

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Microbiología II



**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS  
[BETA]-LACTÁMICOS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS  
DE “SALMONELLA TYPHIMURIUM”**

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

María Luisa Güerri Santos

Bajo la dirección del Doctor:

Rafael Rotger Anglada

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-2031-5**

# ÍNDICE

---

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b><u>EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA</u></b>	
1. ALGUNOS DATOS HISTÓRICOS	2
2. FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL AUMENTO DE LA RESISTENCIA	3
2.1. La automedicación	3
2.2. La prescripción innecesaria	3
2.3. Uso de antibióticos en países en vías de desarrollo	4
2.4. El uso veterinario de antibióticos	5
2.5. El uso en agricultura	7
3. APARICIÓN DE LA RESISTENCIA Y PROPAGACIÓN DE LA MISMA	8
3.1. Intercambio genético entre bacterias	10
3.1.1. Transformación	10
3.1.2. Transducción	10
3.1.3. Conjugación	11
3.2. Elementos móviles de DNA	12
3.2.1. Transposones	12
3.2.2. Integrones	12
4. PAPEL DE LOS INTEGRONES EN LA PROPAGACIÓN DE LA RESISTENCIA EN <i>Salmonella spp.</i>	16
<b><u>EL MICROORGANISMO</u></b>	
1. INTRODUCCIÓN	22
2. DESCRIPCIÓN	22
3. CLASIFICACIÓN	22
4. METODOS DE TIPIFICACIÓN DE <i>Salmonella</i>	24
4.1. Serotipificación	24
4.2. Fagotipificación	25
4.3. Polimorfismo de fragmentos de restricción (PFGE)	26

	Índice
5. EPIDEMIOLOGÍA	27
6. CLÍNICA	28
7. TRATAMIENTO	30
8. $\beta$ -LACTÁMICOS Y $\beta$ -LACTAMASAS	31
8.1. Clasificación y nomenclatura	31
8.2. $\beta$ -lactamasas en <i>Salmonella</i>	33
8.3. Resistencia a inhibidores de $\beta$ -lactamasas (IRT)	34
8.4. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	37
9. EMERGENCIA DE CEPAS MULTIRRESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS (MDR)	42
9.1. <i>S. typhimurium</i> DT 104	42
9.2. <i>S. typhimurium</i> U302	44
9.3. Otros fagotipos de <i>S. typhimurium</i>	45
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
1. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS RESISTENCIAS EN LA ÚLTIMA DÉCADA	49
1.1. Paciente	49
1.1.1. Edades	49
1.1.2. Sexo	49
1.1.3. Distribución por servicios	50
1.2. Muestra	51
1.3. Aislado	52
1.3.1. Serogrupos	52
1.3.2. Antibióticos	53
2. RESULTADOS DEL ESTUDIO GENÉTICO	57
2.1. Conjugación	57
2.2. Búsqueda de $\beta$ -lactamasas tipo TEM	59

---

2.3. Búsqueda de $\beta$ -lactamasas tipo PSE	62
2.4. Búsqueda de integrones	64
2.4.1. Secuenciación de los amplicones obtenidos para la caracterización de los posibles integrones	66
2.4.1.1. Secuenciación del amplicón A	67
2.4.1.2. Secuenciación del amplicón B	68
2.4.1.3. Secuenciación del amplicón C	71
2.4.1.4. Secuenciación del amplicón de D	73
3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS CEPAS DEL ESTUDIO	75
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>82</b>
1. EVOLUCIÓN DE LAS RESISTENCIAS	83
1.1. Distribución de los aislados	83
1.1.1. Edad y Sexo	
1.1.2. Procedencia de las muestras	83
1.1.3. Infecciones extraintestinales por <i>Salmonella</i>	84
1.2. Datos correspondientes al aislado	85
1.2.1. Serogrupo	85
1.2.2. Resistencias a antibióticos	86
2. ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DE LA RESISTENCIA	90
3. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA	91
4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	95
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>VI. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>99</b>
1. ESTUDIO DE EVOLUCIÓN DE RESISTENCIAS	100
2. ESTUDIO MOLECULAR	101
2.1. Medios utilizados para el crecimiento de las cepas	101
2.2. Conjugación	102

---

2.2.1. Conjugación en medio sólido	103
2.2.2. Conjugación en medio líquido	103
2.3. Extracción y visualización del DNA	103
2.3.1. Extracción de DNA genómico de bacterias	103
2.3.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	105
2.3.3. Extracción del DNA plasmídico de <i>Salmonella</i>	106
2.4. Electroforesis en geles de agarosa	107
2.5. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa	108
2.6. Hibridación de membranas con sondas específicas	108
2.6.1. Transferencia de DNA de gel a membrana	108
2.6.2. Marcaje del DNA sonda para la hibridación	110
2.6.3. Hibridación de la membrana con sondas específicas	111
2.7. Tratamientos enzimáticos del DNA	114
2.7.1. Digestión con endonucleasas de restricción	115
2.7.2. Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	116
2.8. Cromatografía en columna de los productos de PCR	117
2.9. Secuenciación automática del DNA	117
2.9.1. Secuenciación de DNA plasmídico	117
2.9.2. Secuenciación de productos de PCR	118
2.9.2.1. Secuenciación de los amplicones A y B	118
2.9.2.2. Secuenciación del amplicón C	118
2.10. Soporte informático	119
3. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO	120
3.1. Serotipificación	120
3.2. Fagotipificación	120
3.3. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	121
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>125</b>



ANTICORPES

Apoptosis

AIC (Asociación Internacional de Contadores)

Comisión de Contadores

Oxígeno

Contabilidad

Grupos

Ni

Ni (Níquel)

Exposición

---

# ABREVIATURAS

---

## ANTIBIÓTICOS

Ap: ampicilina

A/C: amoxicilina /clavulánico

Cm: cloranfenicol

Cx: Cefuroxima

Cz: Cefazolina

Ge: Gentamicina

Ni: nitrofurtantoína

Nx: ácido nalidíxico

Sm: estreptomina

Su: sulfamida

Tc: tetraciclina

Sxt : cotrimoxazol

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

nt: nucleótidos

# INTRODUCCIÓN

---

---

# EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA

## 1. ALGUNOS DATOS HISTÓRICOS

El descubrimiento de la penicilina en 1927 por Alexander Fleming marcó el principio de la era antibiótica. La aparición de este “medicamento milagroso”, como lo llamaban los científicos de la época, alentó a la comunidad investigadora que en pocos años descubrió numerosos antibióticos como la estreptomina, la tetraciclina y las quinolonas, seguidas más tarde por los primeros antituberculosos, antiparasitarios y antivíricos, para tratar las hasta entonces mortales infecciones. Todos estos descubrimientos hicieron pensar que era el principio del fin de las enfermedades infecciosas, aunque pronto comenzaron a surgir los primeros problemas:

- En 1940 se empezó a observar que los pacientes tuberculosos tratados con un solo fármaco recaían rápidamente debido a la aparición de resistencias al mismo. Se propuso entonces utilizar dos fármacos simultáneamente, creyendo que no era posible que ningún microorganismo fuera resistente a dos fármacos a la vez.
- En la década de los 50, *Staphylococcus aureus* pasó de un 80% de cepas sensibles (en 1950) a un 80% de cepas resistentes (en 1959), por producción de  $\beta$ -lactamasas. En esta misma década se describen las primeras resistencias de los microorganismos gram-negativos, especialmente enterobacterias, a la estreptomina.
- En 1960 una amplia población de meningococos se hace resistente a sulfamidas; los microorganismos gram-negativos adquieren resistencia a la kanamicina y se describe por primera vez en Australia la aparición de neumococos resistentes a la penicilina.
- En 1970 la resistencia de los microorganismos gram-negativos se extiende a la gentamicina y *Haemophilus influenzae* desarrolla resistencia a ampicilina, probablemente por adquisición de  $\beta$ -lactamasas de las enterobacterias.
- En 1980 los neumococos resistentes a penicilina llegan a África y España y los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) comienzan a suponer un grave problema en los hospitales.

- En 1990 los neumococos resistentes a penicilina son habituales en un gran número de países y aparecen cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Se detectan enterococos con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos y vancomicina; aparecen los primeros estafilococos con resistencia moderada a la vancomicina y las micobacterias multirresistentes se hacen comunes en algunos grupos de población.
- Hoy día el arsenal terapéutico contra las enfermedades infecciosas es de más de 150 compuestos, pero la fármaco-resistencia es tan importante que hay microorganismos resistentes a cualquier antibiótico o combinación de antibióticos que podamos utilizar.

## **2. FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL AUMENTO DE LA RESISTENCIA**

Aunque la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural, se convierte en un problema significativo para la salud pública cuando se ve exacerbado por el abuso y el mal empleo de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades humanas, así como su uso indiscriminado en la ganadería o la agricultura.

Analizamos los principales factores relacionados con el mal uso de los antibióticos que contribuyen al aumento de resistencias de los microorganismos.

### **2.1. LA AUTOMEDICACIÓN**

En muchos países la automedicación está a la orden del día y cualquier persona puede acceder a los antibióticos y tomarlos cuándo y cómo considere oportuno; en la mayoría de las ocasiones cuando no es necesario y cuando lo es, durante un periodo insuficiente.

Este hecho contribuye de forma directa a la selección de microorganismos resistentes que serán los responsables de la infección en posteriores ocasiones.

### **2.2. LA PRESCRIPCIÓN INNECESARIA**

Hay muchos estudios sobre la prescripción innecesaria de antibióticos, fundamentalmente para tratamiento de diarrea aguda infantil (Bojalil y Calva, 1994) e infecciones respiratorias de vías altas (Reyes *et al.*, 1997). En un análisis de 10 estudios emprendidos en hospitales docentes de todo el mundo, los investigadores concluyeron que entre un 40% y un 91% de los antibióticos prescritos eran inapropiados.

### 2.3. USO DE ANTIBIÓTICOS EN LOS PAISES EN VIAS DE DESARROLLO

Por paradójico que parezca, la escasez de antibióticos en los países en vías de desarrollo contribuye de forma importantísima a la aparición y desarrollo de resistencias y varios son los motivos que contribuyen a ello:

- ✓ Los antibióticos están solo al alcance de unos pocos que pueden pagarlos, por lo que la mayor parte de los enfermos acuden a productos falsificados. Un estudio realizado por la OMS entre 1992 y 1994 constata que en el 51% de los casos de falsificación no se halló ningún principio activo, un 17% contenía ingredientes erróneos, un 11% contenía el principio activo en concentraciones inferiores a las terapéuticas, y sólo un 4% contenía la cantidad y calidad apropiadas. El 90% de los casos de falsificación tuvieron lugar en países en vías de desarrollo. (Lee *et al.*, 1991; Land, 1992; Alubo, 1994; Couper, 1997).
- ✓ Otro gran problema es el mal cumplimiento del tratamiento motivado en ocasiones por el alto coste de los antibióticos (Lansang *et al.*, 1990) y en ocasiones por la precariedad de las infraestructuras que dificultan el acceso a los mismos (Strang, 1996).
- ✓ Las malas condiciones de almacenamiento y conservación de los antibióticos hace que se degraden y pierdan actividad terapéutica (Taylor *et al.*, 1995; Shakoor *et al.*, 1997).

En lugar de exterminar completamente la infección, los medicamentos sólo eliminan los microorganismos más sensibles y dejan a sus homólogos resistentes, que se replicarán y propagarán los genes de resistencia a otras bacterias.

En un estudio realizado en el año 2001 por el Instituto Nacional de Salud Pública Finlandés para detectar cepas con sensibilidad disminuída a ciprofloxacino, el 40% de las cepas recibidas, procedían de pacientes que habían viajado al extranjero en el mes previo a sufrir la infección (Asia, Tailandia, España....) y eran estos pacientes precisamente en los que se aislaron las cepas con mayores tasas de resistencia a este grupo de antibióticos (Hakanen *et al.*, 2001). Estos datos sólo confirman que el problema de las resistencias ha de plantearse globalmente; una cepa multirresistente puede dar la vuelta al mundo en pocos días gracias a los modernos medios de transporte con los que contamos hoy en día.

A pesar de la multitud de comunicaciones que han denunciado durante años este problema, el último boletín informativo de la OMS (2002; 80:126-133) denuncia que el problema

de las resistencias continúa sin ser tratado eficazmente. Es especialmente importante en dos microorganismos: *S. aureus* y *Salmonella spp.*, y señala la importancia de una respuesta global en la que la coordinación internacional es clave para controlar el problema y el estímulo de la investigación hacia el desarrollo de nuevos fármacos, la alternativa para encontrar tratamientos eficaces.

## 2.4. EL USO VETERINARIO

Según una estimación realizada por Pérez-Gorricho y Baquero (1999) el consumo veterinario en España en 1994 fue de 240 toneladas y ese mismo año se dedicaron al consumo humano 365 toneladas. Sólo el consumo de quinolonas y macrólidos en veterinaria en 1996 en nuestro país supuso 1.695 y 1.452 millones de pesetas respectivamente (Díez y Calderón, 1997)

Según datos de la OMS, la mitad de la producción mundial de antibióticos se destina al uso veterinario, para el tratamiento de animales enfermos, como **promotores de crecimiento del ganado** o para eliminar organismos destructores de productos agrarios.

La utilización de antibióticos como promotores del crecimiento se hace en cantidades muy inferiores a las utilizadas en profilaxis o tratamiento. El antibiótico se mezcla con el agua o el pienso del animal y consigue debilitar el efecto barrera ejercido por la flora intestinal, dando lugar a una mayor absorción de nutrientes y aumentando el ritmo de crecimiento. En esta situación el uso de antibióticos se hace más necesario ya que los animales están más expuestos a las infecciones al no ser capaces de desarrollar, en tan poco tiempo, un sistema inmunitario eficaz.

Este hecho se remonta a principios de la década de los 50, cuando se descubrió que pequeñas dosis de tetraciclina mejoraban el crecimiento del ganado (Stockstad y Jukes, 1950). A finales de la década de los 60 surgieron las primeras voces de alerta sobre el incremento de resistencias al cloranfenicol en *Salmonella* y la posible implicación del consumo de antibióticos como promotores de crecimiento en la aparición de aislados clínicos resistentes.

Señalamos a continuación distintas consecuencias que puede tener el uso de antibióticos animales:

- **La selección de bacterias resistentes**, que no sólo pueden infectar al hombre sino también causarle enfermedad. A menudo bacterias inocuas para el ganado son mortales para el ser humano. Un brote de salmonelosis en Dinamarca en 1998 por

cepas de *Salmonella typhimurium* multirresistente originó una grave enfermedad en 25 personas 5 de las cuales perdieron la vida; un grupo de epidemiólogos detectó la cepa en carne de cerdo y se logró localizar la piara resultante del brote y así contenerlo.

- No hay que olvidar tampoco el hecho de que bacterias de origen agrícola o animal puedan transmitir los determinantes de resistencia a otras bacterias del entorno a través de la cadena alimentaria o por las excretas de los animales (Wall *et al.*, 1996).
- También hay que considerar que estas dosis subinhibitorias de antibiótico, pasan directamente al hombre a través de la cadena alimentaria, seleccionando así microorganismos resistentes entre la propia flora endógena del individuo, por no hablar de los problemas de alergias a los antibióticos en los consumidores que esto conlleva.

Desde la aparición de las primeras resistencias cruzadas entre cepas de origen animal y humano, y especialmente desde la sugerencia de que el uso de avoparcina como aditivo alimentario en el pienso fue la causa de la resistencia a la vancomicina en enterococos aislados de muestras clínicas, se ha propuesto la total eliminación de antibióticos como promotores de crecimiento (Bogaard y Stobberingh, 1996; Howarth y Poulter, 1996) aunque la contribución directa del uso de antibióticos en animales a la resistencia de cepas clínicas es muy cuestionada (Pidcock, 1996; Van den Bogaard, 1997).

En el caso de *Salmonella* resistente a antibióticos se ha demostrado claramente su paso desde los animales al hombre y el desarrollo posterior de infecciones (Holmberg *et al.*, 1984; Heisig *et al.*, 1995).

Hoy en día muchos de los antibióticos usados en veterinaria están prohibidos para su uso como promotores de crecimiento (el cloranfenicol se prohibió en 1994) y sólo unos pocos antibióticos están permitidos con este fin en la Comunidad Europea y son regularmente evaluados por el SCAN (comisión científica de nutrición veterinaria); para estos antibióticos, la CEE establece unos límites máximos de residuos (LMR) antibióticos que puede contener un alimento (reglamento 2377/1990). Esto implica que los antibióticos pueden utilizarse pero deben haberse eliminado en su mayor parte antes de que el alimento sea distribuido para el consumo. También se indican los periodos de supresión o tiempo en que los animales no deben recibir antibióticos antes del sacrificio.

La alarma social creada por la implicación del uso de antibióticos en animales en la aparición de cepas resistentes en muestras de origen humano ha provocado distintas reacciones; recientemente Rusia ha comunicado su rechazo a la importación de pollos procedentes de EEUU por la presencia de residuos de antibióticos en su carne a lo que gran parte de los productores de este país han respondido paralizando el uso de quinolonas para el tratamiento de animales enfermos (Lipsitch, 2002).

Es importante señalar que la resistencia a ciertos antibióticos es más crítica que a otros y uno de los antibióticos que está causando mayor preocupación entre los científicos es el grupo de las quinolonas tan usado en veterinaria (enrofloxacino). La resistencia a estos antibióticos es altamente indeseable dado la gran eficacia de los mismos para el tratamiento de algunas enfermedades graves producidas por microorganismos multiresistentes y aunque no esté del todo demostrada su implicación en la aparición de cepas multiresistentes en humanos, es evidente que influye de forma considerable, por lo que se deben tomar medidas a este nivel para maximizar el beneficio terapéutico de este grupo de antibióticos y minimizar la amenaza de la resistencia. Países como Japón sólo permiten el uso de quinolonas en animales, cuando éste sea el único tratamiento de elección, siempre bajo la supervisión de un veterinario y durante un tiempo máximo de cinco días (Nakamura, 1995). La alerta creada ante el gran aumento de cepas con sensibilidad disminuída a quinolonas a mediados de los 90's, empujó a la OMS a convocar una reunión especial sobre el impacto en salud humana del uso de quinolonas en animales de renta (OMS, 1998).

El uso de antibióticos en animales contribuye a la adquisición de resistencia fundamentalmente en bacterias transmitidas por alimentos como *Campylobacter jejuni*, *E.coli* y *Salmonella* y no debemos olvidar que las infecciones de origen alimentario más frecuentes en nuestro país son las causadas por *Salmonella* muy por encima del resto de microorganismos.

Por último mencionar que el uso de antibióticos en acuicultura en Asia está contribuyendo a la emergencia y diseminación de cepas resistentes; ya se han aislado cepas de *Salmonella paratyphi B* que contienen los genes de resistencia *tetG* y *flor* en peces de Singapur (Angulo y Griffin, 2000).

## **2.5.EL USO EN AGRICULTURA**

Aunque menos importante también hay que señalar el uso de antibióticos en agricultura.

- Biswas y Mukherji, describieron en 1985 que la penicilina puede tener un efecto sobre el metabolismo de las plantas superiores y mostraron que un aporte externo de penicilina aumentaba la formación de clorofila en las semillas de arroz y su desarrollo posterior.
- Otro aspecto del uso de antibióticos en la agricultura es su posible aplicación en la preservación de los alimentos. Los antibióticos más utilizados con este fin son la nistatina, la clortetraciclina y la oxitetraciclina (Fennema, 1996) aunque estas aplicaciones, afortunadamente, se han desarrollado muy poco. Entre otros motivos por el elevado coste que ello supone y el temor a que su uso lleve a un incremento en el desarrollo de genes de resistencias.
- Y por último comentar que algunas plantas utilizadas en la alimentación pueden estar genéticamente modificadas, y que como recientemente ha ocurrido con un maíz elaborado por Ciba Geigy, pueden contener como marcador un gen de resistencia. La SCAN ha recomendado que se utilicen marcadores diferentes a genes de resistencia antibiótica en estas manipulaciones genéticas.

### **3. APARICIÓN DE LA RESISTENCIA Y PROPAGACIÓN DE LA MISMA**

Es muy popular la hipótesis de que los primeros genes de resistencia aparecieron en las bacterias productoras de antibióticos que necesitaron desarrollar mecanismos que las hicieran resistentes a los antibióticos que ellas mismas sintetizaban (Davies, 1992). Varios datos apoyan esta teoría, como el hecho de que los genes implicados en la síntesis de antibióticos se encuentren en la misma región que los genes que confieren resistencia, como demuestran en su estudio (Martín y Liras, 1989). También se ha observado una alta homología entre las enzimas inactivantes de aminoglucósidos presentes en *Actinomycetos* (productores de este antibiótico) y las halladas en distintas bacterias que muestran resistencia a los mismos; lo mismo ocurre con las  $\beta$ -lactamasas de *Nocardia lactamdurans* aisladas en diversos microorganismos resistentes a los  $\beta$ -lactámicos). Otro dato a favor de esta hipótesis es el publicado por algunas productoras de antibióticos que han detectado material genético, en concreto genes de resistencia, contaminando los antibióticos que producen y plantean que ésta sea una de las fuentes de propagación de la resistencia (Webb y Davies, 1998).

Los principales mecanismos por los que un microorganismo es resistente a un antibiótico se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Alteración de la diana, (considerando la diana como el lugar específico del microorganismo con el que interactúa el antibiótico) de forma que el antibiótico no la reconozca o hiperproducción de la misma, de manera que no hay antibiótico suficiente para inactivarla totalmente.
- Disminución del antibiótico en el lugar de acción: impidiendo que este llegue a interactuar con la diana, bien por dificultar la entrada (alterando la permeabilidad celular) o bien por propiciar la salida (mediante bombas de expulsión activa).
- Inactivación el antibiótico: Mediante la producción de enzimas, como las  $\beta$ -lactamasas que se unen al  $\beta$ -lactámico impidiendo que este realice su función.
- Desarrollo de vías metabólicas alternativas que suplen la diana inhibida por el antibiótico permitiendo al microorganismo vivir con normalidad.
- Otra posibilidad es la aparición de mutaciones espontáneas que permiten a los microorganismos que las sufren, resistir la acción del antibiótico y transmitir esta propiedad a otras bacterias. Las mutaciones pueden producirse incluso en ausencia del antibiótico y éste lo único que hace es seleccionar los mutantes resistentes. Normalmente el antibiótico no influye en la aparición de resistencias salvo algunos grupos como las quinolonas, cuya capacidad mutágena incrementa la tasa de mutación en la bacteria por encima del valor normal  $10^{-6}$ , pero algunos investigadores postulan la hipótesis del “fenotipo mutador” que defiende que la presencia de antibiótico en el medio provoca en la bacteria un estado de estrés que la hace más susceptible de sufrir estas mutaciones (Taddei *et al.*, 1997). Además la presencia de antibiótico en el medio no sólo selecciona cepas resistentes o facilita la variación genética, también puede facilitar los mecanismos de conjugación, transposición o recombinación; a su vez el proceso de transferencia (que implica hebra sencilla de DNA) puede por sí solo incrementar la tasa de mutación.

## PROPAGACIÓN DE LA RESISTENCIA

Una vez que la bacteria es resistente al antibiótico es capaz de transmitir su resistencia de **forma vertical** a su descendencia o de **forma horizontal** a otras bacterias que pueden ser de distinta especie e incluso género mediante la transferencia del material genético que codifica esa resistencia. Esta última es la forma más común de transmisión de resistencias. Hay

estudios que demuestran la transferencia de plásmidos interespecie *in vivo*, como el trabajo de Marchandin y colaboradores en (1999), que describen la transferencia de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica entre cuatro enterobacterias diferentes aisladas de un mismo paciente ingresado en un hospital y sometido a presión antibiótica.

### 3.1. INTERCAMBIO GENÉTICO ENTRE BACTERIAS

- Existen tres formas de intercambio genético entre bacterias:

#### 3.1.1. TRANSFORMACIÓN:

El DNA es adquirido directamente del medio ambiente a partir de una bacteria que ha liberado su material genético al exterior y es recogido por la bacteria receptora. Una vez dentro de la bacteria el DNA podrá mantenerse como tal cuando se trate de un elemento autónomo, o bien integrarse en el genoma del huésped por recombinación. Este proceso sigue el siguiente orden:

DNA en el ambiente → Inducción del “estado de competencia” en la células → Interacción células-DNA → Entrada del DNA y procesamiento del mismo en el interior celular → Integración y expresión del DNA en las células.

Para que este proceso tenga lugar, es necesario que las células sean **competentes**, entendiendo el estado de competencia como aquel en el que las bacterias permiten que el DNA se una a su superficie favoreciendo la adquisición de nuevos genes. De la existencia de proteínas de membrana que permitan su incorporación al interior celular depende la eficiencia de la transformación .

#### 3.1.2. TRANSDUCCIÓN:

Un bacteriófago interviene en el proceso transfiriendo los genes de resistencia entre bacterias compatibles. En la transducción el DNA está protegido del medio ambiente pudiendo sobrevivir largos periodos de tiempo. Es el método más restringido y específico, ya que el rango del huésped, es determinado por la interacción entre el bacteriófago y el receptor bacteriano. Clínicamente, sólo tiene importancia en la transmisión de genes de resistencia de cocos gram-positivos, fundamentalmente *S. aureus*.

#### 3.1.3. CONJUGACIÓN:

La conjugación es la vía principal de diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas. Éste es el mecanismo de intercambio de genes más importante entre las bacterias gram-negativas. Para que se produzca es imprescindible que las bacterias estén en contacto directo entre sí y por lo tanto es muy frecuente que ocurra entre bacterias que comparten nicho biológico, como ocurre con las enterobacterias en el intestino. En los microorganismos gram-negativos participa en el proceso un "pilus conjugativo" a través del cual se produce el intercambio de material genético. En los microorganismos gram-positivos el proceso no parece estar relacionado con la presencia de "pili conjugativo" (Clewell, 1990). En este caso juega un papel primordial la producción de feromonas por la célula receptora. Estas feromonas son pequeños péptidos que inducen la formación de adhesinas en las células donadoras responsables del contacto entre ambas.

Ésta es la forma más probable por la que *Salmonella* spp. haya adquirido algunas  $\beta$ -lactamasas tipo TEM, tan frecuentemente halladas en plásmidos conjugativos de cepas de *E.coli* aisladas en el intestino de hombres y animales (Balis *et al.*, 1996; Platt *et al.*, 1984), como resultado del intercambio genético entre ambos microorganismos.

La conjugación permite la transferencia de plásmido entre distintos géneros bacterianos (Heinemann, 1991) incluso algunos muy alejados filogenéticamente, algo que no ocurre con la transformación y la transducción. No obstante las bacterias gram-positivas tienen más facilidad para transferir su material genético y es mucho más frecuente encontrar genes de resistencia a antibióticos específicos de microorganismos gram-positivos en gram-negativos que el caso contrario (Brisson-Nöel *et al.*, 1998)

**La conjugación está mediada por plásmidos;** Los plásmidos, son moléculas autorreplicables de DNA. Los genes que contienen no son imprescindibles para la supervivencia de la bacteria pero les confieren ventajas evolutivas; éste es el caso de los genes de resistencia. Pero no todos los plásmidos son conjugativos. Para que un plásmido sea conjugativo debe llevar además un conjunto de genes (*tra*) que son los responsables de que se produzca la conjugación de la bacteria que los hospeda, con la receptora. Los transconjugantes obtenidos adquieren las propiedades de la bacteria donadora.

## 3.2. ELEMENTOS MÓVILES DE MATERIAL GENÉTICO.

El descubrimiento de los plásmidos en la década de los 70 supuso una revolución en el concepto de intercambio genético entre bacterias. Este concepto se amplió una década más tarde con la descripción de los primeros transposones y más recientemente, la presencia de integrones en numerosas bacterias justifica la grandísima diseminación de genes de resistencia que hemos observado en los últimos años.

### 3.2.1. TRANSPOSONES

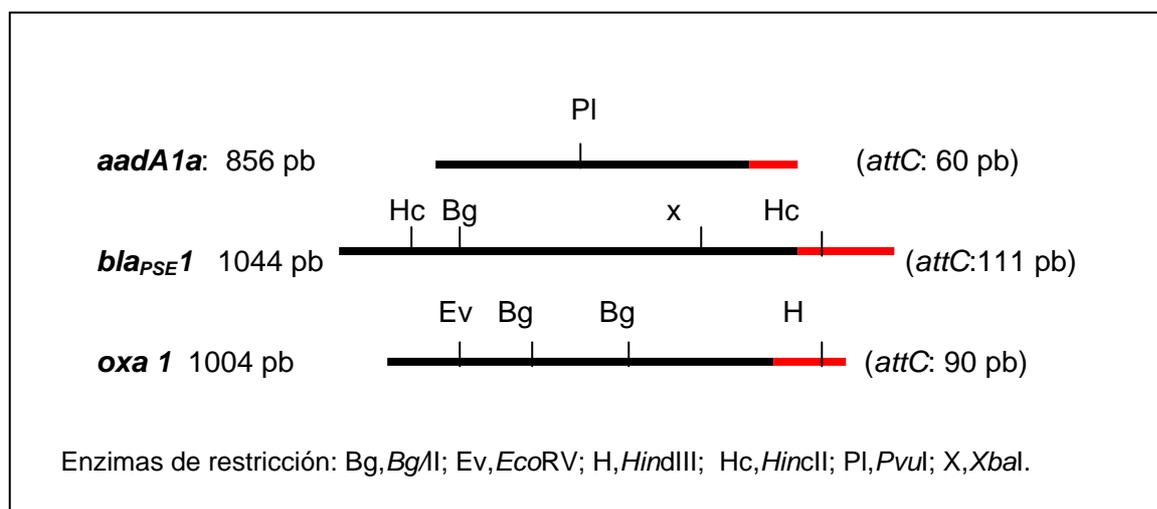
Los transposones, son elementos genéticos móviles, capaces de insertarse en distintos lugares dentro del cromosoma bacteriano y “saltar” a otras localizaciones, incluyendo plásmidos o DNA de bacteriófagos. Hay transposones conjugativos, capaces de promover la conjugación aunque deben insertarse en el cromosoma o en un plásmido porque no son autorreplicativos. Analizando las funciones de recombinación del transposón Tn21 se observaron una clase de recombinantes sitio-específicos distintos de los producidos por la transposasa e independientes de ésta y de los extremos invertidos del transposón. El estudio detallado de estos recombinantes y de las secuencias requeridas para su obtención, revelaron la presencia de un elemento independiente, más tarde denominado **integrón**.

