aunque también se ha hallado en otras especies, como *Arcanobacterium pyogenes*, presentando una homología superior al 95% ¹⁵⁹.

Otros mecanismos de resistencia que afectan a la diana, aunque menos frecuentes, son los debidos a mutaciones en el gen que codifica el 23S ARNr y a las proteínas L4 y L22 ^{144, 160, 161}. En el primero de los casos se produce por sustituciones y metilaciones de bases que afectan al dominio V, y deleciones en el dominio II ^{160, 162-165}. El fenotipo de resistencia que se produce es ML, con resistencia a todos los macrólidos y lincosamidas ¹⁴⁴. Por otra parte las mutaciones en la proteína L4 produce el fenotipo MS con disminución de la inhibición originada por clindamicina y ausencia de halo para eritromicina y estreptograminas ¹⁶⁶.

Las bombas de expulsión suponen otro importante mecanismo de resistencia a estos antibióticos. Constituyen un conjunto de proteínas transportadoras que expulsan el antibiótico al exterior disminuyendo la concentración intracelular del mismo. Estas proteínas están codificadas por una serie de genes de los cuales los más destacados son los genes *mef* (macrolide efflux), encontrados en el género *Streptococcus* y que confieren el fenotipo de resistencia M, y los genes *msr* (macrolide streptogramin resistance), detectados en el género *Staphylococcus*, y que producen el fenotipo de resistencia MS. El fenotipo M se caracteriza por producir un nivel de resistencia bajo o moderado a macrólidos de 14 y 15 átomos pero no a macrólidos del grupo de la espiramicina, lincosamidas y a estreptograminas del grupo B. Por el contrario, el fenotipo MS aparece por el desarrollo de resistencia frente a macrólidos de 14 y 15 átomos y a estreptograminas del grupo B, sin afectar a la actividad de macrólidos de 16 átomos y lincosamidas ^{144, 167, 168}. En el género *Streptococcus*, el gen *mef* se erige como el segundo gen en importancia que confiere resistencia a macrólidos tras el *erm(B)* ^{169, 170}. El gen *mef* consta de las subclases *mef(A)* y *mef(E)* sobre las que existe cierta controversia ya que poseen una similitud superior al 90% ¹⁷¹. En este punto habría que destacar que el gen *mef(E)* tiene una mayor prevalencia en América del Norte, Suráfrica y Asia, a diferencia del *mef(A)* que

predomina en las cepas europeas ^{169, 172}. Las bombas de expulsión activa Mef desarrollan su función gracias a la energía de protones, derivada del potencial electroquímico a uno y otro lado de la membrana citoplasmática, mientras que en las bombas MsrA y MsrSA, de *S. epidermidis* y *S. aureus* respectivamente, el sistema de expulsión está relacionado con el ATP ¹⁴⁴.

El último mecanismo de resistencia es la inactivación del fármaco mediante enzimas que producen alguna alteración en su estructura. Es un mecanismo muy poco frecuente y los genes de mayor implicación son los *mph* (macrolide phosphotransferase), que codifican unas enzimas fosfotransferasas que inactivan al macrólido al introducir un grupo fosfato ¹⁴⁶, y los genes *ere* (erythromycin resistance esterase), que codifican las estereras EreA y EreB cuya misión es hidrolizar el anillo de lactona del núcleo del macrólido en diversas especies de enterobacterias ^{146, 173}.

La mayoría de estos genes están asociados a elementos móviles que permiten su diseminación entre las diversas especies bacterianas mediante los mecanismos de conjugación, transformación y transducción. De estos elementos genéticos, los más conocidos son los plásmidos a los que se les ha relacionado con los genes de clase *erm* y otros determinantes de resistencia en diversas especies ^{146, 174-176}. De igual modo, los transposones constituyen otra vía de movilización para estos genes bien a través de conjugación ¹⁷⁷, o a través de otro mecanismo diferente en el caso de que el gen estuviera insertado en un transposon no conjugativo ^{178, 179}. A todo esto hay que añadir que, en los últimos años, ha tomado una especial relevancia, en este tipo de procesos, la familia de los integrones que constituyen un grupo de elementos genéticos capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los diferentes antibióticos ^{180, 181}.

OBJETIVOS

1. Evaluación de la sensibilidad *in vitro* de las diferentes especies pertenecientes al género *Corynebacterium* frente a los antibióticos macrólidos, cetólidos, lincosamidas y estreptograminas, así como la caracterización de los fenotipos de resistencia que se dan con estas familias de antibióticos.
2. Detección de genes de resistencia a macrólidos en aislamientos clínicos de *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. coyleae*, *C. aurimucosum* y *C. afermentans* subsp. *afermentans*, mediante PCR.
3. Estudio de la presencia de enzimas hidrolíticas frente a los antibióticos macrólidos en las diferentes especies del género *Corynebacterium* a estudio.
4. Detección, aislamiento y caracterización de plásmidos en las mismas especies anteriormente reseñadas. Evaluación de la presencia de determinantes de resistencia frente a los antibióticos macrólidos a nivel plasmídico.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS

Procesamiento de las cepas bacterianas

Los aislamientos se realizaron a partir de las muestras clínicas procesadas en el Laboratorio de Microbiología Clínica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid y del Complejo Asistencial de León durante el periodo comprendido entre enero de 1985 y diciembre de 2005. Las cepas aisladas pertenecían a diferentes especies del género *Corynebacterium* y procedían de diferentes pacientes sin ninguna relación epidemiológica conocida entre ellos.

Las muestras se procesaron inicialmente en la sección que les correspondía para su cultivo en los medios convencionales, realizándose además exámenes directos mediante una extensión para tinción de Gram de acuerdo con los protocolos aceptados internacionalmente en cada momento^{13, 182-184}.

Además, se estudiaron cepas de *C. urealyticum* aisladas de la piel, concretamente de la axila, el área periumbilical y la ingle, procedentes de un estudio sobre colonización de pacientes hospitalizados por distintas especies del género *Corynebacterium*¹⁸⁵.

Almacenamiento

Hasta su estudio las cepas permanecieron congeladas a -20°C en viales de leche desnatada preparada a partir de una mezcla al 10% de Skim Milk Powder (Oxoid) en agua destilada y posterior esterilización por autoclave durante 5 minutos a 121°C.

PRUEBAS FENOTÍPICAS CONVENCIONALES

Identificación

Las cepas fueron incubadas en placas de triptosa-soja con 5% de sangre de carnero (TSS, bioMérieux) durante 48 horas en atmósfera de CO₂ para conseguir inóculo suficiente antes de realizar su caracterización fenotípica. El procedimiento se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales utilizando el sistema comercial API Coryne System (bioMérieux). El sistema API consta de 21 pruebas bioquímicas cuyos resultados pueden ser interpretados en 24 ó 48 horas. La tira contiene 20 tubos con substratos deshidratados que permiten determinar la presencia de once enzimas (nitrato reductasa, pirazinamidasa, pirrolidoniil arilamidasa, fosfatasa alcalina, β-glucuronidasa, β-galactosidasa, α-glucosidasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, β-glucosidasa en la hidrólisis de la esculina, ureasa y la hidrólisis de la gelatina) y la fermentación de ocho azúcares (glucosa, ribosa, xilosa, manosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa y glicógeno) junto con un control negativo de fermentación. La prueba de la catalasa fue realizada tomando unas pocas colonias de la placa de TSS y empleando H₂O₂ al 30%¹⁸⁶.

El inóculo se preparó en agua destilada hasta conseguir que la suspensión alcanzara una turbidez de 6 en la escala de MacFarland. La suspensión del inóculo se añadió a cada pocillo correspondiente a las pruebas enzimáticas, y con el objeto de conseguir el desarrollo de las pruebas de fermentación, 0,5 mL de la suspensión fueron añadidos a 2 mL de la solución GP medium (medio enriquecido que contiene rojo fenol como indicador de pH), que tras homogeneización, se colocó en los diferentes tubos. Para conseguir las condiciones de anaerobiosis se empleó aceite de parafina que se colocó en los tubos empleados en la determinación de la ureasa, la fermentación de azúcares y el control negativo de fermentación, rellenándose los pocillos de la galería atendiendo a las instrucciones del fabricante^{18,187}.

Se empleó una placa de TSS como control de esterilidad de la suspensión y, junto con la galería de tubos, se incubó a 37 °C en atmósfera de oxígeno por un periodo de 24 ó 48 horas. Si el crecimiento de la placa control fue adecuado la lectura de la tira se realizó a las 24 horas, pero si por el contrario el crecimiento no fue considerado suficiente la lectura de las pruebas bioquímicas se realizó a las 48 horas de incubación. El análisis de los datos obtenidos se realizó con ayuda del programa informático APILAB, empleando la base de datos API CORYNE en su versión 2.0.

Sensibilidad antibiótica

Agentes antimicrobianos

Los antibióticos utilizados fueron los siguientes: azitromicina (AZ), eritromicina (EM), claritromicina (CH), clindamicina (CM) y quinupristina/dalfopristina (RP), en tiras de E-test (AB BIODISK, Suecia) con una concentración comprendida entre 0,016 y 256 mg/L, excepto para la quinupristina/dalfopristina que estuvo comprendida entre 0,002 y 32 mg/L, espiramicina en discos de papel de celulosa de 6 mm de diámetro con una carga de 100 µg (SP, bioDiscs, BioMérieux, Francia), y telitromicina 15 µg (RU, Oxoid Ltd, Inglaterra).

Procedimiento

Para el estudio de la sensibilidad antibiótica se inocularon los microorganismos directamente en el medio líquido CTS (caldo triptosa soja) que posee una concentración de: 17 g/L de triptosa, 3 g/L de soja, 5 g/L de cloruro sódico, 2,5 g/L de fosfato bipotásico y 2,5 g/L de glucosa, en tubos de 9 mL (bioMérieux, Francia). La concentración del inóculo se ajustó a 0,5 de la escala de MacFarland, aproximadamente 10^7 UFC (unidades formadoras de colonia)/mL, permaneciendo los tubos a temperatura ambiente.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron mediante el método de difusión disco-placa para la espiramicina y la telitromicina, dejando el estudio de la concentración mínima inhibitoria

(CMI) por el método del E-test para el resto de los antibióticos. Las bacterias se sembraron con hisopos de algodón en placas de Mueller-Hinton 2 suplementadas con un 5% de sangre de carnero. La placa de Mueller-Hinton Sangre (MHS) contiene una concentración de 300 g/L de infusión de carne de buey, 17,5 g/L de caseína, 1,5 g/L de almidón y 17 g/L de agar, en una placa de 90 mm de diámetro y de 4-5 mm de espesor (bioMérieux, Francia). Se colocaron dos tiras de E-test por placa de MHS (Figura 1). Por el contrario, los discos fueron colocados de manera individual. Las placas fueron incubadas a 37 °C en atmósfera normal durante 48 horas. Pasado este tiempo, se midieron los halos de inhibición, tomando como referencia el diámetro más corto que separaba a dos colonias en el caso de los antibióticos en discos, y los puntos de corte con las tiras de E-test, considerando la concentración mínima inhibitoria la concentración más baja de antibiótico que inhibió el crecimiento del microorganismo.

Las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 29213 y ATCC 25923 se utilizaron para el estudio de la CMI y del estudio disco-placa respectivamente. Los protocolos y valores de sensibilidad antibiótica de eritromicina, clindamicina y quinupristina/dalfopristina se realizaron tomando los puntos de corte para *Corynebacterium* sp., de acuerdo con la normativa del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ¹⁸⁸. Con el resto de antibióticos se emplearon los puntos de corte descritos para *Staphylococcus* sp. ¹⁸⁹ (Tabla 2).

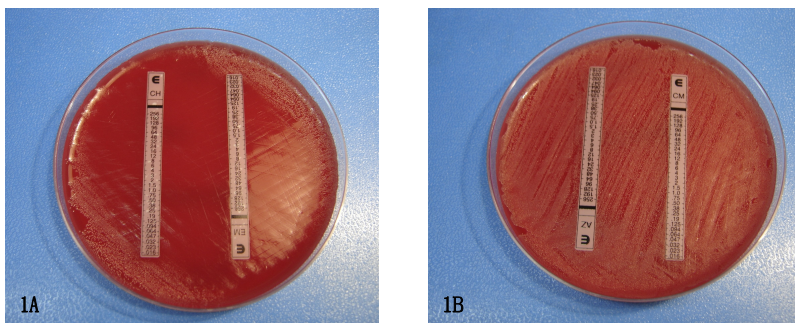


Figura 1. Disposición de las tiras de E-test de los diferentes antibióticos. 1A: tiras de E-test de eritromicina y claritromicina a las que se mostró sensible una cepa de *C. urealyticum*. 1B: tiras de azitromicina y clindamicina a las que se mostró resistente una cepa de *C. urealyticum*.

Tabla 2. Valores de sensibilidad.

Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente
Eritromicina	$\leq 0,5$	1	≥ 2
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Azitromicina	≤ 2	4	≥ 8
Clindamicina	$\leq 0,5$	1-2	≥ 4
Quinupristina/Dalfopristina	≤ 1	2	≥ 4
Espiramicina ^(a)	≥ 23	14-22	≤ 13
Telitromicina ^(a)	≥ 22	19-21	≤ 18

CMI en mg/L.

^(a) Diámetro de inhibición en mm.

PRUEBAS MOLECULARES

Amplificación de los genes *erm(X)*, *erm(B)*, *erm(A)*, *erm(TR)*, *mef(A)* y *mef(E)*

mediante PCR

Extracción de ADN

Se procedió a partir de una colonia aislada en agar sangre que se resuspendió en 200 μ L de agua destilada estéril. Después de 10 minutos hirviendo, se centrifugó la mezcla durante 15 minutos a 12.000 rpm (revoluciones por minuto). A continuación se tomaron 150 μ L del sobrenadante, en el cual se encontraba el extracto de ADN, para su posterior uso en el experimento, permaneciendo congelado a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

Procedimiento

Basándonos en el protocolo de Rosato y colaboradores¹⁵⁷, la mezcla de reacción de la PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L. Se emplearon los tubos eppendorf comerciales *puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences, Reino Unido) que contienen estabilizadores, dNTPs (200 μ M en el volumen final dado), Tris-HCl (10 mM), KCl (50 mM),

MgCl₂ (1,5 mM) y aproximadamente 2,5 unidades de *puReTaq* ADN polimerasa. Se añadieron 0,2 µL de cada *primer* (Pacisa-Giralt, España) (Tabla 3) y 23,35 µL de agua destilada estéril hasta completar el volumen de reacción. Finalmente, se agregaron 1,25 µL del extracto de ADN de las cepas de las diferentes especies difteromorfas a estudio, 1,25 µL de agua destilada estéril para el control negativo, y 1,25 µL de extracto de ADN de las diferentes especies que contenían alguno de los genes que se evaluaban para el control positivo.

Tabla 3. *Primers* utilizados para la detección de los diferentes genes de resistencia.

<i>Primer</i>	pb	Secuencia	Tf
Cerm 1 (<i>ermX</i>)	20	5'-GAC ACG GCC GTC ACG AGC AT-3'	63,4°C
Cerm 2 (<i>ermX</i>)	17	5'-GGC GGC GAG CGA CTT CC-3'	62,4°C
Erm A-1 (<i>ermA</i>)	21	5'-TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA-3'	48,1°C
Erm A-2 (<i>ermA</i>)	21	5'-CTT CGA TAG TTT ATT AAT AGT-3'	50,7°C
Erm B-1 (<i>ermB</i>)	21	5'-GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA-3'	52,0°C
Erm B-2 (<i>ermB</i>)	24	5'-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3'	54,2°C
Erm TR-1 (<i>ermTR</i>)	23	5'-ATA GAA ATT GGG TCA GGA AAA CG-3'	57,1°C
Erm TR-2 (<i>ermTR</i>)	19	5'-TTG ATT TTT AGT AAA AAG G-3'	43,7°C
Mef A-E-1 (<i>mefA</i> y <i>mefE</i>)	21	5'-AGT ATC ATT ATT CAC TAG TGC-3'	52,0°C
Mef A-E-2 (<i>mefA</i> y <i>mefE</i>)	21	5'-TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG-3'	54,0°C

Los *primers* Cerm 1 y Cerm 2 delimitan una sección de 390 pares de base del gen.

Los *primers* Erm A-1 y Erm A-2 delimitan una sección de 645 pares de base del gen.

Los *primers* Erm B-1 y Erm B-2 delimitan una sección de 639 pares de base del gen.

Los *primers* Erm TR-1 y Erm TR-2 delimitan una sección de 530 pares de base del gen.

Los *primers* Mef A-E-1 y Mef A-E-2 delimitan una sección de 348 pares de base del gen.

Tf: temperatura de fusión recomendada por el fabricante.

pb: número de pares de base del *primer*.

La amplificación del gen *erm(X)* por PCR se realizó en un termociclador PTC-100, Peltier Thermal Cycler MJ Research (Bio-Rad, EEUU), y el programa consistió en una desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a 66°C y 2 minutos de elongación a 72°C, para finalizar el proceso con la permanencia del producto de amplificación a una temperatura de 4°C hasta su posterior utilización ¹⁵⁷.

Los genes *erm(B)*, *erm(A)*, *erm(TR)*, *mef(A)* y *mef(E)* fueron amplificados también por PCR con el mismo termociclador pero empleándose un protocolo diferente de amplificación que constaba de una desnaturalización a 93°C durante 3 minutos, para a continuación realizar 35 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 93°C, 1 minuto de anillamiento a 51°C y 1 minuto de fase de elongación a 72°C, concluyendo con 5 minutos de elongación a 72°C durante 5 minutos y la consiguiente conservación de la mezcla amplificada a 4°C hasta su uso ¹⁹⁰.

Electroforesis y tinción del gel

Se realizó en un gel de agarosa al 3% en tampón 1x TBE (10x en preparación de Bio-Rad, EEUU). La disolución de tampón 1x contiene las siguientes concentraciones: 89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, con un pH de 8,4. Al gel se le añadió bromuro de etidio (Bio-Rad, EEUU) con el fin de observar el producto de la PCR.

Se añadió a la muestra 5 µL de tampón de carga (preparado a 6x: 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilencianol y sacarosa en agua en una proporción de 40% p/V) para que la relación con los 25 µL de producto fuese de 1:5. La electroforesis se realizó en una cubeta Sub-Cell GT o Wide mini-sub cell GT (Bio-Rad, EEUU) rellena de tampón TBE 1x durante una hora, aproximadamente, y a 100 voltios (suministrador de voltaje Power Pac Basic o Power Pac 300 de Bio-Rad, EEUU).

Los productos de amplificación de la PCR fueron los fragmentos de los genes *erm(X)* de 390 pb, *erm(B)* de 639 pb, *erm(A)* de 645 pb, *erm(TR)* de 530 pb y *mef(A)* y *mef(E)* de 348 pb. Todos ellos fueron estimados gracias a los diferentes controles positivos y a un marcador de peso molecular en escalera conocido (20 pb molecular ruler, Bio-Rad, EEUU). Como control positivo para el *erm(X)* se utilizó una cepa de *C. jeikeium* que contenía el gen procedente de la colección de difteromorfos del Servicio de Microbiología de la Fundación Jiménez Díaz. El control positivo del gen *erm(B)* fueron las cepas de *Streptococcus mitis* 8128 y *Streptococcus agalactiae* 637, el gen *erm(TR)* la cepa de *Streptococcus pyogenes* 859, y el gen *mef(A-E)* la cepa de *Streptococcus pyogenes* 504. Todas estas cepas fueron remitidas por el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Finalmente, el control positivo para el gen *erm(A)* fue una cepa de *Enterococcus* sp., suministrada por la Sección de Microbiología del Hospital de la Rioja.

Lectura y análisis de los geles

El análisis fue realizado en un transiluminador (EcoGen, EEUU), acoplado a un ordenador (EcoGen, National Electronics M900X, EEUU). Las fotografías fueron escaneadas y analizadas con el software PhotoCapt (BioGene, EEUU).