### 3.2.2. INTEGRONES

Se define el integrón como un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio-específico se acumula una combinación de genes. Aunque los genes estructurales presentes en los integrones son mayoritariamente genes de resistencia, también es posible la integración de otro tipo de genes que probablemente no se observan con tanta frecuencia, porque no existe la presión selectiva necesaria para ponerlos de manifiesto. La ubicuidad de los integrones es tal, que no sólo se han descrito en plásmidos y cromosomas de distintos géneros de enterobacterias sino también en microorganismos gram-positivos e incluso micobacterias. Su papel en la transmisión horizontal de resistencias cobra mayor importancia recientemente con el descubrimiento de los superintegrone (SI) (Rowe-Magnus y Mazel, 2001). Dos características diferencian los SI de los integrone tradicionales de resistencia (RIs): el gran número de cassettes que contienen (en *Vibrio cholerae* se han descrito más de 150) y la homología observada entre los sitios *attC* de esos cassettes. Se han identificado SI entre los miembros de la familia *Vibrionaceae* (Mazel y Dychinco *et al.*, 1998) y algunas especies relacionadas como *Xanthomonas* y *Pseudomonas*.

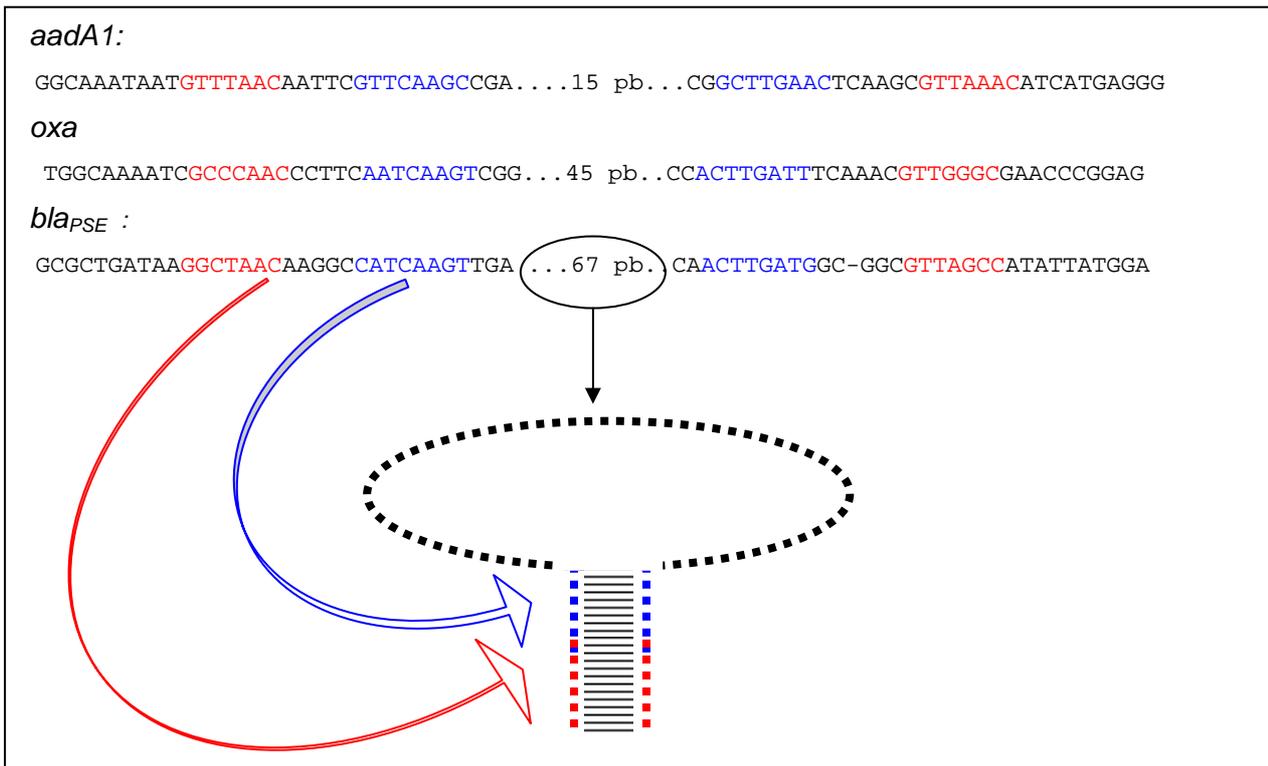
Para la actividad de los integrones se requiere un gen que codifica una recombinasa sitio-específica conocida como **integrasa**, localizada en la región constante 5'CS. Esta región se transcribe de derecha a izquierda y en ella se encuentran **dos promotores divergentes** que controlan la transcripción del gen de la integrasa y la de los genes estructurales situados a su derecha. En la actualidad se habla de cuatro tipos de integrones que se distinguen por la integrasa que codifican. La función de la integrasa es catalizar la recombinación entre dos secuencias cortas de DNA que pueden ser de dos clases *attI* y *attC*.

Los sitios ***attC*** o **59 be** se localizan en la región central variable, entre los genes estructurales, y su longitud oscila entre 57 y 141 pb (Figura I.1).



**Figura I.1:** Se muestra la estructura linealizada de algunos cassetes de genes que se han descrito formando parte de integrones; Se detalla el tamaño del gen y el del sitio *attC* correspondiente así como las enzimas de restricción específicas.

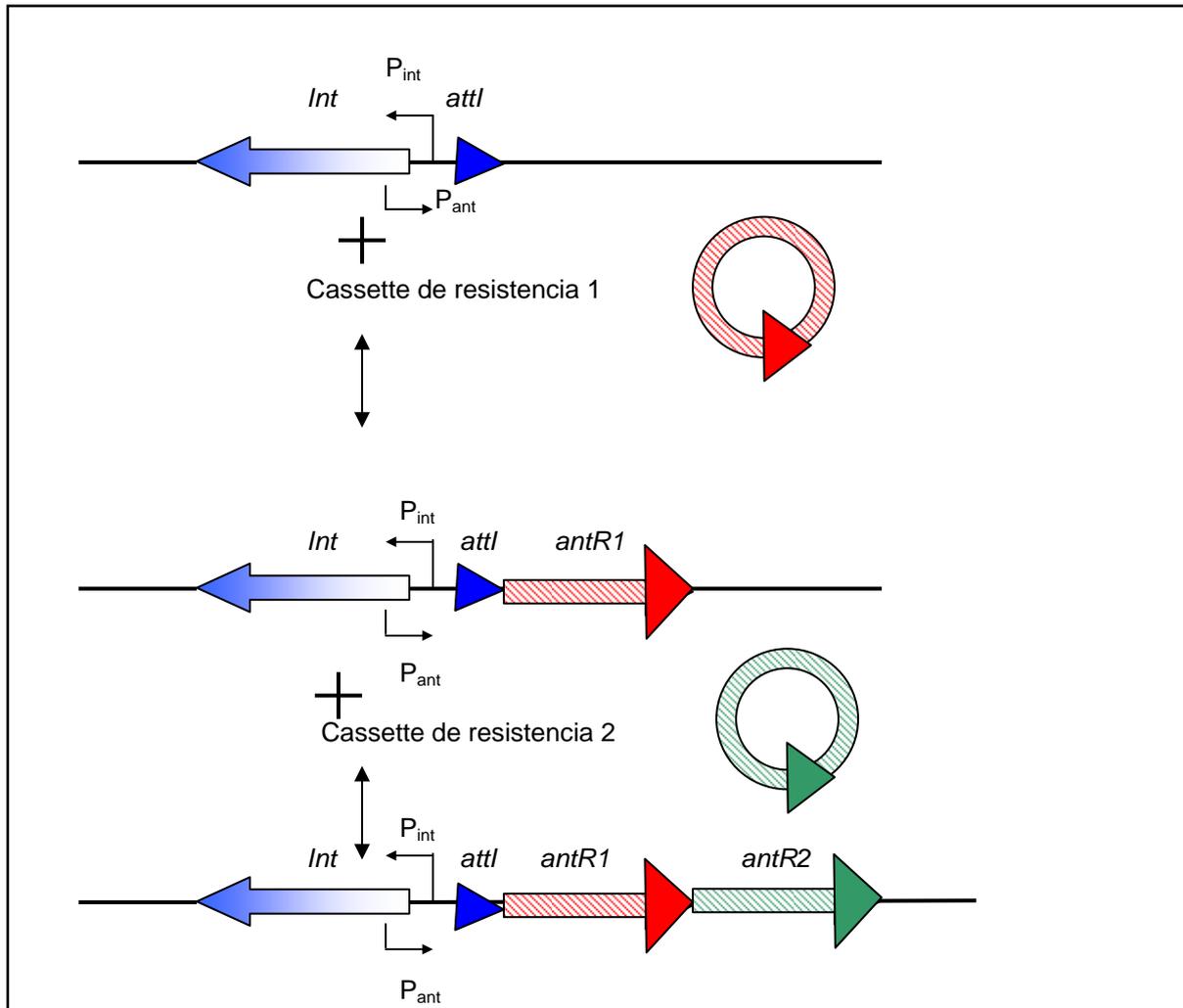
Su secuencia es muy distinta en cada caso y sólo muestran alguna constancia en los extremos; lo que siempre ocurre es que poseen agrupaciones de 7 pb que se repiten en un mismo sitio *attC* orientados inversamente y formando un palíndromo imperfecto. Esta estructura les permite adoptar formas tipo horquilla (Figura I.2) cuando están en forma de DNA de cadena sencilla o cruciformes cuando se localizan en DNA superenrollado (Stokes *et al.*, 1997).



**Figura I.2:** Estructura de las secuencias *attC* de tres cassettes diferentes donde se puede observar la peculiaridad palindrómica de su secuencia y la estructura de horquilla resultante como resultado de la unión entre los oligonucleótidos homólogos marcados en color.

**El sitio *attC*** se localiza al lado 5' del gen de la integrasa y marca la separación entre la región conservada 5' y la región variable. Su secuencia es prácticamente la misma en todos los integrones.

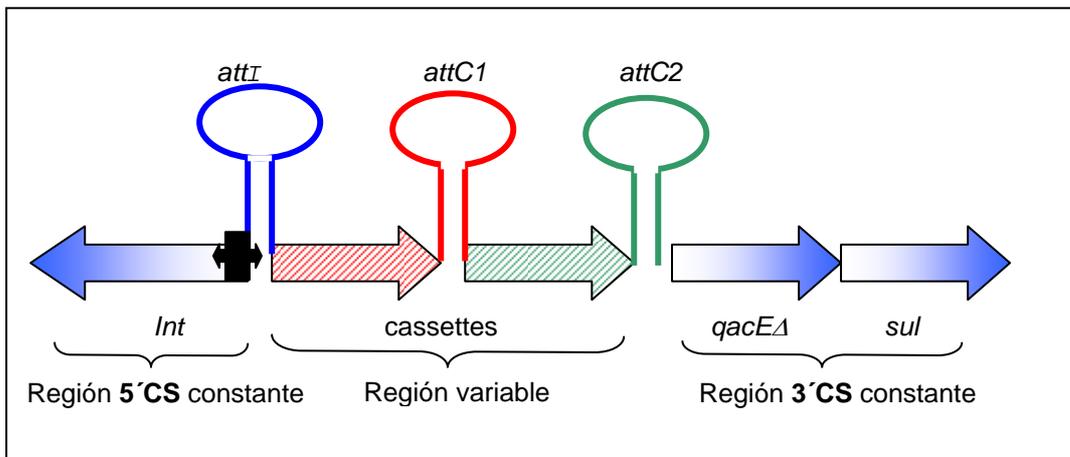
En la **región central variable** se pueden integrar uno o varios genes estructurales. Éstos pueden escindirse y formar círculos covalentemente cerrados, autónomos pero no replicativos, que se denominan **cassettes de resistencia** y constan de un gen de resistencia y un sitio *attC* y son el elemento móvil del sistema (Hall y Stokes, 1993). Se han caracterizado más de 70 cassettes de resistencia diferentes (Mazel y Davies, 1999), la mayoría de ellos con un sitio *attC* único. Su sitio *attC* los convierte en sustratos de la integrasa y facilita su inclusión en los distintos integrones (Recchia y Hall, 1995). La organización de los genes en la región variable de los integrones sugiere un mecanismo general para la formación de operones. La acción del integrón coloca genes sucesivos bajo el control de un mismo promotor separados por sitios *attC* como ilustra la figura I.3.



**Figura I.3:** Proceso mediante el cual se incorporan los distintos genes de resistencia circularizados (cassettes) en el integrón, bajo la acción de los promotor  $P_{ant}$  y  $P_{int}$ . *Int*: integrasa,  $P_{ant}$  y  $P_{int}$ : promotores, *antR 1* y *2*: genes de resistencia a antibióticos.

A continuación de la región variable se encuentra una **región constante 3'CS** en la que se encuentra un locus de resistencia la bromuro de etidio (*qacEΔ*), el gen que codifica resistencia a sulfamidas (*sul1*) y otros marcos abiertos de lectura que contienen genes cuya función no es del todo conocida (Figura I.4).

**Los integrones de clase 1** son los más frecuentemente aislados de muestras clínicas (Sallen *et al.*, 1995) y su integrasa es una proteína de 337 aa y 38 KDa cuyo prototipo es la integrasa del fago  $\lambda$ . La señal de identidad de esta familia se localiza en el extremo carboxi terminal de la proteína donde aparece la tríada H-R-H y tienen en común la presencia del gen *sul* (Roy, 1999).



**Figura I.4:** Estructura básica de un integrón. La región variable consta de uno o varios cassettes con los distintos genes de resistencia. La caja negra con doble flecha corresponde a la zona donde se sitúan los dos promotores divergentes. En la parte superior aparece la estructura y ubicación de los correspondientes sitios *attC*.

#### 4. PAPEL DE LOS INTEGRONES EN LA PROPAGACIÓN DE LA RESISTENCIA EN *Salmonella*

En las distintas especies del género *Salmonella* pero fundamentalmente en *S. typhimurium* se han hallado integrones de clase 1 portando múltiples combinaciones de cassettes con distintos genes de resistencia.

Aunque normalmente la localización de estos integrones es cromosómica, también se ha descrito su localización en plásmidos conjugativos y no conjugativos. Las cepas donde se han localizado estos integrones son tanto de origen humano como animal, e incluso se han descrito en microorganismos presentes en el agua o en alimentos (Natasi y Mammina, 2001). Los integrones descritos son de distintos tamaños, en función de los cassettes de resistencia que portan; también se han descrito integrones de un mismo tamaño cuya secuencia ha revelado diferencias en los cassettes de resistencia que contienen.

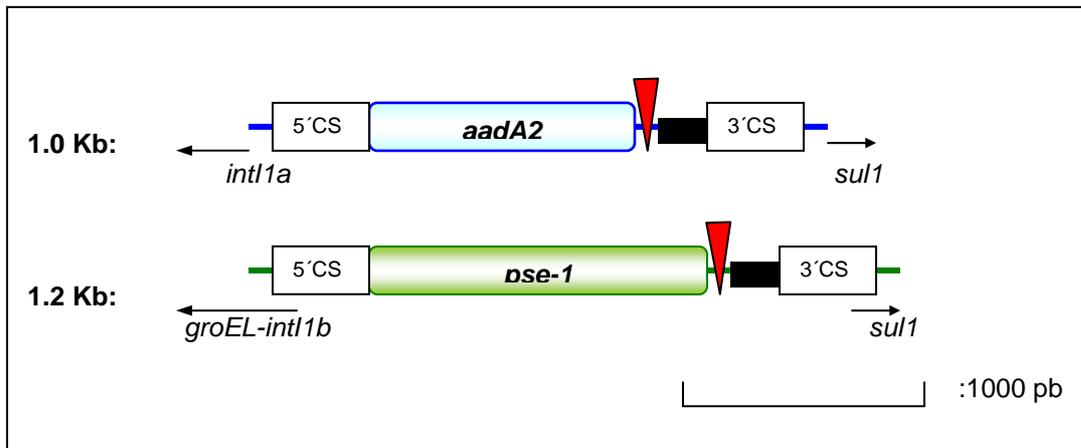
Mostramos en la tabla I.1., algunos de los integrones descritos en las distintas especies de *Salmonella*.

**Tabla I.1:** Características fenotípicas y genotípicas de las distintas especies de *Salmonella* en las que se han descrito distintos integrones de clase I y tamaño de los mismos.

Tamaño	Patrón de resistencias	Localización	Procedencia	Serotipo	Cita
2.0 Kb	ApCmSmSuTcTpGn	Plasmídica	Humana	<i>S. derby</i>	Natassi 2001
2.0 Kb	ApSmSuCmTc	Plasmídica	Humana	<i>S. typhimurium</i>	Sandvag 1998 Carattoli 2001 Tosini 1998
1.8 Kb	ApCmSmSuTcTp	Plasmídica	Animal	<i>S. saintpaul</i>	Natassi 2001
1.8 Kb	ApSuTcTp	Cromosómica	Agua	<i>S. anatum</i>	Natassi 2001
1.0 Kb	SmSuCmTp	Cromosómica	Humana	<i>S. typhimurium</i>	Sandvag 1998
1.0 Kb	CmSmSuTcTp	Plasmídica	Humana	<i>S. bradenburg</i>	Natassi 2001
1.0+1.2 Kb	ApCmSuSmTc	Cromosómica	Agua Humana Animal	<i>S. typhimurium</i>	Sandvag 1998

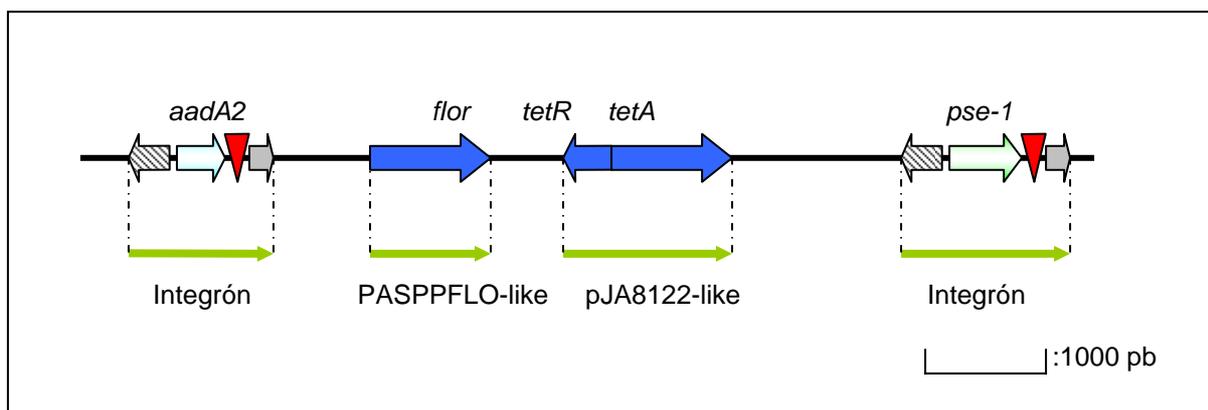
A pesar de la ubicuidad de los integrones en todas las especies de *Salmonella* hay algunos integrones que se observan con mucha más frecuencia en unos serotipos que en otros, como ocurre con la combinación característica del fagotipo DT 104 de *S. typhimurium* o el integrón de 2000 pb que contiene los genes *oxa1-aadA1* observado también con más frecuencia en este serotipo. De hecho aunque se han descrito integrones en casi todas las especies de *Salmonella* es sin duda *S. typhimurium* la especie que con más frecuencia integra este tipo de estructuras en su material genético.

Dentro de un mismo serotipo también la distribución de integrones es característica según el fagotipo del que se trate; un estudio realizado por Daly y Fanning (2000), demuestra que el 95% de las cepas de *S. typhimurium* en los que se detectó algún tipo de integrón pertenecían al fagotipo DT 104 y el perfil más observado fue el formado por dos integrones de 1.0 y 1.2 Kb respectivamente. En la figura I.5 se puede observar un esquema de los mismos.



**Figura I.5:** Estructura de los integrones de 1.0 y 1.2 Kb descritos en *S. typhimurium* DT 104. 5'CS y 3'CS representan las regiones conservadas del integrón. Las posiciones de la integrasa y el gen de resistencia a sulfamidas aparecen indicados con flechas. Los triángulos rojos representan los sitios *attC* y los cuadrados negros el gen *qacEΔ* que codifica resistencia al bromuro de etidio. En el interior de los casettes aparece el nombre del gen de resistencia que contienen.

Estos dos integrones tienen localización cromosómica y concretamente en un fragmento de 14 Kb perteneciente a la denominada isla genómica 1 (SGI1) de *S. typhimurium* (Boyd *et al.*, 2000). Esta región contiene, además de los integrones descritos anteriormente los genes que codifican resistencia a cloranfenicol y tetraciclina, y se organiza como ilustra la figura I.6.

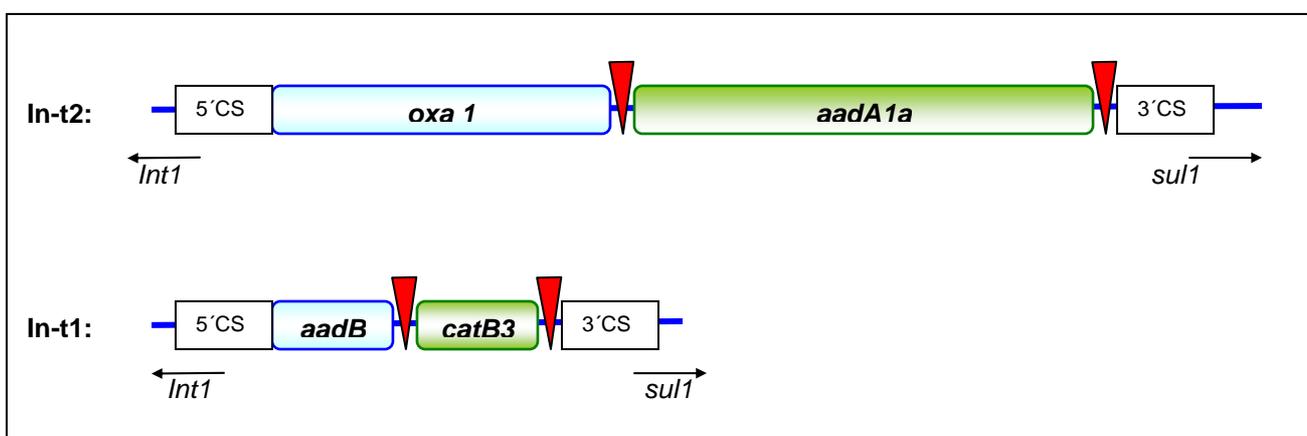


**Figura I.6:** Estructura de la zona de resistencia de la isla genómica I (SGI1) de *S. typhimurium* DT 104. Las flechas rayadas corresponden a las integrasas, las flechas grises a los genes que codifican resistencia a sulfamidas y los triángulos rojos a los sitios *attC*. En la parte superior de las flechas coloreadas se encuentra el nombre del gen que representan.

El fenotipo de las cepas multirresistentes de *S. typhimurium* DT 104 (ApCmStSuTc), se ha observado también en otros serotipos de *Salmonella*, pero hasta hace poco tiempo se pensó que la presencia de esta isla de resistencia era exclusiva de *S. typhimurium* y dentro de éste del fagotipo DT 104, como sugieren los estudios de PCR realizados por Briggs y Fratamico (1999), en los que con una reacción en cadena de la polimerasa consiguen amplificar un fragmento de 10 kb correspondiente a esta isla, únicamente en las cepas de *S. typhimurium* DT 104 y no en el resto de los serotipos a pesar de tener el mismo fenotipo de resistencia. Sin embargo recientes estudios han hallado esta isla en otros serotipos distintos a *S. typhimurium* como *S. agona* o *S. paratyphi B* (Meunier *et al.*, 2002). Se postula que el paso de esta isla entre los distintos serotipos de *Salmonella* sea consecuencia de la transmisión horizontal de esta región, en la que la transducción a través de un fago es la responsable de la recombinación homóloga que coloca a esta isla en la misma región del cromosoma en las tres especies.

La presencia de este fenotipo (ApCmStSuTc) en fagotipos distintos al DT 104 pero con idéntico perfil electroforético hace pensar, más que en una transmisión horizontal, en un cambio de fagotipo, que puede ser consecuencia de cambios en los receptores de la pared bacteriana que alteran la sensibilidad de la bacteria a los distintos fagos, lo que hace clasificar a las bacterias como pertenecientes a otros fagotipos como el DT 120 o el DT12 (Lawson *et al.*, 2002).

Y por último destacar la presencia de otro integrón detectado en algunas cepas de *S. typhimurium*, que es el denominado In-t2 por Carattoli *et al.*, (2001), entre otros (Figura I.7). Se trata de un integrón de 2000 pb que se localiza en el plásmido conjugativo de 140 Kb IncF1. Este integrón suele aparecer sólo en el plásmido o acompañado de otro integrón de menor tamaño denominado In-t1 (Figura I.7) que confiere resistencia a los aminoglucósidos gentamicina y tobramicina.



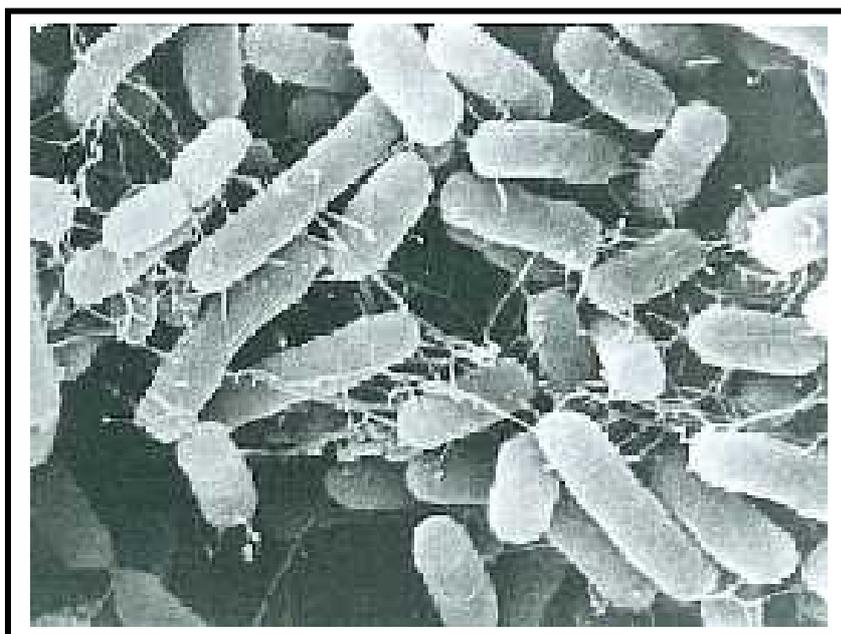
**Figura I.7:** Estructura de los integrones In-t1 e In-t2 descritos en *S. typhimurium*. 5'CS y 3'CS representan las regiones conservadas del integrón. Las posiciones de la integrasa y el gen de resistencia a sulfamidas aparecen indicados con flechas y los triángulos rojos representan los sitios *attC*. En el interior de los cassetes aparece el nombre del gen que contienen.

Como se puede observar en la figura anterior (Figura I.7.), la región variable del integrón In-t2 está compuesta por dos genes de resistencia: *oxa-1* y *aadA1a*; este último gen aparece con mucha frecuencia en integrones descritos en *Salmonella*, formando parte de distintos cassettes. Un trabajo realizado por Guerra *et al.*, (2000), que estudia integrones descritos en distintas especies de *Salmonella* recogidas durante la década 89-99 en nuestro país, describe seis perfiles electroforéticos diferentes que corresponden a distintos tipos de integrones. En cinco de ellos se encuentra el gen *aadA1a* formando distintas combinaciones: En catorce ocasiones aparece sólo, en una ocasión junto al gen *dfr/A14*, en dieciseis ocasiones junto al gen *dfr /A1*, en cinco ocasiones junto al gen *oxa-1* y en tres ocasiones junto al gen *sat1*.

En resumen dos grupos de factores son los responsables del gran aumento de la resistencia de los microorganismos a los distintos antibióticos en los últimos años:

- Factores externos entre los que destacamos el mal uso de los antibióticos tanto en el hombre como en los animales
- Factores intrínsecos al propio microorganismo que se ha adaptado rápidamente a sobrevivir en presencia del antibiótico, desarrollando distintos mecanismos de resistencia, que ha transmitido a otros microorganismos por distintas vías, entre las que destacamos la conjugación y la presencia de integrones.