Extracción de plásmidos

Procedimiento

El método de extracción se realizó atendiendo al protocolo descrito por Tauch y colaboradores¹⁹¹ y empleando el sistema comercial NucleoBond Plasmid Mini Kit (Clontech Laboratories). El inóculo bacteriano se preparó suspendiendo una colonia de la bacteria en 200 µL de tampón TE y se centrifugó a una velocidad de 3.500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de Tris 10 mM a un pH de 8,2. El precipitado bacteriano fue resuspendido en 0,4 mL de S1, con 5 µg/mL de lisozima (25.000 unidades/mg; Sigma) en frío y agitando en el vórtex para favorecer

la disolución, permaneciendo en incubación a 37°C durante 90 minutos para favorecer la lisis de la bacteria. A continuación se añadieron 0,4 mL de tampón S2 a temperatura ambiente e invirtiendo el tubo 5 veces con el fin de favorecer la mezcla, para inmediatamente después agregar 0,4 mL de tampón S3 en frío, realizando el mismo proceso de agitación anteriormente señalado, y manteniendo el conjunto en hielo picado durante un periodo de tiempo no superior a 5 minutos. Seguidamente, se procedió a su centrifugación durante 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio para su posterior elución por gravedad en una columna. La fracción eluida se recogió y se volvió a pasar por la misma columna que previamente se había humedecido con 1 mL de tampón N2, y esta misma columna fue lavada tres veces con 1 mL de tampón N3. Se añadió 1,6 mL de tampón N5 a la columna para eluir el ADN plasmídico y posteriormente se adicionó 1,2 mL de isopropanol a la fracción eluida. El paso siguiente fue la centrifugación de la mezcla a 4°C durante 30 minutos y la subsiguiente eliminación del sobrenadante. Por último, se añadió al sedimento 1 mL de etanol al 70% frío, a una temperatura de 4°C, centrifugándose durante 2 minutos y, tras ser eliminado el etanol cuidadosamente, se dejó secar a temperatura ambiente, aproximadamente 5 minutos, para finalmente resuspender el sedimento en 50 µL de tampón TE.

En la determinación de la existencia de plásmidos también se utilizó el sistema comercial UltraClean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.), siguiendo las instrucciones que marcaba su protocolo ¹⁹², aunque se realizaron algunas modificaciones orientadas a conseguir una hidrólisis completa de las cepas de difteromorfos que se iban a estudiar. De esta manera, se añadieron 2 µg/mL de lisozima (25.000 unidades/mg; Sigma) a la solución I (tampón de suspensión celular con Tris, EDTA y RNasa A) y posteriormente se dejó en incubación a 37°C durante 90 minutos.

Electroforesis del plásmido y tinción del gel

Se efectuó en un gel de agarosa al 0,7% en tampón 1x TBE y con bromuro de etidio (Bio-Rad, EEUU) para observar el producto de la PCR. Los pocillos del gel se cargaron con 7

μL de la muestra de extracción y 3 μL de tampón de carga (en dilución 6x). La electroforesis se realizó en una cubeta Wide mini-sub cell GT (Bio-Rad, EEUU) rellena de dicho tampón durante hora y media a 30 voltios.

Como control positivo de extracción de plásmidos se utilizó la cepa ATCC 19223 de *Corynebacterium glutamicum*, que contiene un plásmido críptico estable de 20 kb, y que creció en el medio LB ¹⁹³ suplementado con 50 μg de kanamicina a temperatura de 37°C durante 24 horas de incubación de acuerdo con el protocolo descrito por Tauch ¹⁹¹. Como control de peso molecular de los plásmidos se realizó una extracción de la cepa de *Escherichia coli* V 517, que contiene 8 plásmidos de peso molecular conocido: 54.38 kb, 7.30 kb, 5.56 kb, 5.14 kb, 3.98 kb, 3.08 kb, 2.71 kb y 2.06 kb.

Lectura y análisis de los geles

Al igual que anteriormente, el análisis se realizó en un transiluminador (EcoGen, EEUU), acoplado a un ordenador (EcoGen, National Electronics M900X, EEUU) y las fotografías que se tomaron fueron escaneadas y analizadas con el software PhotoCapt (BioGene, EEUU).

Secuenciación de los fragmentos amplificados *erm(X)* y *erm(B)*

Amplificación

El procedimiento se realizó en la Fundación Jiménez Díaz de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente para los genes *erm(X)* y *erm(B)*.

Purificación

Se realizó tras el proceso de amplificación específica de los genes por PCR, empleando el sistema comercial Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation). En este sentido, 300 µL de agua destilada o tampón se depositaron en un contenedor, previamente insertado en uno de los viales suministrados por el proveedor. A continuación se añadieron 100 µL del producto de la reacción de la PCR hasta completar un volumen total de 400 µL. Posteriormente, se procedió a centrifugar el contenido durante 15 minutos a una velocidad de 3.500 rpm. Se tomó el contenedor que contenía el producto del centrifugado que se colocó sobre un vial nuevo invirtiendo su posición. Por último, se añadieron 20 µL de agua o tampón TE y se centrifugó durante dos minutos a 3.500 rpm, recogiendo finalmente el filtrado con el producto de la PCR purificado.

Secuenciación

En su realización se siguió el protocolo desarrollado en el Centro de Referencia de Microbiología de Majadahonda. En la secuenciación se realizaron dos mezclas de reacción, una para cada *primer*, es decir, dos tubos por muestra. La mezcla de reacción de la PCR se realizó en un volumen final de 10 µL. Se emplearon los tubos eppendorf comerciales *puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences, Reino Unido) y se añadieron, en el caso del gen *erm(X)*, 1 µL del *primer* Cerm1 a la mezcla que secuenció en un sentido y 1 µL del *primer* Cerm2 en la mezcla que secuenció en el sentido contrario, 2 µL de ADN purificado, 2 µL de Big Dye Terminator (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Alemania) y 5 µL de agua destilada. Los mismos componentes y cantidades se utilizaron para la amplificación del *erm(B)* pero empleando los *primers* iniciadores, *ermB-1* y *ermB-2*, específicos para este gen.

El programa de secuenciación de los genes se realizó en el mismo termociclador consistiendo en un ciclo de desnaturalización a una temperatura de 94°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos a 96°C durante 10 segundos y 60°C durante 4 minutos y 5 segundos, para

finalizar con la preservación del producto final a 4°C hasta su utilización. Las secuencias de los iniciadores utilizados fueron Cerm1, Cerm2, ermB-1 y ermB-2 (Tabla 3).

Caracterización genotípica de la especie mediante 16S ARN

La identificación genotípica de las diferentes especies pertenecientes al género *Corynebacterium* se realizó en el Centro de Referencia de Microbiología de Majadahonda aplicando el protocolo habitual de trabajo.

Extracción de ADN

Se procedió a partir de una colonia aislada recientemente en agar sangre que se resuspendió en 600 µL de agua destilada estéril. La suspensión se favoreció agitando el tubo en el agitador para posteriormente hervir la muestra durante 10 minutos y centrifugarla a 12.000 rpm. En último lugar el sobrenadante recogido se almacenó a -20°C hasta su uso.

Amplificación

Se emplearon los tubos eppendorf comerciales *puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences, Reino Unido) a los que se añadieron 5 µL de ADN de la muestra problema, 1 µL del *primer* SEQ1-Forward, que amplifica en el sentido 5'-3', 1 µL del *primer* RP2-Reverse, que amplifica en el sentido contrario 3'-5' (Tabla 4), y 18 µL de agua destilada para completar un volumen final de 25 µL en el tubo.

La amplificación del ADN se realizó por PCR en un termociclador PTC-100, MJ Research, Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, EEUU), con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 50 segundos, para concluir con un ciclo final

de elongación a 72°C durante 5 minutos. El producto de amplificación permaneció a una temperatura de 4°C hasta su empleo.

Para comprobar si el fragmento 16S había sido amplificado correctamente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (MS-8, Pronadisa) al 0,8% en TAE 1x. Los pocillos del gel se cargaron con 2 µL de muestra y 2 µL del tampón de carga Loading Dye (MoBio), que contiene 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol y 30% de glicerol en agua. Como control de peso molecular se empleó el marcador de tamaño molecular X (Roche). La electroforesis se realizó en una cubeta rellena del tampón TAE 1x con una corriente eléctrica de 100 voltios durante 10 minutos. Finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio (Sigma) disuelto en agua a una concentración de 1 µg/mL durante 10 minutos. Los fragmentos amplificados fueron visualizados y fotografiados en un equipo de captación de imágenes (Flúor STM Multimanager, BioRad) utilizando el Software Quantity One 4.1.1.

Tabla 4. *Primers* utilizados para la amplificación y secuenciación del 16S ARN.

<i>Primer</i>	pb	Secuencia	Producto de amplificación
SEQ1-Forward	20	5´-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3´	1459 pb
RP2-Reverse	21	5´-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3´	1459 pb

pb: pares de bases

Purificación

Se realizó una purificación directa del amplificado de ADN utilizando el Kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). A una columna, previamente insertada en el tubo del sistema comercial, se le añadieron 300 µL de tampón de captura y 25 µL de la muestra de ADN amplificado. Se procedió a su centrifugación a 13.000

rpm durante un tiempo de 3 minutos. A continuación se añadieron a la columna 300 μL de tampón de lavado, para posteriormente realizar otra centrifugación a una velocidad de 13.000 rpm durante 1 minuto, tras la cual se eliminó el tampón del tubo, y se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 4 minutos para conseguir la completa eliminación del tampón. El producto fijado en la columna fue traspasado a un tubo eppendorf al que se añadió una cantidad de agua destilada en función de la intensidad de banda alcanzada en el gel de electroforesis; si la banda fue tenue se le añadieron 18 μL de agua destilada, con el fin de concentrar el ADN, y si la banda fue muy intensa se le añadieron 35 μL de agua, para favorecer una mejor disolución. Pasados 5 minutos se realizó la última centrifugación durante 3 minutos, quedando el sobrenadante con ADN purificado. Para cerciorarnos de no haber perdido ADN al purificar, se cargó un gel de agarosa D1 (Pronadisa) en las mismas cantidades y condiciones de electroforesis que se utilizaron en la amplificación.

Secuenciación

A partir de una muestra de ADN purificado se obtuvieron dos mezclas de reacción, una para cada *primer* utilizado. Se emplearon los tubos eppendorf comerciales *puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences, Reino Unido). Los *primers* empleados fueron SEQ1-Forward y RP2-Reverse en cantidades de 1 μL en cada tubo respectivamente. El resto de la mezcla de reacción constaba de 2 μL de la muestra amplificada de ADN, 2 μL de Big Dye Terminator (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Alemania) y 5 μL de agua destilada hasta completar un volumen total de 10 μL .

Las condiciones de la PCR de secuenciación consistieron en un ciclo inicial de 3 minutos a 94°C y 25 ciclos de 10 segundos a 96°C y de 4,05 minutos a 60°C. La conservación del producto secuenciado se realizó a una temperatura de 4°C hasta su empleo. La secuencia de los iniciadores utilizados se encuentra en la tabla 4. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 Peltier (MJ. Research, Inc).

Análisis de las secuencias

Los resultados obtenidos de la secuenciación de los genes *erm(X)*, *erm(B)* y 16S ARN fueron analizados mediante el programa CHROMAS versión 1.45 (Southport Queensland, Australia). Las secuencias de nucleótidos se compararon con las secuencias nucleotídicas presentes en la base de datos del GenBank (NCBI) utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), proporcionando un porcentaje de homología que sirvió para equiparar los diferentes resultados.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ERITROMICINA

Se analizó la concentración de eritromicina presente en el caldo mediante el método descrito por Wondrack y colaboradores ¹⁹⁴. Para la evaluación de la hidrólisis de este antibiótico, se incubaron las cepas problema en caldo cerebro-corazón (BHI), con una concentración de 5 mg/L de eritromicina, durante 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo se centrifugó el cultivo durante 30 minutos a 3.500 rpm, y el sedimento resultante se resuspendió en tampón fosfato potásico 0,1 M y pH de 7, en una proporción de 1/10. Se prepararon concentraciones de 40 mg/L y 400 mg/L de eritromicina y se añadieron a los pocillos de una placa *microtiter* en una cantidad de 100 µL. A continuación se añadieron 100 µL de la suspensión bacteriana concentrada a cada pocillo. Las placas se incubaron en agitación a 37°C, y pasadas 24 y 48 horas se tomaron alícuotas. Después de la centrifugación se tomaron 25 µL del sobrenadante y se colocaron sobre discos estériles que se situaron sobre las placas sembradas de una cepa de *S. aureus* ATCC 25923 sensible a eritromicina. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C, y pasado este periodo, se compararon los halos de inhibición entre las placas incubadas con el antibiótico a una concentración de 40 mg/L y las incubadas con el antibiótico a 400 mg/L y la cepa de *S. aureus*. El procedimiento tuvo como control

positivo una cepa de *Escherichia coli* ClaNal/pAT172 (pUC8 Ω ereB), portadora del gen *ere*(B) en un plásmido que inactiva la eritromicina. Esta cepa de *E. coli*, portadora del plásmido, fue remitida por el doctor Patrice Courvalin del Instituto Pasteur de París. Como controles negativos se utilizaron caldos carentes de bacterias.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación de los porcentajes de sensibilidad y resistencia frente a la eritromicina entre las diferentes especies pertenecientes al género *Corynebacterium* fueron analizados mediante la elaboración de tablas de contingencia y la aplicación de la prueba exacta de Fisher. Se consideró que existía evidencia estadística cuando el cálculo de la probabilidad exacta de asociación (P) entre las variables cualitativas (especie y sensibilidad) era pequeña, con un valor de $P < 0,05$. Todos los análisis fueron realizados mediante el software estadístico SPSS 10.0 para Windows.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN, SENSIBILIDAD *IN VITRO* Y DETERMINACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA

Durante el periodo de estudio se aislaron 254 cepas pertenecientes a diferentes especies del género *Corynebacterium*. Del conjunto, 120 fueron identificadas como *C. urealyticum*, 66 *C. amycolatum*, 20 *C. striatum*, 17 *C. jeikeium*, 12 *C. coyleae*, 11 *C. aurimucosum* y 8 *C. afermentans* subsp. *afermentans*. Todas las cepas fueron aisladas de diferentes muestras clínicas de pacientes. Tanto las cepas de *C. urealyticum* como las pertenecientes a *C. jeikeium* correspondían a diversas colecciones de diferomorfos de la Fundación Jiménez Díaz donde fueron estudiadas y analizadas. El resto de especies fueron procesadas en el Departamento de Microbiología Clínica del Complejo Asistencial de León.

Las cepas de *C. urealyticum* fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales empleando el sistema comercial API Coryne. De estas 120 cepas, una fue aislada en un exudado de catéter, 40 en muestras de orina, y las 79 restantes fueron recogidas en la piel de pacientes hospitalizados y que se hallaban colonizados por el microorganismo. De este último grupo 57 cepas procedían de la región periumbilical, 15 del área inguinal y 7 de la axila. El estudio de sensibilidad antibiótica se llevó a cabo empleando los antibióticos eritromicina, azitromicina, claritromicina, espiramicina, clindamicina y quinupristina/dalfopristina. La sensibilidad a telitromicina no fue evaluada en este microorganismo. El estudio de genes implicados en la resistencia a macrólidos se realizó mediante la amplificación de los genes *erm(X)*, *erm(B)*, *erm(A)*, *erm(TR)*, *mef(A)* y *mef(E)*. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 5.

Tabla 5. *Corynebacterium urealyticum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación API Coryne V 2.0	Gen <i>erm(X)</i>	Gen <i>erm(A)</i>	Gen <i>erm(B)</i>	Gen <i>erm(TR)</i>	Gen <i>mef(A-E)</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
										Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	
1	BACT-1202	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	12	4	>256	6	>256	0.25	
2	BACT-1280	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.032	42	0.032	0.38	
3	BACT-1342	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	>32	
4	BACT-1347	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	
5	CB-256	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
6	CB-257	Orina	2001004	+	+	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	
7	CB-258	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	
8	CB-816	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
9	CB-828	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	
10	CB-845	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	
11	CB-855	Orina	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.125	32	0.032	0.25	
12	CB-877	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	
13	CB-895	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
14	CB-920	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	0.023	0.023	0.25	32	0.047	0.19	
15	CB-930	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.09	35	0.047	0.19	
16	CB-945	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	0.032	0.032	0.5	30	1	0.19	
17	CB-946	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	0.032	0.023	≤0.016	33	0.5	0.125	
18	CB-947	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	0.023	0.032	≤0.016	32	0.5	0.19	
19	CB-997	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	
20	CB-1005	Orina	2001004	+	-	-	-	-	NO	0.023	≤0.016	≤0.016	34	0.5	0.125	
21	LBC-52	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	
22	LBC-53	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.032	35	0.064	0.75	
23	LBC-113	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	33	0.064	0.38	
24	LBC-146	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	
25	LBC-303	Orina	2101004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	
26	A-6 (167-F)	Piel (ombliggo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	
27	A-7(102-A)	Piel (axilia)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
28	A-8(133-P)	Piel (ombliggo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
29	A-9(156-I)	Piel (ingle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
30	A-10(126-I)	Piel (ingle)	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	38	0.125	0.5	
									NO	0.023	0.023	0.06	35	0.06	0.38	

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Erit, eritromicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina.

Tabla 5. *Corynebacterium urealyticum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación API Coryne V.2.0	Gen <i>erm(X)</i>	Gen <i>erm(A)</i>	Gen <i>erm(B)</i>	Gen <i>erm(TR)</i>	Gen <i>mef (A-E)</i>	FENOTIPO MLS	Estudio de sensibilidad a:						
										Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	
31	A-11(118-I)	Piel (íngle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	
32	A-12(117-I)	Piel (íngle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
33	A-13(162-I)	Piel (íngle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
34	A-14(49-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	
35	A-15(50-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
36	A-16(46-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
37	A-17(111-A)	Piel (axilia)	2101004	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.023	37	0.064	0.38	
38	A-18(131-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	
39	A-20(122-I)	Piel (íngle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	
40	A-21(136-I)	Piel (íngle)	2001004	+	-	-	-	-	NO	0.023	0.023	0.125	36	0.064	0.25	
41	A-22(128-I)	Piel (íngle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	
42	A-23(110-A)	Piel (axilia)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	
43	A-24(161-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.064	32	0.125	0.5	
44	A-49(1-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	
45	A-50(2-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	
46	A-51(3-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	
47	A-52(4-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	
48	A-53(5-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	
49	A-54(6-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	
50	A-55(7-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	
51	A-56(8-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	
52	A-58(9-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	
53	A-64(1-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	
54	A-65(2-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	2	
55	A-66(7-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	
56	A-67(11-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.064	33	0.064	0.75	
57	A-68(40-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	
58	A-69(47-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	
59	A-70(76-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	
60	A-71(99-P)	Piel (ombífigo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina.

Tabla 5. *Corynebacterium urealyticum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación API Coryne V 2.0	Gen <i>erm(X)</i>	Gen <i>erm(A)</i>	Gen <i>erm(B)</i>	Gen <i>erm(TR)</i>	Gen <i>meI(A-E)</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
										Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azít (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	
61	A-72(25-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1,5	
62	A-73(26-O)	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0,016	≤0,016	0,023	32	0,064	0,75	
63	A-74(27-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,5	
64	A-75(41-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,5	
65	A-76(42-O)	Orina	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	96	>256	>256	6	>256	0,25	
66	A-77(43-O)	Orina	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0,016	≤0,016	0,032	35	0,064	0,5	
67	A-78(48-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,38	
68	A-79(48-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	+	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,75	
69	B-10(4-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,5	
70	B-11(6-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,38	
71	B-12(9-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,75	
72	B-13(11-P)	Piel (ombiligo)	2101004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,5	
73	B-14(11-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0,016	≤0,016	0,064	35	0,047	0,75	
74	B-15(12-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,38	
75	B-16(13-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0,016	≤0,016	0,032	36	0,064	0,5	
76	B-17(15-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,38	
77	B-18(14)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,38	
78	B-19(16-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,75	
79	B-20(16-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,25	
80	B-21(16-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,38	
81	B-22(16-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0,016	≤0,016	0,047	35	0,047	0,38	
82	B-23(19-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,75	
83	B-24(20-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,5	
84	B-25(21-P)	Piel (ombiligo)	2101004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	
85	B-26(21-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1,5	
86	B-39(159-A)	Piel (ingle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,5	
87	B-40(102-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,38	
88	B-41(104-P)	Piel (ombiligo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0,016	≤0,016	0,047	34	0,047	0,38	
89	B-42(106-1)	Piel (ingle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0,38	
90	B-44(108-1)	Piel (ingle)	2001004	-	-	-	-	-	NO	0,023	0,016	0,047	30	0,064	0,25	

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azít, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalofipristina.