## EL MICROORGANISMO



## 1. INTRODUCCIÓN

Fue en 1885 cuando Daniel E. Salmon, un veterinario cirujano estadounidense descubrió un microorganismo en el intestino de un cerdo que producía diarreas en el mismo. Lo denominó *Salmonella choleraesuis* en honor a su apellido y aludiendo al cuadro diarreico que producía en el animal. Esta nomenclatura aún se utiliza en la actualidad.

En 1960 Paul H. Black, uno de los pioneros en el estudio clínico de las infecciones por *Salmonella* vaticinó en un artículo en el New England lo siguiente: “la salmonelosis será un grave problema durante muchos años. Sólo cabe esperar que la predisposición de esta bacteria para recombinar y redistribuir su material genético fracase en la producción de un organismo de mayor virulencia, antes de que su capacidad evolutiva se haya agotado.....” Las predicciones de Paul Black se han cumplido 40 años después, y como consecuencia de esta capacidad de recombinación se conocen más de 2400 serotipos diferentes, algunos con gran virulencia y resistencia a múltiples antibióticos.

## 2. DESCRIPCIÓN

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las enterobacterias y sus características morfológicas y bioquímicas están detalladas en el manual Bergey. Son bacilos gram-negativos de un tamaño que oscila entre 0.7 x 2 y 1.5 x 5 micras, que se mueven por flagelos peritricos aunque también hay serotipos inmóviles.

Entre sus características bioquímicas destaca que la mayoría puede utilizar citrato como fuente de carbono, produce gas como consecuencia de la fermentación de glucosa (a excepción de algunos serotipos como *S. typhi*), no fermenta la lactosa, y reduce el sulfato del medio produciendo ácido sulfídrico lo que confiere a sus colonias el color negro característico si se encuentra en el medio apropiado. Este género presenta la mayor resistencia entre los miembros de su familia a las sales biliares y otros componentes químicos (verde brillante o selenito) lo que permite utilizar medios selectivos para su aislamiento.

## 3. CLASIFICACIÓN

La taxonomía de *Salmonella* ha sido revisada en múltiples ocasiones. El equipo de Le Minor realizó durante la década de los ochenta un amplio estudio taxonómico basado en la taxonomía numérica tradicional y en estudios de homología de DNA. Como consecuencia de

estos estudios y de las posteriores modificaciones de 1987 y 1989 se describen 2 especies, *Salmonella enterica* (Le Minor 1987) y *Salmonella bongori* (Reeves, 1989).

*S. enterica* se divide en 6 subespecies, en base a un pequeño número de reacciones bioquímicas (Le Minor, 1982; Le Minor 1986), que se denominan:

- Salmonella enterica* subespecie *enterica* (subespecie I)
- Salmonella enterica* subespecie *salamae* (subespecie II)
- Salmonella enterica* subespecie *arizonae* (subespecie IIIa)
- Salmonella enterica* subespecie *diarizonae* (subespecie IIIb)
- Salmonella enterica* subespecie *houtenae* (subespecie IV)
- Salmonella enterica* subespecie *indica* (subespecie VI)

El 99,8% de los aislados de origen humano pertenecen a serotipos de la subespecie *enterica*, por lo que en lo sucesivo nombraremos los serotipos como si se tratara de especies y así no diremos *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium, sino simplemente *Salmonella typhimurium*.

La identificación serológica de *Salmonella* se basa en la caracterización de sus antígenos somáticos y flagelares:

Los antígenos somáticos "O" pueden ser clasificados en "mayores" que son los responsables de la división del género en serogrupos (Mäkelä, 1984) y "menores" que pueden encontrarse en diferentes serogrupos o proceden de la modificación química de algunos antígenos "mayores". Así, dentro del grupo B las cepas comparten el antígeno somático O:4, dentro del C1, el antígeno O:7, dentro del C2, el O:8 y las del grupo D, comparten el antígeno O:9. Para mayor comodidad, en lo sucesivo hablaremos de serogrupo B 4, D 9, C2-8 y C1-7. De todos los serotipos pertenecientes al serogrupo B el más frecuente e importante desde el punto de vista clínico es *S. typhimurium* que posee el antígeno somáticos O:4 (antígeno mayor) y puede tener o no el antígeno O:5 (antígeno menor); por ello los sueros utilizados para una primera identificación en la rutina clínica, poseen anticuerpos frente a estos dos antígenos.

Los antígenos flagelares pueden estar presentes o no, aunque la mayoría de las cepas son móviles y presentan dos tipos de antígenos flagelares "H": de fase 1 y de fase 2. Los de primera fase se expresan con letras y los de segunda fase (cuando existe) con números o letras. y ambos están separados por dos puntos; la ausencia de antígenos flagelares se representa con un guión. En cada cepa se expresan alternativamente uno u otro pero no

ambos simultáneamente, por un proceso que se denomina “cambio de fase” que tiene lugar de forma espontánea cada  $10^3$ - $10^5$  generaciones, en el que interviene un elemento genético invertible que cambia de orientación al azar y que determina la expresión de un tipo u otro de proteína flagelar. A continuación se mencionan algunos de los serogrupos de *Salmonella* y los serotipos que contienen:

GRUPO B	{	<i>S. typhimurium</i>	4,5,12:i:1,2
		<i>S. paratyphi B</i>	4,5,12:b:1,2
		<i>S. heidelberg</i>	4,5,12:r:1,2
		<i>S. derby</i>	4,5,12:fg:-
		<i>S. agona</i>	4,5,12:fgs:-
		<i>S. bredeney</i>	4,12:lv:1,7
		.....	.....
GRUPO C 1	{	<i>S. virchow</i>	6,7:r:1,2
		<i>S. infantis</i>	6,7:r:1,5
		<i>S. montevideo</i>	6,7:gms:-
		.....	.....
GRUPO C 2	{	<i>S. newport</i>	6,8:eh:1,2
		<i>S. blockley</i>	6,8:k:1,5
		.....	.....
GRUPO D	{	<i>S. enteritidis</i>	9,12:gm:-
		<i>S. panama</i>	9,12:lv:1,5
		<i>S. typhi</i>	9,12,[Vi]:d:-
		.....	.....

## 4. METODOS DE TIPIFICACIÓN DE SALMONELLA

### 4.1. SEROTIPIFICACIÓN

La **serotipificación** es un método sencillo y rápido; basta con enfrentar la cepa en estudio con sueros que contienen anticuerpos que reconocen específicamente los antígenos característicos de cada serotipo y observar la aglutinación producida. En el género *Salmonella* se diferencian tres tipos de antígenos:

- Antígeno somático o antígeno O: Consta de tres regiones de distinta naturaleza: la región III de naturaleza lipídica, y las regiones I y II de naturaleza polisacáridica. Mutaciones en las cadenas polisacáridicas dan lugar a un cambio

de fase de lisa (S) a rugosa (R), lo que determina una pérdida de patogenicidad y la autoaglutinación de la cepa.

- Antígeno flagelar o antígeno H: Los flagelos son polímeros de proteínas filamentosas denominadas flagelinas codificadas por los genes *fliC* (fase 1) y *fli B* (fase 2). Estos genes se sitúan en zonas distintas del DNA cromosómico. La expresión de un tipo u otro de flagelo se denomina cambio de fase y se debe a la presencia de un elemento genético invertible que cambia de orientación al azar y determina la expresión de un tipo u otro de proteína flagelar. Hay serotipos monofásicos que son capaces de expresar únicamente una especificidad flagelar.
- Antígeno capsular o de superficie o antígeno Vi: Este tipo de antígeno se ha descrito también en otros géneros bacterianos (*E. coli*, *Klebsiella*), su naturaleza es homopolisacáridica.

La serotipia tiene un importante peso taxonómico refrendado además porque la patología causada por algunos serotipos es muy específica y diferente a la causada por otros. Sin embargo, para realizar estudios epidemiológicos, se requiere una tipificación más completa, ya que en España, como se ha mencionado con anterioridad, la mayoría de las infecciones están causadas por el serotipo Enteritidis (Echeita y Usera, 1999).

## 4.2. FAGOTIPIFICACIÓN

El método más frecuentemente empleado en la tipificación de *Salmonella* es la **fagotipia**, basada en la capacidad de algunos fagos de unirse a determinantes concretos de la pared celular, infectando y lisando la bacteria. Como resultado de esta lisis se observan zonas de inhibición de crecimiento (placas de lisis) en los cultivos de *Salmonella* que han sido inoculados con los distintos fagos y en función de los fagos que produzcan la lisis y el tipo de lisis producida se define el fagotipo.

El primer esquema de fagotipificación para *Salmonella* fue desarrollado por Craigie y Yen (1938) para el *Salmonella typhi*; actualmente con el juego de fagos en uso para este serotipo, se diferencian 106 fagotipos distintos (Edelman y Levine 1989). La fagotipificación da muy buenos resultados para los serotipos más frecuentes en los que se hace necesaria una posterior subdivisión, como en el caso del *S. typhimurim* (Anderson *et al.*, 1977).

Pero esta técnica tan utilizada para la subdivisión de los serotipos de *Salmonella* presenta también algunas limitaciones:

- Conseguir una colección adecuada de fagos y mantenerla operativa es complejo por lo que los juegos de fagos suelen encontrarse en centros de referencia que es donde se realizan las fagotipias habitualmente.
- Estos experimentos deben realizarse en determinadas condiciones ambientales ya que cambios en las mismas pueden provocar alteraciones en la sensibilidad de las bacterias a los fagos y conversiones en el fagotipo relacionadas con la pérdida de lipopolisacárido (Baggesen *et al.*, 1997) o adquisición de plásmidos (Ridley *et al.*, 1996)

#### **4.3. POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN**

Los patrones de restricción obtenidos mediante la digestión del DNA cromosómico por enzimas de restricción son útiles en muchos casos para diferenciar cepas bacterianas. El mayor inconveniente es que muchas veces el patrón de bandas es muy complejo y que con la electroforesis en agarosa convencional no se logra separar completamente las bandas de DNA. Esta técnica se ha optimizado mediante el desarrollo de equipos de electroforesis en campo pulsado ( *Pulse Field Gel Electroforesis* **PFGE**) que presentan un enorme poder resolutivo para grandes moléculas de DNA, incluyendo fragmentos de genomas bacterianos. La migración del DNA se realiza en una matriz de agarosa y depende del tiempo de electroforesis, de los cambios en el campo eléctrico, el voltaje, el ángulo del campo y el tiempo de electroforesis. En este tipo de electroforesis el campo eléctrico cambia rítmicamente en forma de breves pulsos obligando a las moléculas de DNA a cambiar constantemente de dirección o a reorientarse según su carga. Las moléculas más grandes tardan más en reorientarse, y por tanto, tienen menos tiempo para moverse durante el pulso, migrando más despacio que las pequeñas. De esta forma, se ha mejorado enormemente la resolución de las bandas.

La electroforesis en campo pulsado se ha empleado con éxito en la tipificación epidemiológica de diferentes serotipos de *Salmonella* (Usera *et al.*, 1998; Laconcha *et al.*, 2000 Sandvang *et al.*, 2000).

## 5. EPIDEMIOLOGÍA

En España, al igual que en el resto de los países occidentales, la mayoría de las salmonelosis están producidas por *S. enteritidis*, seguida en incidencia por *S. typhimurium* y en mucha menor medida por otros serotipos.

La salmonelosis es considerada una zoonosis, es decir, la transmisión del agente infeccioso es unidireccional, de los animales al ser humano, aunque algunos autores la consideren una infección bidireccional, en la cual, la especie humana y sus actividades estarían también implicadas en la transmisión de la enfermedad. No obstante su principal reservorio es el intestino de un gran número de animales, entre los que destacan aves de granja, y otros animales estabulados, aunque hay autores que destacan la importancia de animales salvajes, fundamentalmente las aves, en la diseminación de este microorganismo en el medio ambiente (Goopé, 2000).

El animal más frecuentemente implicado son las gallinas. Los huevos se contaminan a su paso por el oviducto de gallinas infectadas. Normalmente es la cáscara la que está contaminada pero en ocasiones la contaminación se produce en el ovario y afecta también al interior del huevo. Un estudio realizado en el Instituto de Salud Carlos III sobre los alimentos implicados en todo tipo de infecciones alimentarias sitúa a los alimentos con huevo en primer lugar (55%) seguido de repostería (11%), pescados y mariscos (11%), carnes (7%), lácteos (4%) y otros (13%). Las carnes de todos los animales de abasto que son portadores de *Salmonella* (aves, bóvidos, cerdos...) se pueden contaminar a partir del tubo digestivo durante el sacrificio en los mataderos aunque esta vía de infección es menos frecuente.

En las cocinas, durante la manipulación de los alimentos, los microorganismos pueden pasar de los contaminados a los no contaminados, y los manipuladores de alimentos que sean portadores asintomáticos pueden transmitir el microorganismo a los alimentos donde se multiplica hasta ser ingerido y causa la infección. Los manipuladores de alimentos en los que se detecte la presencia de *Salmonella* en heces no deben reanudar su trabajo hasta que al menos tres cultivos consecutivos de heces sean negativos.

La estacionalidad de la salmonelosis presenta un claro predominio en los meses de verano, motivado por el aumento en la temperatura ambiental que facilitaría la proliferación de la bacteria en los alimentos.

## 6. CLÍNICA

La gastroenteritis es la manifestación clínica más frecuente de la infección por *Salmonella enterica* serotipo no tifoideo (SNT).

**La dosis infecciosa** es aproximadamente de  $10^6$  bacterias, por lo que la transmisión persona-persona es prácticamente imposible. El microorganismo debe multiplicarse en el alimento hasta alcanzar su dosis infecciosa por lo que, como ya comentamos anteriormente, la salmonelosis es mucho más frecuente en verano donde la temperatura es más favorable.

**El periodo de incubación** suele oscilar entre 6 y 48 horas y tras este periodo comienza un **cuadro clínico** con dolor, fiebre, mialgia, náuseas, vómitos y diarrea. La diarrea puede llegar a la deshidratación, sobre todo en niños y ancianos. Si no surgen complicaciones, la enfermedad se autolimita y suele remitir en 3 - 4 días aunque el enfermo puede seguir eliminando *Salmonella* por heces durante 2 - 4 meses o incluso durante más tiempo permaneciendo así en estado de portador asintomático. La enfermedad es más grave en pacientes inmunodeprimidos, ancianos y niños, pudiendo causar en estos grupos de riesgo, importantes complicaciones.

*Salmonella* puede pasar a la sangre y producir sepsis. El riesgo de desarrollar bacteriemia depende de distintos factores:

- ✓ Relativos al microorganismo: Hay serotipos con más facilidad para producir sepsis. Este hecho se atribuye a varios determinantes de patogenicidad entre los que destaca la posesión del antígeno Vi de virulencia que permite a la bacteria inhibir la fagocitosis y hace que el inóculo necesario para desarrollar infección y producir bacteriemia sea menor (Fierer *et al.*, 1992), y la presencia del plásmido de virulencia.
  
- ✓ Relativos al huésped:
  - **La edad** constituye un factor fundamental para el desarrollo de bacteriemia, su incidencia es mayor en grupos extremos de edad. En los neonatos la función leucocitaria es deficiente y la mucosa no ejerce con completa eficiencia su función de barrera protectora. Su sistema inmune no está desarrollado, por lo que presentan disgammaglobulinemia fisiológica. Por otro lado, los neonatos carecen de flora endógena equilibrada, lo que les hace susceptibles a la colonización por la flora presente en el lugar donde se encuentren. Este hecho, hace a las unidades de

cuidados intensivos neonatales y pediátricas más susceptibles de sufrir brotes por *Salmonella*. Los riesgos se incrementan considerablemente cuando estos pacientes son sometidos a cirugía o reciben tratamiento inmunosupresor o tratamiento antibiótico prolongado, que los predispone a colonizarse por cepas multi-resistentes (Hammami *et al.*, 1991; Bosch Mestres *et al.*, 1993). La incidencia de los procesos epidémicos por *Salmonella* en estas unidades está relacionada con el desarrollo sanitario del país que se considere; y así, estudios realizados en Finlandia, y EEUU encuentran una incidencia del 1% (Vesikari *et al.*, 1985; Gladstone *et al.*, 1990) y en Pakistán asciende al 20% (Bhutta *et al.*, 1991).

- **La inmunodepresión**, tanto humoral como celular, favorece el desarrollo de afecciones extraintestinales dado el importante papel que juega la función macrofágica en el control de esta infección. La importancia de la inmunidad celular en el control de la infección es tal que justifica la mayor incidencia de la enfermedad en pacientes infectados por el VIH. Estos enfermos tienen 20 veces más riesgo de padecer salmonelosis (Moreno *et al.*, 1994). Además, la aparición de sepsis por *Salmonella* en estos pacientes precede al resto de infecciones oportunistas y al propio desarrollo del cuadro SIDA, ya que el grado de inmunodepresión requerido para la instauración de este cuadro es menor que el necesario para que surjan otras infecciones oportunistas.
- **Otros factores** que predisponen al desarrollo de sepsis son aquellos que alteran la producción de ácido en el estómago, como la existencia de gastrectomía previa, la ingesta de álcalis, de antibióticos y de astringentes que destruyendo esta barrera natural hacen al sujeto más proclive a adquirir formas extraentéricas de salmonelosis. Especial atención merecen los pacientes con cuadros asociados con hemólisis (anemia de células falciformes, anemia hemolítica autoinmune..); se ha documentado la mayor sensibilidad de estos pacientes a la infección por *S. enterica* en todas sus formas debido a que la eritrofagocitosis producida por parte de los monocitos disminuye la capacidad de éstos para lisar las salmonellas. También se han descrito infecciones instauradas sobre aneurismas en los que el enlentecimiento y la turbulencia del flujo sanguíneo facilitan el acantonamiento del microorganismo y la trombosis, protege a *Salmonella* de la fagocitosis.

El diagnóstico de sepsis por *Salmonella* se realiza por el hemocultivo, ya que el coprocultivo suele ser negativo. La detección de bacteriemia por *Salmonella* permite sospechar la existencia de una infección focal simultánea (*Salmonella* suele llegar a los distintos focos vía

hematogena) aunque **la infección extraintestinal** es un cuadro poco habitual en nuestro medio (1,5% a 6% en función de las fuentes consultadas) (Ruiz *et al.*, 2000).

Algunas de estas infecciones extraintestinales son:

- ✓ Infecciones osteoarticulares, fundamentalmente en pacientes con enfermedades hematológicas y en niños en los que son más frecuentes las osteomielitis y las artritis asociadas en un 60% de los casos a diarrea previa.
- ✓ Infecciones endoteliales, con especial predisposición a afectar endotelios vasculares previamente dañados.
- ✓ Infección pleuropulmonar, que supone un 5-9% del total de las manifestaciones extraintestinales (Berdonces *et al.*, 2001).
- ✓ Infecciones urológicas
- ✓ Infecciones intraabdominales, afectando fundamentalmente al hígado y bazo de personas con neoplasias hematológicas.
- ✓ Infecciones de partes blandas tanto de la piel como del tejido subcutáneo.
- ✓ Infecciones neurológicas, que representan un 0,9% de las formas extraintestinales, y es mucho más frecuentes en neonatos y lactantes; en España se han comunicado sólo 9 casos de meningitis producidas por *Salmonella* en adultos (Tena *et al.*, 2001).

## 7. TRATAMIENTO

En las formas benignas (las más frecuentes en la población normal) el único tratamiento requerido es la **prevención de la deshidratación**, aunque como se comentó al principio de esta introducción en muchas ocasiones se recurre al tratamiento antibiótico de forma innecesaria. Las gastroenteritis producidas por *Salmonella* en el hombre no deben ser tratadas con antimicrobianos para no prolongar el estado de portador (Wegwerner *et al.*, 1999).

Sin embargo, entre el 1 y el 2% de las cepas de *S. typhimurium* causan infecciones invasivas en humanos las cuales siempre requieren una terapia antimicrobiana debido a la alta mortalidad asociada con esta infección. (Orden Gutierrez y de la Fuente, 2001).

- En las formas graves de enteritis: fluorquinolonas orales durante 3-7 días, cotrimoxazol o ampicilina (siempre que la cepa sea sensible).
- En bacteriemia o infección localizada: Cefalosporinas de tercera generación, aztreonam o una fluorquinolona. Si el paciente está inmunodeprimido o tiene factores de riesgo para desarrollar metástasis (aneurisma aórtico o hemólisis) el tratamiento se prolongará hasta un mes.

## 8. $\beta$ -LACTÁMICOS Y $\beta$ -LACTAMASAS

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se han usado ampliamente en el tratamiento de la salmonelosis. El creciente e inadecuado uso de estos antibióticos ha provocado una paulatina pérdida de eficacia de los mismos en el tratamiento de este tipo de infecciones. El factor que más ha contribuido a este hecho es la aparición y diseminación de  $\beta$ -lactamasas.

### 8.1. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

La continua aparición de nuevas  $\beta$ -lactamasas ha creado problemas en su **clasificación y nomenclatura**. En un principio, su nombre hacía referencia a aspectos tan diversos como: el sustrato sobre el que actúa (CARB, OXA), sus propiedades bioquímicas (SHV), la bacteria que la produjo por primera vez (PSE descrita por primera vez en *P. aeruginosa*), el paciente del que procedía la muestra (TEM, ROB) o el hospital donde estaba ingresado el paciente (MIR, RHH) y el estado al que pertenecía (OHIO), no pudiendo faltar las iniciales de los autores que las describieron por primera vez (HMS). Hoy se conocen más de 300 enzimas diferentes lo que impone una nomenclatura mucho más lógica que asigna un número a cada enzima.

La clasificación propuesta por Jack y Richmond en 1970 y posteriormente ampliada por Richmond y Stykes en 1973, fue la que se utilizó hasta que Bush en el año 1989 propusiera una clasificación basada en la actividad enzimática o afinidad de los enzimas por diferentes sustratos y su sensibilidad a la acción inhibitoria por el ácido clavulánico. Esta clasificación fue revisada en 1995 y es la que se utiliza en la actualidad (Tabla I.2)

Por otro lado Ambler (1980) propuso una clasificación en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia de aminoácidos de las  $\beta$ -lactamasas en la que distinguen cuatro clases de enzimas designados como A, B, C y D. Esta es la clasificación

defendida por autores como Livermore (1995) que argumenta que las clasificaciones fenotípicas presentan el problema de que cualquier mutación puntual puede alterar la especificidad de sustrato y la sensibilidad a los inhibidores, variando así el grupo al que estarían asignadas. Este problema no lo tiene la clasificación de Ambler ya que se basa en características esencialmente estables y no distorsionadas por mutaciones y posee además la belleza de la simplicidad al reconocer únicamente cuatro clases de enzimas.

**Tabla I.2:** Clasificación de  $\beta$ -lactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros (1995).

GRUPO	Sustrato preferido	Inhibidas por ac.clavulánico	Enzimas representativas	CLASE Ambler
1	Cefalosporinas	No	AmpC, MOX-1	C
2.a	Penicilinas	Si	(A,B,C,D) <i>S.aureus</i>	A
2.b	Penicilinas, cefalosporinas 1 <sup>a</sup> generación	Si	TEM-1, TEM-2, SHV-1	
2.b.e	Penicilinas, cefalosporinas 1 <sup>a</sup> y 3 <sup>a</sup> generación, monobactamas	Si	TEM-3-29,43-44, SHV 1-10, K-1	
2.b.r	Penicilinas, inhibidores de betalactamasas	Si/No	TEM 30-41	
2.c	Penicilinas, carbenicilina	Si	PSE-1, PSE-3, PSE-4	
2.d	Penicilinas, cloxacilina	Si/No	OXA-1-10 OXA 11-19	D
2.d.e.	Penicilinas, cloxacilina, cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> generación	Si/No		
2.e	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> generación	Si Si	Cefuroximasa NMC-A, Sme-1	A
2.f	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> generación, penicilinas, carbapenemes			
3	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> generación, penicilinas, carbapenemes	No	L1,CcrA,IMP-1	B
4	Penicilinas	No	SAR-2	No Definida

## 8.2. $\beta$ -LACTAMASAS EN *Salmonella*

Aunque la existencia de cefalosporinasas cromosómicas está prácticamente generalizada en la familia de las enterobacterias, no están presentes en el género *Salmonella*. La única descrita en la bibliografía es una cefalosporinasa cromosómica en un aislado de *S. typhimurium*, mencionada únicamente por Sykes y Matthew en una revisión de 1976.

El coste biológico que supone la expresión de estas enzimas puede ser el responsable de que *Salmonella* haya sacrificado mecanismos de resistencia por mantener sus caracteres patógenos; así la ausencia de  $\beta$ -lactamasa cromosómica en este microorganismo podría explicarse por la incompatibilidad entre la alta expresión de esta enzima y la capacidad de invasión y multiplicación intracelular de *Salmonella*.

Las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas más frecuentemente descritas en *Salmonella* incluyen las de tipo TEM, las oxacilinasas (OXA) o las de tipo SHV o PSE.

- Las penicilinasas tipo TEM, tienen capacidad de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas aunque no tienen actividad sobre los  $\beta$ -lactámicos denominados de espectro ampliado. Su carácter transferible les ha permitido diseminarse por una gran diversidad de géneros bacterianos (*E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Haemophilus* y *Neisseria* entre otros) La más frecuente es la enzima TEM-1 codificada por el gen *bla*<sub>TEM-1A</sub> o *bla*<sub>TEM-1B</sub>.
- Las penicilinasas de tipo SHV-1 se encuentran principalmente en bacterias pertenecientes al género *Klebsiella*, comparte un 68% de homología con TEM-1 lo que le confiere un perfil de resistencias muy similar al de dicha enzima.
- Las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA confieren resistencia a las amino y ureidopenicilinas. Poseen una gran capacidad hidrolítica frente a la cloxacilina y son resistentes a la acción inhibitoria del ácido clavulánico aunque permanecen sensibles a la asociación piperacilina-tazobactam. (Livermore, 1995)
- La  $\beta$ -lactamasa tipo PSE-1 se describió por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* (Newsom 1969) y aunque normalmente ofrece unos perfiles de resistencia similares a los de las  $\beta$ -lactamasas clásicas, en algunos casos se presentan resistentes a la acción del ácido clavulánico mostrando un fenotipo de resistencia muy similar al de las

$\beta$ -lactamasas de tipo IRT (resistencia a amoxicilina-clavulánico pero sensibilidad frente a cefalosporinas de primera generación). En 1999 Poirel describió este tipo de enzimas en *S. typhimurium* DT 104 codificadas en un integrón de localización cromosómica.

### 8.3. RESISTENCIA A INHIBIDORES DE $\beta$ -LACTAMASAS. IRT

Dada la alta frecuencia en la producción de  $\beta$ -lactamasas por los distintos microorganismos y el fracaso terapéutico asociado a la producción de las mismas, se buscaron soluciones para reestablecer la actividad de los  $\beta$ -lactámicos diseñando antibióticos más resistentes a la acción de las  $\beta$ -lactamasas.

Las primeras aproximaciones en la lucha contra las  $\beta$ -lactamasas fue la búsqueda de inhibidores que se realizó durante las décadas de 1940 y 1950 aunque sin mucho éxito. En 1967 un laboratorio farmacéutico desarrolló un programa de investigación encaminado a detectar metabolitos microbianos con actividad inhibitoria de las  $\beta$ -lactamasas, que tuvo como consecuencia el descubrimiento de los ácidos olivánicos a partir de una cepa de *Streptomyces olivaceus* y del ácido clavulánico producido por *Streptomyces clavuligenus* (Brown *et al.*, 1976). El ácido clavulánico mostraba escasa actividad antimicrobiana pero una importante capacidad de inhibir algunas  $\beta$ -lactamasas (las de clase A de Amber) de forma irreversible. Fue registrado oficialmente como inhibidor de  $\beta$ -lactamasas en el año 1975. Estas moléculas tienen una elevada afinidad por las  $\beta$ -lactamasas, mayor que la de los antimicrobianos a los que se asocian, y las inhiben irreversiblemente protegiendo de su acción a los  $\beta$ -lactámicos.

Estas estrategias se mostraron eficaces hasta que a principios de 1987 comenzaron a aparecer las primeras cepas de *E.coli* causantes de infección del tracto urinario con un sensibilidad disminuida a amoxicilina / clavulánico (Sirot, 1995). Un estudio realizado en Francia en 1995 que recoge los datos de 19 hospitales de todo el país, encuentra que un 4,9% de las cepas de *E. coli* aisladas de orina eran resistentes a amoxicilina /clavulánico por la presencia de  $\beta$ -lactamasas resistentes a inhibidores (IRTs).

Los datos obtenidos en nuestra comunidad durante los últimos cuatro años, muestran una prevalencia de *E.coli* resistentes a amoxicilina / clavulánico (CMI >16/8 mg/l) del 12% y aunque el mecanismo de resistencia más frecuente es la hiperproducción de penicilinas (80%) seguido de la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (13,5%) o la producción de cefalosporinas de clase C (4,3%), en un 1.3% de las cepas se detectó la presencia de  $\beta$ -lactamasas de tipo IRT (Cuevas *et al.*, 2002).