Tabla 5. *Corynebacterium urealyticum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación API Coryne V 2.0	Gen <i>erm(X)</i>	Gen <i>erm(A)</i>	Gen <i>erm(B)</i>	Gen <i>erm(TR)</i>	Gen <i>meff(A-E)</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:					
										Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)
91	B-45(109-I)	Piel (ingle)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	31	0.38	0.75
92	B-46(111-I)	Piel (ingle)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75
93	B-47(115-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38
94	B-48(116-A)	Piel (axilia)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	2	2	>256	6	48	0.25
95	B-49(118-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
96	B-50(175-P)	Piel (ombíligo)	2001004	-	-	-	-	-	NO	0.023	≤0.016	0.125	33	0.064	0.38
97	B-51	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
98	B-52(178-A)	Piel (axilia)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
99	B-53(180-I)	Piel (ingle)	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	37	0.047	0.19
100	B-54(182-I)	Piel (ingle)	2001004	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.19
101	B-55(8-A)	Piel (axilia)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
102	B-56(54-A)	Piel (axilia)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
103	B-57	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.19
104	B-58	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.19
105	B-67(23-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
106	B-68(24-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
107	B-69(25-P)	Piel (ombíligo)	2101004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
108	B-70(26-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
109	B-71(27-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.094
110	B-72(28-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
111	B-73(29-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38
112	B-74(30-P)	Piel (ombíligo)	2001004	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.064	40	0.047	0.38
113	B-75(31-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38
114	B-76(33-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	33	0.064	0.75
115	B-77(34-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	34	0.047	0.38
116	B-78(35-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5
117	B-79(36-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38
118	B-80(37-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
119	B-81(38-P)	Piel (ombíligo)	2001004	+	-	-	-	-	NO	0.023	≤0.016	0.064	33	0.047	0.38
120	FIS-FI	Exudado catéter	2041004	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina.

De las 120 cepas de *C. urealyticum*, 90 presentaron resistencia a eritromicina, claritromicina, espiramicina y clindamicina, detectándose en este grupo una cepa con una resistencia intermedia a claritromicina y otra cepa que se mostró sensible a claritromicina. Las 30 cepas restantes se mostraron sensibles a todos los antibióticos, excepto una cepa que mostró resistencia intermedia a clindamicina. El número de cepas resistentes a quinupristina/dalfopristina fue menor, objetivándose sólo 7 cepas resistentes, 6 de ellas con resistencia intermedia (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de las cepas de *C. urealyticum*.

Antibiótico	Cepas sensibles	Cepas con resistencia intermedia	Cepas resistentes
Eritromicina	25%	0%	75%
Claritromicina	25,83%	0,83%	73,33%
Azitromicina	25%	0%	75%
Espiramicina	25%	0%	75%
Clindamicina	24,16%	0,83%	75%
Quinupristina/Dalfopristina	94,16%	5%	0,83%

Las cepas resistentes a los tres tipos de antibióticos (macrólidos, lincosamidas estreptograminas) se pueden englobar dentro del fenotipo de resistencia MLS_B. Entre las 90 cepas resistentes, 83 cepas presentaron el fenotipo MLS_B con la presencia de un gen de resistencia. De este grupo, 82 cepas tuvieron el gen *erm(X)*, una de ellas, la cepa A-79, también incluía el gen *erm(B)*, mientras que sólo una, la cepa CB-257, era portadora exclusivamente del gen *erm(B)*. En las 7 cepas restantes no se detectó la presencia de ningún gen de resistencia (Tabla 7). En las 30 cepas restantes, que se mostraron sensibles a los antibióticos estudiados, no se hallaron los genes *erm(X)* y *erm(B)*. Tampoco se hallaron en el total de cepas estudiadas ninguno de los demás genes buscados: *erm(A)*, *erm(TR)*, *mef(A)* y *mef(E)*.

Tabla 7. C. urealyticum MLS_B/erm(X) y erm(B).

Fenotipo/gen	Número de cepas	Porcentaje (total 120 bacterias)
MLS _B (+)/ermX(+)	82	68,33%
MLS _B (+)/ermB(+)	2	1,6%
MLS _B (+)/ermX-ermB(-)	7	5,8%
MLS _B (-)/ermX-ermB(+)	0	0%
MLS _B (-)/ermX-ermB(-)	30	25%

El gen *erm(X)* fue el marcador de resistencia más importante apareciendo en el 68,33% de las cepas de *C. urealyticum* estudiadas, mientras que el 31,67% restante no lo mostraron. Por otro lado, hubo un 6,67% de cepas en las que no se detectó el gen de resistencia *erm(X)* pero que, sin embargo, presentaron un fenotipo de resistencia MLS_B (Figura 2). De las 90 cepas con el fenotipo MLS_B el 91,11%, 82 cepas, dieron positivo para el marcador *erm(X)*.

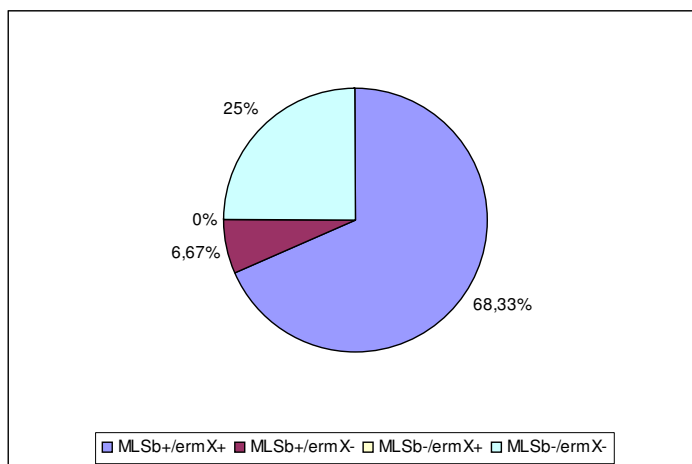


Figura 2. Relación entre la aparición del fenotipo de resistencia MLS_B y la presencia del gen *erm(X)* en la especie *C. urealyticum*.

El producto de amplificación del gen *erm(X)* fue revelado en geles de agarosa, originando una banda particular que se sitúa alrededor de 390 pares de bases (Figuras 3, 4 y 5).

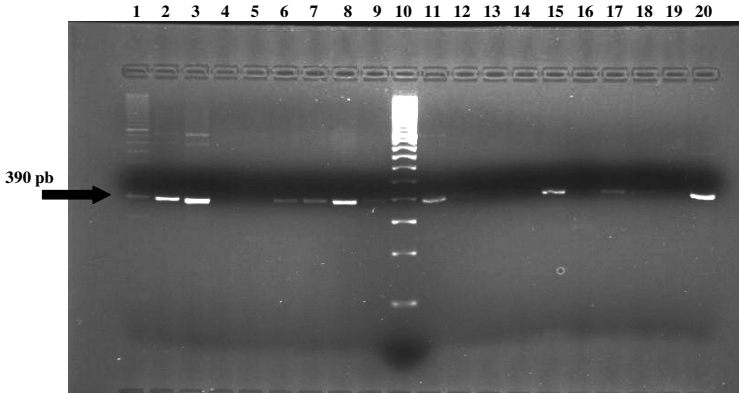


Figura 3. Localización del gen *erm(X)* en las cepas de *C. urealyticum*. Posición 1, cepa A-6; posición 2, cepa A-7; posición 3, cepa A-8; posición 4, cepa A-9; posición 5, cepa A-10; posición 6, cepa A-11; posición 7, cepa A-12; posición 8, cepa A-13; posición 9, cepa A-14; posición 10, escalera control de peso molecular *ladder*; posición 11, cepa A-15; posición 12, cepa A-16; posición 13, cepa A-17; posición 14, cepa A-18; posición 15, cepa A-20; posición 16, cepa A-21; posición 17, cepa A-22; posición 18, cepa A-23; posición 19, control negativo (agua destilada); posición 20, control positivo (*C. jeikeium* CB-396).

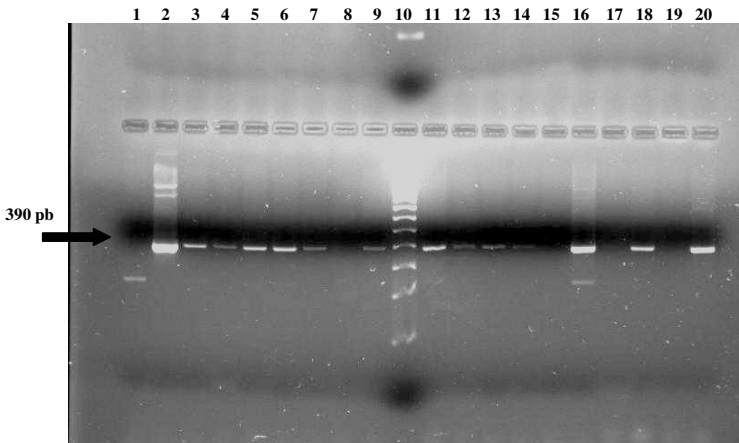


Figura 4. Localización del gen *erm(X)* en las cepas de *C. urealyticum*. Posición 1, cepa A-24; posición 2, cepa A-49; posición 3, cepa A-50; posición 4, cepa A-51; posición 5, cepa A-52; posición 6, cepa A-53; posición 7, cepa A-54; posición 8, cepa A-55; posición 9, cepa A-56; posición 10, escalera control de peso molecular *ladder*; posición 11, cepa A-58; posición 12, cepa A-64; posición 13, cepa A-65; posición 14, cepa A-66; posición 15, cepa A-67; posición 16, cepa A-68; posición 17, cepa A-69; posición 18, cepa A-70; posición 19, control negativo (agua destilada); posición 20, control positivo (*C. jeikeium* CB-396).

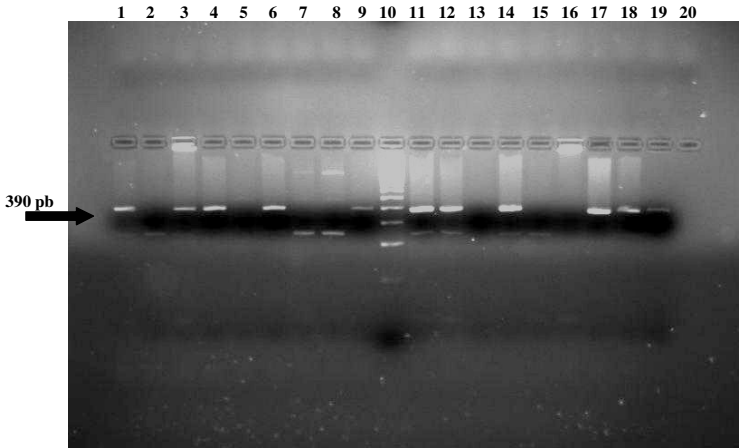


Figura 5. Localización del gen *erm(X)* en las cepas de *C. urealyticum*. Posición 1, cepa B-70; posición 2, cepa B-71; posición 3, cepa B-72; posición 4, cepa B-73; posición 5, B-74; posición 6, cepa B-75; posición 7, cepa B-76; posición 8, cepa B-77; posición 9, cepa B-78; posición 10, escalera control de peso molecular *ladder*; posición 11, cepa B-79; posición 12, cepa B-80; posición 13, cepa B-81; posición 14, cepa LBC-52; posición 15, cepa LBC-53; posición 16, cepa LBC-113; posición 17, cepa LBC-146; posición 18, cepa LBC-303; posición 19, control positivo (*C. jeikeium* CB-396); posición 20, control negativo (agua destilada).

Por el contrario el gen *erm(B)* fue aislado solamente en dos cepas de *C. urealyticum*, siendo el amplicón de un tamaño de 639 pares de bases aproximadamente (Figuras 6 y 7).

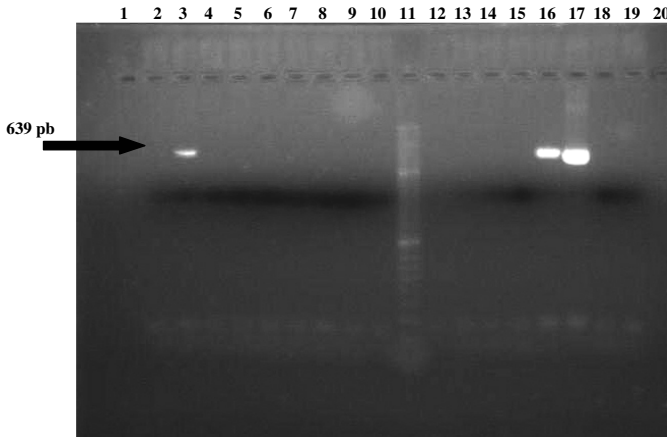


Figura 6. Banda correspondiente al gen *erm(B)* de la cepa de *C. urealyticum* CB-257 en la posición 3; posición 11, escalera control de peso molecular *ladder*; posiciones 16 y 17, controles positivos correspondientes a la cepa *S. agalactiae* 637; posición 18, control negativo (agua destilada).

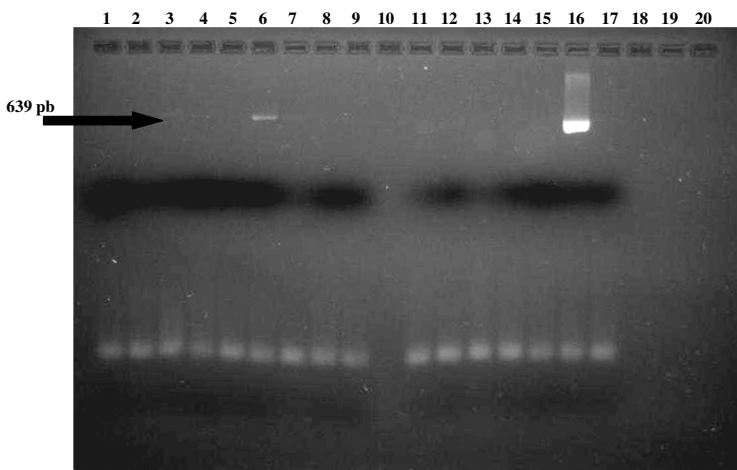


Figura 7. Banda del gen *erm(B)* correspondiente a la cepa de *C. urealyticum* A-79 en la posición 6; escalera control de peso molecular *ladder* en la posición 10; control positivo correspondiente a la cepa *S. agalactiae* 637 en la posición 16 del gel.

Las 17 cepas de *C. jeikeium* que se analizaron fueron aisladas de hemocultivos en otros tantos pacientes. Todas las cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas, empleando el sistema comercial API Coryne. Sólo se detectó el gen *erm(X)* en 10 de las cepas estudiadas. Ninguno de los otros genes de resistencia estudiados fue localizado. Se evaluó la sensibilidad de *C. jeikeium* frente a los antibióticos eritromicina, azitromicina, claritromicina, espiramicina, clindamicina y quinupristina/dalfopristina. Al igual que sucediese con *C. urealyticum*, en este microorganismo tampoco se evaluó la sensibilidad frente a telitromicina. Únicamente 4 cepas presentaron sensibilidad a los antibióticos estudiados, excepto para la clindamicina a la que se mostraron resistentes, dos con resistencia intermedia. Las 13 cepas restantes se mostraron resistentes tanto a los antibióticos macrólidos como a la clindamicina. Todas las cepas de esta especie tuvieron en común el presentar sensibilidad a quinupristina/dalfopristina, aunque 3 con resistencia intermedia (Tabla 8). El fenotipo de resistencia MLS_B lo presentaron 13 cepas, 10 de ellas con el gen *erm(X)*, mientras que en las otras 3 no se detectó este gen (Tabla 9). En las 4 cepas sensibles tampoco se halló ningún otro determinante de resistencia.

Tabla 8. *Corynebacterium jeikeium*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación API Coryne V 2.0	Gen <i>erm(X)</i>	Gen <i>erm(A)</i>	Gen <i>erm(B)</i>	Gen <i>erm(III)</i>	Gen <i>erm(IV)</i>	Gen <i>erm(V)</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:					
											Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)
1	CB-25	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	2
2	CB-26	Hemocultivo	2100304	-	-	-	-	-	-	NO	0.064	0.064	0.25	32	4	1
3	CB-27	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1
4	CB-28	Hemocultivo	2100304	-	-	-	-	-	-	NO	0.032	0.032	0.25	33	1	0.25
5	CB-29	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	32	>256	2
6	CB-38	Hemocultivo	2100304	-	-	-	-	-	-	NO	0.032	0.032	0.25	33	4	1
7	CB-39	Hemocultivo	2100304	-	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25
8	CB-40	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.50
9	CB-41	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	2
10	CB-42	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.50
11	CB-57	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1
12	CB-90	Hemocultivo	2100304	-	-	-	-	-	-	NO	0.032	0.032	0.25	36	1	0.25
13	CB-124	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	32	>256	6	>256	1
14	CB-382	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5
15	CB-396	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5
16	CB-414	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5
17	CB-485	Hemocultivo	2100304	+	-	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina.

Tabla 9. *C. jeikeium* MLS_B/erm(X).

Fenotipo/gen	Número de cepas	Porcentaje (total 17 bacterias)
MLS _B (+)/ermX(+)	10	58,82%
MLS _B (+)/ermX(-)	3	17,65%
MLS _B (-)/ermX(+)	0	0%
MLS _B (-)/ermX(-)	4	23,53%

Las especies *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. coyleae*, *C. aurimucosum* y *C. afermentans* subsp. *afermentans* procedían de diversas muestras clínicas del Complejo Asistencial de León. A todas las cepas se les realizó una identificación preliminar con el sistema API Coryne, obteniendo unos resultados que fueron posteriormente confirmados o modificados mediante estudios de amplificación y secuenciación del gen que codifica el 16S ARN en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda). Se consideró válido el resultado con similitudes del 99% entre el amplicón y el fragmento patrón. En el estudio de sensibilidad se emplearon los mismos antibióticos utilizados para *C. urealyticum* y *C. jeikeium*, pero con la inclusión de la telitromicina.

Las cepas estudiadas de *C. amycolatum* fueron 66 y sus resultados vienen resumidos en la tabla 10. Inicialmente, 20 de estas cepas no se identificaron correctamente mediante el sistema API Coryne, siendo posteriormente confirmada su pertenencia a esta especie tras los estudios moleculares pertinentes. Los aislamientos se realizaron a partir de muestras de pacientes, creciendo 41 cepas en hemocultivos, 22 en catéteres, uno de ellos epidural, 2 aislamientos en exudados de heridas y uno en un líquido articular. De todo el conjunto, diez cepas fueron sensibles a todos los antibióticos, aunque una cepa presentó resistencia intermedia a la clindamicina. El resto se mostró resistente al menos a un grupo de antibióticos.