Y es que un microorganismo puede ser resistente a la acción de los inhibidores  $\beta$ -lactamasas por distintos mecanismos, entre los que destacan:

- Hiperproducción de las  $\beta$ -lactamasas tradicionales (TEM) haciendo así que el inhibidor no sea capaz de reaccionar con tal cantidad de sustrato, como demuestra Espinasse *et al.*, (1999).
- Hiperproducción de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas al no ser éstas tan sensibles a los inhibidores o producción de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas tipo OXA-1 mucho menos sensibles a la inhibición que las tradicionales TEM o SHV.
- Alteración de la permeabilidad por pérdida de porinas (Reguera *et al.*, 1991).
- Mutaciones en las  $\beta$ -lactamasas clásicas que afectan a la afinidad de las mismas por los inhibidores; esta pérdida de afinidad deja libre a la  $\beta$ -lactamasa que actúa inactivando el antibiótico, estas mutaciones en  $\beta$ -lactamasas clásicas (TEM o SHV) dieron nombre a las  **$\beta$ -lactamasas IRT** (Inhibitor Resistant TEM) resistentes a los inhibidores.

Las sustituciones en los aminoácidos provocan un cambio en la especificidad de la enzima por el sustrato que afecta en mayor medida a la afinidad de la enzima por los inhibidores, son mutaciones puntuales y en ningún caso se han descrito más de tres por enzima. La tabla I.3. muestra algunos ejemplos de mutaciones encontradas en las  $\beta$ -lactamasas resistentes a inhibidores que se han descrito.

El aminoácido que cambia con más frecuencia es la metionina situada en posición 69 que puede ser sustituido por leucina, isoleucina o valina ; a pesar de su proximidad al centro activo (Ser70) la pérdida de actividad se debe más a que su cadena lateral forma parte del lugar de unión de la enzima al sustrato formado por las amidas de Ser70 y Ala237 (Chaibi *et al.*, 1988).

La sustitución de Arg244 por aminoácidos con cadenas laterales más cortas, como cisteína (IRT-1), serina (IRT-2), modifica la interacción de enzima y sustrato, disminuyendo su afinidad; además estos aminoácidos con cadenas más cortas serían incapaces de activar la molécula de agua necesaria para que el ácido clavulánico inactive la  $\beta$ -lactamasa (Saves *et al.*, 1995)

La sustitución de Arg244 por aminoácidos con cadenas laterales más cortas, como cisteína (IRT-1), serina (IRT-2), modifica la interacción de enzima y sustrato, disminuyendo su afinidad; además estos aminoácidos con cadenas más cortas serían incapaces de activar la molécula de agua necesaria para que el ácido clavulánico inactive la  $\beta$ -lactamasa (Saves *et al.*, 1995)

Uno de los aminoácidos más conservados es la Ser130, quizás por su importancia en mantener la geometría del centro activo y su gran participación en el proceso catalítico de las  $\beta$ -lactamasas de clase A. No obstante la mutación en Ser130Gly se ha descrito en tres  $\beta$ -lactamasas resistentes a inhibidores, una de ellas aparece en la tabla I.3. y las otras dos son consecuencia de mutaciones en SHV-5 (SHV-10) y OXY-2 (IRKO-1) respectivamente ( Bermudes *et al.*, 1998, Prinarakis *et al.*, 1997).

**Tabla I. 3:** Mutaciones encontradas en algunas de las  $\beta$ -lactamasas resistentes a inhibidores que se han descrito. \* Esa mutación ocurre en TEM-2 y no en TEM-1 como el resto.

$\beta$ -lactamasas	Posición de aminoácidos y mutación encontrada							
	69	130	165	182	244	261	275	276
TEM-1	Met	Ser	Trp	Met	Arg	Val	Arg	Asn
TEM-31 (IRT-1)					Cys			
TEM-30 (IRT-2)					Ser			
TEM-33 (IRT-5)	Leu							
TEM-34 (IRT-6)	Val							
TEM-40 (IRT-7)	Ile							Asp
TEM-45(IRT-14)	Leu					Gnl		
TEM-51(IRT-15)								
TEM-44(IRT-3)*					Ser			
TEM-39(IRT-10)	Leu		Arg					Asp
TEM-60		Gly						

Las enterobacterias fueron de nuevo las primeras en demostrar su poderosa adaptación al ataque terapéutico (Sirost *et al.*, 1994) y aunque *E. coli* fue el primer microorganismo en producir este tipo de enzimas, se siguieron los casos de aparición de IRT en diferentes microorganismos como *Proteus* como resultado de mutaciones en esta ocasión de TEM 2 en vez de TEM 1 como en *E. coli*. En 1995 se describe por primera vez la presencia de IRT en familias distintas a las enterobacterias y se constata el intercambio de enzimas entre los distintos microorganismos al observar que las primeras IRT halladas en *K. pneumoniae* coinciden con las primeras halladas también en *E. coli*.

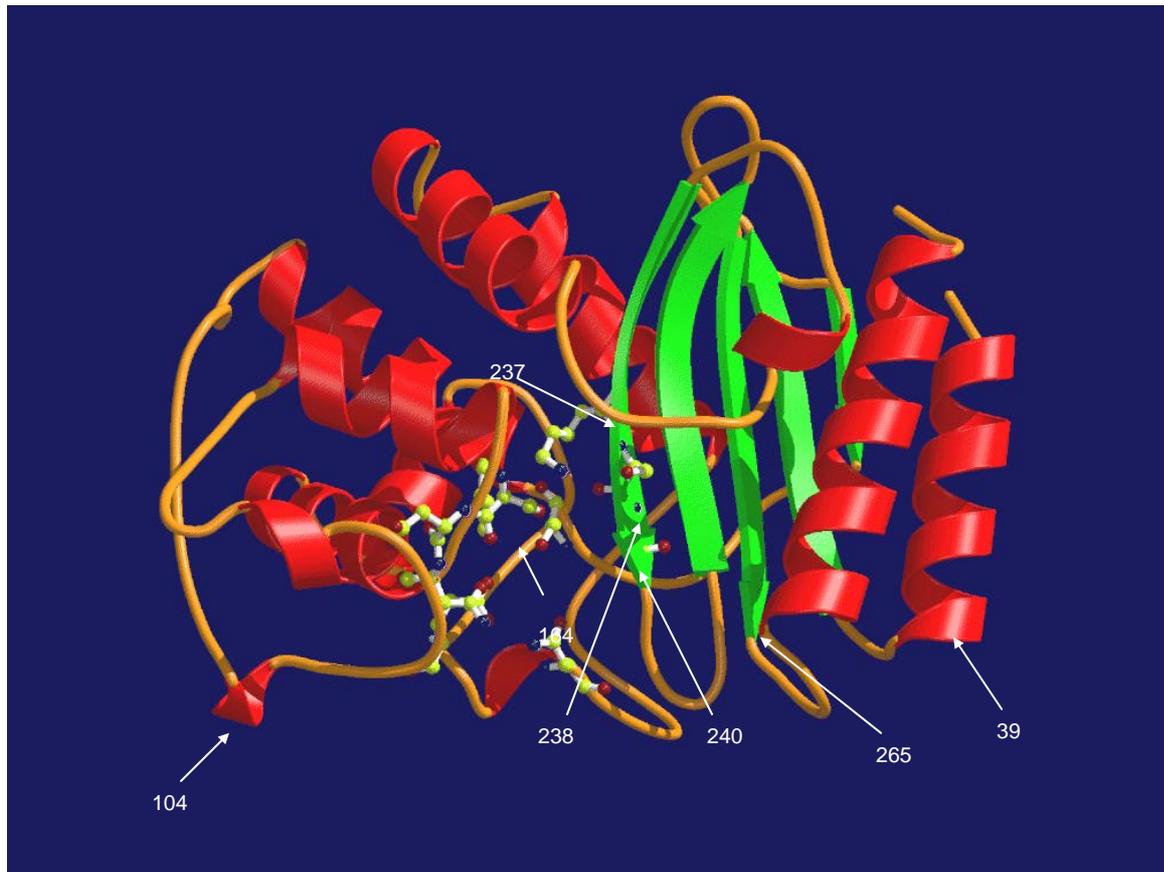
La introducción en la práctica médica de las asociaciones de  $\beta$ -lactámicos- inhibidores de  $\beta$ -lactamasas ha contribuido notablemente a la selección y multiplicación de estas cepas resistentes y de hecho, el predominio de estos microorganismos en la comunidad es debido a que el uso de estos antibióticos es mucho más frecuente en el tratamiento ambulatorio que en el hospitalario.

En *Salmonella* se han encontrado cepas resistentes a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas fundamentalmente por hiperproducción de TEM-1 (Espinasse *et al.*, 1997) o de PSE-1 (Poirel *et al.*, 1999).

#### **8.4. $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)**

A principios de los años 80, aparecieron las primeras  $\beta$ -lactamasas plasmídicas sintetizadas por microorganismos gram-negativos con actividad sobre cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima). Aunque en un principio se encontraron únicamente en especies muy concretas (*Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*) localizadas en un ámbito geográfico limitado, muy pronto se extendieron por toda Europa, EEUU y el resto de países y cada vez son más los microorganismos en las que se han descrito algún tipo de BLEE (*Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter*, o *Serratia* entre otros)

Su espectro incluye las amino y ureidopenicilinas, penicilinas de segunda y tercera generación y monobactamas; las cefamicinas (cefoxitina y cefotetan) así como los carbapenemes (imipenem y meropenem) continúan siendo activos frente a los microorganismos productores de BLEE. Estas enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico.



**Figura I.8:** Imagen tridimensional de la estructura terciaria de una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM con el antibiótico  $\beta$ -lactámico en el sitio activo. Las flechas blancas señalan la localización de las mutaciones más frecuentemente encontradas en este tipo de  $\beta$ -lactamasa.

La mayoría de las BLEEs son mutantes derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, que presentan de dos a cuatro sustituciones en su secuencia de aminoácidos, lo que les confiere capacidad para remodelar el centro activo de la enzima, siendo capaces de hidrolizar no solo penicilinas o cefalosporinas de primera generación, sino también las de tercera y cuarta generación.

Estas mutaciones en las diversas BLEEs conocidas, no necesariamente les confieren capacidad para hidrolizar a los mismos sustratos y por ejemplo TEM-7 hidroliza ceftazidima y cefotaxima con la misma efectividad, mientras que, SHV-2 hidroliza a cefotaxima cerca de 10 veces más rápido que a ceftazidima.

**Tabla I.4:** Algunos ejemplos de BLEEs con los aminoácidos que aparecen mutados respecto a la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 que aparece en negrita.

$\beta$ -lactamasas	Posición de aminoácidos						
	<b>39</b>	<b>104</b>	<b>164</b>	<b>237</b>	<b>238</b>	<b>240</b>	<b>265</b>
<b>TEM-1</b>	<b>Gln</b>	<b>Glu</b>	<b>Arg</b>	<b>Ala</b>	<b>Gly</b>	<b>Glu</b>	<b>Thr</b>
TEM-2	Lys						
TEM-3	Lys	Lys			Ser		
TEM-8	Lys	Lys	Ser		Ser		
TEM-14	Lys	Lys			Ser		Met
TEM-27			His			Lys	Met
TEM-29			His				
TEM-42	Lys				Ser	Lys	Met

A continuación se comentan estas mutaciones, relacionando el cambio estructural que producen con la mayor actividad catalítica que esto supone:

- **Posición 39. Gln:** El único cambio descrito es por Lys. Este residuo, está muy alejado del sitio activo, por lo que la cadena lateral de estos aminoácidos no tiene contacto con el  $\beta$ -lactámico. Se pensó por ello que la  $\beta$ -lactamasa TEM-2 no presentaría diferencias catalíticas respecto a la TEM-1 ya que sólo se diferencia de ella en este aminoácido. Sin embargo se ha demostrado que la eficiencia catalítica de TEM-2 es superior a la de TEM-1 (Blázquez *et al.*, 1995), probablemente por la aparición de un puente salino adicional cuando el aminoácido es Lys que influye en el plegamiento de la enzima y mejora su actividad.
- **Posición 104. Glu:** El único cambio descrito es por Lys. Este aminoácido contribuye a la estabilidad del “loop” Ser130AspAsn132. La larga cadena lateral de la lisina cargada positivamente puede interactuar con el grupo carboxilo de la ceftazidima o el aztreonam lo que hace que la capacidad catalítica para estos antibióticos sea mayor cuando es la lisina la que ocupa esta posición.

- **Posición 164. Arg:** Este aminoácido se encuentra en el “loop” omega y forma un puente salino muy conservado con el Asp 179 que da rigidez a esta estructura, manteniendo la configuración estructural del sitio activo. Las modificaciones en este punto desestabilizan el puente salino y la menor atracción electrostática debilita el “loop” lo que supone una flexibilización del mismo y un mayor espacio que da cabida a los sustituyentes más voluminosos de los nuevos  $\beta$ -lactámicos.
- **Posición 238. Gly:** Ubicado en la parte interna de la lámina  $\beta$ 3; El cambio por serina (que es el único descrito), con una cadena lateral más larga que la glicina hace que la parte inferior del sitio activo se expanda permitiendo una mayor interacción con las nuevas cefalosporinas.
- **Posición 240. Glu:** Situado al final de la lámina  $\beta$ 3, y muy expuesto para interaccionar con los sustituyentes de los antibióticos. La sustitución por Lys, cambia la carga electrostática (Glu está cargado negativamente) aumentando la afinidad por los grupos carboxilo de los oximinio- $\beta$ -lactámicos e hidrolizando eficazmente a ceftazidima o aztreonam.
- **Posición 265. Thr:** Dada su lejanía del centro activo su mutación no produce cambios muy significativos en la actividad catalítica de la enzima. Aunque se había postulado que la mutación en este residuo es una sustitución funcionalmente silente, Blázquez *et al.*, (1993), han observado un aumento leve de resistencia a algunas cefalosporinas.

Las enterobacterias son las principales productoras de estas enzimas y uno de los microorganismos que con más frecuencia produce BLEE es *E. coli*, siendo la mayoría de las muestras donde se aíslan estas cepas, orinas de pacientes extrahospitalarios (Navarro *et al.*, 2002). Un estudio multicéntrico realizado en 40 hospitales de nuestro país para la detección de BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* encuentra que el 92,5% de los hospitales participantes remitió cepas productoras de BLEE. En más del 50% de los casos, los microorganismos productores de estas enzimas se aislaron en pacientes ambulatorios (Hernández *et al.*, 2002).

Las BLEE predominantes en Europa han sido las de tipo SHV, si bien en la actualidad comienzan a ser frecuentes nuevas variantes de tipo CTX-M. De hecho en nuestro país ha habido un cambio drástico en los últimos años, siendo las de tipo CTX-M las BLEE que predominan (Coque *et al.*, 2002; Mirelis *et al.*, 2002).

La mayoría de estas  $\beta$ -lactamasas se han localizado en plásmidos conjugativos lo que predice el modo de adquisición de las mismas a partir de otras bacterias resistentes. Estudios realizados *in vitro* han probado como la flora normal del intestino y más concretamente *E. coli*, puede actuar como reservorio de genes de resistencia y actuar como un factor de diseminación de genes entre los distintos patógenos intestinales como *Salmonella* (Balis *et al.*, 1996). Otros genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas se han localizado formando parte de cassettes de integrones situados tanto en DNA plasmídico como en DNA cromosómico; es el caso de PSE, IMP-1, OXA, (Barnaud *et al.*, 1998) y más recientemente CTX-M-9 en el integrón In60 (Sabaté *et al.*, 2002). La tabla I.5. recoge algunas de las BLEE descritas en los distintos serotipos de *Salmonella*.

**Tabla I.5:** Algunas de las BLEE descritas en los distintos serotipos de *Salmonella*.

$\beta$ -LACTAMASA	SEROTIPO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
TEM-3 (CTX-1)	Panama	Cabie <i>et al.</i> , 1989
TEM-25 (CTX-2)	Mbandaka	Poupart <i>et al.</i> , 1991
SHV-2	Typhimurium	Ben Redjeb <i>et al.</i> , 1998
SHV-2	Typhimurium	Baraniak <i>et al.</i> , 2002
CTX-6	Typhimurium	Gazouli <i>et al.</i> , 1998
DHA-1	Enteritidis	Verdet <i>et al.</i> , 2000
CTX-M-5	Typhimurium	Bradford <i>et al.</i> , 1998
TEM-27	Othmarschen	Morosini <i>et al.</i> , 1995
TEM-35	Typhimurium	Morosini <i>et al.</i> , 1995
CMY-2	Typhimurium	Koeck <i>et al.</i> , 1997
CTX-M-3	Typhimurium	Bradford <i>et al.</i> , 1997

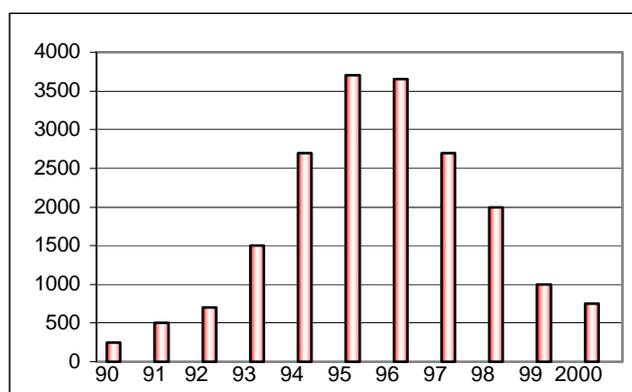
Una mención especial merecen las  $\beta$ -lactamasas de clase C (AmpC). Estas enzimas codificadas en el cromosoma de muchas bacterias gram-negativas y de la mayor parte de las enterobacterias, poseen la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación y son naturalmente resistentes a la inhibición por los inhibidores clásicos. Además, la producción de la mayoría de estas enzimas es inducible indirectamente por la acción de los  $\beta$ -lactámicos, e incluso por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

La aparición de bacterias productoras de BLEE, tiene importantes repercusiones clínicas y terapéuticas: la mayoría de los aislamientos tiene codificada esta resistencia en plásmidos que pueden ser transmitidos a otros microorganismos. El aislamiento de cepas productoras de BLEE limita considerablemente las opciones terapéuticas teniendo que recurrir en muchas ocasiones a antibióticos más caros.

## 9. EMERGENCIA DE CEPAS MULTIRRESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS (MDR)

### 9.1. *S. typhimurium* DT104

*S. typhimurium* DT104 es un importante patógeno humano y animal. En 1984 se aisló en el Reino Unido la primera cepa perteneciente a este fagotipo multirresistente, procedente de aves salvajes (Threlfall, 1993). A finales de los años 80 se encontraron en otros animales pertenecientes al ganado ovino y porcino, y a principio de 1990 se detectó el primer aislado de origen humano. A partir de ese momento comenzaron a aumentar el número de casos en humanos llegando la epidemia a alcanzar su mayor índice de casos en el año 1996, momento en el que comienzan a disminuir progresivamente como se puede observar en la figura I.9.



**Figura 9:** Casos confirmados de salmonelosis por *S. typhimurium* DT 104 en el Reino Unido desde 1990 hasta en año 2000.

Este hecho se repitió en numerosos países. En 1994 comienzan a aislarse las primeras cepas en **Israel** y en 1996 más de la mitad de las cepas aisladas en este país corresponden al fagotipo DT 104 (Metzer *et al.*, 1998). En 1996, se encontraron en **Holanda** diversas piaras de cerdos en las que se pudo aislar *S. typhimurium* DT 104 (Sandvang, 1997). En poco tiempo, se encontraron aislados de este fagotipo en otros países europeos como **España, Alemania, Holanda y Francia**, (Poirel *et al.*, 1999, Almuth *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1990; Besser *et al.*, 1997); en la **República Checa** se detectó el primer caso en animales en 1994; los dos primeros casos en humanos en el verano de 1996 y en 1997 el 44% de los aislamientos

humanos de *Salmonella typhimurium* correspondieron al fagotipo DT 104 (Karpiskova *et al.*, 1999). En **Noruega** se aisló por primera vez en un viajero en 1990 y el primer aislamiento en un enfermo que supuestamente adquirió la infección en Noruega se registro en 1994. Dos años después el 30% de los aislamientos de *S. typhimurium* era DT 104 multirresistente (Alvseike *et al.*, 2002).

Estudios epidemiológicos realizados a las cepas aisladas en los distintos países sugieren que se trata del mismo clon procedente del Reino Unido.

En la rápida diseminación de este clon han influido mucho factores, algunos propios del microorganismo, como se comentará posteriormente y otros de naturaleza externa. La selección de este clon multirresistente por el abuso de antimicrobianos puede ser uno de ellos.

Aunque el ganado es el principal reservorio de *S. typhimurium* en países industrializados es un error asumir que la diseminación del clon puede ser facilitado únicamente por los animales. También el hombre es un importante reservorio (Gracey *et al.*, 1980) y la diseminación de cepas multirresistentes a través del tráfico humano está bien documentada y es la forma más probable de transporte internacional de cepas multirresistentes (CDC, 1982). Además del hombre y los animales otros vehículos han participado en la diseminación de la epidemia, entre ellos, la leche no pasteurizada, los quesos producidos a partir de ella, la carne mal cocinada o las verduras mal lavadas. Son varios los autores que publican evidencias sobre la transmisión de esta cepa por la cadena alimentaria (Poppe *et al.*, 1998).

El aislamiento de este fagotipo constituye un problema de salud pública de gran alcance por los motivos que se comentan a continuación:

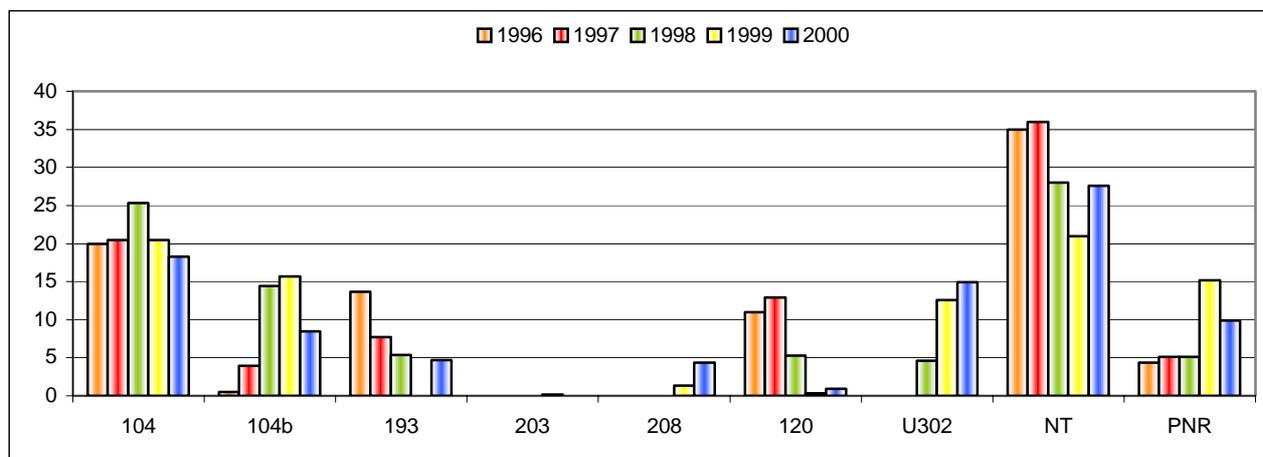
- Hay estudios que mencionan la mayor agresividad de este fagotipo frente al resto; Wall *et al.*, (1994) encontraron que el 36% de los pacientes afectados por cepas de *Salmonella* DT 104 multirresistente, necesitaron ingreso hospitalario y la mortalidad fue del 3%. Villar *et al.*, (1999) observaron en un brote que tuvo lugar en EEUU la alta incidencia (72%) de diarrea sanguinolenta en los pacientes afectados por este fagotipo. No obstante no hay evidencias de que la cepa sea más invasiva y el riesgo de producir bacteriemia no es mayor que en el resto de los fagotipos.
- Otra característica de esta cepa es su mayor resistencia al ácido gástrico, al calentamiento y a las bajas temperaturas pudiendo crecer a 7 °C. Es capaz de sobrevivir durante periodos prolongados en superficies de cocinas, fábricas y granjas permaneciendo viable, lo que ha contribuido considerablemente a su gran diseminación.

- El tratamiento de las infecciones por estas cepas es más complejo y costoso. El patrón de resistencias de este fagotipo es dinámico; aunque lo más frecuente es que presente un patrón de resistencia a cinco antibióticos (**ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, sulfonamidas y estreptomicina**) se han descrito cepas resistentes a hasta nueve antibióticos entre los que se encuentran los aminoglucósidos, el cotrimoxazol y las quinolonas.
- Otro motivo es la presencia de los genes que codifican la resistencia a los antibióticos en estas cepas en DNA cromosómico (aunque también se han descrito en algunas ocasiones en DNA plasmídico), ya que este hecho asegura la continuidad de la resistencia de generación en generación y al contrario de lo que ocurre con los genes situados en DNA plasmídico, la desaparición de presión antibiótica no favorece la pérdida de los mismos. El hallazgo en el DNA cromosómico de estas cepas de integrones con facilidad para incorporar una gran variedad de “cassettes” de resistencia no hace sino facilitar la adquisición de nuevos genes de resistencia. La presencia de estos integrones en serotipos distintos a *S. typhimurium* es mucho menos frecuente, aunque también se ha descrito (Natasi y Mammina, 2001)

## **9.2. *Salmonella typhimurium* U302**

En Agosto de 1997 el Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda, detectó la emergencia de una cepa de *Salmonella* multirresistente a los antibióticos (Echeita *et al.*, 1999). Según el esquema de Anderson *et al.*, (1997) fue clasificada como perteneciente al fagotipo U302. Su estructura antigénica era característica (4,5,12:i:-) y su perfil de resistencias incluía los siguientes antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomicina, sulfamidas, cotrimoxazol y tetraciclinas. La fuente del brote se asoció con el consumo de carne de cerdo contaminada. La incidencia de este microorganismo aumentó rápidamente pasando a ser el cuarto serotipo más frecuentemente aislado en España en 1998 con una incidencia anual del 4,3% (Guerra *et al.*, 2000). Este fagotipo se ha aislado con posterioridad en otros países con un fenotipo similar al descrito anteriormente aunque de forma esporádica (Briggs y Fratamico, 1999).

### 9.3. OTROS FAGOTIPOS DE *S. typhimurium*



**Figura 10:** Evolución de los fagotipos de *S. typhimurium* durante los años 1995-2000. Datos recogidos del Boletín Epidemiológico Semanal publicado por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III. NT: No tipable; PNR : Patrón No Reconocido.

Aunque *S. typhimurium* se puede subdividir en unos 40 fagotipos diferentes se muestran en este gráfico los más frecuentes (104, 104b, 193, 120, U302) y algunos que a pesar de su baja frecuencia (203, 208) merecen ser mencionados ya que a ellos pertenecen algunas de las cepas en este trabajo.

Como se puede observar en el anterior gráfico el serotipo 104 tuvo su máxima importancia en el año 1998 y desde entonces esta descendiendo al igual que ocurre con el resto de los países Europeos. Pero quizás lo más llamativo es el claro aumento que esta experimentando el fagotipo U302, sustituyendo a otros serotipos hasta entonces más frecuentes como el 120 o el 193. Gran parte de este aumento puede ser debido a la inclusión de dos nuevos fagos (10 y 18) al juego de fagos utilizado habitualmente para la fagotipificación de las cepas ya que un 4,6% de las cepas fagotipo U302 son lisadas únicamente por el fago 10 adicional y sin él, quedaban sin fagotipar; de hecho observamos también desde esta fecha una disminución de las cepas no tipables ( Boletín Epidemiológico Semanal, 1999).

# OBJETIVOS

---

---

Considerando los problemas que plantea la creciente resistencia a antibióticos y la emergencia de nuevos fenotipos multirresistentes en *Salmonella*, nos planteamos en este trabajo los siguientes objetivos:

- Estudiar la evolución de la resistencia a antibióticos en los aislamientos de *Salmonella* obtenidos de las muestras recibidas por el Servicio de Microbiología de la Ciudad Sanitaria “La Paz” durante los últimos 11 años.
- Estudiar la transmisibilidad de los genes implicados en la resistencia a antibióticos de *Salmonella*, determinando su localización cromosómica o plasmídica.
- Investigar las causas de la disminución de sensibilidad a la asociación amoxicilina/clavulánico en *Salmonella*.
- Caracterizar genéticamente las bases de los fenotipos más comunes de resistencia a antibióticos.
- Analizar los marcadores epidemiológicos que permitan establecer relaciones entre las cepas estudiadas de *Salmonella*.

# RESULTADOS

---

## 1. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS RESISTENCIAS EN LA ULTIMA DÉCADA

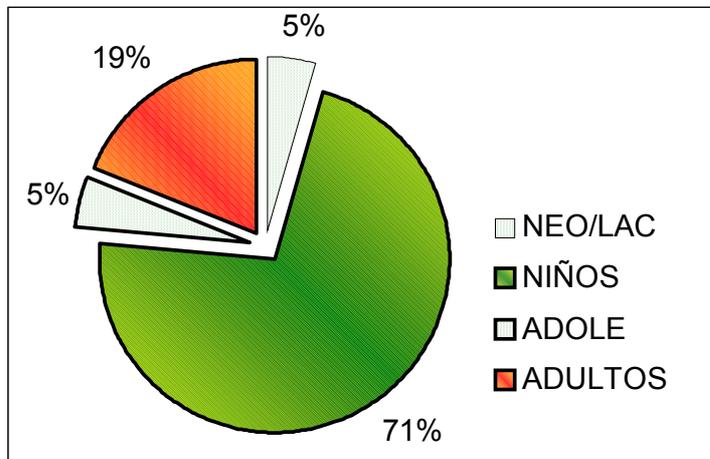
Se estudiaron los datos correspondientes a las muestras recogidas desde el 1 de Enero de 1991 hasta el 31 Diciembre del año 2001 en las que se aisló alguna especie del género *Salmonella*. El total de muestras incluidas en el estudio fue de 3230.