Tabla 10. *Corynebacterium amycolatum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación preliminar	Identificación API Coryne V 2.0	Gen <i>ermX</i>	Gen <i>ermA</i>	Gen <i>ermB</i>	Gen <i>ermTR</i>	Gen <i>mefA-E</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
											Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	Tel (mm)
1	00/01/0757	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	36
2	00/01/0824	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	35
3	00/02/2296	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100324	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	0.125	0.064	37	0.125	0.125	44
4	00/03/3517	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	40
5	00/05/2246	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	8	>256	6	>256	0.19	50
6	00/06/0260	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	13	>256	0.25	42
7	00/06/1769	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100105	+	-	-	-	-	MLS _B	24	8	>256	6	>256	0.19	36
8	00/06/2348	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> gr:G	3100305	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	35
9	00/07/0397	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	6
10	00/08/0747	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.032	30	0.094	0.125	39
11	00/09/2190	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	33
12	00/09/3144	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	-	-	-	-	-	MLS _B	≤0.016	0.023	0.047	29	0.094	0.19	34
13	00/12/0598	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	23
14	00/12/1147	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	NO	0.064	0.064	0.25	35	0.125	0.38	37
15	00/12/1949	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	■	-	-	-	-	■	12	12	12	30	0.125	0.19	31
16	01/01/0848	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100324	■	-	-	-	-	NO	0.32	0.016	0.125	36	0.19	0.19	40
17	01/01/1881	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100304	■	-	-	-	-	■	12	8	24	30	0.25	0.125	38
18	01/02/2476	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	34
19	01/03/3172	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	35
20	02/03/0978	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	38
21	02/08/1204	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	2	29
22	02/09/0292	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	40

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; Tel, telitromicina.

Tabla 10. *Corynebacterium amycolatum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación preliminar	Identificación API Coryne V.2.0	Gen ermX	Gen ermA	Gen ermB	Gen ermTR	Gen meg/A-E	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
											Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Aziti (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	Tel (mm)
23	03/02/0429	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	MI	12	8	8	37	0.125	0.25	35
24	03/03/0907	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100304	+	-	-	-	-	VI	8	8	24	33	0.125	0.125	33
25	03/04/2487	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100304	+	-	-	-	-	VI	8	8	32	35	0.19	0.19	34
26	03/05/5039	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100304	+	-	-	-	-	VI	12	12	16	42	0.094	0.38	34
27	03/05/3261	Catéter	<i>Corynebacterium</i> sp	3100305	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	32
28	03/05/3262	Catéter	<i>Corynebacterium</i> sp	3100205	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	40
29	03/10/0475	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	40
30	03/09/2859	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100324	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	34
31	03/10/0475	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	47
32	03/10/2954	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100324	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	34
33	03/10/3559	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	42
34	03/10/3876	Cat. Epidural	<i>Corynebacterium</i> sp	2100325	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	34
35	03/11/2464	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100324	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	40
36	03/12/1090	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100324	+	-	-	-	-	ML _S B	24	8	>256	6	>256	0.125	38
37	03/12/1267	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	36
38	03/12/2275	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	6
39	04/01/1043	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	25
40	04/01/1958	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	34	≤0.016	0.25	43
41	04/03/3585	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	2100324	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.19	30
42	04/04/0827	Catéter	<i>C. macginleyi</i>	1100325	+	-	-	-	-	VI	12	8	48	33	0.125	0.125	36
43	04/04/2097	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	40
44	04/04/3284	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	ML _S B	>256	>256	>256	12	>256	0.38	32

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Aziti, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; Tel, telitromicina.

Tabla 10. *Corynebacterium amycolatum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación preliminar	Identificación API Coryne V 2.0	Gen ermX	Gen ermA	Gen ermB	Gen ermTR	Gen mg/A-E	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
											Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	Tel (mm)
45	04/05/2691	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	34
46	04/06/1224	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	3100305	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	32
47	04/06/1924	Ex. Herida	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	50
48	04/06/2110	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	3100305	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	30
49	04/06/2373	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	31
50	04/06/3511	Ex. Herida	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	MLS _B	12	12	>256	13	>256	0.25	40
51	04/07/0038	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.064	33	0.125	0.25	41
52	04/07/0332	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	37	0.25	0.25	40
53	04/08/0819	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	38
54	04/08/1543	Liq. articular	<i>C. amycolatum</i>	2100324	+	-	-	-	-	MLS _B	8	8	24	6	>256	0.012	39
55	04/08/1818	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	12	8	>256	11	>256	0.38	40
56	04/08/1820	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	12	8	>256	11	>256	0.38	40
57	04/08/3552	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100324	-	-	-	-	-	NO	0.023	≤0.016	0.125	38	0.125	0.016	41
58	04/08/4240	Catéter	<i>Corynebacterium</i> sp	3100305	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	24	>256	6	>256	0.38	40
59	04/09/0554	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	35
60	04/09/1885	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100324	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	40
61	04/11/1629	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	30
62	04/11/2538	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100324	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	34
63	04/11/3202	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100324	-	-	-	-	-	NO	0.032	≤0.016	0.094	40	2	1	40
64	04/12/0576	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3110324	+	-	-	-	-	Y	8	4	8	30	0.25	0.25	35
65	04/12/0939	Hemocultivo	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	37
66	04/12/2307	Catéter	<i>C. amycolatum</i>	3100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	33

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; Tel, telitromicina.

En 49 cepas se observó la presencia del gen *erm(X)* no encontrándose ningún otro gen de resistencia. De este grupo 47 cepas presentaron un fenotipo de resistencia MLS_B mientras que dos de ellas mostraron un fenotipo de resistencia M, resistentes a los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, eritromicina, claritromicina y azitromicina, y sensibles a macrólidos de 16 carbonos, espiramicina, clindamicina, quinupristina/dalfopristina y telitromicina. Además, en las otras 17 cepas en las que no se detectó el gen *erm(X)*, el fenotipo de resistencia M lo presentaron 6 cepas y sólo una cepa el MLS_B (Tabla 11). Las 10 cepas restantes se mostraron sensibles a todos los antibióticos, excepto una cepa que presentó resistencia intermedia a clindamicina.

Tabla 11. *C. amycolatum* MLS_B/*erm(X)* y M/*erm(X)*.

Fenotipo/gen	Número de cepas	Porcentaje (total 66 bacterias)
MLS _B (+)/ <i>ermX</i> (+)	47	71,21%
MLS _B (+)/ <i>ermX</i> (-)	1	1,51%
MLS _B (-)/ <i>ermX</i> (+)	0	0%
MLS _B (-)/ <i>ermX</i> (-)	10	15,15%
M(+)/ <i>ermX</i> (+)	2	3,03%
M(+)/ <i>ermX</i> (-)	6	9,1%

El fenotipo de resistencia MLS_B, al igual que sucedió con el resto de especies del género *Corynebacterium*, fue el más abundante con la manifestación del mismo en el 72,72% de las cepas de *C. amycolatum*. La gran diferencia con el resto de especies difteromorfas estudiadas es la aparición del fenotipo M, apareciendo en 8 cepas, el 12,12% del total. En un 75% de las cepas que mostraron el fenotipo M no se determinó ningún gen de resistencia mientras que sólo en 2 cepas, el 25%, se detectó la presencia del gen *erm(X)*, algo que no es habitual (Figura 8).

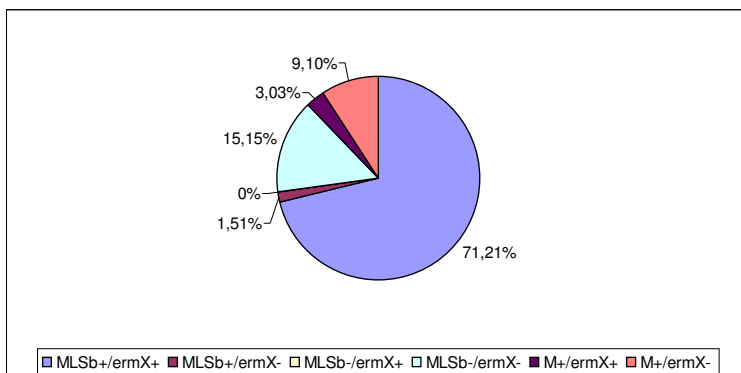


Figura 8. Relación entre la aparición de los fenotipos de resistencia MLS_B y M respecto a la presencia del gen *erm(X)* en la especie *C. amycolatum*.

Las cepas con el fenotipo MLS_B mostraron una resistencia de alto nivel, es decir, con una CMI mayor de 256 mg/L para la eritromicina, claritromicina y azitromicina, mientras que las cepas con el fenotipo M la resistencia mostrada fue de bajo nivel, siempre con las CMIs de los antibióticos inferiores a 256 mg/L. El resto de antibióticos mostraron el perfil de sensibilidad esperado de acuerdo con las características fenotípicas y la presencia del gen en la cepa, destacando que sólo dos cepas fueron resistentes a telitromicina, que una cepa presentó resistencia intermedia a clindamicina y que 6 cepas mostraron resistencia intermedia a quinupristina/dalfopristina (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de las cepas de *C. amycolatum*.

Antibiótico	Cepas sensibles	Cepas con resistencia intermedia	Cepas resistentes
Eritromicina	15,15%	0%	84,85%
Claritromicina	15,15%	1,51%	83,33%
Azitromicina	15,15%	0%	84,85%
Espiramicina	27,27%	0%	72,73%
Telitromicina	96,97%	0%	3,03%
Clindamicina	25,75%	1,51%	72,73%
Quinupristina/Dalfopristina	90,9%	9,1%	0%

De la especie *C. striatum* se estudiaron 20 cepas, correspondientes a otros tantos pacientes, de las que 12 fueron aisladas en muestras de hemocultivos, 6 de catéteres y 2 de exudados de herida. Las 11 cepas con el fenotipo MLS_B presentaron resultados muy homogéneos con una resistencia de alto nivel frente a eritromicina, claritromicina, azitromicina, espiramicina y clindamicina, apareciendo solamente la cepa 03/11/3812 con resistencia intermedia a espiramicina. Aparecieron tres cepas resistentes a telitromicina, una de ellas, la cepa 04/03/3701, con resistencia intermedia. Todas las cepas fueron sensibles a quinupristina/dalfopristina, excepto la cepa 04/12/1763 que presentó resistencia intermedia (Tabla 13).

Inicialmente, en la identificación preliminar mediante pruebas bioquímicas convencionales, dos de las cepas fueron caracterizadas como *C. macginleyi*, aunque después de realizar el debido estudio molecular, se confirmó que estas dos cepas pertenecían a la especie *C. striatum*.

El único determinante de resistencia que se halló fue el gen *erm(X)*, demostrándose la presencia del mismo en 11 cepas. El resto de genes estudiados, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(TR)*, *mef(A)* y *mef(E)* no se detectaron en esta especie. De estas 11 cepas todas presentaron un fenotipo de resistencia MLS_B excepto la cepa número 04/03/0244 que presentó un perfil de sensibilidad a todos los antibióticos estudiados, a pesar de que se demostró la presencia del gen *erm(X)* en su estructura. Por otra parte, las 9 cepas, en las que no se observó la presencia de ningún gen de resistencia, mostraron sensibilidad a todos los antibióticos, excepto la cepa número 01/03/1411 que exhibió el fenotipo MLS_B con una elevada resistencia a todos los antibióticos macrólidos y a clindamicina, pero mostrándose sensible a quinupristina/dalfopristina y telitromicina (Tabla 14).

Tabla 13. *Corynebacterium striatum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación preliminar	Identificación API Coryne V.2.0	Gen <i>ermX</i>	Gen <i>ermA</i>	Gen <i>ermB</i>	Gen <i>ermTR</i>	Gen <i>mefA-E</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
											Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	Tel (mm)
1	00/01/0757	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	38	0.38	0.5	40
2	00/02/1120	Catéter	<i>C. striatum</i>	3100105	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	≤0.016	38	0.25	0.38	38
3	00/09/2126	Catéter	<i>C. striatum</i>	3100105	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.023	40	0.38	0.25	46
4	01/03/0249	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	≤0.016	38	0.25	0.25	48
5	01/03/1411	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	13	>256	0.38	38
6	01/06/1594	Catéter	<i>C. striatum</i>	3100305	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.023	42	0.38	0.38	46
7	01/07/1145	Hemocultivo	<i>C. macginleyi</i>	1100105	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.023	58	0.5	0.5	64
8	01/02/2191	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	2100324	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	40
9	01/12/2937	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	40
10	02/04/1826	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	6
11	02/07/1464	Catéter	<i>C. striatum</i>	3100105	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	27	0.5	1	56
12	02/12/0080	Catéter	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.25	40
13	03/05/0044	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	12	>256	0.5	40
14	03/11/3472	Catéter	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	6
15	03/11/3812	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	15	>256	0.38	40
16	04/03/0244	Exudado herida	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.19	23	0.25	0.5	40
17	04/03/3701	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	21
18	04/04/3037	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	11	>256	0.5	40
19	04/06/1676	Exudado herida	<i>C. macginleyi</i>	1100105	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.047	30	0.38	0.38	40
20	04/12/1763	Hemocultivo	<i>C. striatum</i>	3100105	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	13	>256	1.5	31

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; Tel, telitromicina.

Tabla 14: *C. striatum* MLS_B/erm(X).

Fenotipo/gen	Número de cepas	Porcentaje (total 20 bacterias)
MLS _B (+)/ermX(+)	10	50%
MLS _B (+)/ermX(-)	1	5%
MLS _B (-)/ermX(+)	1	5%
MLS _B (-)/ermX(-)	8	40%

El resto de cepas estudiadas fue un total de 32 correspondiendo 13 a la especie *C. coyleae*, 11 a *C. aurimucosum* y 8 *C. afermentans* subsp. *afermentans* (Tablas 15, 16 y 17). Todas las cepas procedían de diversas muestras clínicas del mismo número de pacientes, y tuvieron el denominador común de una incorrecta identificación mediante el sistema API Coryne que fue corregida después de realizar los estudios moleculares pertinentes.

El gen *erm(X)* fue el único gen de resistencia que se determinó. En la especie *C. coyleae* se halló en 8 de las 12 cepas estudiadas, aunque el fenotipo MLS_B se vio en 10 cepas, encontrándose dos cepas con ausencia de los genes estudiados pero resistentes a macrólidos y lincosamidas. Todas las cepas fueron sensibles a telitromicina pero no frente a quinupristina/dalfopristina a la que cinco cepas se mostraron resistentes, cuatro de ellas con resistencia intermedia (Tabla 15). Sólo la cepa 04/06/1902 de *C. aurimucosum* presentó el gen *erm(X)* con un patrón de sensibilidad frente a los antibióticos estudiados (Tabla 16). Las demás cepas de *C. aurimucosum* mostraron una correcta correlación entre la aparición del gen *erm(X)* y la presencia del fenotipo MLS_B al igual que las 8 cepas de *C. afermentans* subsp. *afermentans* (Tabla 17). Se detectaron dos cepas resistentes a telitromicina y dos con resistencia intermedia a quinupristina/dalfopristina en *C. aurimucosum*. De la misma manera, una cepa de *C. afermentans* subsp. *afermentans* evidenció resistencia frente a quinupristina/dalfopristina.

Tabla 15. *Corynebacterium coyleae*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación preliminar	Identificación API Coryne V.2.0	Gen <i>ermX</i>	Gen <i>ermA</i>	Gen <i>ermB</i>	Gen <i>ermTR</i>	Gen <i>meq/A-E</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
											Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	Tel (mm)
1	04/02/2842	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	17	>256	0.5	37
2	04/04/3027	Hemocultivo	<i>C. jeikeium</i>	2100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	46
3	04/06/0714	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	12	>256	10	>256	1.5	23
4	04/06/2373	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	>32	36
5	04/08/0541	Hemocultivo	<i>C. jeikeium</i>	2100304	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.032	34	1.5	1.5	41
6	04/08/0840	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100304	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.032	34	1.5	1	44
7	04/10/0128	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	50
8	04/10/2419	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	2	42
9	04/12/1159	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	35
10	01/09/1493	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> gr. G	6100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	23
11	03/10/3208	Hemocultivo	<i>C. jeikeium</i>	2100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	8	>256	6	>256	0.75	40
12	04/03/1312	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> gr. G	6100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	24

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalopristina; Tel, telitromicina.

Tabla 16. *Corynebacterium aurimucosum*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación preliminar	Identificación API Coryne V.2.0	Gen <i>ermX</i>	Gen <i>ermA</i>	Gen <i>ermB</i>	Gen <i>ermTR</i>	Gen <i>meq/A-E</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
											Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	Tel (mm)
1	04/06/1902	Catéter	<i>C. striatum/amycolatum</i>	210125	+	-	-	-	-	NO	0.5	0.125	2	22	0.5	0.38	33
2	04/07/1403	Catéter	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	1.5
3	04/07/2964	Hemocultivo	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	≤0.016	44	0.5	0.5	46
4	04/08/1424	Hemocultivo	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1.5	11
5	04/08/1540	Hemocultivo	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.064	38	0.5	0.5	46
6	04/08/1547	Liq. Pertoneal	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	-	-	-	-	-	NO	≤0.016	≤0.016	0.064	38	0.5	0.5	46
7	04/08/1819	Hemocultivo	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	42
8	01/03/1249	Hemocultivo	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	29
9	03/03/3561	Hemocultivo	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	23
10	03/07/3393	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2140125	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	6
11	03/07/4248	Catéter	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100125	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	33

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalopristina; Tel, telitromicina.

Tabla 17. *Corynebacterium afermentans* subsp. *afermentans*.

Orden	Número de cepa	Muestra	Identificación preliminar	Identificación API Coryne V 2.0	Gen <i>ermX</i>	Gen <i>ermA</i>	Gen <i>ermB</i>	Gen <i>ermTR</i>	Gen <i>me/A-E</i>	Fenotipo MLS	Estudio de sensibilidad a:						
											Erit (mg/L)	Clar (mg/L)	Azit (mg/L)	Espir (mm)	Clind (mg/L)	Q/D (mg/L)	Tel (mm)
1	04/01/0323	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> gr. G	6100305	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	1	48
2	04/03/2561	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	2100325	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	12	>256	6	>256	0.125	30
3	04/04/1833	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	6100306	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.38	46
4	04/05/3808	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> gr. G	6100305	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.75	34
5	04/05/4308	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	3100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	50
6	04/05/4317	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	3100304	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	0.5	50
7	04/05/4529	Hemocultivo	<i>Corynebacterium</i> sp	3100306	-	-	-	-	-	NO	0.032	0.032	0.25	40	0.125	0.19	36
8	04/05/4584	Catéter	<i>Corynebacterium</i> gr. G	6100305	+	-	-	-	-	MLS _B	>256	>256	>256	6	>256	4	36

Erit, eritromicina; Clar, claritromicina; Azit, azitromicina; Espir, espiramicina; Clind, clindamicina; Q/D, quinupristina/dalofpristina; Tel, telitromicina.

El número de difteromorfos resistentes a macrólidos fue de 194 de un total de 254. Esto significa que un 76,37% del conjunto de las cepas investigadas presentaron resistencia al menos a un antibiótico de este grupo. Por especies la tasa de resistencia a macrólidos fue variable, pero siempre superior al 50%, comprobándose una alta correlación entre la presencia del gen *erm(X)* y la aparición de resistencia (Tabla 18). La excepción fueron dos cepas, correspondientes a las especies *C. striatum* y *C. aurimucosum*, que poseían el gen *erm(X)* y no mostraron resistencia a ningún antibiótico, y otras dos cepas de *C. amycolatum* que presentaron el gen *erm(X)* y fenotipo M pero no MLS_B. El gen *erm(B)* fue el otro determinante hallado en dos cepas de *C. urealyticum*. Los genes *erm(A)*, *erm(TR)* y *mef(A)* y *mef(E)* no se detectaron en ninguno de los microorganismos analizados, aunque sí aparecieron en los controles positivos pertenecientes a diferentes cepas del género *Enterococcus* y del género *Streptococcus*.

Tabla 18. Sensibilidad a eritromicina y presencia de determinantes de resistencia en cada especie.

Especie	Número	Resistencia (%)	Sensibilidad (%)	Genes detectados		
				<i>erm(X)</i>	<i>erm(B)</i>	Ninguno
<i>C. urealyticum</i>	120	90 (75%)	30 (25%)	82 ^(a)	2 ^(a)	7
<i>C. amycolatum</i>	66	56 ^(b) (84,8%)	10 (15,2%)	49	0	7
<i>C. striatum</i>	20	11 (55%)	9 (45%)	11	0	1
<i>C. jeikeium</i>	17	13 (76,5%)	4 (23,5%)	10	0	3
<i>C. coyleae</i>	12	10 (83,3%)	2 (16,7%)	8	0	2
<i>C. aurimucosum</i>	11	7 (63,6%)	4 (36,4%)	8	0	0
<i>C. afermentans</i>	8	7 (87,5%)	1 (12,5%)	7	0	0

^(a) En una cepa se detectó simultáneamente los genes *erm(X)* y *erm(B)*.