Las muestras fueron recibidas en el Servicio de Microbiología de la Ciudad Sanitaria "La Paz" procedentes de sus cuatro hospitales: H. infantil (274 camas), H. Maternal (194 camas), H. General (620 camas) y Traumatología (234 camas) así como de los servicios de Urgencias y consultas externas.

### 1.1. PACIENTE:

#### 1.1.1. EDADES

La distribución de los aislamientos por edades aparece reflejada en el siguiente diagrama de sectores, en el que se puede observar un claro predominio de aislamientos de *Salmonella* en niños (Figura R.1.1.).



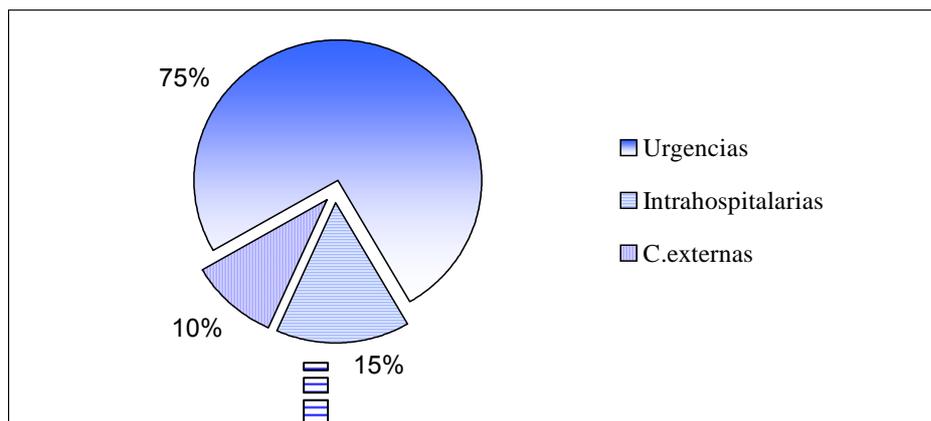
**Figura R.1.1:** Distribución de aislamientos por edades. Neo/Lac: edades comprendidas entre 0-1 año; niños: 1-10; adolescentes: 11-18; adultos: >19años.

#### 1.1.2. SEXO:

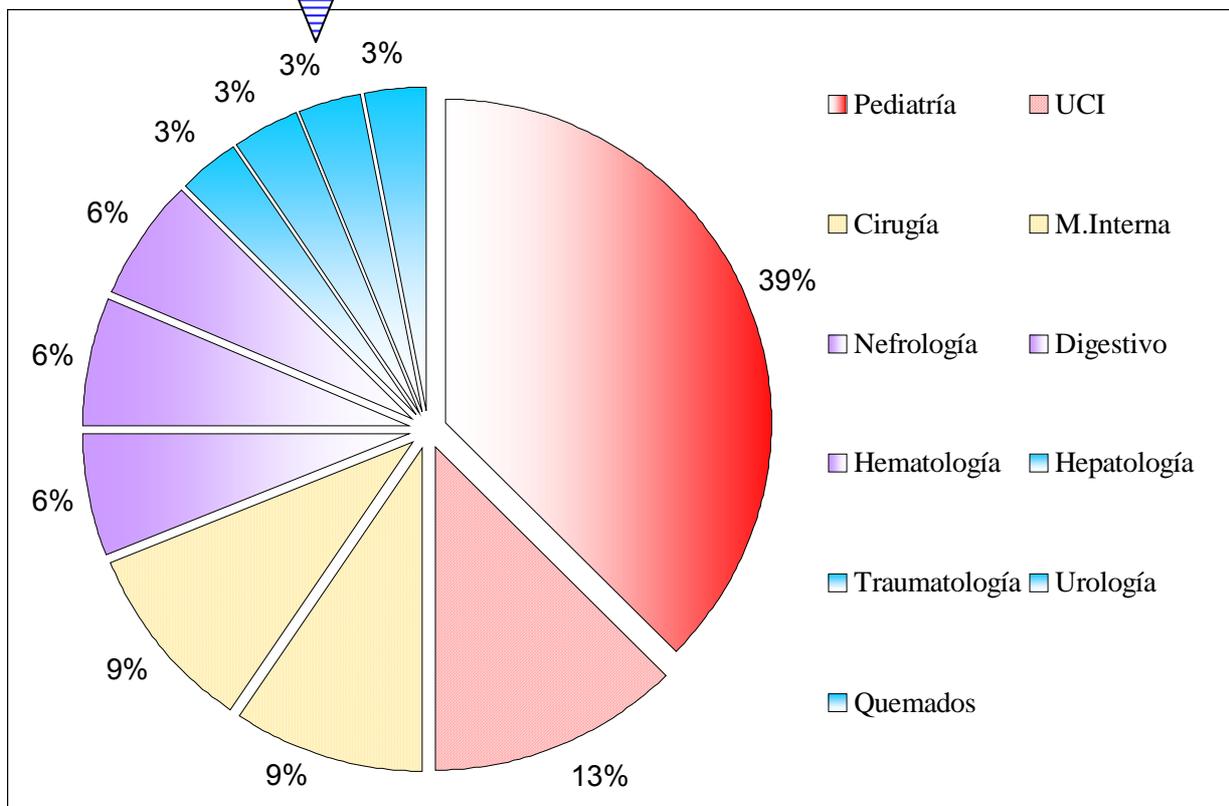
El 48% de los pacientes fueron varones y el 52% restante mujeres.

**1.1.3. DISTRIBUCIÓN POR SERVICIOS:**

Como se puede observar en la figura R.1.2. la mayoría de las muestras son de origen extrahospitalario siendo el mayoritario el servicio de Urgencias seguido de las Consultas externas. Un 15% de las muestras proceden de diversos servicios distribuidos por el hospital como indica la figura 1.3.



**Figura R.1.2:** Distribución de los aislados según la procedencia de las muestras.



**Figura R.1.3:** Distribución del 15% de las muestras de origen intrahospitalario.

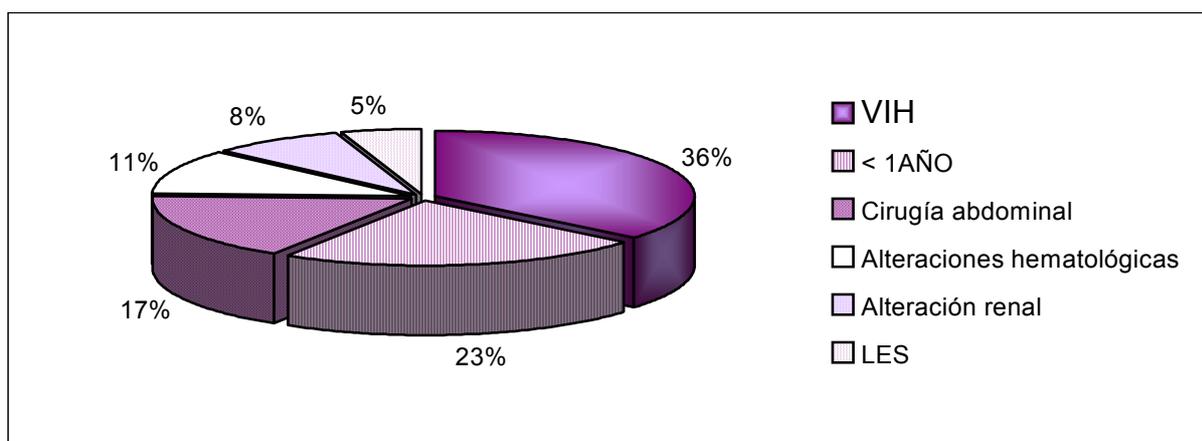
## 1.2. MUESTRA:

- El 93.5% de las muestras en las que se aisló *Salmonella spp.* fueron **heces**.
- Otras localizaciones mucho menos frecuentes aparecen reflejadas en la siguiente tabla así como los serogrupos aislados en cada localización (Tabla R.1.1.).

**Tabla R 1:** Serogrupos aislados en los distintos tipos de muestras.

Serogrupo	Total	Sangre	Orina	L.articular	Bilis	Absceso	Otros	Total
<b>D 9</b>	2034	84	8	1	3	5	1	102
<b>B 4</b>	907	49	2	4	2	3	4	64
<b>C2-8</b>	85	2	1	0	0	0	0	3
<b>C1-7</b>	204	2	0	2	1	1	0	6
	<b>3230</b>	137	11	7	6	9	5	<b>175</b>

- La localización extraintestinal más frecuente fue **la sangre** suponiendo un 4,3% del total de los aislamientos y un 78% de las localizaciones extraintestinales.
- El 5,4% de las cepas pertenecientes al serogrupo B 4, se aislaron en sangre. El porcentaje de cepas pertenecientes al serogrupo D 9 productoras de bacteriemia fue algo menor 4.1%.
- Se revisaron las historias clínicas de los pacientes en los que se aisló *Salmonella* en sangre buscando los factores predisponentes para el desarrollo de la bacteriemia. Los datos más significativos aparecen reflejados en el siguiente diagrama de sectores (Figura R.1.4.)

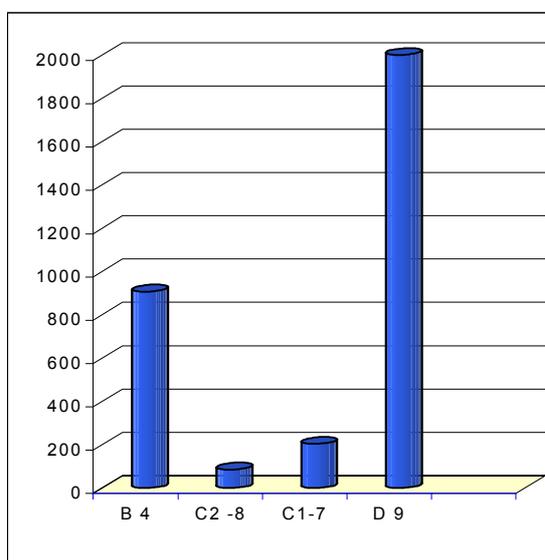


**Figura R.1.4:** Porcentaje de aislados en sangre en distintos grupos de pacientes.

### 1.3. AISLADOS:

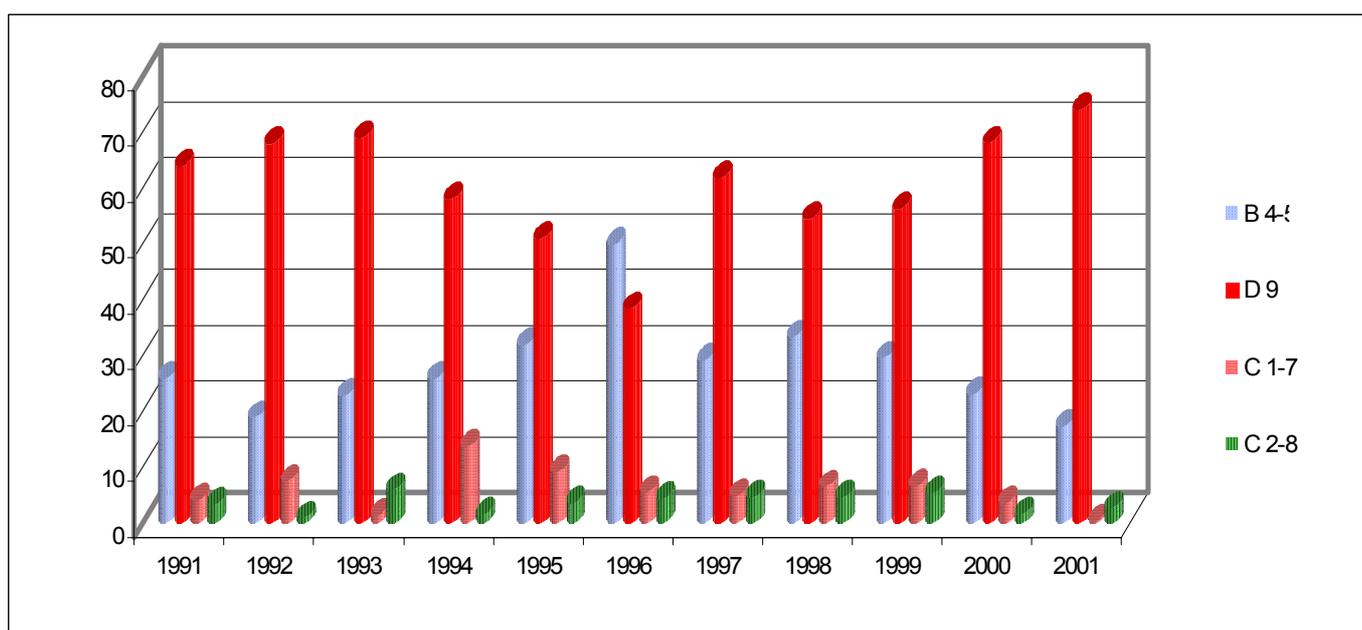
#### 1.3.1. SEROGRUPOS

El serogrupo aislado con mayor frecuencia en esta década es el D 9 seguido por el B 4 y con mucha menos frecuencia los serogrupos C1-7 y C2-8 (Figura R.1.5.).



**Figura R.1.5:** Número total de serogrupos aislados durante la última década.

Si observamos la distribución de serogrupos en los 11 años del estudio observamos que en el año 1996 el serogrupo más frecuentemente aislado fue el B 4 (Figura R.1.6.). El resto de los años predomina, de forma creciente, el serogrupo D 9 llegando a suponer el 74% de los aislamientos del año 2001.

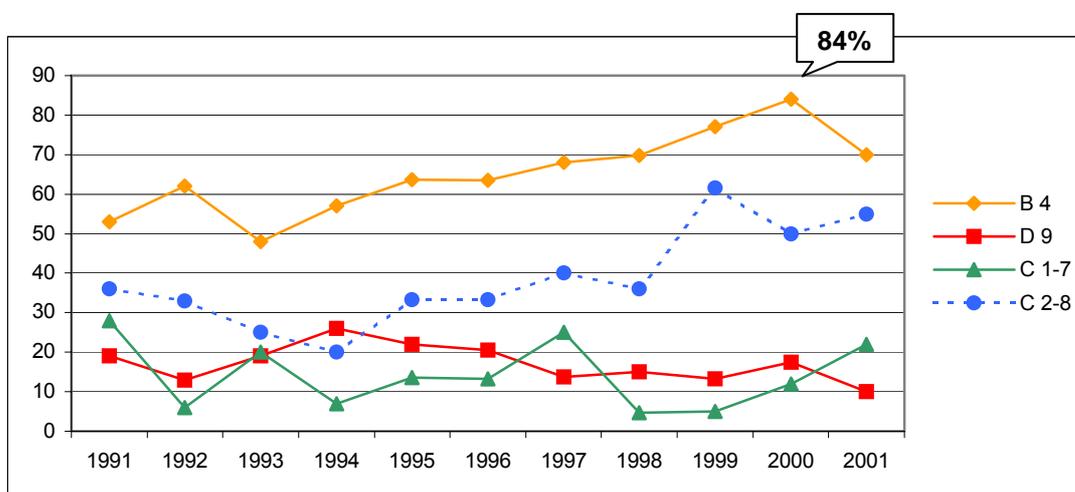


**Figura R.1.6:** Evolución de los serogrupos aislados desde 1991 hasta el año 2001.

### 1.3.2. ANTIBIÓTICOS:

A continuación se evalúa el porcentaje de cepas resistentes a los distintos antibióticos, aisladas cada año, desde 1991 al año 2001. Se analizan por separado los cuatro serogrupos: B 4 D 9, C1-7 y C2-8.

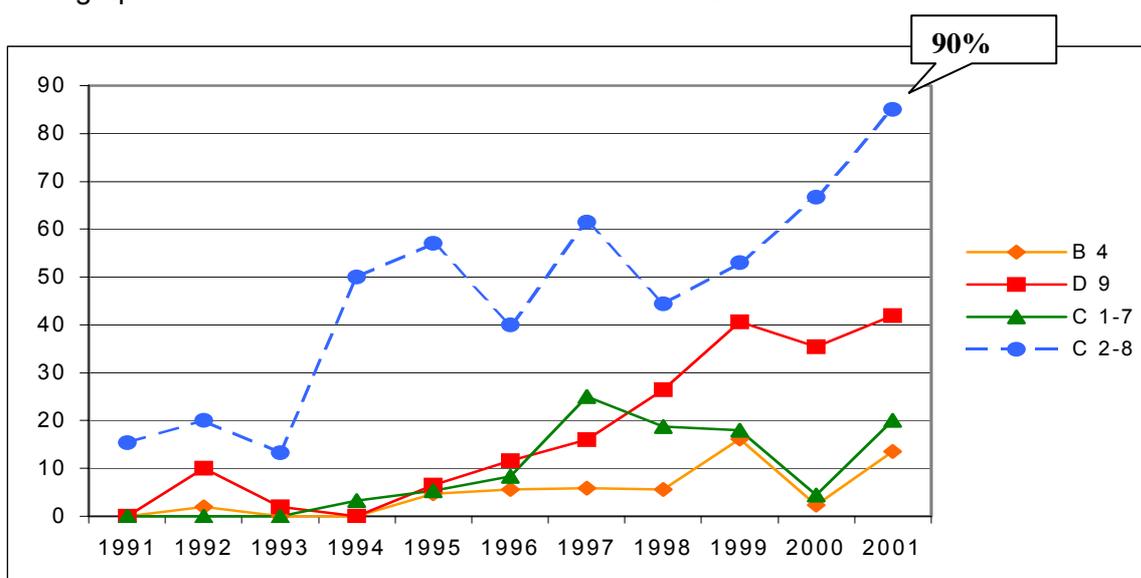
- AMPICILINA: El serogrupo más resistente a este antibiótico fue el B 4 (Figura R.1.7.). La resistencia a ampicilina muestra un ligero aumento en los últimos años para este serogrupo y para el serogrupo C2-8. En el resto de los serogrupos no se observó este gradual aumento en el porcentaje de cepas resistentes.



**Figura R.1.7:** Evolución de la resistencia de los distintos serogrupos a ampicilina.

- CEFAZOLINA: El serogrupo más resistente a este antibiótico resultó ser el C2-8 muy por encima del resto, llegando a un 37% en el año 2000.
- CEFUROXIMA: La resistencia a cefuroxima no superó en ningún caso el 12% y fue más frecuente en el serogrupo B 4.
- CEFOTAXIMA: Únicamente en el último año se aislaron 3 cepas pertenecientes al serogrupo C1-7 resistentes a este antibiótico. En el resto de los años no se aisló ninguna cepa resistente.

- AMOXICILINA / CLAVULÁNICO: El serogrupo más resistente a esta combinación de  $\beta$ -lactámico / inhibidor de  $\beta$ -lactamasas fue el B 4 muy por encima de los otros serogrupos. La resistencia osciló entre un 25% y un 45% de forma aleatoria sin mostrar una clara tendencia ascendente.
- COTRIMOXAZOL: Los serogrupos más resistentes a este antibiótico fueron el B 4 y el C 2-8, oscilando el porcentaje de cepas resistentes entre un 10 y un 30 % en los distintos años de manera aleatoria.
- GENTAMICINA: La resistencia a gentamicina no superó en ningún caso el 9%, observándose un ligero aumento en el serogrupo B 4 en los últimos 3 años llegando al 9,5% en el año 2000. El resto de los serogrupos fueron mayoritariamente sensibles a este antibiótico (>95%).
- ACIDO NALIDÍXICO: El serogrupo más resistente a esta quinolona de primera generación resultó ser el C2-8 (Figura R.1.9.). Se observó una tendencia gradual de todos los serogrupos a aumentar la resistencia en los últimos años.

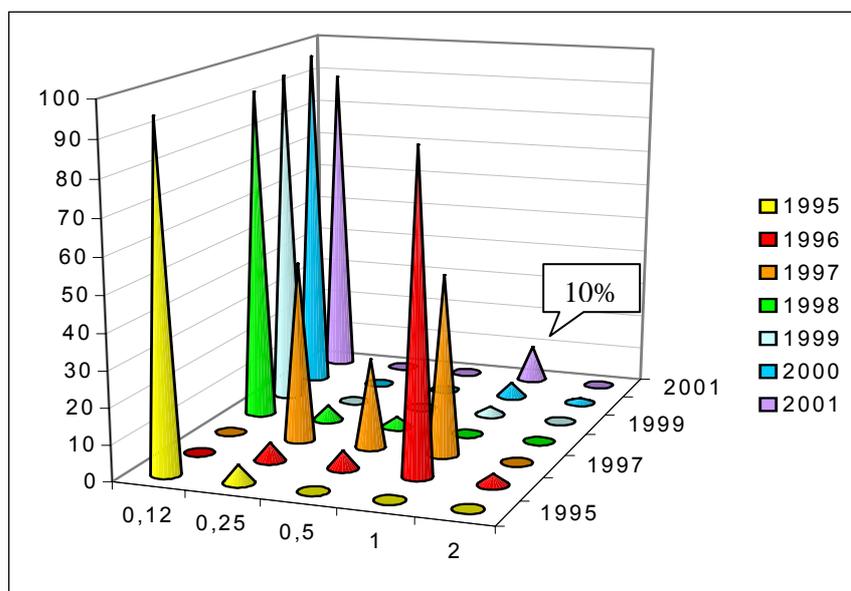


**Figura R.1.8:** Evolución de la resistencia de los distintos serogrupos al ácido nalidíxico.

- CIPROFLOXACINO: Se observó una cepa resistente a ciprofloxacino en el año 1996 perteneciente al serogrupo B 4 y dos en el año 1997, pertenecientes al serogrupo C2-8 . Se estudió con más detalle la evolución las CMI a ciprofloxacino de los distintos serogrupos durante los últimos siete años.

➤ SEROGRUPO B 4

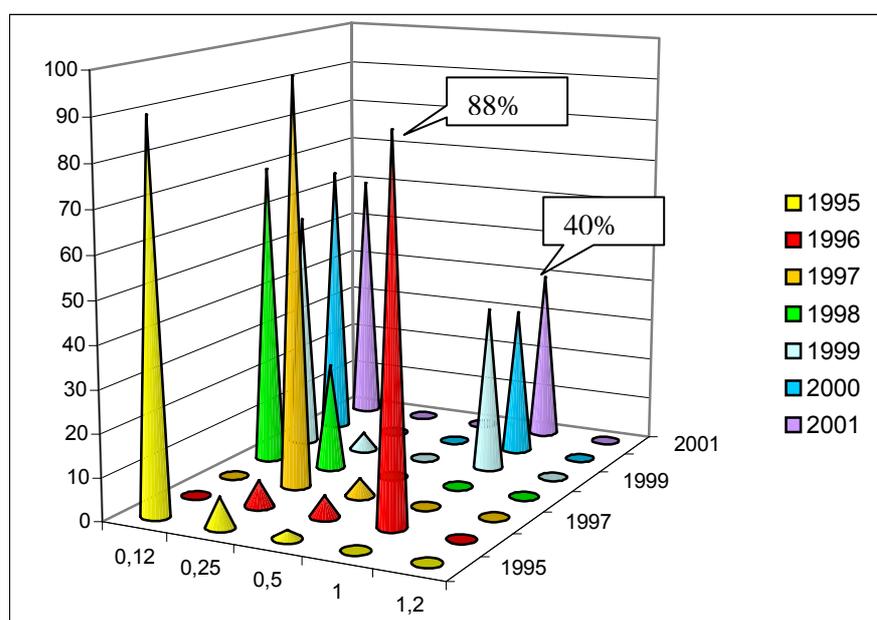
En el año 1995 el 98% de los aislados tenían una CMI  $\leq 0,12 \mu\text{g/ml}$  (Figura R.1.9.). Este dato aumenta considerablemente en el año 1996 en el que el 88% de los aislados elevan su CMI a  $1 \mu\text{g/ml}$ ; en años posteriores se recupera la sensibilidad de 1995 pero en el último año comienzan a aparecer de nuevo algunas cepas con CMI  $1 \mu\text{g/ml}$  (10%)



**Figura R.1.9:**  
Evolución de la CMI a ciprofloxacino para el serogrupo B 4.

➤ SEROGRUPO D 9

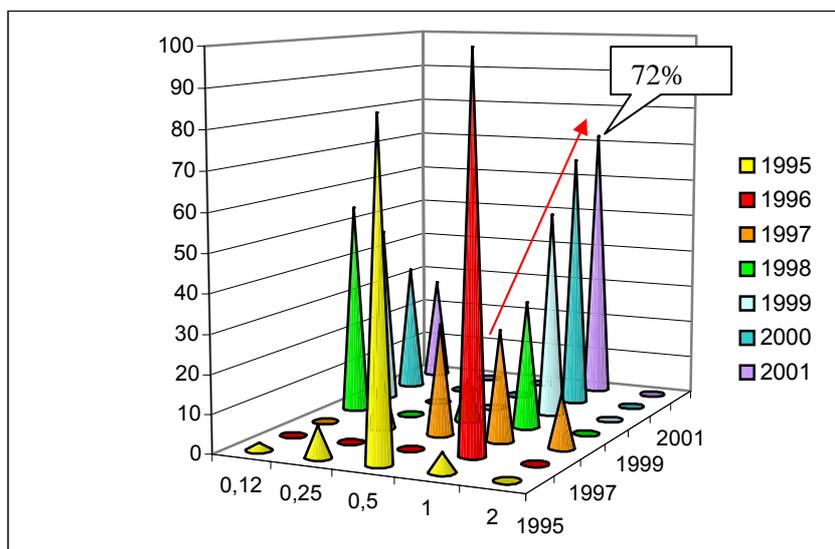
Nuevamente es el año 1996 en el que más cepas (88%) muestran mayores valores de CMI ( $1 \mu\text{g/ml}$ ); en los años siguientes estos valores descienden y es a partir de 1998 cuando observamos un lento y progresivo aumento de cepas con CMIs de  $1 \mu\text{g/ml}$  (Figura R.1.10.).



**Figura R. 1.10:**  
Evolución de la CMI a ciprofloxacino para el serogrupo D 9.

➤ SEROGRUPO C2-8

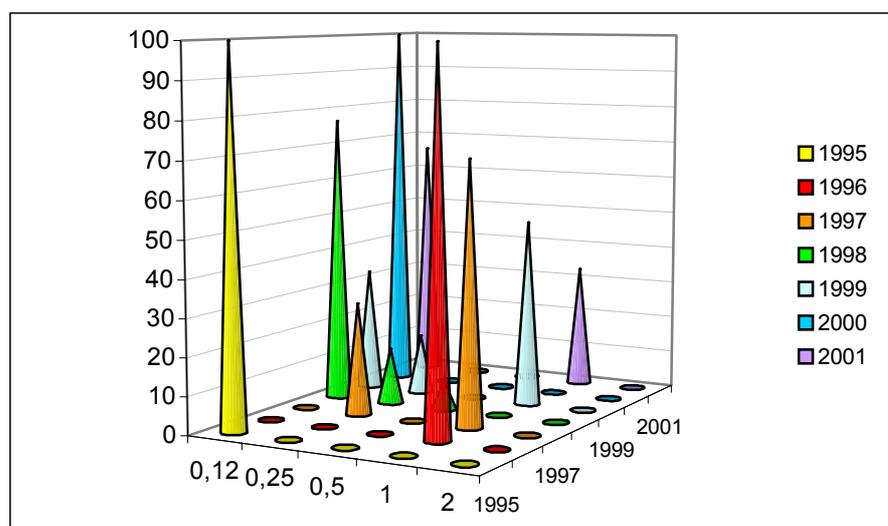
El año de mayor número de cepas con CMI de  $1\mu\text{g/ml}$  es de nuevo el año 1996. En 1997 la resistencia descende y desde ese año, aumenta el porcentaje de aislados con CMI de  $1\mu\text{g/ml}$  de forma progresiva: 28,6, 33, 54, 66,7% (Figura R.1.11.) y finalmente en el año 2001 el 72% de las cepas tienen una CMI de  $1\mu\text{g/ml}$ .



**Figura R.1.11:**  
Evolución de la CMI a ciprofloxacino para el serogrupo C2-8.

➤ SEROGRUPO C1-7

Como se observa en la figura R.1.12., este serogrupo también presenta su mayor CMI en el año 1996 descendiendo hasta alcanzar los valores de 1995 en el año 2000, en el que la mayoría de los aislados tienen una CMI a ciprofloxacino de  $0,12\mu\text{g/ml}$ ; en el último año ha habido de nuevo un porcentaje significativo (29%) de cepas con CMI  $1\mu\text{g/ml}$ .



**Figura R.1.12:**  
Evolución de la CMI a ciprofloxacino para el serogrupo C1-7.

## 2. RESULTADOS DEL ESTUDIO GENÉTICO

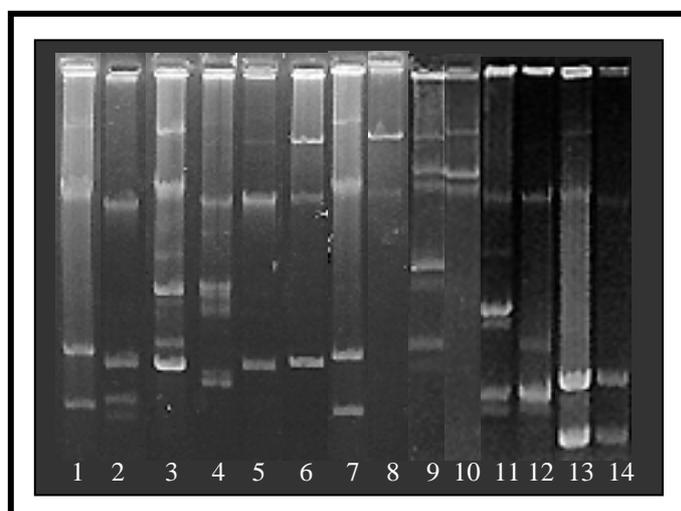
Debido a que el objetivo de esta tesis está centrado en el búsqueda y tipificación de las  $\beta$ -lactamasas presentes en las cepas del estudio, y a que según lo mencionado anteriormente el sergrupo con mayor resistencia a ampicilina es el sergrupo B 4, seleccionamos 33 cepas resistentes a ampicilina pertenecientes a este sergrupo para realizar un estudio molecular detallado de las mismas.