^(b) Ocho cepas presentaron resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, dos de ellas con la presencia del gen *erm(X)*.

C. striatum se mostró más sensible frente a eritromicina en comparación con el resto de especies, aunque sólo la diferencia con *C. amycolatum* resultó estadísticamente significativa con una P=0,011 (prueba exacta de Fisher). Los valores de P para la comparación con *C. urealyticum* y *C. jeikeium* fueron, respectivamente, de 0,103 y 0,3. El número de cepas de *C. coyleae*, *C. aurimucosum* y *C. afermentans* fue insuficiente para el análisis estadístico.

Tabla 19. Intervalos de concentración, CMI₅₀s, y CMI₉₀s de antimicrobianos frente a las especies de *Corynebacterium*.

Especies (n)	Eritromicina		Clarithromicina		Azitromicina		Clindamicina		Quinupristina/Dalfopristina			
	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>C. urealyticum</i> (120)	≤0.016 - >256	>256	>256	≤0.016 - >256	>256	>256	0.032 - >256	>256	>256	0.094 - >32	0.38	1
<i>C. amycolatum</i> (66)	≤0.016 - >256	>256	>256	0.032 - >256	>256	>256	≤0.016 - >256	>256	>256	0.012 - 2	0.25	1
<i>C. striatum</i> (20)	≤0.016 - >256	>256	>256	≤0.016 - >256	>256	>256	0.25 - >256	>256	>256	0.25 - 1.5	0.38	1
<i>C. jeikeium</i> (17)	0.032 - >256	>256	>256	0.032 - >256	>256	>256	1 - >256	>256	>256	0.25 - 2	1	2
<i>C. coyleae</i> (12)	≤0.016 - >256	>256	>256	0.032 - >256	>256	>256	1.5 - >256	>256	>256	0.38 - >32	1.5	1.5
<i>C. aurimucosum</i> (11)	≤0.016 - >256	>256	>256	≤0.016 - >256	>256	>256	0.5 - >256	>256	>256	0.38 - 1.5	0.5	1.5
<i>C. afermentans</i> (8)	0.032 - >256	>256	>256	0.25 - >256	>256	>256	0.125 - >256	>256	>256	0.125 - 4	0.5	4
Total (254)	≤0.016 - >256	>256	>256	≤0.016 - >256	>256	>256	≤0.016 - >256	>256	>256	0.012 - >32	0.38	1

CMI en mg/L.

Los intervalos de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de las diferentes especies difteromorfas estudiadas se muestran en la tabla 19. Todas las especies mostraron un alto nivel de resistencia frente a macrólidos y lincosamidas con una CMI₅₀ y CMI₉₀ para la eritromicina, claritromicina, azitromicina y clindamicina superior a 250 mg/L. Por el contrario, la asociación quinupristina/dalfopristina se mostró como el antibiótico más activo con una CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0.38 y 1 mg/L respectivamente. El número de cepas resistentes a la eritromicina fue de 194 lo que supone un 76,4% del total. Frente al resto de antibióticos macrólidos el comportamiento fue casi idéntico presentando unos porcentajes de resistencia similares a los de la eritromicina (Tabla 20). De todas las cepas resistentes a estos antibióticos 186 mostraron un fenotipo de resistencia MLS_B mientras que 8 cepas de *C. amycolatum* presentaron el fenotipo M. La clindamicina tuvo un comportamiento similar a la eritromicina aunque con un porcentaje de resistencia intermedia mayor debido a las cepas de *C. coyleae* y *C. jeikeium* en las que, a pesar de no presentar resistencia a macrólidos, sin embargo sí mostraron unos niveles de CMI altos frente a la clindamicina. Por otro lado, la quinupristina/dalfopristina se mostró como un antibiótico activo en 229 cepas, presentando resistencia solamente 25 cepas (9,84%), 22 de ellas con resistencia intermedia. Del mismo modo, la telitromicina se mostró como el antibiótico más activo en el 93,16% de las 117 cepas estudiadas de las que sólo 8 fueron resistentes, una de ellas con resistencia intermedia.

Tabla 20. Sensibilidad del conjunto de especies del género *Corynebacterium*.

Antimicrobianos	Sensibilidad antimicrobiana (%)			CMI (mg/L)		
	S	I	R	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Eritromicina	23.6	0	76.4	≤0.016 - >256	>256	>256
Claritromicina	24	0.8	75.2	≤0.016 - >256	>256	>256
Azitromicina	23.6	0	76.4	≤0.016 - >256	>256	>256
Clindamicina	23.6	2.4	74	≤0.016 - >256	>256	>256
Quinupristina/dalfopristina	90.1	8.7	1.2	0.012 - >32	0.38	1

S, sensible; I, intermedio; R, resistente.

CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *erm(X)* Y *erm(B)*

Como complemento a la detección de los genes, se purificaron 20 cepas portadoras del gen *erm(X)*: 5 cepas pertenecientes a la especie *C. urealyticum*, 4 a *C. amycolatum*, 3 a *C. afermentans* subsp. *afermentans*, 2 a *C. jeikeium*, 2 a *C. coyleae*, 2 a *C. striatum* y 2 a *C. aurimucosum* (Figuras 9 y 10). En todas las cepas estudiadas se obtuvo un amplificado de 359 pares de bases. Del mismo modo, se purificaron también los positivos para el gen *erm(B)* hallados en las dos cepas CB-257 y A-79 de *C. urealyticum*. Este fragmento amplificado fue de 600 pares de bases.

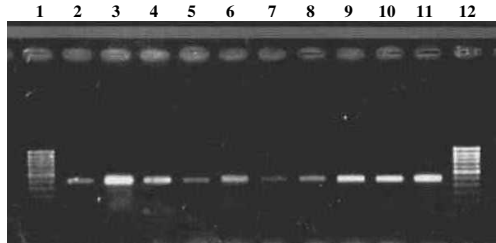


Figura 9. Determinación de bandas del gen *erm(X)* purificado. Posiciones 1 y 12, escalera peso molecular *ladder*; posición 2, cepa 04/06/2373 de *C. coyleae*; posición 3, cepa 04/06/3511 de *C. amycolatum*; posición 4, cepa 04/03/1312 de *C. coyleae*; posición 5, 6 y 7, cepas 04/01/0323, 04/05/4317 y 04/05/4584 de *C. afermentans*; posiciones 8 y 9, cepas 04/07/1403 y 04/08/1424 de *C. aurimucosum*; posiciones 10 y 11, cepas 04/04/3037 y 04/03/3701 de *C. striatum*.

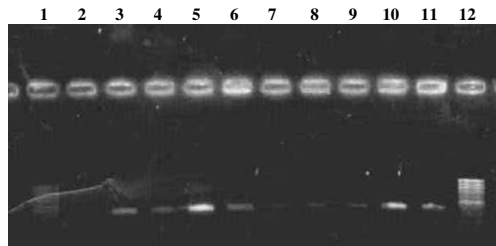


Figura 10. Determinación de bandas del gen *erm(X)* purificado. Posiciones 1 y 12, escalera peso molecular *ladder*; posiciones 2, 3, 4, 5 y 6, cepas A-49, A-72, BACT-1202, A-76 y B-48 de *C. urealyticum*; posiciones 7 y 8, cepas CB-414 y CB-25 de *C. jeikeium*; posiciones 9, 10 y 11, cepas 00/01/0824, 00/03/3517 y 00/06/0260 de *C. amycolatum*.

Score = 640 bits (346), Expect = 2e-180		Identities = 349/350 (99%), Gaps = 1/350 (0%)	
Strand=Plus/Plus			
CuA-76	10	ATTTTCTCACCAACCAAGNATCATCAACTCCATCATCGACCTTGTGAAACAAAACCTCC	69
CuDSM	2241163	ATTTTCTCACCAACCAAG-ATCATCAACTCCATCATCGACCTTGTGAAACAAAACCTCC	2241221
CuA-76	70	GGCCCCATCATTGAGATCGGACCAGGAAGCGGTGCCCTCACTACCCCGATGGCCCACTTG	129
CuDSM	2241222	GGCCCCATCATTGAGATCGGACCAGGAAGCGGTGCCCTCACTACCCCGATGGCCCACTTG	2241281
CuA-76	130	GGGAGGGCGATAACGGCAGTTGAAGTGGACGCAAAACTAGCTGCCAAAATCACACAAGAA	189
CuDSM	2241282	GGGAGGGCGATAACGGCAGTTGAAGTGGACGCAAAACTAGCTGCCAAAATCACACAAGAA	2241341
CuA-76	190	ACCTCCTCGCGCGGTCGAAGTGGTCCATGATGATTTCCCTTAACCTCCGGTTACCCGCC	249
CuDSM	2241342	ACCTCCTCGCGCGGTCGAAGTGGTCCATGATGATTTCCCTTAACCTCCGGTTACCCGCC	2241401
CuA-76	250	ACTCCCTGCGTCATTGTGGGAAACATTCCCTTTCACCTCACCACTGCCATTCTTCGAAAG	309
CuDSM	2241402	ACTCCCTGCGTCATTGTGGGAAACATTCCCTTTCACCTCACCACTGCCATTCTTCGAAAG	2241461
CuA-76	310	TTGCTGCATGCGCCAGCATGGACTGACGCTGTACTCCTCATGCAGTGGGA	359
CuDSM	2241462	TTGCTGCATGCGCCAGCATGGACTGACGCTGTACTCCTCATGCAGTGGGA	2241511

Figura 11. Secuenciación del fragmento amplificado del gen *erm(X)* de la cepa A-76 de *C. urealyticum* (CuA-76) comparado con el gen *erm(X)* secuenciado en el genoma completo de *C. urealyticum* DSM 7109 (CuDSM) (GenBank n° de acceso AM942444.1). Variación en la posición 30 del fragmento amplificado del gen *erm(X)* de *C. urealyticum*.

La secuencia del gen *erm(X)* amplificado se comparó con otras secuencias del género *Corynebacterium*, presentando una similitud del 99% con el gen *erm(X)* insertado en el cromosoma bacteriano de *C. urealyticum* DSM 7109 (GenBank n° de acceso AM942444.1) (Figura 11), con el mismo gen insertado en el plásmido pNG2 de *C. diphtheriae* (GenBank n° de acceso AF492560.1), en el plásmido pTP10 de *C. striatum* (GenBank n° de acceso U21300.1), y en la secuencia de inserción IS1249 de *C. jeikeium* CJ21 (GenBank n° de acceso AF338705.1).

Sin embargo, la homología no fue tan alta con otros genes *erm(X)*, oscilando entre un 92% para el gen insertado en la secuencia de inserción IS1249 de *C. urealyticum* (GenBank n° de acceso DQ643386.1), un 96% comparado con el gen del genoma de *C. jeikeium* K411 (GenBank n° de acceso CR931997.1), un 97% para el gen caracterizado en el plásmido pLEW279a de *Corynebacterium* sp. L2-79-05 (GenBank n° de acceso DQ390458.1) y un 98% con el gen ubicado en la secuencia de inserción IS1249a de *C. urealyticum* (GenBank n° de acceso DQ643386.1).

Score = 1037 bits (561), Expect = 0.0	
Identities = 562/563 (99%), Gaps = 0/563 (0%)	
Strand=Plus/Plus	
<i>Cureal</i> CB-257	38 ATTGAACAGGTAAGGGCATTAAACGACGAAACTGGCTAAAAATAAGTAAACAGGTAACG 97
<i>Spneum</i> 2218	412 ATTGAACAGGTAAGGGCATTAAACGACGAAACTGGCTAAAAATAAGTAAACAGGTAACG 471
<i>Cureal</i> CB-257	98 TCTATTGAATTAGACAGTCATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTTAAACTGAACATT 157
<i>Spneum</i> 2218	472 TCTATTGAATTAGACAGTCATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTTAAACTGAACATT 531
<i>Cureal</i> CB-257	158 CGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTCTACAGTTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTAT 217
<i>Spneum</i> 2218	532 CGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTCTACAGTTTCAATTCCCTAACAAACAGAGGTAT 591
<i>Cureal</i> CB-257	218 AAAATTGTTGGGAATATTCCCTTACCATTTAAGCACACAAAATTTAAAAAGTGGTTTTT 277
<i>Spneum</i> 2218	592 AAAATTGTTGGGAATATTCCCTTACCATTTAAGCACACAAAATTTAAAAAGTGGTTTTT 651
<i>Cureal</i> CB-257	278 GAAAGCCATGCGCTGTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTG 337
<i>Spneum</i> 2218	652 GAAAGCCATGCGCTGTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTG 711
<i>Cureal</i> CB-257	338 GATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGACACTCAAGTCTCGATTGAGCAATGCTT 397
<i>Spneum</i> 2218	712 GATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGACACTCAAGTCTCGATTGAGCAATGCTT 771
<i>Cureal</i> CB-257	398 AAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAACCAAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAAACTT 457
<i>Spneum</i> 2218	772 AAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAACCAAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAAACTT 831
<i>Cureal</i> CB-257	458 ACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACNACTTTGTTTCA 517
<i>Spneum</i> 2218	832 ACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACNACTTTGTTTCA 891
<i>Cureal</i> CB-257	518 AAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATG 577
<i>Spneum</i> 2218	892 AAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATG 951
<i>Cureal</i> CB-257	578 AAACACGCCAAAGTAAACAATTT 600
<i>Spneum</i> 2218	952 AAACACGCCAAAGTAAACAATTT 974

Figura 12. Secuenciación del fragmento amplificado del gen *erm(B)* de la cepa CB-257 de *C. urealyticum* comparado con el gen *erm(B)* de *S. pneumoniae* cepa 2218 (GenBank n° de acceso AJ972603.1). Variación en la posición 505 del fragmento amplificado del gen *erm(B)* de *C. urealyticum*.

Los dos únicos casos del gen *erm(B)* mantuvieron una similitud del 99% con respecto a la misma secuencia del gen *erm(B)* de *S. pneumoniae* cepa 2218 (GenBank n° de acceso AJ972603.1) (Figura 12), y de *S. pneumoniae* cepa K-96 (GenBank n° de acceso AJ972605.1). En relación con el gen *erm(B)* caracterizado en el genoma de otras especies como *S. pyogenes* cepa AncR14 (GenBank n° de acceso AJ972607.1), y el gen *erm(B)* contenido en el plásmido pRUM de *E. faecium* cepa (GenBank n° de acceso AF507977.1), la homología que presentó la secuencia aislada de *C. urealyticum* en estas dos cepas fue también del 99%.

DETERMINACIÓN DE PLÁSMIDOS

Para el estudio de plásmidos se eligieron 85 cepas, pertenecientes a distintas especies, de entre las 254 que componían el estudio. Se eligió un número de cepas representativo de cada especie estudiada: 30 de *C. urealyticum*, 25 de *C. amycolatum*, 10 de *C. jeikeium*, 7 de *C. striatum*, 5 de *C. aurimucosum*, 5 de *C. afermentans* subsp. *afermentans* y 3 de *C. coyleae*. Todas ellas tenían como denominador común el poseer en su estructura el gen *erm(X)* y presentar el fenotipo de resistencia MLS_B. El control positivo que se empleó fue la cepa de *C. glutamicum* ATCC 19223 que posee un plásmido críptico de 20 kb. Como control de peso molecular de los plásmidos se empleó la cepa de *E. coli* V 517 con ocho plásmidos de un peso molecular conocido. No se detectó la presencia de plásmidos en ninguna de las cepas estudiadas (Tabla 21).

Tabla 21. Aislamiento de plásmidos en distintas especies del género *Corynebacterium*.

Especie	Número	Resistencia	Plásmidos
<i>C. urealyticum</i>	30	100%	No
<i>C. amycolatum</i>	25	100%	No
<i>C. jeikeium</i>	10	100%	No
<i>C. striatum</i>	7	100%	No
<i>C. aurimucosum</i>	5	100%	No
<i>C. afermentans</i>	5	100%	No
<i>C. coyleae</i>	3	100%	No

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ERITROMICINA

En la determinación del gen *ere(B)* que codifica para una enzima, cuya función es la hidrólisis de la eritromicina, se emplearon las 14 cepas de diferentes especies del género *Corynebacterium* que tuvieron un fenotipo de resistencia MLS_B pero sin la presencia de ningún determinante de resistencia (Tabla 22). El control positivo empleado fue una cepa de *E. coli* ClaNal/pAT172 que posee el gen *ere(B)* en el plásmido pUC8Ω. Las concentraciones de eritromicina fueron de 40 mg/L y 400 mg/L, evaluándose el halo de inhibición en placas sembradas con la cepa *S. aureus* ATCC 25923 sensible a este antibiótico. Como control negativo se utilizó un caldo carente de bacterias. Los resultados fueron negativos para todas las cepas estudiadas.

Tabla 22. Hidrólisis de eritromicina en las cepas sin gen *erm(X)* y fenotipo MLS_B.

Especie	Cepa	Diámetro ^(a)	Diámetro ^(a)	Hidrólisis
		Eritromicina 40 mg/L	Eritromicina 400mg/L	
<i>C. urealyticum</i>	A-18	21	30	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	B-15	22	29	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	B-24	22	30	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	B-47	21	30	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	B-54	22	31	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	B-55	21	30	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	B-71	19	26	Negativa
<i>C. jeikeium</i>	CB-29	21	29	Negativa
<i>C. jeikeium</i>	CB-39	21	28	Negativa
<i>C. jeikeium</i>	CB-41	20	29	Negativa
<i>C. amycolatum</i>	04/11/1629	23	29	Negativa
<i>C. striatum</i>	01/03/1411	23	30	Negativa
<i>C. coyleae</i>	04/02/2842	20	30	Negativa
<i>C. coyleae</i>	04/10/2419	23	28	Negativa
<i>E. coli</i>	ClaNal/pAT172	0	0	Positiva
Control negativo		23	30	Negativa

^(a) Diámetro de inhibición en mm.

De forma análoga, se estudiaron otras 35 cepas, pertenecientes a las diferentes especies del género, escogiéndose cinco cepas de cada especie. Todas estas cepas se caracterizaban por

tener el gen *erm(X)* en su estructura y presentar el fenotipo de resistencia MLS_B, excepto la cepa 03/04/2487 de *C. amycolatum* a la que no se le aisló ningún determinante de resistencia y presentaba el fenotipo de resistencia M. Todos los resultados fueron negativos (Tabla 23).

Tabla 23. Hidrólisis de eritromicina en las cepas con gen *erm(X)* y fenotipo MLS_B.

Especie	Cepa	Diámetro ^(a)	Diámetro ^(a)	Hidrólisis
		Eritromicina 40 mg/L	Eritromicina 400mg/L	
<i>C. urealyticum</i>	CB-256	21	29	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	CB-257	20	29	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	CB-258	21	30	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	CB-816	21	30	Negativa
<i>C. urealyticum</i>	BACT-1347	22	31	Negativa
<i>C. jeikeium</i>	CB-40	19	25	Negativa
<i>C. jeikeium</i>	CB-42	20	29	Negativa
<i>C. jeikeium</i>	CB-57	21	29	Negativa
<i>C. jeikeium</i>	CB-382	21	28	Negativa
<i>C. jeikeium</i>	CB-396	22	29	Negativa
<i>C. amycolatum</i>	00/01/0824	23	29	Negativa
<i>C. amycolatum</i>	00/03/3517	23	30	Negativa
<i>C. amycolatum</i>	00/05/2246	23	27	Negativa
<i>C. amycolatum</i>	00/06/0260	23	28	Negativa
<i>C. amycolatum</i> ^(b)	03/04/2487	23	29	Negativa
<i>C. striatum</i>	01/02/2191	22	30	Negativa
<i>C. striatum</i>	02/04/1826	23	30	Negativa
<i>C. striatum</i>	03/11/3472	22	29	Negativa
<i>C. striatum</i>	04/03/3701	21	29	Negativa
<i>C. striatum</i>	04/04/3037	22	31	Negativa
<i>C. coyleae</i>	04/12/1159	21	30	Negativa
<i>C. coyleae</i>	04/03/1312	20	29	Negativa
<i>C. coyleae</i>	04/06/2373	20	30	Negativa
<i>C. coyleae</i>	04/04/3027	20	29	Negativa
<i>C. coyleae</i>	04/06/0714	20	30	Negativa
<i>C. aurimucosum</i>	03/03/3561	23	30	Negativa
<i>C. aurimucosum</i>	04/07/1403	24	30	Negativa
<i>C. aurimucosum</i>	04/08/1424	24	31	Negativa
<i>C. aurimucosum</i>	04/08/1819	24	31	Negativa
<i>C. aurimucosum</i>	01/03/1249	24	30	Negativa
<i>C. afermentans</i>	04/01/0323	23	30	Negativa
<i>C. afermentans</i>	04/08/2561	23	31	Negativa
<i>C. afermentans</i>	04/04/1833	24	32	Negativa
<i>C. afermentans</i>	04/05/4308	24	31	Negativa
<i>C. afermentans</i>	04/05/4317	23	30	Negativa
<i>E. coli</i>	ClaNal/pAT172	0	0	Positiva
Control negativo		23	30	Negativa

^(a) Diámetro de inhibición en mm.

^(b) Cepa sin la presencia del gen *erm(X)* y con fenotipo de resistencia M.

DISCUSIÓN

SENSIBILIDAD *IN VITRO*

En los últimos años, las especies pertenecientes al género *Corynebacterium* han alcanzado un importante protagonismo debido a un incremento de los aislamientos clínicamente significativos, así como a una mayor precisión en la identificación y caracterización de las distintas especies debido a una mejora de las técnicas en el laboratorio asistencial^{2, 7, 13}. Estas especies, consideradas en un gran número de casos como contaminantes, van a estar implicadas en infecciones polimicrobianas de diferente localización y en una gran variedad de cuadros clínicos de gran importancia^{10, 11, 60, 107, 109}. Paralelamente a este fenómeno, diversos estudios han puesto de manifiesto una elevada tasa de resistencias de los diferentes miembros del género *Corynebacterium* frente a los antibióticos macrólidos^{116-118, 130}. Estos antimicrobianos son considerados en muchas ocasiones el tratamiento de elección en distintas patologías causadas por las diferentes especies de diferomorfos como el eritrasma y determinados cuadros respiratorios¹³⁵. Además, constituyen la principal alternativa a los β -lactámicos en personas alérgicas a los mismos y a las tetraciclinas en mujeres embarazadas y niños^{135, 136}. Estas características hacen de los macrólidos uno de los grupos de antibióticos con mayor significación y trascendencia en la práctica clínica.

En la actualidad, la elevada resistencia que presentan a los macrólidos las diferentes especies del género *Corynebacterium*, y otras especies, es un asunto de gran importancia. En nuestro estudio la resistencia *in vitro* que mostraron las diferentes cepas frente a este grupo de antibióticos fue muy elevada, exactamente un 76,37%, lo que confirma la alta prevalencia de resistencias que presentan las diferentes especies de este género^{117, 118}. La eritromicina, considerada el tratamiento de elección en algunas patologías causadas por estos

microorganismos, mostró muy poca actividad frente a *C. urealyticum*, *C. jeikeium* y *C. amycolatum*, especies que muestran habitualmente un perfil de multiresistencia^{117, 121}. Del mismo modo otras especies menos habituales como *C. afermentans* subsp. *afermentans*, *C. aurimucosum* y *C. coyleae* también presentaron unos índices de resistencia muy elevados. Sólo las cepas de *C. striatum* mostraron un porcentaje de resistencia menor que el resto de especies, exactamente un 55% , aunque lo suficientemente alto como para considerar a la eritromicina como un fármaco poco activo frente a esta especie^{15, 120}. El resto de macrólidos no se mostraron más activos que la eritromicina frente a estas especies de difteromorfos. En este sentido, la claritromicina se ha caracterizado por poseer una mejor actividad intrínseca que el resto de macrólidos frente al género *Corynebacterium* al poseer una CMI₅₀ inferior¹⁹⁵. Ésta es una característica que se muestra particularmente relevante en algunas especies como *C. amycolatum*¹⁵⁸. Sin embargo, su comportamiento en este estudio fue muy similar a la presentada por la eritromicina, exhibiendo un alto nivel de resistencia con CMI₅₀ y CMI₉₀ superior a 256 mg/L.

En especies pertenecientes al género *Streptococcus* también aparece una alta prevalencia de resistencias para la eritromicina y el resto de macrólidos. Estos índices de resistencia son variables en función de la especie y la zona geográfica oscilando entre un 20 y un 40%^{196, 197}. En nuestro medio, las tasas frente a las especies del género *Streptococcus* son muy similares^{148, 154, 198}, percibiéndose en los últimos años un aumento de las mismas como consecuencia del aumento del consumo de macrólidos^{168, 199, 200}. En el género *Staphylococcus* las tasas de resistencia pueden estar situadas por encima del 40%¹⁴⁹. No obstante, todas estas tasas de resistencia, aún siendo altas, están por debajo de las encontradas en este estudio y en otras publicaciones donde se evaluó la sensibilidad en diferentes especies de difteromorfos^{117, 118, 158}. De cualquier modo, todos estos datos hacen desaconsejable el uso de la eritromicina en la profilaxis y en el tratamiento de las infecciones en las que puedan estar implicados estos microorganismos, debiendo realizarse más estudios de sensibilidad para adecuar dicho tratamiento.

En el caso de la clindamicina, la actividad fue casi idéntica a la mostrada por los macrólidos debido a la resistencia cruzada que aparece con las lincosamidas. El porcentaje de resistencias del total de cepas estudiadas fue de un 76,37%, con una CMI₅₀ y CMI₉₀ superior a 256 mg/L en todas las especies, coincidiendo con los datos de sensibilidad que se tienen sobre este grupo de antibióticos en los principales miembros del género *Corynebacterium*¹³⁰, y de otras especies como *S. aureus* en las que se ha caracterizado un perfil de resistencia muy parecido¹⁵³. Además, en esta última especie, es muy característica la presencia del fenotipo MLS_B que se manifiesta con carácter inducible, existiendo una alta probabilidad de aparición de cepas resistentes¹⁵⁰, por lo que al igual que sucede con los macrólidos, el uso de la clindamicina en las infecciones de piel y tejidos blandos puede suponer un riesgo de fracaso terapéutico.

Por el contrario, la quinupristina/dalfopristina (synercid[®]) mostró excelentes niveles de actividad en todas las especies estudiadas, excepto en 25 cepas de distintas especies que presentaron una CMI mayor. Esta excelente actividad ya había sido previamente confirmada en otros estudios de sensibilidad *in vitro* realizados en diferentes especies del género *Corynebacterium*^{118, 126, 127}. Del mismo modo, en el caso de la telitromicina, artículos previos publicados sobre la actividad de este antibiótico demostraron que tenía una magnífica actividad en diferentes especies difteromorfas sin tener en cuenta la presencia en las mismas de determinantes de resistencia^{118, 131}. En este estudio, la telitromicina mostró una buena actividad *in vitro* frente al 93% en los aislamientos de *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. coyleae*, *C. aurimucosum* y *C. afermentans*, siendo sensible con independencia de la presencia de determinantes de resistencia frente a macrólidos. Estos resultados confirmaron los descubrimientos previos sobre la buena actividad *in vitro* de este antibiótico en difteromorfos, incluso en cepas multirresistentes¹⁵⁸. Por otro lado, hay que destacar que este resultado de la telitromicina, con un porcentaje de resistencias que no llega al 7% en el conjunto de cepas de difteromorfos, contrasta con los resultados de otros estudios para la especie *C. amycolatum*, en los que se ha hallado un nivel de resistencia algo más elevado para esta especie¹²². No obstante, tanto el synercid como la telitromicina podrían ser en ocasiones una alternativa útil frente a

infecciones producidas por los miembros multirresistentes pertenecientes al género *Corynebacterium*.

PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA

Las ARNr metilasas constituyen el mecanismo de resistencia más importante frente a macrólidos que se encuentran tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas. En el género *Corynebacterium* estas enzimas están codificadas por los genes *erm* de clase X. Esta clase agrupa a los genes *erm*(CD), *erm*(CX) y *erm*(A), que originariamente fueron detectados en las especies *C. diphtheriae*, *C. xerosis* y *C. striatum*, debido a que presentan una homología del 80% entre ellos¹⁴⁶. Posteriormente, la presencia del gen *erm*(X) fue detectada en las especies *C. jeikeium* y *C. amycolatum*^{157, 158}. Los resultados obtenidos en este estudio ponen de relieve la alta prevalencia del gen *erm*(X) en las diferentes especies del género *Corynebacterium*¹⁵⁸. Además de detectarse el gen *erm*(X) en las especies en las que ya estaba descrito como *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. amycolatum* y *C. urealyticum*, también se detectó su presencia en otras especies como *C. coyleae*, *C. aurimucosum* y *C. afermentans*.

El conjunto de cepas que presentaron este gen fue del 68,89%, observándose una relación muy alta entre la presencia del gen *erm*(X) y la aparición del fenotipo de resistencia MLS_B con una correlación del 91,93%. Comparativamente con otras especies como *S. aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, en las que los genes *erm* son el principal mecanismo de resistencia frente a macrólidos, se vio que la correlación entre la presencia del gen productor de metilasa y la aparición del fenotipo MLS_B era muy similar, pero con la diferencia de que en estas especies el porcentaje de cepas en las que se detectó alguna de las clases de estos genes era menor^{153, 154, 201}. En este sentido, la alta prevalencia del gen *erm*(X) en los difteromorfos explicaría el elevado índice de resistencias que existe frente a los antibióticos macrólidos y a

clindamicina con respecto a especies pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

Paradójicamente, hubo dos cepas pertenecientes a las especies *C. striatum* y *C. aurimucosum*, en las que, aún detectándose la presencia del gen *erm(X)*, mostraron sensibilidad a los diferentes antibióticos estudiados. Igualmente, dos cepas pertenecientes a la especie *C. amycolatum* en las que se detectó el gen *erm(X)*, presentaron un fenotipo M, con perfil de resistencia únicamente frente a los antibióticos macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono y sensibilidad frente al resto de antibióticos estudiados. Posiblemente, todos estos resultados podrían deberse a una mala expresión del gen en estas cepas, o que el gen no estuviese completo como consecuencia de la delección de algún fragmento.

Hay que resaltar que 14 aislamientos mostraron el perfil fenotípico MLS_B, pero con ausencia de este gen. Este 7,52% de resistencias podría deberse a la existencia de otros mecanismos de resistencia presentes en estas bacteria, pero no estudiados. En este sentido, existen varias publicaciones que describen la presencia de mutaciones en el ADN que codifica el ARN ribosómico, y en las proteínas ribosomales L4 y L22, que producen resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B¹⁴⁴. Estos estudios han sido realizados principalmente en la especie *S. pneumoniae*^{161, 162, 165, 202}, donde se ha comprobado la relación existente entre estas mutaciones y la aparición de resistencia, por lo que no habría que descartar la posibilidad de que en estas cepas del género *Corynebacterium* también se den este tipo de mecanismos de resistencia.

Por otro lado, la telitromicina se mostró refractaria a este tipo de resistencia producida por el gen *erm(X)*. En este sentido, existen diversos estudios realizados en el género *Streptococcus* en los que se ha evidenciado que variaciones en la expresión del gen *erm(B)* han

desencadenado una mayor efectividad en la metilación de los ribosomas bacterianos y, en consecuencia, un incremento del número de cepas resistentes a la telitromicina²⁰³⁻²⁰⁵. Este fenómeno podría ser una explicación oportuna en la aparición de resistencia frente a este antibiótico en las especies del género *Corynebacterium*, aunque estos mecanismos todavía no son bien conocidos en el gen *erm(X)*, por lo que serán necesarios más estudios para comprobar esta hipótesis.

OTROS DETERMINANTES DE RESISTENCIA

Otra de las opciones que podría explicar la aparición de resistencia a los macrólidos en ausencia del gen *erm(X)*, sería la presencia en el cromosoma bacteriano de otros genes de la familia *erm*. En este estudio se contempló esa posibilidad por lo que se evaluó la presencia de los determinantes de resistencia *erm(A)*, *erm(B)* y *erm(TR)*, habituales en otras especies^{148, 153, 155, 156, 206}. Los resultados que se obtuvieron fueron negativos en todas las cepas estudiadas, excepto para dos cepas de *C. urealyticum* en las que se detectó la presencia del gen *erm(B)*. En uno de los casos fue el único determinante aislado, mientras que en la otra cepa la presencia de este gen fue detectada conjuntamente con el *erm(X)*. El gen *erm(B)* ya había sido descrito anteriormente en una cepa del género *Corynebacterium* perteneciente al grupo A¹⁷⁷. Sin embargo, la metodología llevada a cabo en este estudio difiere bastante respecto a los protocolos de amplificación para este gen recientemente publicados^{157, 190}, ya que la temperatura de anillamiento que se empleó fue de 37°C, temperatura a la que la hibridación del gen es muy inespecífica. A esto hay que añadir la no identificación a nivel de especie de la cepa que llevaba el gen *erm(B)*. Por estos motivos el resultado descrito sobre la presencia del gen *erm(B)* en dicha publicación habría que tomarlo con cierta cautela.

Otra característica a destacar es que se halló en una cepa de *C. urealyticum* la presencia conjunta de los genes *erm(X)* y *erm(B)*, característica que no había sido descrita en este género anteriormente. Este hallazgo contrasta enormemente con las especies pertenecientes al género *Staphylococcus*, donde la presencia de varios determinantes de resistencia de la familia *erm* suele ser bastante habitual¹⁵³.

La presencia del fenotipo M en 8 cepas de *C. amycolatum* hizo pensar en la posibilidad de la existencia de algún gen que codificara para proteínas que produjeran la expulsión del fármaco. En este sentido, se intentó determinar la presencia de los genes *mef(A)* y *mef(E)* en todas las cepas, pero el resultado fue negativo para todos los casos. El gen *mef(E)* ya había sido descrito con anterioridad en *C. jeikeium* y en otras dos especies pertenecientes a los grupos A y ANF, en el artículo, citado anteriormente, en el que fue descrito el gen *erm(B)* para el género *Corynebacterium*¹⁷⁷. En este artículo, la homología que presentó el gen *mef(E)* estuvo entre un 93 y un 95%, pero, al igual que antes, el estudio presenta algunas dudas metodológicas ya que, al empleo de la temperatura de anillamiento a 37°C y la no identificación de tres aislamientos a nivel de especie, hay que añadir la no correlación entre las CMIs de eritromicina y clindamicina con la presencia del fenotipo de resistencia M. Además, el alto número de cepas que presentaron el gen *mef*, 4 de 17 cepas estudiadas, supone una elevada prevalencia en este género si la comparamos con los resultados negativos para este mismo gen que se obtuvieron en todas las cepas analizadas de nuestro estudio.

Otra de las posibilidades, en la explicación del fenotipo M, sería la posible presencia de otro gen que produjera un fenotipo similar. A este respecto, el gen *msr*, descrito en los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*^{146, 172}, podría ser una posible opción que explicaría este fenómeno. Este mismo gen ha sido recientemente descrito en un estudio publicado sobre diversos microorganismos grampositivos entre los que se encontraba un miembro perteneciente al género *Corynebacterium*, aunque no se especificaba la especie¹⁶⁷. La evaluación del gen *msr*

no se realizó en este estudio por lo que no habría que descartar la posibilidad de la presencia de este gen en alguna de estas cepas.

En el género *Corynebacterium*, y en concreto en la especie *C. glutamicum*, ha sido descrita la presencia del gen *cmr* (corynebacterial multidrug resistance) que codifica para una proteína transmembranal que actúa como una bomba de expulsión para determinados antibióticos entre los que se encuentra la eritromicina. Si bien, esta especie se muestra sensible frente a este antibiótico, diversos experimentos han puesto de relieve que en la especie *E. coli*, a la que se le ha transferido el gen, sí presenta resistencia²⁰⁷. La posibilidad de la existencia de este gen u otro similar, en las cepas de *C. amycolatum* con el fenotipo M, explicaría la resistencia frente a los antibióticos macrólidos y la aparición de este fenotipo en dichas cepas, aunque serían necesarios más estudios para comprobar este fenómeno.

Finalmente, en este estudio se intentó por primera vez evaluar la hidrólisis enzimática de eritromicina en el género *Corynebacterium* a través de la detección del gen *ere*, si bien no se obtuvo ningún resultado positivo en ninguna de las cepas estudiadas. Parece poco probable la presencia de este determinante de resistencia en las diferentes especies de este género, ya que ha sido detectado principalmente en gramnegativos¹⁴⁶, aunque últimamente se ha demostrado experimentalmente la capacidad que tiene este gen para ser adquirido por microorganismos grampositivos¹⁹⁴.

PRESENCIA DE PLÁSMIDOS

Ante la posibilidad de que algunos determinantes de resistencia estuvieran incorporados en algún plásmido se procedió a realizar un estudio de los mismos. A este respecto, la presencia del gen *erm(X)* ya había sido detectada en el plásmido pNG2 de *C. diphtheriae*¹⁷⁴. También se

evidenció la presencia de un plásmido en una cepa de la especie *C. striatum*, pero sin hallarse en el mismo ningún determinante de resistencia frente a los antibióticos macrólidos ²⁰⁸. Por el contrario, en nuestro estudio no se detectó la presencia de ningún plásmido en ninguna de las especies de difteromorfos estudiadas, aunque no se estudiaron el total de las cepas, por lo que no se puede descartar la posibilidad de la presencia de plásmidos en alguna de ellas. Todos estos datos inducen a pensar que la presencia de los determinantes de resistencia hallados, tanto el gen *erm(X)* como el gen *erm(B)*, se hallan insertados en el cromosoma bacteriano. Esta aseveración ha sido confirmada por otras publicaciones en las que se evaluó la presencia del gen *erm(X)* en elementos móviles como transposones o plásmidos ¹⁵⁷.

Posiblemente, el origen de estos determinantes de resistencia habría que buscarlo en algún elemento móvil que hubiera transferido estos genes al cromosoma de la bacteria, quedando insertados en el mismo. En este sentido, la presencia del gen *erm(X)* se ha asociado al transposon Tn5432 en diferentes especies ^{157, 178, 209}. Probablemente estas cepas adquirieron el gen insertado en este elemento móvil, y posteriormente este transposon se integró en el cromosoma ^{157, 208}. Es muy probable que haya sido la presión antibiótica en la práctica clínica la que haya ayudado a la selección de las cepas difteromorfas que adquirieron este gen de resistencia.

CONCLUSIONES

1. En nuestro medio existe un alto porcentaje de cepas de las especies *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. jeikeium*, *C. coyleae*, *C. aurimucosum* y *C. afermentans* subsp. *afermentans* resistentes a macrólidos. Aunque el porcentaje de cepas de *C. striatum* sensibles a eritromicina fue superior respecto al resto de especies, sólo resultó estadísticamente significativo con respecto a la especie *C. amycolatum*.
2. En todas las especies, el fenotipo de resistencia predominante fue el MLS_B con resistencia cruzada a lincosamidas y estreptograminas del grupo B. En la especie *C. amycolatum* un escaso número de cepas también presentaron un fenotipo de resistencia M, sólo con resistencia de bajo nivel a los antibióticos macrólidos.
3. La resistencia a telitromicina es excepcional en nuestro medio entre las diferentes especies pertenecientes al género *Corynebacterium* en las que se estudió este antibiótico.
4. La resistencia a macrólidos en las especies *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. coyleae*, *C. aurimucosum* y *C. afermentans* subsp. *afermentans*, está mediada principalmente por el gen *erm(X)*.
5. La resistencia mediada por el gen *erm(B)* se da con muy poca frecuencia y está asociada a la especie *C. urealyticum*.