### **ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DE LOS GENES DE RESISTENCIA PRESENTES EN LOS AISLAMIENTOS DE *Salmonella*.**

#### **2.1. CONJUGACIÓN:**

Para detectar si los genes de resistencia presentes en las cepas de *Salmonella* se encontraban en plásmidos conjugativos, se realizó una **conjugación** de las cepas seleccionadas utilizando como receptor *E.coli*  $\alpha$  DH5. Se analizó posteriormente el fenotipo de los transconjugantes obtenidos para verificar si la cepa receptora había adquirido los genes de resistencia presentes en las cepas de *Salmonella* originales (Tabla R.2.1.). El estudio de la sensibilidad a los antibióticos se realizó por el sistema Wider® por duplicado para confirmar los resultados .

La tabla R.2.1. compara la sensibilidad de las cepas de *Salmonella* y los transconjugantes obtenidos. Como se puede observar en la misma, la resistencia a ampicilina fue transmisible en todos los casos. Esto no ocurre con ninguno de los otros antibióticos exceptuando una cepa (5651) en la que también fue transmisible la resistencia a cotrimoxazol. Posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmídico de las cepas de *Salmonella* y sus respectivos transconjugantes y se compararon sus perfiles electroforéticos (Figura R.2.1.).



**Figura R.2.1:** DNA plasmídico de las cepas de *Salmonella* y sus correspondientes transconjugantes

**Carril 1:** *S.typhimurium* 0481  
**Carril 3:** *S.typhimurium* 0901  
**Carril 5:** *S.typhimurium* 0318  
**Carril 7:** *S.typhimurium* 5651  
**Carril 9:** *S.typhimurium* 3828  
**Carril 11:** *S.typhimurium* 3344  
**Carril 13:** *S.typhimurium* 5905  
**Carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12,14:**  
 Correspondientes transconjugantes

**Tabla R.2.1:** Compara los fenotipos de las cepas de *Salmonella* originales y los transconjugantes obtenidos tras la conjugación con *E.coli*  $\alpha$ DH5. Son resultados obtenidos por el Sistema Wider®.

CEPA	Ap	A/C	Cz	Cx	Ge	Na	Ni	Sxt	Tc	Cm
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5	<4 S	<4/2 S	<2 S	<1 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	<1 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 0136	>16 R	8/4 S	4 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	4 S
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 0136	>16 R	4/2 S	<2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	2 S
<i>S.typhimurium</i> 0212	>16 R	16/8 I	8 S	4 S	<2 S	<4 S	>64 R	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 0212	>16 R	4/2 S	4 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 0318	>16 R	16/8 I	<2 S	2 S	<2 S	<4 S	<64 S	>4/76 R	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 0318	>16 R	4/2 S	<2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 0481	>16 R	>32/16 R	4 S	8 I	<2 S	<4 S	>64 R	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 0481	>16 R	8/4 S	4 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	8 S
<i>S.typhimurium</i> 0558	>16 R	>32/16 R	16 I	>16 R	<2 S	<4 S	>64 R	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 0558	>16 R	16/8 I	16 I	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	8 S
<i>S.typhimurium</i> 0901	>16 R	16/8 I	<2 S	8 I	<2 S	<4 S	>64 R	>4/76 R	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 0901	>16 R	8/4 S	4 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	2/38 S	4 S	8 S
<i>S.typhimurium</i> 1837	>16 R	8/4 S	8 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 1837	>16 R	8/4 S	4 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 1838	>16 R	4/2 S	8 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	<1 S	4 S
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 1838	>16 R	4/2 S	4 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 1915	>16 R	8/4 S	8 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	<1 S	4 S
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 1915	>16 R	8/4 S	2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	<1 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 2297	>16 R	8/4 S	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 2297	>16 R	8/4 S	<2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 2600	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 2600	>16 R	8/4 S	<2 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	8 S
<i>S.typhimurium</i> 3344	>16 R	4/2 S	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	4 S
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 3344	>16 R	4/2 S	<2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 3525	>16 R	4/2 S	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 3525	>16 R	4/2 S	<2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 3688	>16 R	16/8 I	4 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 3688	>16 R	8/4 S	<2 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 3828	>16 R	8/4 S	4 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	2 S	8 S
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 3828	>16 R	8/4 S	4 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 4020	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	>4/76 R	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 4020	>16 R	4/2 S	<2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 4965	>16 R	8/4 S	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 4965	>16 R	8/4 S	<2 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S
<i>S.typhimurium</i> 5345	>16 R	16/8 I	<2 S	2 S	<2 S	<4 S	<64 S	>4/76 R	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 5345	>16 R	4/2 S	<2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	2/38 S	2 S	8 S
<i>S.typhimurium</i> 5651	>16 R	<4/2 S	<2 S	8 I	>8 R	<4 S	>64 R	>4/76 R	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 5651	>16 R	4/2 S	2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	>4/76 R	2 S	8 S
<i>S.typhimurium</i> 5905	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>E.coli</i> $\alpha$ DH5 5905	>16 R	4/2 S	<2 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	2 S	4 S

R: resistente; I: intermedio; S: sensible según los puntos de corte de la NCCLS.

La conjugación se realizó en 20 de las 33 cepas del estudio; en 8 casos la conjugación no tuvo éxito y en otros 5 no se pudo realizar por presentar resistencia al ácido nalidíxico la cepas de *Salmonella*. El antibiograma estas 13 cepas aparece en la tabla R.2.2.

**Tabla R.2.2:** Antibiograma de las cepas de *Salmonella* en las que no se produjo la conjugación.

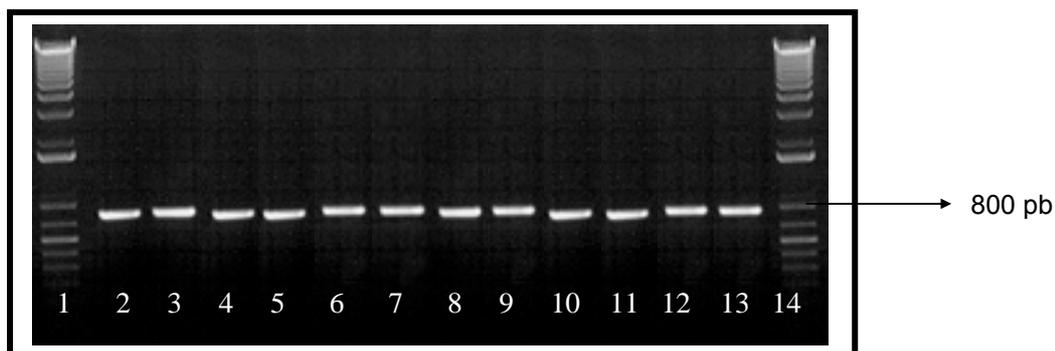
CEPA	Ap	A/C	Cz	Cx	Ge	Na	Ni	Tp	Tc	Cm
<i>S. typhimurium</i> 0113	>16 R	8/4 S	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>S. typhimurium</i> 0388	>16 R	8/4 S	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	<16 S	4 S
<i>S. typhimurium</i> 0929	>16 R	8/4 S	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	4/76 R	>16 R	>8 R
<i>S. typhimurium</i> 1144	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>S. typhimurium</i> 2399	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	4/76 R	>16 R	>8 R
<i>S. typhimurium</i> 3496	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>S. typhimurium</i> 3727	>16 R	4/2 S	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	4 S
<i>S. typhimurium</i> 5636	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	<4 S	<64 S	<2/38 S	>16 R	4 S
<i>S. typhimurium</i> 0511	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	>16 R	4 S
<i>S. typhimurium</i> 0716	>16 R	>32/16 R	2 S	4 S	>8 R	>16 R	>64 R	>4/76 R	>16 R	>8 R
<i>S. typhimurium</i> 1166	>16 R	4/2 S	<2 S	2 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	>16 R	4 S
<i>S. typhimurium</i> 3136	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	>16 R	>64 R	<2/38 S	>16 R	>8 R
<i>S. typhimurium</i> 5055	>16 R	16/8 I	<2 S	4 S	<2 S	>16 R	<64 S	<2/38 S	>16 R	4 S

R: resistente; I: intermedio; S: sensible según los puntos de corte de la NCCLS.

## 2.2. BÚSQUEDA DE $\beta$ -LACTAMASAS TIPO TEM

Según se comenta en la introducción, el mecanismo de resistencia que con más frecuencia justifica un fenotipo similar al observado en nuestras cepas es la producción de  $\beta$ -lactamasas y más concretamente las de tipo TEM. Para verificar si esto ocurre en nuestras cepas, y detectar la presencia del gen que codifica esta enzima, se realizó una amplificación del mismo, utilizando los cebadores TEM-1 y TEM-2 cuya secuencia aparece detallada en la tabla M.3. **El resultado de la amplificación fue positivo en todas la cepas de *Salmonella*** (Fig R.2.2.)

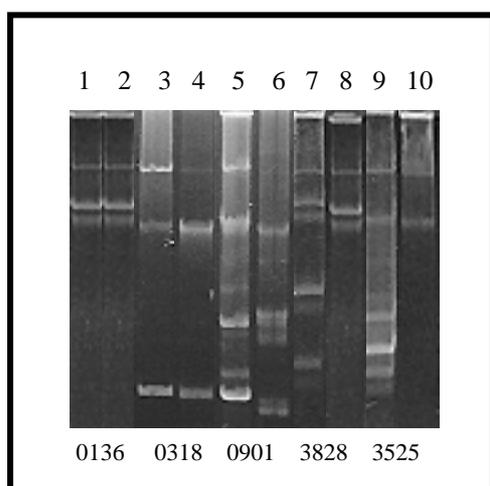
La transmisibilidad de la resistencia a ampicilina observada en la tabla R.2.1. anterior sugiere la presencia del gen *bla*<sub>TEM</sub> en un plásmido conjugativo, responsable del fenotipo observado en los transconjugantes, por lo que se realizó también la amplificación de éste, en las cepas de *E. coli* transconjugantes. **El resultado de la amplificación también fue positivo en los transconjugantes** (Fig R.2.2.)



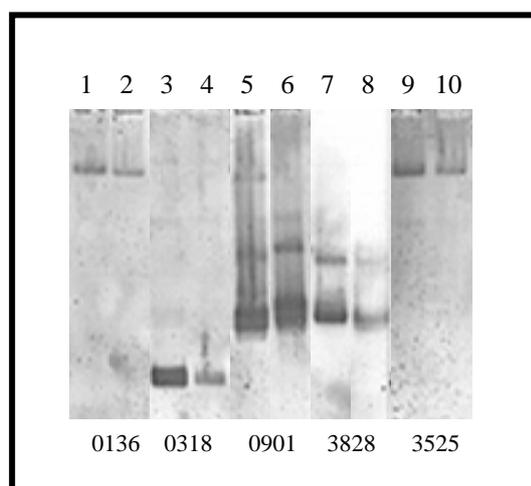
**Figura R.2.2:** PCR del gen *bla*<sub>TEM</sub> de las cepas de *Salmonella* y los correspondientes transconjugantes. **Carriles 1 y 14:** Marcadores de pesos moleculares. **Carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12:** *S. typhimurium* 0212, 0418, 0901, 1838, 1915, 2600; **Carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13:** Transconjugantes correspondientes.

Para verificar la localización plasmídica del gen *bla*<sub>TEM</sub>, se transfirió el DNA plasmídico de las todas las cepas de *Salmonella* y sus respectivos transconjugantes del gel a una membrana de nylon por el método Southern (2.6.1 material y métodos) y posteriormente se realizó una hibridación con sonda específica para TEM según se detalla en el apartado 2.6.3. de material y métodos.

El resultado de dicha hibridación **confirma la presencia del gen *bla*<sub>TEM</sub> en un plásmido conjugativo** ya que se detecta su presencia tanto en las cepas de *Salmonella* como en las resultantes de la conjugación como se ilustra en las figuras R.2.3. y R.2.4.



**Figura R.2.3.** Extracción de DNA plasmídico. **Carriles 1, 3, 5, 7, 9** cepas de *Salmonella*. **Carriles 2, 4, 6, 8, 10** cepas de correspondientes transconjugantes.



**Figura R.2.4:** Hibridación del DNA plasmídico con la sonda TEM. **Carriles 1, 3, 5, 7 y 9** cepas de *Salmonella*. **Carriles 2, 4, 6, 8 y 10** correspondientes transconjugantes.

Tanto los estudios de amplificación como los de hibridación **confirman la presencia del gen que codifica  $\beta$ -lactamasas tipo TEM en un plásmido conjugativo.**

Este tipo de  $\beta$ -lactamasas, es inhibida por el ácido clavulánico, y sin embargo nuestras cepas muestran una sensibilidad disminuída a la combinación amoxicilina / clavulánico. Una de las causas que puede justificar este hecho es la presencia de mutaciones en la  $\beta$ -lactamasa original, dando lugar a las llamadas IRT (Inhibitor Resistant TEM), resistentes a la acción de los inhibidores, como se menciona detalladamente en el apartado 8.3. de la introducción. Para definir que tipo de enzima es la codificada por el gen presente en nuestras cepas se procedió a la secuenciación del producto de PCR obtenido de la amplificación realizada con los cebadores TEM-1 y TEM-2 (Tabla M.3.) de una cepa escogida entre las que presentaban resistencia a la combinación amoxicilina / clavulánico (0481). Se repitió la secuencia en distintas ocasiones para resolver ambigüedades y se diseñaron cebadores internos que permitieran una mayor exactitud en la secuencia del gen. Esta secuencia con los cebadores internos se hizo partiendo del DNA plasmídico y no del producto de PCR para una mejor secuenciación de los extremos del gen como se indica en la figura M.2.

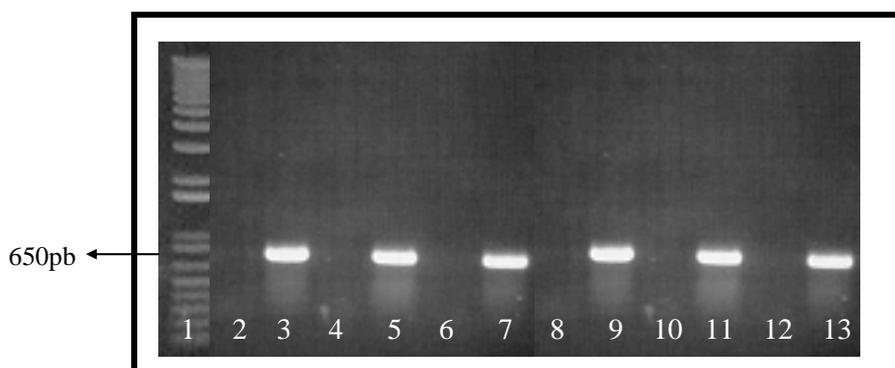
La secuencia obtenida muestra una similitud del 100% con la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 de *E.coli* según los resultados del BLAST (número de acceso P00810); se ha prestado especial atención a los aminoácidos mutados en las IRT y que aparecen subrayados en rojo en la secuencia que ilustra la figura R.2.5.

```
MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMM
STFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAA
NLLTTIGGPKELTAFLHNMGDHSVTRLDRWEPELNEAIPNDERDTTMPAAMATTLRKLTLGELLTLA
SRQQLIDWMEADKVAGPLLRALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQA
TMDERNRQIAEIGASLIKHW
```

**Figura R.2.5.** Secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -lactamasa.

Algunos autores han descrito la presencia de genes de resistencia en el plásmido de virulencia de *S. typhimurium*. Este plásmido ha transportado genes de resistencia como el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> entre distintos microorganismos gracias a su carácter conjugativo, según sugieren, Llanes et al., (1999).

Ante la posibilidad de que el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> en nuestras cepas se encontrara en este plásmido, se realizó la amplificación del gen *spvC* de las cepas de *Salmonella* y sus respectivos transconjugantes utilizando los cebadores SPV-1 y SPV-2 (tabla M.3.). La amplificación fue positiva en todas las cepas de *Salmonella* y negativa en todos los transconjugantes estudiados (figura R.2.6). **Estos resultados excluyen la presencia del gen *bla*<sub>TEM-1</sub> en el plásmido de virulencia.**



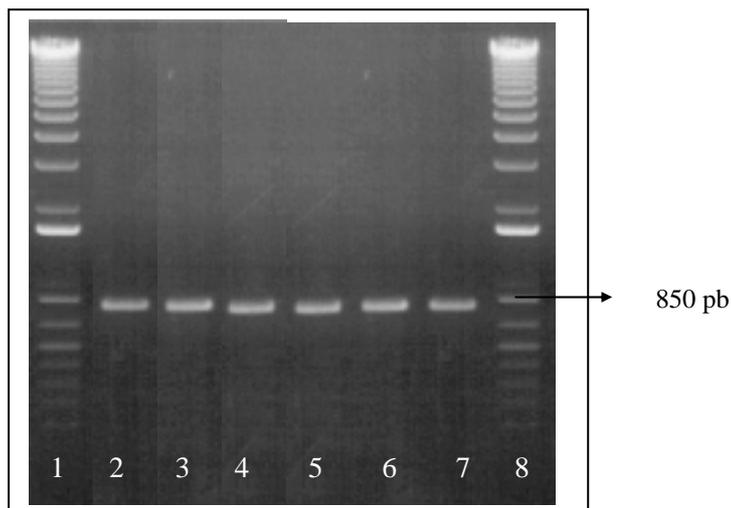
**Figura R.2.6.** Amplificación del gen *spvC* de las cepas de *Salmonella* y sus transconjugantes. **Carril 1:** Marcador de pesos moleculares. **Carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13:** *S. typhimurium* 0212, 0418, 0901, 1838, 1915, 2600. **Carriles: 2, 4, 6, 8, 10, 12:** transconjugantes correspondientes.

### 2.3. BÚSQUEDA DE $\beta$ -LACTAMASAS TIPO PSE

La presencia del gen *bla*<sub>TEM-1</sub> por sí solo, no justifica el fenotipo de resistencia observado en nuestras cepas, ya que, como comentamos antes, codifica una  $\beta$ -lactamasa perteneciente al grupo 2b que es inhibida por el ácido clavulánico. Las cepas deberían presentar CMI < 4/2 $\mu$ g/ml frente a este antibiótico y los valores de CMI de nuestras cepas para la asociación amoxicilina / clavulánico oscilan entre 8/4 y 32/16  $\mu$ g/ml.

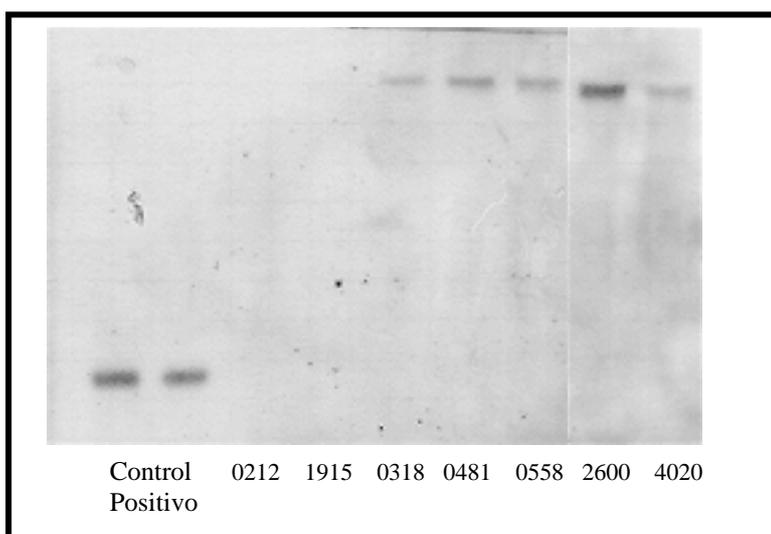
Descartada la presencia de IRT, buscamos en nuestras cepas la presencia de algún otro tipo de  $\beta$ -lactamasa que pueda justificar ese fenotipo. En ocasiones se ha descrito un fenotipo similar asociado a la presencia de más de un tipo de enzima entre los que se incluye la enzima PSE.

Para detectar la presencia del gen *bla*<sub>PSE-1</sub> se realizó una amplificación utilizando los cebadores PSE-1 y PSE-2 (Tabla M.3) de las cepas de *Salmonella* y sus respectivos transconjugantes, para ver si la localización de este gen era también un plásmido conjugativo. El resultado de la PCR fue positivo en el 53% de las cepas de *Salmonella* (Figura R.3.1.) y en ninguno de los transconjugantes se amplificó el gen *bla*<sub>PSE-1</sub>.



**Figura R.3.1.** Reacción en cadena de la polimerasa para amplificación de la  $\beta$ -lactamasa PSE en las cepas de *Salmonella*. **Carril 1 y 8:** Marcadores de pesos moleculares. **Carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7:** 2399, 2600, 2297, 4020, 4965 y 5345.

Para verificar estos resultados se hibridaron las membranas de DNA plasmídico de la misma forma que antes, esta vez con la sonda PSE. Esta hibridación fue negativa en todos los casos. Se procedió por ello a la restricción del DNA cromosómico de las cepas de *Salmonella* con la enzima de restricción EcoRV y posterior transferencia del mismo a la membrana, para su hibridación con la sonda PSE (2.6.1. material y métodos). Los resultados de este hibridación (Figura R.3.2.) **confirman la presencia del gen  $bla_{PSE-1}$  en el DNA cromosómico** lo que justificaría la no transmisibilidad del mismo en los experimentos de conjugación.



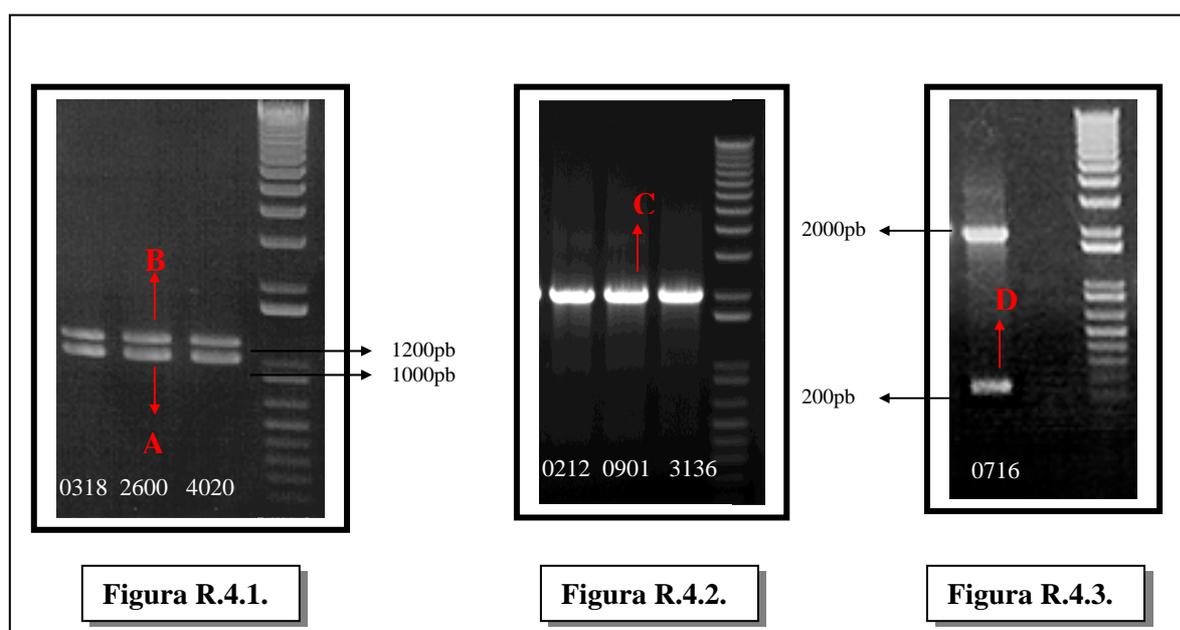
**Figura R.3.2.** Hibridación del DNA cromosómico cortado con la enzima Eco RV de las cepas de *Salmonella* con la sonda PSE.

Descartados los plásmidos conjugativos como vehículos del gen *bla*<sub>PSE-1</sub>, buscamos otros elementos genéticos capaces de integrar estos genes de resistencia en el genoma bacteriano. El papel de los integrones en la diseminación de resistencias es de gran importancia y son muchas las publicaciones que describen integrones que transportan distintos genes de resistencia entre los que se encuentra el gen *bla*<sub>PSE-1</sub> (Poirel *et al.*, 1999; Verdet *et al.*, 2000). Un buen ejemplo de ello es la presencia de estos integrones portando genes de resistencia en el fagotipo DT 104 de *S. typhimurium* lo que le confiere un fenotipo multirresistente característico (ApCmSmSuTc).

## 2.4. DETECCIÓN DE INTEGRONES

Para detectar la presencia de integrones en nuestras cepas, realizamos una PCR de las mismas utilizando los cebadores 5'CS y 3'CS denominados I-1 e I-2 respectivamente (Tabla M.3.) que corresponden a las regiones conservadas 5' y 3' de los integrones de clase 1, los más frecuentes en aislados de muestras clínicas. Como productos de PCR observamos tres tipos de perfiles:

- Aquellas cepas en las que se observan dos amplicones de 1000 pb (A) y 1200 pb (B) respectivamente (Figura R.4.1.).
- Aquellas con un único amplicón de mayor tamaño unas 2000 pb aproximadamente (C) (Figura R.4.2.).
- En una cepa se observó el amplicón de 2000 pb junto a otro amplicón (D) de menor tamaño (200 pb aprox) (Figura R.4.3.).



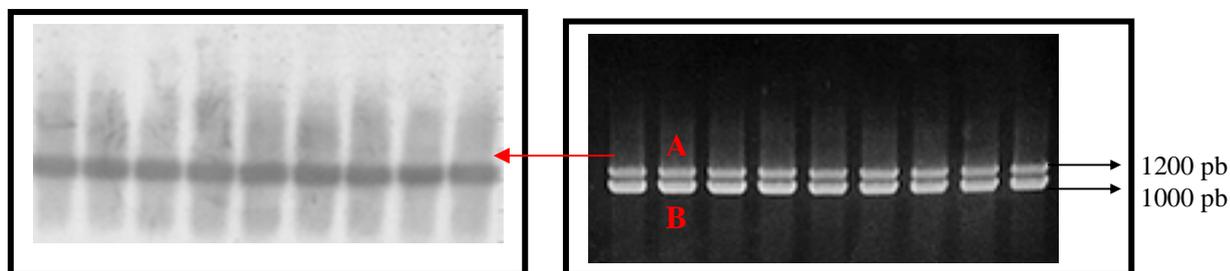
Distintos perfiles observados como consecuencia de la amplificación con los cebadores I-1 e I-2.

Observamos que la presencia de un tipo u otro de amplicón está relacionada con el fenotipo y la presencia o ausencia de PSE. Así, las cepas con PCR positiva para PSE poseen los amplicones A y B, y todas las cepas que poseen el amplicón C, carecen del gen *bla*<sub>PSE-1</sub> (Tabla R.3).

**Tabla R.3.** Relación entre en fenotipo y la presencia de un tipo u otro de amplicón. También se muestra el resultado de la PCR para detectar el gen *bla*<sub>PSE-1</sub>.

CEPA	PSE	AMPLICÓN				FENOTIPO de resistencias
		A	B	C	D	
0113	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
0318	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTcSxt
0481	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTcA/cNi
0558	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTcCxNi
0929	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTcSxt
1144	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
2297	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
2399	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTcSxt
2600	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
3496	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
3688	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
4020	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTcSxt
4965	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
5055	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTcNa
5345	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
5636	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
5905	+	+	+	-	-	ApCmSmSuTc
5651	-	-	-	-	-	ApCmSmSuTcGNiSxt
0212	-	-	-	+	-	ApCmSmSuTcNi
0511	-	-	-	+	-	ApSmSuTcNa
0716	-	-	-	+	+	ApCmSmSuTcA/cGNaNiToSxt
0901	-	-	-	+	-	ApCmSmSuTcNiSxt
3136	-	-	-	+	-	ApCmSmSuTcNiNa
0136	-	-	-	-	-	ApTc
0388	-	-	-	-	-	ApNaTc
1166	-	-	-	-	-	ApNaTc
1837	-	-	-	-	-	Ap
1838	-	-	-	-	-	Ap
1915	-	-	-	-	-	Ap
3344	-	-	-	-	-	ApTc
3525	-	-	-	-	-	Ap
3727	-	-	-	-	-	ApTc
3828	-	-	-	-	-	Ap

Ya que todas las cepas en las que se amplifica el gen *bla*<sub>PSE-1</sub> poseen dos tipos de integrones, se realizó la hibridación de una membrana, donde previamente se habían transferido los dos amplicones obtenidos, con la sonda PSE para localizar el gen en uno de los amplicones.



**Figura R.4.4.** Hibridación de los amplicones con la sonda PSE. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: 0113, 0318, 0481, 0558, 0929, 1144, 2399, 2600.

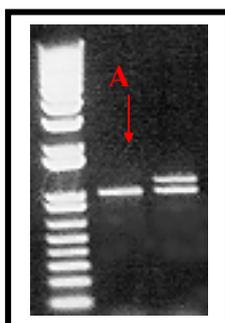
**Figura R.4.5.** Amplificación de las cepas de *Salmonella* utilizando los cebadores I-1 e I-2. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: 0113, 0318, 0481, 0558, 0929, 1144, 2399, 2600.

El resultado de la hibridación **localiza el gen *bla*<sub>PSE-1</sub> en el amplicón de mayor tamaño (1200 pb) denominado B** como se puede observar en las figuras R.4.4. y R.4.5.

## 2.4.1. SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS POSIBLES INTEGRONES

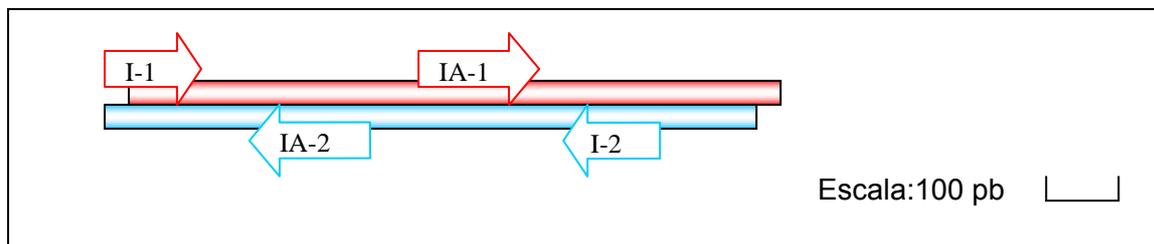
### 2.4.1.1. SECUENCIACIÓN DEL AMPLICÓN A.

Debido a la proximidad de los dos amplicones (A y B) en el gel por su similar tamaño, se procedió a la electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % para conseguir una mayor separación de las bandas. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa sin bromuro de etidio a 50 mV durante 3 horas. Se eluyó la banda correspondiente al amplicón de menor tamaño y tras su purificación se realizó una nueva amplificación (PCR) con los cebadores I-1 e I-2 (Tabla M.3) para amplificar el resultado de la elución. (Figura 2.4.6.)



**Figura R.4.6.** Electroelución del amplicón A para su posterior secuenciación.

Para obtener la secuencia completa del amplicón en doble cadena y sin ambigüedades se diseñaron los cebadores internos IA-1 e IA-2 (Figura R.4.7.) cuya secuencia aparece detallada en el apartado 2.9.2.1 de material y métodos.



**Figura R.4.7:** Estrategia utilizada para la secuenciación del amplicón A y la localización de los cebadores internos diseñados.

### SECUENCIA COMPLETA DEL AMPLICÓN A:

27.911

	pnt-1	pnt-2		pnt-2	pnt-3
--	-------	-------	--	-------	-------

```

atggttatggagcagcaacgatgttacgcagcagggcagtcgccctaaaacaaagttagacatcatgagggtagcg
                                AadA2 → M R V A
gtgaccatcgaaatttcgaaccaactatcagaggtgctaagcgtcattgagcgccatctggaatcaacgttgctg
V T I E I S N Q L S E V L S V I E R H L E S T L L
gccgtgcatttgtagggctccgcagtgatggcggcctgcagccatacagcgatattgatttggttggtactgtg
A V H L Y G S A V D G G L Q P Y S D I D L L V T V
gccgtaaagcttgatgaaacgacgcggcgagcattgctcaatgaccttatggaggcttcggctttccctggcgag
A V K L D E T T R R A L L N D L M E A S A F P G E
agcgagacgctccgcgctatagaagtcacccttgctcgtgcatgacgacatcatcccgtggcggttatccggctaag
S E T L R A I E V T L V V H D D I I P W R Y P A K
cgcgagctgcaatttgagaatggcagcgcaatgacattcttgcgggatcttcgagccagccatgatcgacatt
R E L Q F G E W Q R N D I L A G I F E P A M I D I
gatctagctatcctgcttacaaaagcaagagaacatagcgttgcccttggttaggtccggcagcggaggaattcttt
D L A I L L T K A R E H S V A L V G P A A E E F F
gaccgggttccctgaacaggatctattcgagggcgtgagggaaaccttgaagctatggaactcgcagcccgactgg
D P V P E Q D L F E A L R E T L K L W N S Q P D W
gccggcgatgacgaaatgtagtgcttacggtcccgctttggtacagcgcaataaccggcaaaatcgcgccg
A G D E R N V V L T L S R I W Y S A I T G K I A P
aaggatgctcgtgcccactgggcaataaaacgcctacctgccagtatcagcccgtcttacttgaagctaagcaa
K D V A A D W A I K R L P A Q Y Q P V L L E A K Q
gcttatctgggacaaaagaagatcacttggcctcacgcgcagatcacttgaagaatttatttcgctttgtgaaa
A Y L G Q K E D H L A S R A D H L E E F I R F V K
ggcgagatcatcaagtcagttggtaaatgatgtctaacaattcgttcaagccgaccgcgctacgcgcgggcgctt
G E I I K S V G K *
aactccggcggttagatgcactaagcacataattgctcacagccaaactatca
                                |
                                28.886

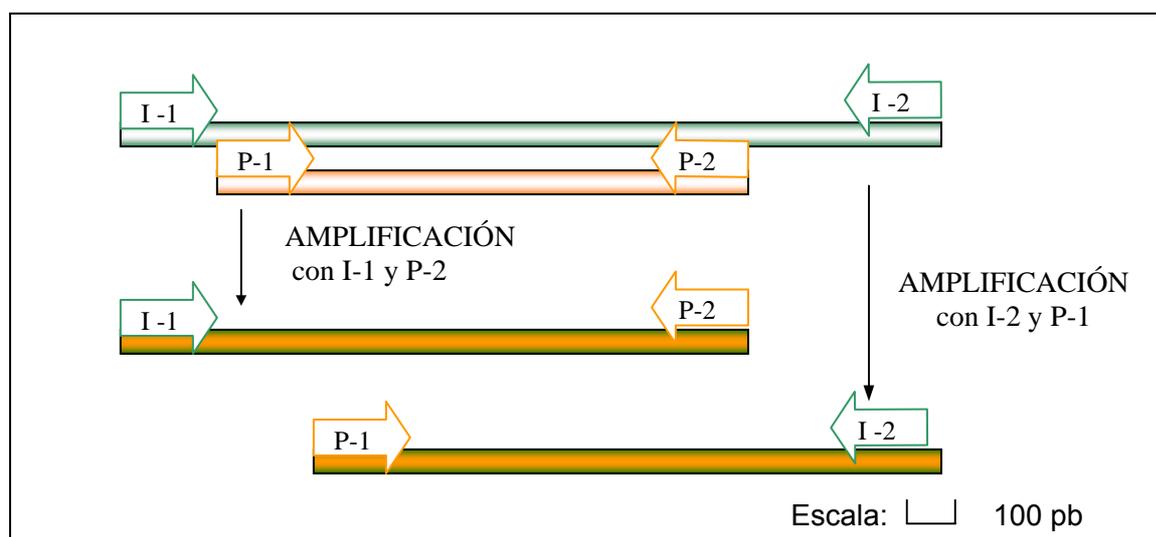
```

**Fig. R.4.8:** Secuencia del amplicón A que se corresponde con los nt 27.911 a 28.886 de la Isla Genómica de resistencia (SGI-1) *Salmonella typhimurium* (AF261825), y secuencia deducida de aminoácidos del producto del gen *aadA2*. Las diferencias entre ambas secuencias se han sombreado en rojo. Se indican también los pentanucleótidos correspondientes al sitio de integración *aatI*. El cebador interno utilizado para completar la secuenciación (I-A1) aparece en letra roja.

### 2.4.1.2. SECUENCIACION DEL AMPLICÓN B.

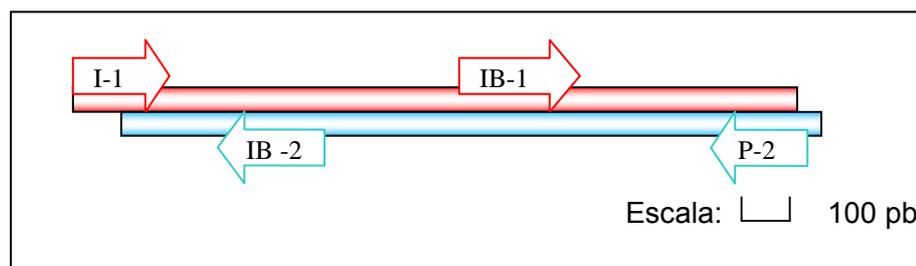
Para la secuenciación de este segundo amplicón se utilizó la misma técnica que para la secuenciación del amplicón A y se intentó la elución de la banda aunque sin éxito, ya que al realizar la amplificación de la banda eluída se obtuvieron de nuevo los dos amplicones, probablemente por arrastre de la banda pequeña. Por ello se intentó una nueva estrategia:

Basándonos en los resultados de la hibridación mostrados anteriormente (Figura 2.4.4) que demuestran la presencia del gen *bla<sub>PSE-1</sub>* en este amplicón se realizó una PCR según ilustra la figura R.4.9., utilizando los cebadores I-1 y P-2 y otra con los cebadores I-2 y P-1. El resultado de la amplificación fue una banda de 1000 pb que se electroeluyó para su posterior secuenciación.



**Figura R.4.9.** Esquema de la obtención del amplicón B para su posterior secuenciación.

Para obtener la secuencia completa del amplicón en doble cadena y sin ambigüedades se diseñaron los cebadores internos IB-1 e IB-2 cuya secuencia aparece detallada en el apartado 2.9.2.1 de material y métodos (Figura R.4.10.).



**Figura R.4.10.** Estrategia utilizada para la secuenciación del amplicón B y localización de los cebadores internos diseñados.

## SECUENCIA COMPLETA DEL AMPLICÓN B:

```

37.207
|          pnt-1      pnt-2                pnt-2      pnt-3
atgttatggagcagcaacgatgttacgcgcagggcagtcgccctaaaacaaagttagccatattatggagcctc

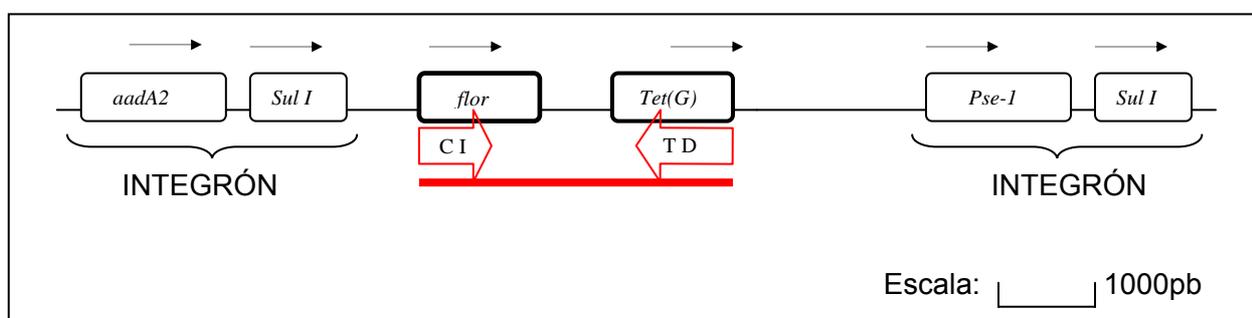
atgcttttatataaaaatggtgtgacaatcaaaattatggggttacttacatgaagtttttattggcatttttcgctt
                                Pse-1 → M K F L L A F S L
ttaataccatccgtggtttttc caagtagttcaaagtttcagcaagttgaacaagacgttaaggcaattgaagtt
L I P S V V F P S S S K F Q Q V E Q D V K A I E V
tctctttctgctcgtataggtgtttccgcttcttgatactcaaaatggagaatattgggattacaatggcaatcag
S L S A R I G V S V L D T Q N G E Y W D Y N G N Q
cgcttcccgttaacaagtacttttaaaacaatagcttgcgctaaattactatatgatgctgagcaaggaaaagtt
R F P L T S T F K T I A C A K L L Y D A E Q G K V
aatcccaatagtagcagtcgagattaagaaagcagatcttgtgacctattcccctgtaatagaaaagcaagtaggg
N P N S T V E I K K A D L V T Y S P V I E K Q V G
caggcaatcacactcgatgatgctgcttcgcaactatgactacaagtgataatactgctggcaaatatcatccta
Q A I T L D D A C F A T M T T S D N T A A N I I L
agtgctgtaggtggccccaaaggcggttactgattttttaagacaaattg cggacaaagagactcgctc tagaccgt
S A V G G P K G V T D F L R Q I A D K E T R L D R
atgagcctgat ttaaatgaaggtgaagctcgggtgatttgagggatacgaactcctaaggcaatagccagttact
I E P D L N E G K L G D L R D T T T P K A I A S T
ttgaataaatttttatttggttccgcgctatctgaaatgaaccagaaaaaattagagtccttggtggtgaacaat
L N K F L F G S A L S E M N Q K K L E S W M V N N
caagtcactggtaatttactacgcttcagttatgcccggcgggatggaacattgctggatcgctcaggtgctggcggga
Q V T G N L L R S V L P A G W N I A D R S G A G G
ttggtgctcggagtattacagcagttgtgtggagtgagcatcaagcccccaattattgtgagcatctatctagct
F G A R S I T A V V W S E H Q A P I I V S I Y L A
caaacacaggcttcaatggcagagcgaaatgatgctgattgttaaaattggtcattcaatttttgacggtttataca
Q T Q A S M A E R N D A I V K I G H S I F D V Y T
tcacagtcgctgataaggctaacaaggccatcaagttgacggcttttccgctcgcttggtttgtggtttaacgc
S Q S R *
tacgctaccacaaaacaatcaactccaagccgcaacttatggcggcgttagatg
|
38.312

```

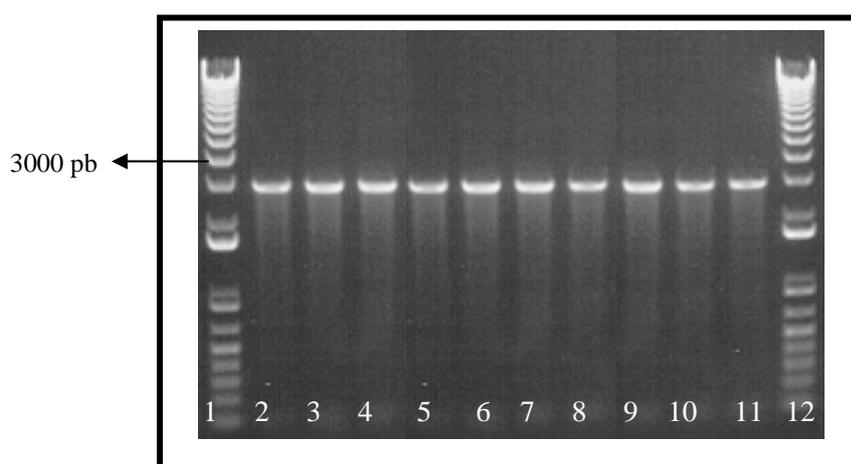
**Figura R.4.11:** Secuencia del amplicón B, que se corresponde con los nt 37.207 a 38.312 de la Isla Genómica de resistencia (SGI-1) *Salmonella typhimurium* (AF261825), y secuencia deducida de aminoácidos del producto del gen *bla*<sub>PSE-1</sub>. Las diferencias entre ambas secuencias se han sombreado en rojo. Se indican también los pentanucleótidos correspondientes al sitio de integración *aatI*. El cebador interno utilizado para completar la secuenciación (I-B1) aparece en letra roja.

Como muestran los resultados de los BLAST, anteriormente mencionados, los amplicones A y B guardan similitudes mayores al 99% con integrones presentes en la isla genómica I (SGI 1) de *S. typhimurium*. En esa región y entre los genes que codifican dichos integrones se encuentran los genes *flo* y *tet* implicados en la resistencia a cloranfenicol y tetraciclina respectivamente.

Debido a que nuestras cepas que poseen esos integrones muestran resistencia a tetraciclina y cloranfenicol (Tabla R.3.) realizamos la búsqueda de estos genes amplificando una región que comprendiera a ambos. Los cebadores utilizados para la amplificación se localizan en dicha región de resistencia como indica la figura (R.4.12) y su secuencia viene detallada en la tabla M.3.



**Figura R.4.12:** Mapa de la región de resistencias de la isla SGI 1 *S. typhimurium*. La orientación de los genes se indica con flechas y la ubicación de los cebadores así como la región amplificada se muestran en rojo.



**Carril 1 y 12:** Marcadores de pesos moleculares.

**Carril 2:** *S.typhimurium* 0113

**Carril 3:** *S.typhimurium* 0318

**Carril 4:** *S.typhimurium* 0481

**Carril 5:** *S.typhimurium* 1144

**Carril 6:** *S.typhimurium* 2297

**Carril 7:** *S.typhimurium* 2399

**Carril 8:** *S.typhimurium* 2600

**Carril 9:** *S.typhimurium* 4020

**Carril 10:** *S.typhimurium* 5636

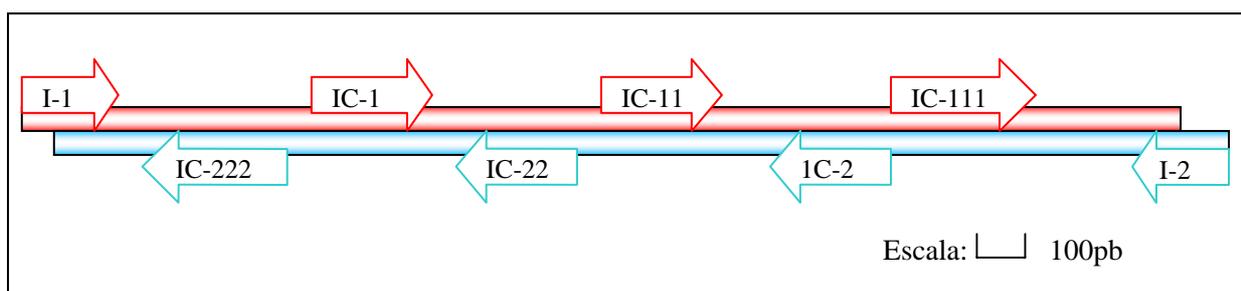
**Carril 11:** *S.typhimurium* 5905

**Figura R.4.13.** Amplificación de los genes *flo* y *tet*.

El resultado de la amplificación fue **positivo en todas las cepas que poseían los integrones A y B** (Figura R.4.13). En el resto de las cepas el resultado fue negativo independientemente del fenotipo de resistencia observado. En las cepas resistentes a cloranfenicol y tetraciclina pero con ausencia de estos integrones (0212, 0716, 0901, 3136, 5651) la PCR fue negativa.

### 2.4.1.3. SECUENCIACIÓN DEL AMPLICÓN C.

Para la secuenciación de este amplicón se realizó la electroforesis en un gel de agarosa sin bromuro de etidio a 50 mV durante 3 horas. Se eluyó la banda correspondiente al amplicón y tras su purificación se realizó una nueva amplificación (PCR) con los cebadores I-1 e I-2 (Tabla M.3) para amplificar el resultado de la elución. Para obtener la secuencia completa del amplicón en doble cadena y sin ambigüedades se diseñaron los cebadores internos IC-1, IC-11, IC-111 e IC-2, IC-22 e IC-222 (Figura R.4.14) cuya secuencia aparece detallada en el apartado 2.9.9.2. de material y métodos.



**Figura R.4.14.** Estrategia utilizada para la secuenciación del amplicón C y localización de los cebadores internos diseñados.

A pesar de que lo descrito por otros autores (Tosini *et al.*, 1998; Carattoli *et al.*, 2001) y lo encontrado en el BLAST anteriormente mencionado, los resultados de la conjugación, (Tabla R.2.1.), no sugieren la presencia de este integrón en un plásmido conjugativo

Para confirmar estos resultados se realizó una amplificación del integrón en los transconjugantes obtenidos, utilizando los cebadores I-1 e I-2 (tabla M.3.) **siendo en todos los casos negativa.** Por último y para descartar la localización plasmídica de este integrón se transfirió el DNA plasmídico de las cepas donde se amplificó este integrón a una membrana de nylon que fue posteriormente hibridada con la sonda *sul*, obtenida tras una amplificación con los cebadores *sul* 1 y *sul* 2 (tabla M.3.) y marcada posteriormente, como se detalla en el punto 2.6.2. del mismo apartado. **El resultado de la hibridación fue también negativo en todos los casos.**

## SECUENCIA COMPLETA DEL AMPLICÓN C:

```

196
|   -35 int                               pnt-1  pnt-2
ccaagcagcaagcgcggttacgccgtgggtcgatgttgatggtatggagcagcaacgatgttacgcagcagggca
      pnt-2  pnt-3
gtcgccctaaaacaagttggggcgaaccggagcctcattaattgtagccgttaaattaagccctttaccaa

ccaatacttattatgaaaaacgcaatacatatcaacttcgctattttttaataattgcaaatattatctacagc
  Oxa-1 → M K N A I H I N F A I F L I I A N I I Y S
agcgccagtgcacacagatatctctactgttgcatctccattatttgaaggaactgaaggttggttttactt
S A S A S T D I S T V A S P L F E G T E G C F L L
tacgatgcatccacaaacgctgaaattgctcaattcaataaagcaaagtgtgcaacgcaaattggcaccagattca
Y D A S T N A E I A Q F N K A K C A T Q M A P D S
actttcaagatcgattatcacttatggcatttgatgcggaataatagatcagaaaaccatattcaaatgggat
T F K I A L S L M A F D A E I I D Q K T I F K W D
aaaacccccaaaggaatggagatctggaacagcaatcatacaccaaagacgtggatgcaattttctgttgg
K T P K G M E I W N S N H T P K T W M Q F S V V W
gtttcgcaagaataacccaaaaattggattaataaaatcaagaattatctcaaagattttgattatggaaat
V S Q E I T Q K I G L N K I K N Y L K D F D Y G N
caagacttctctggagataaagaagaacaacggattaacagaagcatggctcgaagtagcttaaaaatttca
Q D F S G D K E R N N G L T E A W L E S S L K I S
ccagaagaacaaattcaattcctgcgtaaaattattaatcacaatctcccagttaaaaactcagccatagaaaac
P E E Q I Q F L R K I I N H N L P V K N S A I E N
accatagaaacatgtatctacaagatctggataatagtacaaaactgtatgggaaactgggtgcaggattcaca
T I E N M Y L Q D L D N S T K L Y G K T G A G F T
gcaaatagaaccttacaacggatgggttgaaggtttattataagcaaatcaggacataaatatgtttttgtg
A N R T L Q N G W F E G F I I S K S G H K Y V F V
tccgcacttacaggaacttggggtcgaatttaacatcaagcataaaagccaagaaaaatgcatcaccattcta
S A L T G N L G S N L T S S I K A K K N A I T I L
aacacactaatttataaaaaaatctaattggcaaaatcgcccaacccttcaatcaagtgggacggccaaaagcaa
N T L N L *
gcttttggctccctcgctggcgtcgggcgccttatttcaaacgttaaacatcatgaggggaagcgggtgatggc
      AadA1 → M R E A V M A
cgaagcctcgcactcaactatcagaggtagttggcgtcatcgagcgccatctcgaaccgacgttgctggccgtaca
E A S T Q L S E V V G V I E R H L E P T L L A V H
tttgtagcggctccgcagtgatggcggcctgaagccacacagtgatattgatttgcgtggttacggtgaccgtaag
L Y G S A G V D G G L K P H S D I D L L V T V T V R
gcttgatgaaacaagcggcagctttgatcaacgaccttttggaaacttcggcttcccctgagagagcggagat
L D E T T R R A L I N D L L E T S A S P G E S E I
tctccgcgctgtagaagtcaccattgttgtgcacgacatcattccgtggcgttatccagctaagcgcgaact
L R A V E V T I V V H D D I I P W R Y P A K R E L
gcaatttggagaatggcagcgaatgacattctgcaggtatcttcgagccagccacgatcgacattgatctggc
Q F G E W Q R N D I L A G I F E P A T I D I D L A
tatcttgctgacaaaagcaagagaacatagcgttgcttggttaggtccagcggcggaggaactctttgatccggt
I L L T K A R E H S V A L V G P A A E E L F D P V
tctgaacaggatctattttagggcgctaaatgaaaccttaacgctatggaactcgcgcgccgactgggctggcga
P E Q D L F E A L N E T L T L W N S P P D W A G D
tgagcgaatgtagtgcttacgttgtcccgacttgggtacagcgcagtaaccggcaaaatcgcgccgaaggatgt
E R N V V L T L S R L W Y S A V T G K I A P K D V
cgctgccgactgggcaatggagcgcctgcccggccagatcagcccgtcatactgaagctagacaggcttatct
A A D W A M E R L P A Q Y Q P V I L E A R Q A Y L
tggacaagaagaagatcgcttggcctcgcgcgagatcagttggaagaatttgtccactacgtgaaagggcagat
G Q E E D R L A S R A D Q L E E F V H Y V K G E I
caccaaggtagtcggcaataatgtctaacaattcgttcaa
T K V V G K *
|
2.085

```

**Figura R.4.15:** Secuencia del amplicón C, que se corresponde con los nt 196 a 2.085 del integrón In-t2 de *Salmonella typhimurium* (AJ009819), y secuencia deducida de aminoácidos de los productos de los genes *oxa1* and *aadA1*. Las diferencias entre ambas secuencias se han sombreado en rojo. Se indican también los pentanucleótidos correspondientes al sitio de integración *aatI* y la secuencia -35 del promotor del gen de la integrasa. Los cebadores internos utilizados para completar la secuenciación (IC-1, IC-11 e IC-111) aparecen en letra roja.



### 3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS CEPAS DEL ESTUDIO.

Para completar el estudio de nuestras cepas se determinaron los siguientes marcadores epidemiológicos: serotipo, fagotipo y pulsotipo o campo pulsado.

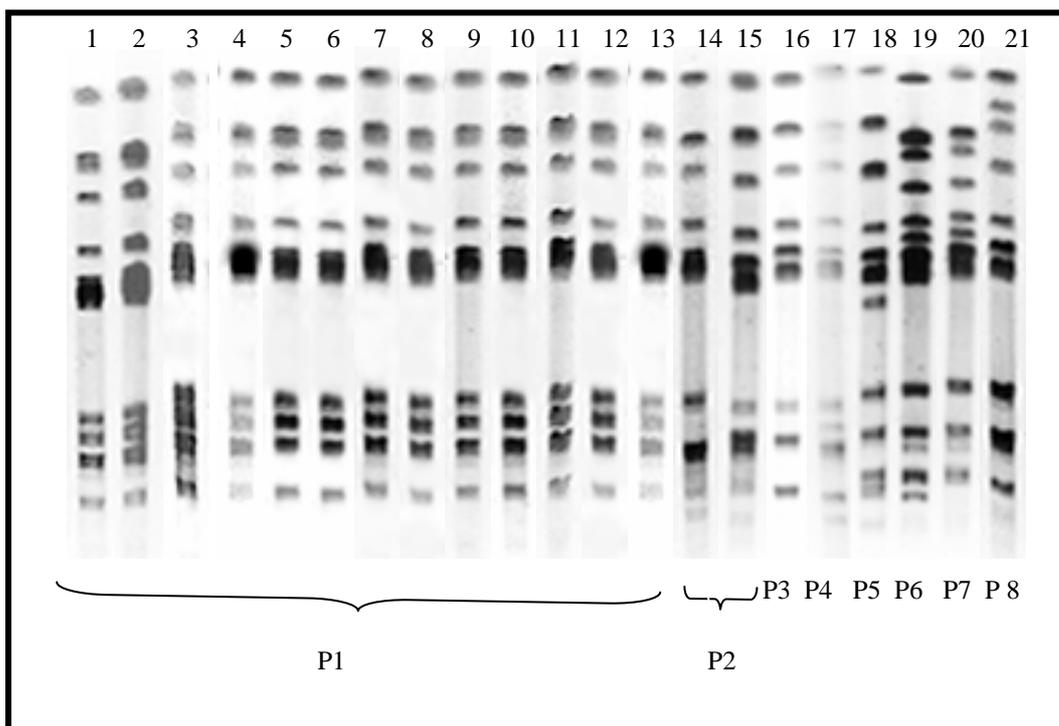
**Tabla R.4:** Muestra el serotipo y el fagotipo de las cepas en estudio. Todas las cepas pertenecían a la especie *Salmonella enterica* subespecie I.