6. Existe un pequeño porcentaje de cepas en las que la resistencia a los antibióticos macrólidos debe estar determinada por otros mecanismos de resistencia diferentes a los producidos por los genes *erm(X)* y *erm(B)*.

7. La resistencia a macrólidos, en las especies estudiadas del género *Corynebacterium*, no está determinada por la presencia de enzimas capaces de hidrolizar los antibióticos macrólidos, tanto en cepas con presencia de genes de resistencia como en cepas que carecen de los mismos.

8. No se evidenció la presencia de plásmidos en las cepas analizadas, lo que indica que los genes implicados en la resistencia a macrólidos deben estar integrados en el cromosoma bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lehmann, K. B. & Neumann, R. (1896). *Atlas und Grundriss der bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*, 1ª edn, München.
2. Funke, G., von Gravenitz, A., Clarridge, J. E. & Bernard, K. A. (1997). Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 125-159.
3. Coyle, M. B. & Lipsky, B. A. (1990). Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical laboratory aspects. *Clinical Microbiology Reviews* **3**, 227-246.
4. Da Silva, G. A. & Holt, J. G. (1965). Numerical taxonomy of certain coryneform bacteria. *Journal of Bacteriology* **90**, 921-927.
5. Bernard, K. A., Bellefeuille, M. & Ewan, E. P. (1991). Cellular fatty acid composition as an adjunct to identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 83-89.
6. Tang, Y., von Gravenitz, A. & Waddington, M. (2000). Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1676-1678.
7. Wauters, G., Van Bosterhaut, B., Janssens, M. & Verhaegen, J. (1998). Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1430-1432.
8. Meyer, D. K. & Reboli, A. C. (2006). Otras bacterias corineformes y *Rhodococcus*. In: *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*, 6ª edn. (Mandell, G. L., Bennett, J. E. & Dolin, R., Eds), pp. 2465-2477. Elsevier, Madrid.
9. Soriano, F., Ponte, C., Ruiz, P. & Zapardiel, J. (1993). Non-urinary tract infections caused by multiply antibiotic-resistant *Corynebacterium urealyticum*. *Clinical Infectious Diseases* **17**, 890-891.

10. Rikitomi, N., Nagatake, T., Matsumoto, K., Watanabe, K. & Mbaki, N. (1987). Lower respiratory tract infections due to non-diphtheria corynebacteria in 8 patients with underlying lung diseases. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **153**, 313-325.
11. Belmares, J., Detterline, S., Pak, J. B. & Parada, J. P. (2007). *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infectious Diseases* **7**, 1-8.
12. Young, V. M., Meyers, W. F., Moody, M. R. & Schimpff, S. C. (1981). The emergence of coryneform bacteria as a cause of nosocomial infections in compromised hosts. *American Journal of Medicine* **70**, 646-650.
13. Funke, G. & Bernard, K. A. (2003). Coryneform gram-positive rods. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edn. (Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C. & Tenover, R. H., Eds), pp. 472-501. ASM Press, Washington, D.C.
14. (2007). VITEK 2 Systems. Información sobre el producto. bioMérieux, Inc., Becton, Dickinson and Company, North Carolina USA.
15. Martínez-Martínez, L., Suárez, A. I., Winstanley, J., Ortega, M. C. & Bernard, K. (1995). Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2458-2461.
16. Freney, J., Duperron, T., Courtier, C., Hansen, W., Allard, F., Boeufgras, J. M., *et al.* (1991). Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 38-41.
17. Gavin, S. E., Leonard, R. B., Briselden, A. M. & Coyle, M. B. (1992). Evaluation of the Rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1692-1695.
18. Funke, G., Renaud, F. N., Freney, J. & Riegel, P. (1997). Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 3122-3126.
19. Renaud, F. N., Dutaur, M., Daoud, S., Aubel, D., Riegel, P., Monget, D., *et al.* (1998). Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3698-3702.

20. Hommez, J., Devriese, L. A., Vaneechoutte, M., Riegel, P., Butaye, P. & Haesebrouck, F. (1999). Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 954-957.
21. Hudspeth, M. K., Hunt Gerardo, S., Citron, D. M. & Goldstein, E. J. (1998). Evaluation of the RapID Plus system for identification of *Corynebacterium* species and other gram-positive rods. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 543-547.
22. Collins, M. D., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1982). Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *Journal of General Microbiology* **128**, 2503-2509.
23. Bernard, K. A., Bellefeuille, M. & Ewan, E. P. (1991). Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 83-89.
24. Butler, W. R., Kilburn, J. O. & Kubica, G. P. (1987). High-performance liquid chromatography analysis of mycolic acids as an aid in laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* species. *Journal of Clinical Microbiology* **25**, 2126-2131.
25. de Briel, D., Couderc, F., Riegel, P., Jehl, F. & Minck, R. (1992). High performance liquid chromatography of corynomycolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and relates organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1407-1417.
26. Riegel, P., Heller, R., Prevost, G., Jehl, F. & Monteil, H. (1997). *Corynebacterium durum* sp. nov., from human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1107-1111.
27. Yassin, A. F., Kroppenstedt, R. M. & Ludwig, W. (2003). *Corynebacterium glaucum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 705-709.
28. Funke, G., Lawson, P. A. & Collins, M. D. (1995). Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 735-739.

29. Björkroth, J., Korkeala, H. & Funke, G. (1999). rRNA gene RFLP as an identification tool for *Corynebacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 983-989.
30. Pascual, A., Lawson, P., Farrow, J. & Navarro, M. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 724-728.
31. Watts, J. L., Lowery, D. E., Teel, J. F., Ditto, C., Horng, J. S. & Rossbach, S. (2001). Phylogenetic studies on *Corynebacterium bovis* isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* **84**, 2419-2423.
32. Roux, V., Drancourt, M., Stein, A., Riegel, P., Didier, R. & La Scola, B. (2004). *Corynebacterium* species isolated from bone and joint infections identified by 16S rRNA gene sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 2231-2233.
33. Khamis, A., Raoult, D. & La Scola, B. (2005). Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 1934-1936.
34. Kemp, M., Holtz, K., Andressen, K. & Christensen, J. J. (2005). Demonstration by PCR and DNA sequencing of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a cause of joint infection and isolation of the same organism from a surface swab specimen from the patient. *Journal of Medical Microbiology* **54**, 689-691.
35. Euzèby, J. P. (2008). List of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus *Corynebacterium*. <http://www.bacterio.cict.fr/c/corynebacterium.html>.
36. MacFaddin, J. F. (2003). Bacterias grampositivas. In: *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, 3ª edn. (MacFaddin, J. F., Ed), pp. 451-579. Editorial Médica Panamericana, S.A., Buenos Aires.
37. Pitcher, D., Soto, A., Soriano, F. & Valero-Guillén, P. L. (1992). Classification of coryneform bacteria associated with human urinary tract infection (group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 178-181.
38. Riebel, W., Frantz, N., Adelstein, D. & Spagnuolo, P. J. (1986). *Corynebacterium* JK: a cause of nosocomial device-related infection. *Reviews of Infectious Diseases* **8**, 42-49.

39. Jousseaume, A. M., Funke, G., Jousseaume, F. & Herbertz, G. (2000). *Corynebacterium macginleyi*: a conjunctiva specific pathogen. *The British Journal of Ophthalmology* **84**, 1420-1422.
40. Ang, L. M. & Brown, H. (2007). *Corynebacterium accolens* isolated from breast abscess: possible association with granulomatous mastitis. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 1666-1668.
41. Sewell, D. L., Coyle, M. B. & Funke, G. (1995). Prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum* (CDC coryneform group ANF-1). *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 759-761.
42. Yagüe, G., Segovia, M. & Valero-Guillén, P. L. (1997). Acyl phosphatidylglycerol: a major phospholipid of *Corynebacterium amycolatum*. *FEMS Microbiology Letters* **151**, 125-130.
43. Esteban, J., Nieto, E., Calvo, R., Fernández-Roblas, R., Valero-Guillén, P. L. & Soriano, F. (1999). Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18**, 18-21.
44. Wauters, G., Driessen, A., Ageron, E., Janssens, M. & Grimont, P. (1996). Propionic acid-producing strains previously designated as *Corynebacterium xerosis*, *C. minutissimum*, *C. striatum*, and CDC group 12 and group F2 coryneforms belong to the species *Corynebacterium amycolatum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 653-657.
45. Oteo, J., Aracil, B., Alós, J. I. & Gómez-Garcés, J. L. (2000). Bacteriemias significativas por *Corynebacterium amycolatum*: un patógeno emergente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **19**, 103-106.
46. Granok, A. B., Benjamin, P. & Garrett, L. S. (2002). *Corynebacterium minutissimum* bacteremia in an immunocompetent host with cellulitis. *Clinical Infectious Diseases* **35**, 40-42.
47. Funke, G., Lawson, P. A. & Collins, M. D. (1998). *Corynebacterium riegelii* sp. nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 624-627.

48. Yassin, A. F., Steiner, U. & Ludwing, W. (2002). *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1001-1005.
49. Auzias, A., Bollet, C., Ayari, R., Drancourt, M. & Raoult, D. (2003). *Corynebacterium freneyi* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 2777-2778.
50. Funke, G., Pascual Ramos, C. & Collins, M. D. (1997). *Corynebacterium coyleae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 92-96.
51. Ahmed, K., Kawakami, K., Watanabe, K., Mitsushima, H., Nagatake, T. & Matsumoto, K. (1995). *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen. *Clinical Infectious Diseases* **20**, 41-46.
52. Itoh, N., Yoshida, K. & Okada, K. (1996). Isolation and identification of styrene-degrading *Corynebacterium* strains, and their styrene metabolism. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**, 1826-1830.
53. Andersson, A. M., Weiss, N., Rainey, F. & Salkinoja-Salonen, M. S. (1999). Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 622-634.
54. Watts, J. L. & Rossbach, S. (2000). Susceptibilities of *Corynebacterium bovis* and *Corynebacterium amycolatum* isolates from bovine mammary glands to 15 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 3476-3477.
55. Vela, A. I., Gracia, E., Fernández, A., Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J. F. (2006). Isolation of *Corynebacterium xerosis* from animal clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 2242-2243.
56. Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S. & Wernars, K. (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2284-2291.

57. Soriano, F., Rodríguez-Tudela, J. L., Fernández-Roblas, R., Aguado, J. M. & Santamaría, M. (1988). Skin colonization by *Corynebacterium* groups D2 and JK in hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 1878-1880.
58. von Graevenitz, A., Punter-Streit, V., Riegel, P. & Funke, G. (1998). Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2087-2088.
59. Aguado, J. M., Ponte, C. & Soriano, F. (1987). Bacteriuria with multiply resistant species of *Corynebacterium* (*Corynebacterium* group D2): an unnoticed cause of urinary tract infection. *Journal of Infectious Diseases* **156**, 144-150.
60. Soriano, F., Ponte, C., Santamaría, M., Aguado, J. M., Wilhelmi, R., Vela, R., *et al.* (1985). *Corynebacterium* group D2 as a cause of alkaline-encrusted cystitis: report of four cases and characterization of the organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **21**, 788-792.
61. Elad, D., Aizenberg, I., Shamir, M., Soriano, F. & Shlomovitz, S. (1992). Isolation of *Corynebacterium* group D2 from two dogs with urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1167-1169.
62. Soriano, F., Ponte, C. & Galiano, M. J. (1993). Adherence of *Corynebacterium urealyticum* (CDC group D2) and *Corynebacterium jeikeium* to intravascular and urinary catheters. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **12**, 453-456.
63. Macedo, E. T., Lago, A., Duarte, K., Jung, L. S. & de Freitas, D. (2005). Superficial corneal foreign body: laboratory and epidemiologic aspects. *Arquivos brasileiros de oftalmologia* **68**, 821-823.
64. Mikucka, A., Gospodarek, E. & Bialek, M. (1997). Opportunistic infections with coryneform. *Medical Science Monitor* **3**, 154-157.
65. Bailiff, N. L., Westropp, J. L., Jang, S. S. & Ling, G. V. (2005). *Corynebacterium urealyticum* urinary tract infection in dogs and cats: 7 cases (1996-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **226**, 1676-1680.
66. Puskar, M., Lemons, C., Papich, M. G., Vaden, S. L. & Birkenheuer, A. (2007). Antibiotic-resistant *Corynebacterium jeikeium* urinary tract infection in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* **43**, 61-64.

67. Hemsley, C., Abraham, S. & Rowland-Jones, S. (1999). *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*--a skin pathogen. *Clinical Infectious Diseases* **29**, 938-939.
68. Berger, S. A., Gorea, A., Stadler, J., Dan, M. & Zilberman, M. (1984). Recurrent breast abscesses caused by *Corynebacterium minutissimum*. *Journal of Clinical Microbiology* **20**, 1219-1220.
69. Saavedra, J., Rodríguez, J. N., Fernández-Jurado, A., Vega, M. D., Pascual, L. & Prados, D. (1996). A necrotic soft-tissue lesion due to *Corynebacterium urealyticum* in a neutropenic child. *Clinical Infectious Diseases* **22**, 851-852.
70. Dykhuizen, R. S., Douglas, G., Weir, J. & Gould, I. M. (1995). *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*: multiple abscess formation in brain and liver. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **27**, 637-639.
71. Knox, K. L. & Holmes, A. H. (2002). Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerging Infectious Diseases* **8**, 97-99.
72. Ojeda-Vargas, M., González-Fernández, M. A., Romero, D., Cedres, A. & Monzón-Moreno, C. (2000). Pericarditis caused by *Corynebacterium urealyticum*. *Clinical Microbiology and Infection* **6**, 560-561.
73. Chomarat, M., Breton, P. & Dubost, J. (1991). Osteomyelitis due to *Corynebacterium* group D2. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **10**, 43.
74. Meria, P., Margaryan, M., Haddad, E., Dore, B. & Lottmann, H. B. (2004). Encrusted cystitis and pyelitis in children: an unusual condition with potentially severe consequences. *The Journal of Urology* **64**, 569-573.
75. Giannakopoulos, S., Alivizatos, G., Deliviliotis, C., Skolarikos, A., Kastriotis, J. & Sofras, F. (2001). Encrusted cystitis and pyelitis. *European Urology* **39**, 446-448.
76. Soriano, F., Aguado, J. M., Ponte, C., Fernández-Roblas, R. & Rodríguez-Tudela, J. L. (1990). Urinary tract infection caused by *Corynebacterium* group D2. Report of 82 cases and review. *Reviews of Infectious Diseases* **12**, 1019-1034.

77. Walkden, D., Klugman, K. P., Vally, S. & Naidoo, P. (1993). Urinary tract infection with *Corynebacterium urealyticum* in South Africa. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **12**, 18-24.
78. Zapardiel, J., Nieto, E. & Soriano, F. (1997). Urinary tract infections caused by beta-lactam-sensitive *Corynebacterium urealyticum* strains. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **16**, 174-176.
79. de Arriba, J. J., Blanch, J. J., Mateos, F., Martínez-Alfaro, E. & Solera, J. (2002). *Corynebacterium striatum* first reported case of prosthetic valve endocarditis. *The Journal of Infection* **44**, 193.
80. Mashavi, M., Soifer, E., Harpaz, D. & Beigel, Y. (2006). First report of prosthetic mitral valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: successful medical treatment. Case report and literature review. *The Journal of infection* **52**, 139-141.
81. Notario, R., Borda, N. & Gambande, T. (1996). Prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium urealyticum*. *Medicina* **56**, 57-58.
82. Markowitz, S. M. & Coudron, P. E. (1990). Native valve endocarditis caused by an organism resembling *Corynebacterium striatum*. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 8-10.
83. Rufael, D. W. & Cohn, S. E. (1994). Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: case report and review. *Clinical Infectious Diseases* **19**, 1054-1061.
84. Stoddart, B., Sandoe, J. A. & Denton, M. (2005). *Corynebacterium striatum* endocarditis masquerading as connective tissue disorders. *Rheumatology* **44**, 557-558.
85. Herschorn, B. J. & Brucker, A. J. (1985). Embolic retinopathy due to *Corynebacterium minutissimum* endocarditis. *British Journal of Ophthalmology* **69**, 29-31.
86. Krish, G., Beaver, W., Sarubbi, F. & Verghese, A. (1989). *Corynebacterium xerosis* as a cause of vertebral osteomyelitis. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 2869-2870.
87. Boc, S. F. & Martone, J. D. (1995). Osteomyelitis caused by *Corynebacterium jeikeium*. *Journal of the American Podiatric Medical Association* **85**, 338-339.
88. Weller, T. M., Smith, P. M. & Crook, D. W. (1994). *Corynebacterium jeikeium* osteomyelitis following total hip joint replacement. *The Journal of Infection* **29**, 113-114.

89. Creagh, R., Saavedra, J. M., Rodríguez, F. J., Rodríguez, P. & Merino, M. D. (2000). Neumonía por *Corynebacterium striatum* en un paciente con sida. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **18**, 297-298.
90. Freeman, J. D., Smith, H. J., Haines, H. G. & Hellyar, A. G. (1994). Seven patients with respiratory infections due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Pathology* **26**, 311-314.
91. Manzella, J. P., Kellogg, J. A. & Parsey, K. S. (1995). *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. *Clinical Infectious Diseases* **20**, 37-40.
92. Wallet, F., Marquette, C. H. & Courcol, R. J. (1994). Multiresistant *Corynebacterium xerosis* as a cause of pneumonia in a patient with acute leukemia. *Clinical Infectious Diseases* **18**, 845-846.
93. Funke, G., Lawson, P. A., Bernard, K. A. & Collins, M. D. (1996). Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1124-1128.
94. Renom, F., Garau, M., Rubí, M., Ramis, F., Galmés, A. & Soriano, J. B. (2007). Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 2064-2067.
95. Soriano, F. & Fernández-Roblas, R. (1988). Infections caused by antibiotic-resistant *Corynebacterium* group D2. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **7**, 337-341.
96. Soriano, F., Ponte, C., Santamaría, M. & Fernández-Roblas, R. (1987). Struvite crystal formation by *Corynebacterium* group D2 in human urine and its prevention by acetohydroxamic acid. *European Urology* **13**, 271-273.
97. Soriano, F., Ponte, C., Santamaría, M., Castilla, C. & Fernández-Roblas, R. (1986). *In vitro* and *in vivo* study of stone formation by *Corynebacterium* group D2 (*Corynebacterium urealyticum*). *Journal of Clinical Microbiology* **23**, 691-694.
98. Marty, N., Agueda, L., Lapchine, L., Clave, D., Henry-Ferry, S. & Chabanon, G. (1991). Adherence and hemagglutination of *Corynebacterium* group D2. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **10**, 20-24.

99. Domínguez-Gil, B., Herrero, J. C., Carreño, A., Morales, E., Andres, A., Aguado, J. M., *et al.* (1999). Ureteral stenosis secondary to encrustation by urea-splitting *Corynebacterium urealyticum* in a kidney transplant patient. *Nephrology Dialysis Transplantation* **14**, 977-978.
100. Penta, M., Fioriti, D., Chinazzi, A., Pietropaolo, V., Conte, M. P., Schippa, S., *et al.* (2006). Encrusted cystitis in an immunocompromised patient: possible coinfection by *Corynebacterium urealyticum* and *E. coli*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **19**, 241-244.
101. Hertig, A., Duvic, C., Chretien, Y., Jungers, P., Grünfeld, J. P. & Rieu, P. (2000). Encrusted pyelitis of native kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 1138-1140.
102. García Bravo, M., Aguado, J. M., Morales, J. M., Hayek, M., Díaz González, R., Gimeno Fernández, C., *et al.* (1995). *Corynebacterium urealyticum* en pacientes con trasplante renal. *Medicina Clínica* **104**, 561-564.
103. Muñoz, J. L., Nebreda, T. & García-Rodríguez, J. A. (1994). Desarrollo de un medio selectivo diferencial para el aislamiento de *Corynebacterium urealyticum* (group D-2). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **12**, 246-250.
104. García-Bravo, M., Aguado, J. M., Morales, J. M. & Noriega, A. R. (1997). Efficacy of a selective and differential medium for isolating *Corynebacterium urealyticum* from urine specimens. *Clinical Microbiology and Infection* **3**, 555-558.
105. Zapardiel, J., Nieto, E. & Soriano, F. (1998). Evaluation of a new selective medium for the isolation of *Corynebacterium urealyticum*. *Journal of Medical Microbiology* **47**, 79-83.
106. Martín, M. C., Melón, O., Celada, M. M., Álvarez, J., Méndez, F. J. & Vázquez, F. (2003). Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. *Journal of Medical Microbiology* **52**, 599-602.
107. Fernández-Natal, I., Guerra, J., Alcoba, M., Cachón, F. & Soriano, F. (2001). Bacteremia caused by multiply resistant *Corynebacterium urealyticum*: six case reports and review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **20**, 514-517.

108. Berner, R., Pelz, K., Wilhelm, C., Funke, A., Leititis, J. U. & Brandis, M. (1997). Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 1011-1012.
109. Weiss, K., Labbé, A. C. & Laverdière, M. (1996). *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *Clinical Infectious Diseases* **23**, 1246-1248.
110. Simonet, M., De Briel, D., Boucot, I., Minck, R. & Veron, M. (1993). Coryneform bacteria isolated from middle ear fluid. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 1667-1668.
111. Ortiz de la Tabla, V., Martín, C. & Martínez, C. (2000). Conjuntivitis por *Corynebacterium macginleyi*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **18**, 481-482.
112. Coudron, P. E., Harris, R. C., Vaughan, M. G. & Dalton, H. P. (1985). Two similar but atypical strains of coryneform group A-4 isolated from patients with endophthalmitis. *Journal of Clinical Microbiology* **22**, 475-477.
113. Scholle, D. (2007). A spontaneous joint infection with *Corynebacterium striatum*. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 656-658.
114. Pierard, D., Lauwers, S., Mouton, M. C., Sennesael, J. & Verbeelen, D. (1983). Group JK *Corynebacterium* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Journal of Clinical Microbiology* **18**, 1011-1014.
115. Szeto, C. C., Chow, K. M., Chung, K. Y., Kwan, B. C., Leung, C. B. & Li, P. K. (2005). The clinical course of peritoneal dialysis-related peritonitis caused by *Corynebacterium* species. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* **20**, 2793-2796.
116. Funke, G., Pünter, V. & von Gravenitz, A. (1996). Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2874-2878.
117. Soriano, F., Zapardiel, J. & Nieto, E. (1995). Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 208-214.

118. Soriano, F., Fernández-Roblas, R., Calvo, R. & García-Calvo, G. (1998). *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultative non-spore-forming gram positive bacilli to HMR 3647 (RU 66647) and 14 other antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 1028-1033.
119. Gómez-Garcés, J. L., Alós, J. I. & Tamayo, J. (2007). *In vitro* activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **29**, 688-692.
120. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Bernard, K. & Suárez, A. I. (1996). Antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium striatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2671-2672.
121. Fernández-Roblas, R., Prieto, S., Santamaría, M., Ponte, C. & Soriano, F. (1987). Activity of nine antimicrobial agents against *Corynebacterium* group D2 strains isolated from clinical specimens and skin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 821-822.
122. Sánchez Hernández, J., Mora Peris, B., Yagüe Guirao, G., Gutiérrez Zufiaurre, N., Muñoz Bellido, J. L., Segovia Hernández, M., *et al.* (2003). *In vitro* activity of newer antibiotics against *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium amycolatum* and *Corynebacterium urealyticum*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**, 492-496.
123. Martínez-Martínez, L., Suárez, A. I., Ortega, M. C. & Perea, E. J. (1994). Comparative *in vitro* activities of new quinolones against coryneform bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 1439-1441.
124. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Suárez, A. I. & Perea, E. J. (1999). *In-vitro* activity of levofloxacin, ofloxacin and D-ofloxacin against coryneform bacteria and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**, 27-32.
125. Martínez-Martínez, L., Joyanes, P., Suárez, A. I. & Perea, E. J. (2001). Activities of gemifloxacin and five other antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* and coryneform bacteria isolated from clinical samples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 2390-2392.
126. Goldstein, E. J., Citron, D. M., Merriam, Y. C., Warren, Y. A., Tyrrel, K. L. & Fernández, H. T. (2004). *In vitro* activities of the new semisynthetic glycopeptide telavancin (TD-6424),

- vancomycin, daptomycin, linezolid, and four comparator agents against anaerobic gram-positive species and *Corynebacterium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 2149-2152.
127. Goldstein, E. J., Citron, D. M., Merriam, Y. C., Warren, Y. A., Tyrrel, K. L. & Fernández, H. T. (2003). *In vitro* activities of daptomycin, vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and five other antimicrobials against 307 gram-positive anaerobic and 31 *Corynebacterium* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 337-341.
128. Claeys, G., Vanhouteghem, H., Riegel, P., Wauters, G., Hamerlynck, R., Dierick, J., *et al.* (1996). Endocarditis of native aortic and mitral valves due to *Corynebacterium accolens*: report of a case and application of phenotypic and genotypic techniques for identification. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1290-1292.
129. Malanoski, G. J., Parker, R. & Eliopoulos, G. M. (1992). Antimicrobial susceptibilities of a *Corynebacterium* CDC group II strain isolated from a patient with endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 1329-1331.
130. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Suárez, A. I. & Perea, E. J. (1998). *In vitro* activities of ketolide HMR 3647, macrolides, and clindamycin against coryneform bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 3290-3292.
131. Fernández-Roblas, R., Calvo, R., Esteban, J., Bryskier, A. & Soriano, F. (1999). The bactericidal activities of HMR 3004, HMR 3647 and erythromycin against gram-positive bacilli and development of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**, 285-289.
132. Dupuis, M. & Leclercq, R. (2006). Activity of a new oral streptogramin, XRP2868, against gram-positive cocci harboring various mechanisms of resistance to streptogramins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 237-242.
133. Weiss, K., Laverdière, M. & Rivest, R. (1996). Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 930-933.
134. Martínez-Martínez, L., Ortega, M. C. & Suárez, A. I. (1995). Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1318-1321.

135. Sevillano, D., Alou, L. & Prieto, J. (2006). Macrólidos y cetólidos. *In: Antimicrobianos en medicina*, 2ª edn. (García Rodríguez, J. A., García Sánchez, J. E., Gobernado, M., Picazo, J. J. & Prieto, J., Eds), pp. 199-218. Sociedad Española de Quimioterapia, Barcelona.
136. Kapusnik-Uner, J. E., Sande, M. E. & Chambers, H. F. (1996). Fármacos antimicrobianos: tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y diversos antibacterianos. *In: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 9ª edn. (Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W. & Goodman Gilman, A., Eds), pp. 1193-1224. McGraw-Hill Interamericana, México, D.F.
137. Lagrou, K., Peetermans, W. E., Jorissen, M., Verhaegen, J., Van Damme, J. & Van Eldere, J. (2000). Subinhibitory concentrations of erythromycin reduce pneumococcal adherence to respiratory epithelial cells in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**, 717-723.
138. Mizukane, R., Hirakata, Y., Kaku, M., Ishii, Y., Furuya, N., Ishida, K., *et al.* (1994). Comparative *in vitro* exoenzyme-suppressing activities of azithromycin and other macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 528-533.
139. Pukhalsky, A. L., Shmarina, G. V., Kapranov, N. I., Kokarovtseva, S. N., Pukhalskaya, D. & Kashirskaja, N. J. (2004). Anti-inflammatory and immunomodulating effects of clarithromycin in patients with cystic fibrosis lung disease. *Mediators of Inflammation* **13**, 111-117.
140. Schultz, M. J. (2004). Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 21-28.
141. Mensa, J., García-Vázquez, E. & Vila, J. (2003). Macrólidos, cetólidos y estreptograminas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **21**, 200-208.
142. de la Rosa Fraile, M., Martínez-Brocal Burgos, A. & Navarro Marí, J. M. (2006). Lincosamidas y estreptograminas. *In: Antimicrobianos en medicina*, 2ª edn. (García Rodríguez, J. A., García Sánchez, J. E., Gobernado, M., Picazo, J. J. & Prieto, J., Eds), pp. 219-225. Sociedad Española de Quimioterapia, Barcelona.

143. Cocito, C., Di Giambattista, M., Nyssen, E. & Vannuffel, P. (1997). Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**, 7-13.
144. Nakajima, Y. (1999). Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy* **5**, 61-74.
145. García-Bravo, M., Aguado, J. M., Morales, J. M. & Noriega, A. R. (1996). Influence of external factors in resistance of *Corynebacterium urealyticum* to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 497-499.
146. Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J. & Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2823-2830.
147. Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 577-585.
148. Gonzalez, J. J., Andreu, A. & Spanish Group for the Study of Perinatal Infection from the Spanish Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. (2005). Multicenter study of the mechanisms of resistance and clonal relationships of *Streptococcus agalactiae* isolates resistant to macrolides, lincosamides, and ketolides in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 2525-2527.
149. Hamilton-Miller, J. M. & Shah, S. (2000). Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**, 941-949.
150. Levin, T. P., Suh, B., Axelrod, P., Truant, A. L. & Fekete, T. (2005). Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 1222-1224.
151. Min, Y. H., Jeong, J. H., Choi, Y. J., Yun, H. J., Lee, K. J., Shim, M. J., *et al.* (2003). Heterogeneity of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 3415-3420.

152. Davis, K. A., Crawford, S. A., Fiebelkorn, K. R. & Jorgensen, J. H. (2005). Induction of telithromycin resistance by erythromycin in isolates of macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 3059-3061.
153. Aktas, Z., Aridogan, A., Kayacan, C. B. & Aydin, D. (2007). Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *The Journal of Microbiology* **45**, 286-290.
154. Morosini, M. I., Cantón, R., Loza, E., Negri, M. C., Galán, J. C., Almaraz, F., *et al.* (2001). *In vitro* activity of telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 2427-2431.
155. Yi, Y. H., Choi, J. H., Lee, H. K., Lee, K. J., Bae, S. M., Yu, J. Y., *et al.* (2006). Characterization of erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Korea. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **59**, 192-194.
156. Seppälä, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M. C. & Huovinen, P. (1998). A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 257-262.
157. Rosato, A. E., Lee, B. S. & Nash, K. A. (2001). Inducible macrolide resistance in *Corynebacterium jeikeium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1982-1989.
158. Yagüe, G., Mora, B., Martínez-Toldos, M. C., Rodríguez, T., Valero, P. L. & Segovia, M. (2005). Implicación de los genes *ermX* en la resistencia a los macrólidos y la telitromicina de *Corynebacterium jeikeium* y *Corynebacterium amycolatum*. *Revista Española de Quimioterapia* **18**, 236-242.
159. Jost, B. H., Field, A. C., Trinh, H. T., Songer, J. G. & Billington, S. J. (2003). Tylosin resistance in *Arcanobacterium pyogenes* is encoded by an *erm X* determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 3519-3524.
160. Vester, B. & Douthwaite, S. (2001). Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1-12.

161. Canu, A., Malbruny, B., Coquemont, M., Davies, T. A., Appelbaum, P. C. & Leclercq, R. (2002). Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 125-131.
162. Tait-kamradt, A., Davies, T. A., Cronan, M., Jacobs, M. R., Appelbaum, P. C. & Sutcliffe, J. (2000). Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2118-2125.
163. Farrel, D. J., Shackcloth, J., Barbadora, K. A. & Green, M. D. (2006). *Streptococcus pyogenes* isolates with high-level macrolide resistance and reduced susceptibility to telithromycin associated with 23S rRNA mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 817-818.
164. Hisanaga, T., Hoban, D. J. & Zhanes, G. G. (2005). Mechanisms of resistance to telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**, 447-450.
165. Davies, T. A., Bush, K., Sham, D. & Evangelista, A. (2005). Predominance of 23S rRNA mutants among non-*erm*, non-*mef* macrolide-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in the United States in 1999-2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 3031-3033.
166. Tait-kamradt, A., Davies, T. A., Appelbaum, P. C., Depardieu, F., Courvalin, P., Petitpas, J., *et al.* (2000). Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 3395-3401.
167. Ojo, K. K., Striplin, M. J., Ulep, C. C., Close, N. S., Zittle, J., Luis, H., *et al.* (2006). *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 1089-1091.
168. Alós, J. I., Aracil, B., Oteo, J., Gómez-Garcés, J. L. & Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting (IAP-SEIMC). (2003). Significant increase in the prevalence

- of erythromycin-resistant, clindamycin- and miocamycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 333-337.
169. Monaco, M., Camilli, R., D'Ambrosio, F., Del Grosso, M. & Pantosti, A. (2005). Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**, 256-259.
170. Cerdá Zolezzi, P., Millán Laplana, L., Rubio Calvo, C., Goñi Cepero, P., Canales Erazo, M. & Gómez-Lus, R. (2004). Molecular basis of resistance to macrolides and other antibiotics in commensal viridans group *Streptococci* and *Gemella* spp. and transfer of resistance genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3462-3467.
171. Klaassen, C. H. & Mouton, J. W. (2005). Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between *mef(A)* and *mef(E)*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 1271-1278.
172. Daly, M. M., Doktor, S. Z., Flamm, R. K. & Shortridge, V. D. (2004). Characterization and prevalence of MefA, MefE, and the associated *msr(D)* gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 3570-3574.
173. O'Hara, K. & Yamamoto, K. (1996). Reaction of roxithromycin and clarithromycin with macrolide-inactivating enzymes from highly erythromycin-resistant *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 1036-1038.
174. Schiller, J., Groman, N. & Coyle, M. (1980). Plasmids in *Corynebacterium diphtheriae* and diphtheroids mediating erythromycin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**, 814-821.
175. Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J. & Thierbach, G. (2003). Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *Journal of Biotechnology* **104**, 27-40.
176. Liebl, W., Kloos, W. E. & Ludwig, W. (2002). Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus*. *Microbiology* **148**, 2479-2487.

177. Luna, V. A., Coates, P., Eady, E. A., Cove, J. H., Nguyen, T. T. & Roberts, M. C. (1999). A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**, 19-25.
178. Ross, J. I., Eady, E. A., Carnegie, E. & Cove, J. H. (2002). Detection of transposon Tn5432-mediated macrolide-lincosamine-streptogramin B (MLS_B) resistance in cutaneous propionibacteria from six european cities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 237-242.
179. Santagati, M., Iannelli, F., Oggioni, M. R., Stefani, S. & Pozzi, G. (2000). Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2585-2587.
180. González, G., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H. & Domínguez, M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile* **132**, 619-626.
181. Sabaté, M. & Prats, G. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **20**, 341-345.
182. Krech, T. & Hollis, D. G. (1991). *Corynebacterium* and related organisms. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 5th edn. (Ballows, A., Hausler, J. W. J., Herrmann, K. L., Isenberg, H. D. & Shadomy, H. J., Eds), pp. 277-286. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
183. Claridge, J. E. & Spiegel, C. A. (1995). *Corynebacterium* and miscellaneous irregular gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 6th edn. (Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. & Tenover, R. H., Eds), pp. 357-378. ASM Press, Washington, D.C.
184. Funke, G. & Bernard, K. A. (1999). Coryneform gram-positive rods. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edn. (Murray, P. R., Baron, E., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. & Tenover, R. H., Eds), pp. 319-345. ASM Press, Washington, D.C.
185. Soriano Garcia, F., Rodríguez-Tudela, J. L., Fernández-Roblas, R., Aguado, J. M. & Santamaría, M. (1988). Skin Colonization by *Corynebacterium* Groups D2 and JK in Hospitalized Patients. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 1878-1880.

186. MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas de catalasa y peroxidasa. In: *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, 3ª edn. (MacFaddin, J. F., Ed), pp. 73-91. Editorial Médica Panamericana, S.A., Buenos Aires.
187. (2003). Sistema de identificación de bacterias corineformes. bio Mérieux, Inc.
188. CLSI. (2006). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
189. CLSI. (2007). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
190. Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-kamradt, A., Wondrack, L. & Grebe, T. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2562-2566.
191. Tauch, A., Krief, S., Kalinowski, J. & Pühler, A. (2000). The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. *Molecular and General Genetics* **263**, 1-11.
192. UltraClean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit™. Instruction Manual. MO BIO Laboratories, Inc.
193. Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). Appendix 2. Media. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd edn. (Sambrook, J. & Russel, D. W., Eds), pp. A2.1-A2.12. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
194. Wondrack, L., Massa, M., Yang, V. & Sutcliffe, J. (1996). Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 992-998.
195. Hardy, D. J., Hensey, D. M., Beyer, J. M., Vojtko, C., McDonald, E. J. & Fernandes, P. B. (1988). Comparative *in vitro* activities of new 14-, 15-, and 16-membered macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**, 1710-1719.

196. Rantala, M., Huikko, S., Houvinen, P., Jalava, J. & Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. (2005). Prevalence and molecular genetics of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Finland in 2002. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* **49**, 4180-4184.
197. Uh, Y., Jang, I. H., Hwang, G. Y., Lee, M. K., Yoon, K. J. & Kim, H. Y. (2004). Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of beta-hemolytic *streptococci* in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 2716-2718.
198. Tamayo, J., Pérez-Trallero, E., Gómez-Garcés, J. L., Alós, J. I. & Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. (2005). Resistance to macrolides, clindamycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolated in Spain during 2004. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**, 780-782.
199. Granizo, J. J., Aguilar, L., Casal, J., García-Rey, D., Dal-Ré, R. & Baquero, F. (2000). *Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and beta-lactam consumption in Spain (1978-1997). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**, 767-773.
200. Granizo, J. J., Aguilar, L., Casal, J., Dal-Ré, R. & Baquero, F. (2000). *Streptococcus pyogenes* resistance to erythromycin in relation to macrolide consumption in Spain (1986-1997). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**, 959-964.
201. Kataja, J., Huovinen, P., Skurnik, M., Seppälä, H. & The Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. (1999). Erythromycin resistance genes in group A *streptococci* in Finland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 48-52.
202. Reinert, R. R. & Al-Lahham, A. (2005). Time-kill study of the activity of telithromycin against macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates with 23S rRNA mutations and changes in ribosomal proteins L4 and L22. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 3011-3013.
203. Douthwaite, S., Jalava, J. & Jakobsen, L. (2005). Ketolide resistance in *Streptococcus pyogenes* correlates with the degree of rRNA dimethylation by Erm. *Molecular Microbiology* **58**, 613-622.

204. Liu, M. & Douthwaite, S. (2002). Activity of the ketolide telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1629-1633.
205. Wolter, N., Smith, A. M., Farrell, D. J., Northwood, J. B., Douthwaite, S. & Klugman, K. P. (2008). Telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* is conferred by a deletion in the leader sequence of *erm(B)* that increases rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 435-440.
206. Fitoussi, F., Loukil, C., Gros, I., Clermont, O., Mariani, P., Bonacorsi, S., *et al.* (2001). Mechanisms of macrolide resistance in clinical group B *Streptococci* isolated in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1889-1891.
207. Jäger, W., Kalinowski, J. & Pühler, A. (1997). A *Corynebacterium glutamicum* gene conferring multidrug resistance in the heterologous host *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**, 2449-2451.
208. Roberts, M. C., Leonard, R. B., Briselden, A., Schoenknecht, F. D. & Coyle, M. B. (1992). Characterization of antibiotic-resistant *Corynebacterium striatum* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **30**, 463-474.
209. van Hoek, A. H., Mayrhofer, S., Domig, K. J. & Aarts, H. J. (2008). Resistance determinant *erm(X)* is borne by transposon Tn5432 in *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **31**, 544-548.

FE DE ERRATAS

Donde se dice:

Se quiere decir:

Pag. 64	...un total de 32 correspondiendo 13 a la especie <i>C. coyleae</i>un total de 31 correspondiendo 12 a la especie <i>C. coyleae</i>
Pag. 68	Tabla 18. El número de genes detectados en la columna de Ninguno para <i>C. amycolatum</i> es 7.	Tabla 18. El número de genes detectados en la columna de Ninguno para <i>C. amycolatum</i> es 1.