CEPA	SEROTIPO	FAGOTIPO
0113	Typhimurium 4,12:i:1,2	DT104
0481	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
2297	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
2399	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
2600	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
3496	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
3688	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
4020	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
4965	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
5055	Typhimurium 4,12:i:1,2	DT104
5345	Typhimurium 4,12:i:1,2	DT104
5636	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
5905	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104
0318	Typhimurium 4,12:i:1,2	DT104B
1166	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT104B
3727	Monofásico 4,5,12:i:-	DT104B
0136	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT193
0558	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT193
3136	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT193
0716	Monofásico 4,5,12:1:-	U302
0929	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	U302
1144	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	U302
1837	Monofásico 4,12:i:-	U302
1838	Typhimurium 4,12:i:1,2	U302
5651	Monofásico 4,5,12:i:-	U302
3344	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT208
0212	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	DT203
3828	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	NT <sup>1</sup>
0388	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	NT
0511	Typhimurium 4,5,12:i:1,2	PNR <sup>2</sup>

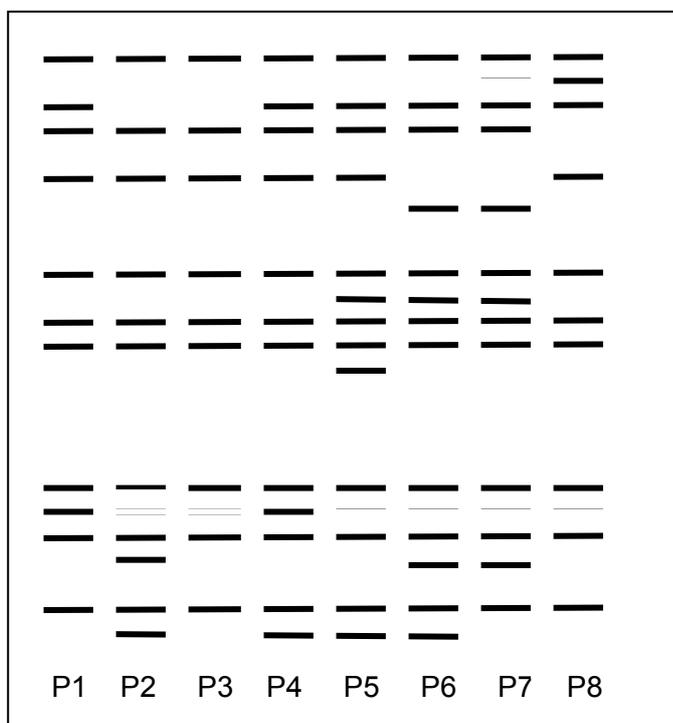
1: No tipable, 2: Patrón no reconocible

El resultado del campo pulsado de las cepas del estudio se puede observar en la figura R.5. en la que se ordenan las cepas en función del perfil electroforético observado.

- Carril 1: 0113 (P1)
- Carril 2: 0318 (P1)
- Carril 3: 0929 (P1)
- Carril 4: 1144 (P1)
- Carril 5: 2297 (P1)
- Carril 6: 2399 (P1)
- Carril 7: 2600 (P1)
- Carril 8: 3496 (P1)
- Carril 9: 3688 (P1)
- Carril 10: 4020 (P1)
- Carril 11: 4965 (P1)
- Carril 12: 5055 (P1)
- Carril 13: 5905 (P1)
- Carril 14: 0212 (P2)
- Carril 15: 0716 (P2)
- Carril 16: 1166 (P 3)
- Carril 17: 0511 (P4)
- Carril 18: 3344 (P5)
- Carril 18: 1838 (p6)
- Carril 19: 1837 (p7)
- Carril 20: 0558 (p8)

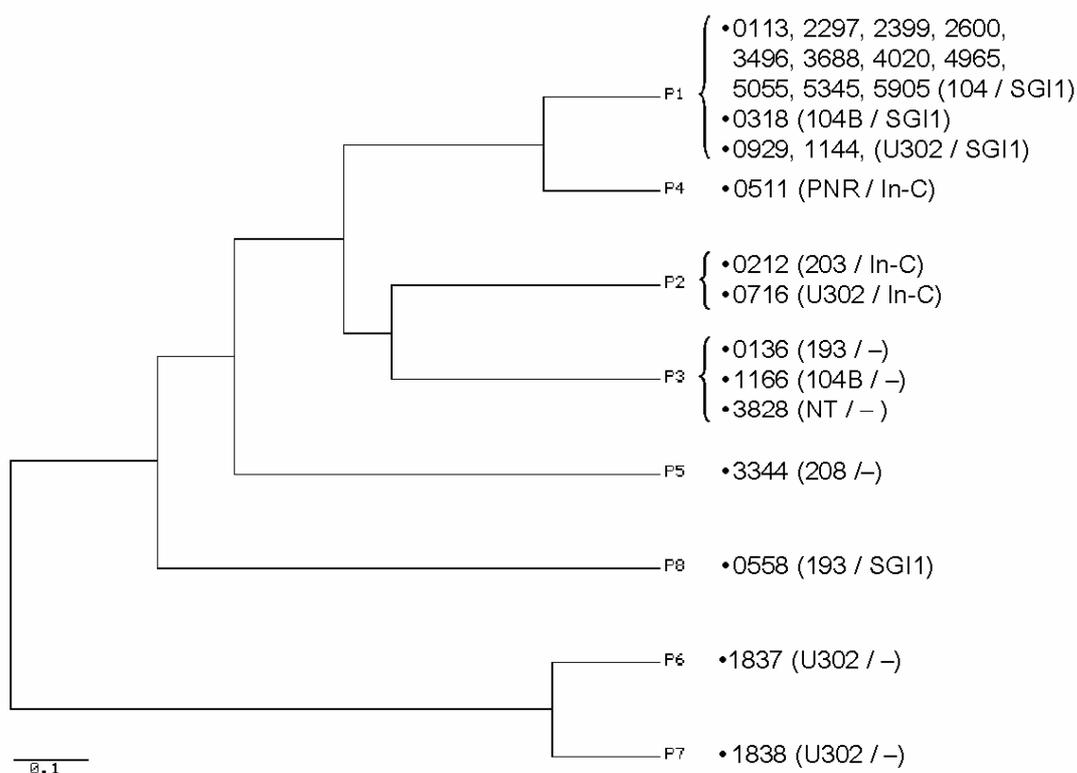


**Figura R.5:** Gel de electroforesis en campo pulsado de algunas de las cepas del estudio. En la parte inferior de la figura se muestran los perfiles electroforéticos asignados a las distintas cepas.



**Figura R.6:** Esquema de los pulsotipos obtenidos.

A partir de los perfiles de restricción en campo pulsado se calculó una matriz de similitud utilizando el método de Dice (adaptado por Nei y Li [1979] a estudios moleculares), en el que se define la similitud entre dos cepas como  $S = \frac{2n_{ab}}{n_a + n_b}$ , donde  $n_{ab}$ : nº de bandas coincidentes de las cepas  $a$  y  $b$ ,  $n_a$ : nº total de bandas de la cepa  $a$ , y  $n_b$ : nº total de bandas de la cepa  $b$ . Esta matriz se utilizó para el cálculo de dendogramas empleando los métodos *Neighbor-Joining* (NJ), *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) y Fitch-Margoliash, disponibles en el paquete *Phylip* de filogenia molecular (<http://sdmc.krdl.org.sg:8080/~lxzhang/phylip/>). El análisis por consenso (*Phylip*) de estos árboles mostró mayor coincidencia con el obtenido con UPGMA, que es el que se muestra aquí dibujado con el programa *Phylo dendron* (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>).



**Figura R.7:** Dendrograma construido con los resultados del análisis por PFGE por el método UPGMA. Para cada uno de los perfiles de PFGE se indican las cepas que lo presentan, y entre paréntesis, fagotipo / integrón de resistencia detectado. PNR: patrón no reconocible; NT: no fagotipable; SGI1: Isla Genómica 1 de *Salmonella*; In-C: integrón C.

**Tabla R.5:** Resumen de los datos obtenidos de las cepas en estudio.

Resultados

CEPA	FECHA	SERVICIO	EDAD	SEXO	FENOTIPO	SEROTIPO	FAGO TIPO	PERFIL PFEG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>sul</i>	<i>tet-flo</i>	<i>aadA2</i>	<i>pse</i>	<i>oxa</i>	In 0
0113	28/12/97	Digestivo	80 a	V	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
0136	20/7/97	Urgencias	2 a	V	ApTc	4,5,12:i:1,2	193	P3	+	-	-	-	-	-	-
0212	22/1/97	Pediatría	3 m	M	ApCmSmSuTcNi	4,5,12:i:1,2	203	P2	+	+	-	-	-	+	-
0318	30/1/97	Urgencias	13 a	V	<b>ApCmSmSuTcTp</b>	4,12:i:1,2	104B	P1	+	+	+	+	+	-	-
0388	23/2/98	Urgencias	5 a	M	ApNaTc	4,5,12:i:1,2	NT	-	+	-	-	-	-	-	-
0481	30/12/97	Urgencias	1a	V	<b>ApCmSmSuTcA/cNi</b>	4,5,12:i:1,2	104	-	+	+	+	+	+	-	-
0511	4/3/98	Urgencias	2 a	M	ApSmSuTcNa	4,5,12:i:1,2	PNR	P4	+	+	-	-	-	+	-
0558	7/3/98	Urgencias	2 a	M	<b>ApCmSmSuTcCxNi</b>	4,5,12:i:1,2	193	P8	+	+	+	+	+	-	-
0716	17/3/97	Cirugía	3 a	M	ApCmSmSuTcA/cGeNaNiToTp	4,5,12:i:-	U302	P2	+	+	-	-	-	+	+
0901	25/4/97	Digestivo	41 a	M	ApCmSmSuTcNiTp	4,5,12:i:1,2	-	-	+	+	-	-	-	+	-
0929	30/5/97	Pediatría	7 a	V	<b>ApCmSmSuTcTp</b>	4,5,12:i:1,2	U302	P1	+	+	+	+	+	-	-
1144	20/4/98	Urgencias	2 a	V	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	U302	P1	+	+	+	+	+	-	-
1166	25/4/98	Urgencias	5 m	M	ApNaTc	4,5,12:i:1,2	104B	P3	+	-	-	-	-	-	-
1837	29/4/97	Urgencias	5 a	V	Ap	4,12:i:-	U302	P6	+	-	-	-	-	-	-
1838	29/4/97	Urgencias	10 a	M	Ap	4,12:i:1,2,	U302	P7	+	-	-	-	-	-	-
1915	14/5/97	Pediatría	3 a	M	Ap	4,12:i:1,2,	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2297	24/5/97	Digestivo	58 a	M	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
2399	23/5/97	Urgencias	5 a	M	<b>ApCmSmSuTcTp</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
2600	5/5/97	Urgencias	3 m	V	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
3136	7/7/97	Urgencias	7 a	M	ApCmSmSuTcNiNa	4,5,12:i:1,2	193	-	+	+	-	-	-	+	-
3344	4/8/97	Urgencias	2 a	M	ApTc	4,5,12:i:1,2	208	P5	+	-	-	-	-	-	-
3496	11/11/97	M.Interna	35 a	V	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-

Resultados

CEPA	FECHA	SERVICIO	EDAD	SEXO	FENOTIPO	SEROTIPO	FAGO TIPO	PERFIL PFEG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>sul</i>	<i>tet-flo</i>	<i>aadA2</i>	<i>pse</i>	<i>oxa</i>	In 0
3525	8/7/97	C.externas	48 a	M	Ap	4,12:i:1,2	—	—	+	-	-	-	-	-	-
3688	21/8/97	Pediatría	2 a	V	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
3727	3/8/97	Urgencias	1 a	M	ApTc	4,5,12:i:-	104B	—	+	-	-	-	-	-	-
3828	23/4/97	Urgencias	3 a	M	Ap	4,5,12:i:1,2	NT	P3	+	-	-	-	-	-	-
4020	18/9/97	Urgencias	1 a	M	<b>ApCmSmSuTcTp</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
4965	20/11/97	Urgencias	6 m	V	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
5055	26/11/97	Urgencias	2 a	V	<b>ApCmSmSuTcNa</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
5345	16/12/97	Urgencias	10 a	V	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-
5636	1/1/98	Urgencias	15 a	M	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	—	+	+	+	+	+	-	-
5651	12/1/98	CIP	2 m	M	ApCmSmSuTcGeNiTp	4,5,12:i:-	U302	—	+	-	-	-	-	-	-
5905	3/2/98	Urgencias	4 a	V	<b>ApCmSmSuTc</b>	4,5,12:i:1,2	104	P1	+	+	+	+	+	-	-

C.externas: consultas externas, CIP: cuidados intensivos pediátricos, M.I: Medicina Interna. NT: No tipable, PNR: Patrón no reconocido.

# DISCUSIÓN

## **1. EVOLUCIÓN DE RESISTENCIAS**

### **1.1. DISTRIBUCIÓN DE AISLADOS**

#### **1.1.1. EDAD Y SEXO.**

La salmonelosis sigue siendo la infección intestinal más frecuente e importante en los países desarrollados y constituye un gran problema de salud pública. Detectamos en los once años de nuestro estudio 3230 casos de salmonelosis, lo que supone una incidencia anual de unos 300 casos al año. El 85% de los afectados son niños. Esta mayor incidencia en niños, coincide con lo publicado por otros autores (Banatvala *et al.*, 1999; Hohnmann, 2001) aunque nuestros datos son algo mayores a los documentados en otras series que hablan de un 60% (Martínez, 2002, Echeita *et al.*, 1999b), motivado quizás por la importancia del hospital infantil en el complejo hospitalario “la Paz” que atiende a mayor número de niños que otros centros. A este predominio infantil contribuyen varias causas, como la inmadurez inmunológica o el mayor consumo de antibióticos de este grupo de pacientes que altera su flora intestinal haciéndolos más susceptibles a adquirir este tipo de infección, aunque también contribuye a aumentar la incidencia de este grupo de población la mayor demanda de coprocultivos en los niños, por la preocupación que generan los episodios de gastroenteritis en niños de corta edad.

Encontramos un leve predominio en mujeres (6% más mujeres que varones), que no consideramos significativo. Otros autores observan mayor frecuencia de aislamientos en varones ( Gil-Setas *et al.*, 2002; González- Hevia *et al.*, 1999; Usera *et al.*, 2002) aunque las diferencias no suelen exceder el 10%.

#### **1.1.2. SEGÚN PROCEDENCIA DE MUESTRAS**

La mayoría de las muestras recibidas por el servicio de Microbiología son de origen extrahospitalario (65%), el (55%) proceden del servicio de Urgencias del Hospital Infantil y un 10% de consultas externas lo que resulta lógico dada la presentación aguda del cuadro clínico. Las muestras de origen intrahospitalario proceden mayoritariamente del servicio de pediatría, donde se suelen ingresar los niños que acuden a Urgencias con un cuadro de gastroenteritis más agudo, y el servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos de donde procede mayor número de muestras extraintestinales. A estos servicios siguen los de Cirugía, la mayor parte de los pacientes fueron sometidos a cirugía digestiva y Medicina Interna donde se encuentran ingresados los pacientes infectados por el VIH. En

el resto de los servicios (Hematología, Nefrología, Hepatología, Unidad de Quemados) la distribución es similar y las muestras proceden de pacientes con alguna patología de base debilitante.

La distribución aleatoria de las muestras por los distintos servicios, descarta la presencia de algún brote intrahospitalario.

### **1.1.3. INFECCIONES EXTRAINTESTINALES POR *Salmonella***

La infección extraintestinal por *Salmonella* es un hecho poco frecuente suponiendo menos del 7% del total de los aislamientos de nuestra serie, lo que coincide con otras series analizadas en nuestro país entre los años 1980-1995 que encuentran un 8% de infecciones extraintestinales por *Salmonella* no typhi (Ramos *et al.*, 1995). La sangre es la localización extraintestinal más importante (78%), y la mayoría de las bacteriemias son transitorias y ocurren en el contexto de una gastroenteritis aguda en pacientes debilitados.

El 36% de las bacteriemias fueron detectadas en pacientes infectados por el VIH coincidiendo con otras series (Levine, 1991) de hecho se ha descrito que estos pacientes tienen 100 veces más riesgo de desarrollar un bacteriemia por *Salmonella* (Moreno *et al.*, 1994) debido en gran medida al gran papel que juega la inmunidad celular en el control de la infección, de hecho para algunos autores la infección por el VIH constituye el principal factor predisponente de salmonelosis (Tocalli *et al.*, 1991). Sin embargo otros autores no observan una mayor incidencia de bacteriemia en estos pacientes (Ruiz *et al.*, 2000) justificada quizás por la aceptable inmunidad celular que les conceden los nuevos tratamientos antirretrovirales.

Los otros dos grupos importantes de pacientes en los que se aisló *Salmonella spp.* en sangre son los niños menores de un año (23%), lo que también estaría justificado por su inmadurez inmunológica y los pacientes sometidos a cirugía abdominal previa (17%) en los que la manipulación quirúrgica facilitó sin duda la diseminación de *Salmonella* del intestino al torrente sanguíneo.

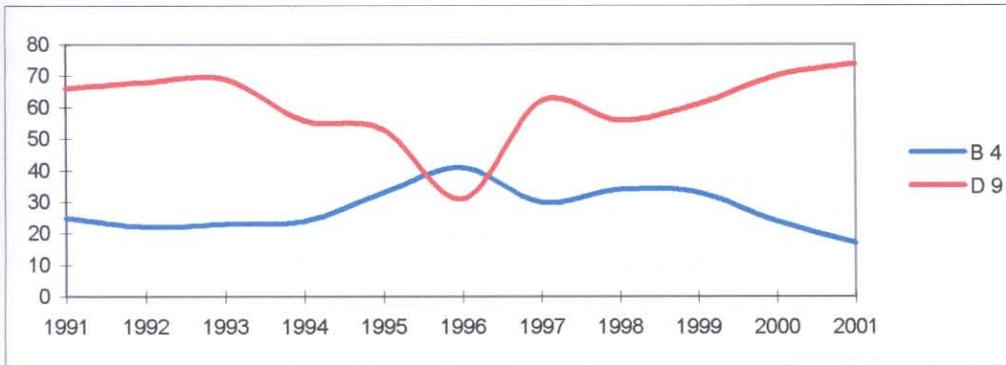
Aunque clásicamente se ha asociado una mayor capacidad de producir cuadros sistémicos a *S. choleraesuis*, y en nuestra serie no aislamos este microorganismo en ninguno de los casos, siendo el serotipo más frecuente *S. typhimurium*. La capacidad invasiva de este serotipo ha sido apoyada por otros autores (Ruiz *et al.*, 2000, Fierer *et al.*, 1992) que encuentran un plásmido asociado a la virulencia de este microorganismo. Además, la virulencia de este serotipo está asociada a la mayor resistencia antibiótica, con el riesgo que

esto supone de seleccionar con el mal uso de los antibióticos no solo a los más resistentes sino también a los más virulentos.

## 1.2. DATOS CORRESPONDIENTES AL AISLADO

### 1.2.1. SEROGRUPO

El serogrupo más prevalente en la última década ha sido el D 9 (61%) seguido del B 4(25%) al igual que ha ocurrido en el resto de los países en la última década. Los serogruos C1-7 y C2-8 han sido mucho menos frecuentes suponiendo un 6% y 2,3% de los aislados respectivamente. Estos son datos globales, pero es importante observar la evolución de los dos serogrupos más importantes durante los 11 años del estudio (figura D.1.).



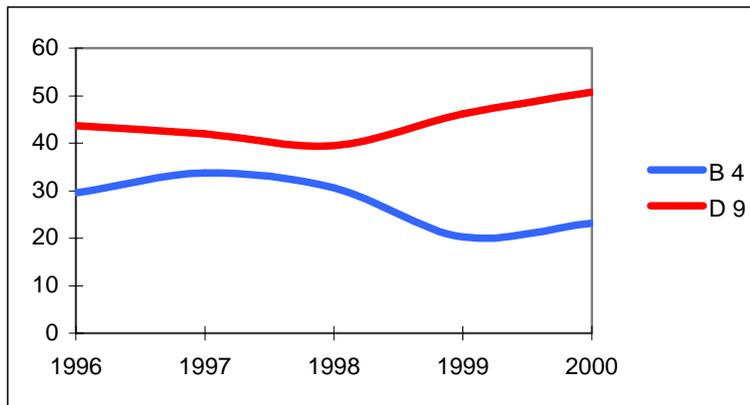
**Figura D.1:** Evolución de los serogrupos B 4 y D 9 de nuestro estudio durante la última década.

De la siguiente figura se desprenden dos importantes conclusiones:

- En el año 1996 hay una inversión de serogrupos pasando a ser el B 4 el más predominante suponiendo un 40% de los aislados por encima del serogrupo D 9 (31%).
- Desde esa fecha se observa un claro aumento de aislados pertenecientes al serogrupo D 9 en detrimento del serogrupo B 4. La diferencia entre ambos es cada vez mayor llegando a un 72% de *S. enteritidis* (D 9) frente a un 17% de *S. typhimurium* (B 4) en el año 2001.

Estos datos coinciden con los comunicados por investigadores de distintos países, siendo también el año 1996 el de mayor prevalencia de *S. typhimurium* frente al resto de los serotipos. En Estados Unidos la prevalencia del serotipo B 4 / D 9 en 1996 fue 31% / 14,6% según un estudio realizado por el CDC (1996); en Israel los datos publicados por el

Ministerio de Salud Israelí son similares 28% / 22% y además estudian las cepas de *Salmonella* aisladas en pollos observando un paralelismo con lo que ocurre en los aislados humanos: *S. typhimurium* representa un 14%, 40% y 44% de los aislados en los años 1994, 1995 y 1996 respectivamente. Resultados similares se observan en varios países de Europa, según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1997). En España también se observa esta tendencia descendente del serogrupo B 4 (Figura D.2) a partir del año 1996.



Numerosos autores atribuyen el aumento de aislamientos de *S. typhimurium* en los años 1996-1997, a la emergencia del clon multirresistente DT 104 observada en estos países (Davies 1998, Metzger 1998) y lo mismo se podría decir de nuestro país donde este aumento de prevalencia del serotipo B 4 va asociado con una mayor resistencia a los antibióticos como se comenta más adelante. En un estudio sobre el origen de los serotipos, se observa que *S. enteritidis* es el predominante en los huevos y carnes de aves de corral, mientras que *S. typhimurium* es el predominante en otros tipos de carnes (Usera *et al.*, 1995b) por lo que se puede suponer que el consumo de productos aviares es la principal causa del aumento de las gastroenteritis por *S. enteritidis* (serogrupo D 9) en los últimos años.

### 1.2.2. RESISTENCIA

*S. enteritidis* es globalmente más sensible a los antibióticos que el resto de los

serotipos. En España los datos muestran unos porcentajes globales de resistencia de 33,3% para *S. typhimurium* frente a 4,56% para *S. enteritidis* (Rivera 1997). Además el incremento de resistencia a los distintos antibióticos observado en los últimos años para *S. typhimurium* no se aprecia en *S. enteritidis*. Países tan cercanos como Francia han visto sus resistencias aumentar vertiginosamente de 0 a 42,5% en menos de 7 años (1987-1994) (Llanes *et al* 1999) y este hecho se ha repetido en la última década en otros países más alejados como EEUU (Glynn, *et al* 1998) o Hong Kong.

De todos modos hay que señalar que la resistencia, es algo característico de cada serotipo; Prueba de ello es la gran resistencia de *S. typhimurium* a ampicilina (70% en el año 2001) frente a la gran sensibilidad de *S. enteritidis* (10% de cepas resistentes en el año 2001) mientras ocurre lo contrario si hablamos del ácido nalidíxico para el que *S. enteritidis* muestra mayores valores de resistencia (41%) que *S. typhimurium* (12%) aunque el serotipo que se caracteriza por mostrar una mayor resistencia frente a esta quinolona de primera generación es el C2-8 que alcanza valores del 85% en el año 2001.

La resistencia a ampicilina del serogrupo B 4, ha sufrido un lento pero constante aumento desde 1993, año en el que la mitad de las cepas eran sensibles a este antibiótico, llegando a un 70% de cepas resistentes en el año 2001. En el resto de los serogrupos no se observa esta tendencia ascendente. Esto coincide con lo que ocurre en otras zonas de España que alcanzan porcentajes de resistencia a ampicilina en el año 2000 del 78,9% de las cepas de *S. typhimurium* y 19% de *S. enteritidis*. (Gil-Setas *et al.*, 2002).

Respecto a las cefalosporinas llama la atención la gran resistencia del serogrupo C2 -8 a la cefazolina por encima del resto de los serogrupos y el escaso porcentaje de cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. El serogrupo más resistente a cefuroxima resultó ser el B 4 y seguido del C2-8 y el D 9 en último lugar. Un gran porcentaje (el 48%) de los pacientes en los que se aislaron estas cepas resistentes provenían de servicios como cirugía, medicina interna o cuidados intensivos y estaban tomando antibióticos de amplio espectro. Las muestras restantes procedían del servicio de urgencias y el 57% de los pacientes en los que se aislaron había tomado antibióticos, los más frecuentes cotrimoxazol y amoxicilina /clavulánico.

Pero el grupo de antibióticos para el que aumento de cepas resistentes ha sido más evidente han sido sin duda, las quinolonas, en concreto el ácido nalidíxico que ha pasado de un 6% de cepas de *S. enteritidis* resistentes en el año 1995 a un 40% en el 2001. Lo mismo ha ocurrido en el resto de los serotipos. Estos datos coinciden con lo observado por otros autores que hablan de resistencias que llegan al 60% de la cepas de *S. enteritidis*, (Bautista *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2002) aunque en nuestro caso el porcentaje de resistencias alcanzado haya sido algo menor. No obstante el 85% de nuestras cepas pertenecientes al serogrupo C2-8 son resistentes a esta quinolona. Esta facilidad del ácido nalidíxico de seleccionar cepas resistentes ha sido observada también en otros miembros de la familia de las enterobacterias (Ronald *et al.*, 1966). La aparición de cepas resistentes a ácido nalidíxico debe estudiarse con precaución porque suele preceder la aparición de resistencias en el resto de las fluorquinolonas (Turnidge, 1995), y debemos interpretarlo como un marcador de futuras resistencias. Afortunadamente los alarmantes datos de resistencia del ácido nalidíxico no se observan en las quinolonas de mayor espectro y únicamente en el año 1997 detectamos dos casos de resistencia a ciprofloxacino, ambos en aislados del serotipo C2-8 y en el año 1996 una cepa perteneciente al serogrupo B 4, coincidiendo por lo publicado por Campo *et al.* en 1997.

EL resto de los años no se ha detectado ninguna cepa resistente a ciprofloxacino. La sensibilidad a este antibiótico se ha mantenido en países tan diversos como EEUU, Irlanda, República Checa o Israel en los que no se ha aislado ninguna cepa resistente (Karpiskokva *et al.* 1999, Yildirmak *et al.* 1998; Cormican *et al.* 1998); y en aquellos donde se ha aislado alguna cepa resistente, como el Reino Unido la frecuencia ha sido bajísima. En nuestro país, estudios realizados en distintas ciudades como Granada o Madrid no encuentran cepas resistentes a ciprofloxacino, aunque constatan un aumento de las CMI's frente a este antibiótico (Martínez *et al.* 2002; Bautista *et al.* 200). Este aumento de CMI's es especialmente significativo para el serogrupo C2-8 (Figura R.1.11.) que llega a un 72% de cepas con CMI 1µg/ml en el año 2001. El 40% de los aislados pertenecientes al serogrupo D 9 poseen una CMI para ciprofloxacino de 1µg/ml dato sólo alcanzado por el 10% de las cepas de *S. typhimurium* lo que corrobora la mayor sensibilidad de éste último serotipo frente a las quinolonas. Estos datos coinciden por lo publicado por otros autores que hablan globalmente de 30-35% de cepas de *Salmonella* con CMI 1µg/ml. Esta cepas serían consideradas sensibles según los criterios del NCCLS (National Committee for clinical Laboratory standards (EE.UU), 2000) así como por otros estamentos

como el SFM (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Francia),1999) o el BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy (Reino Unido),1999) pero según la Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA) estas cepas no serían consideradas sensibles, los puntos de corte de *Salmonella* para ciprofloxacino (CMI  $\leq$  0,1 $\mu$ g/ml para ser considerada sensible) son distintos.

Esta disminución de sensibilidad de *Salmonella* a las quinolonas que se ha detectado de forma preocupante y creciente en muchos países, fundamentalmente de Europa (Frost *et al* 1996), se puede atribuir a distintos factores:

- 1 Como factor determinante de este hecho, el uso de quinolonas en animales para tratar enfermedades, ya que su uso como promotor de crecimiento está totalmente prohibido. Medders demostró en 1998 la capacidad de esta quinolona utilizada también en agricultura de seleccionar mutantes de *Salmonella* resistentes a ácido nalidíxico y fluorquinolonas. De hecho en el Reino Unido al igual que en otros países, la aparición de cepas resistentes a quinolonas fue precedida por la aprobación de enrofloxacino para el uso veterinario en 1995 fundamentalmente para el tratamiento de la colibacilosis relacionada con *E.coli* en el ganado. La aparición de un gran número de cepas de *Campylobacter* resistentes a estos antibióticos hizo a la FDA-CVM (Center for Veterinary Medicine) limitar su uso a casos tan puntuales como el tratamiento de infecciones respiratorias graves en el ganado bovino, en 1998 ( White y McDermott, 2001). Otro dato que refuerza la idea de que la resistencia en *Salmonella* tiene origen en animales es la presencia del gen *floR* en peces. El florfenicol se comenzó a utilizar en Asia en piscifactorías, y el primer gen de resistencia (*pasppflo*) se identificó en *Pasteurella piscicida*, causa frecuente en Asia de seudotuberculosis en peces (Ribot *et al.*, 2002). Sin embargo otros países que llevan utilizando quinolonas en animales de forma habitual desde hace más de 10 años, no han aislado hasta el momento ninguna cepa de *Salmonella* resistente a este antibiótico. ( Karpiskova 1999).
- 1 Esto apoyaría la hipótesis de algunos autores que defienden que la resistencia bacteriana a los antibióticos se debe principalmente al excesivo uso de los mismos en humanos y en mucha menor medida al uso en ganadería o agricultura (Orden y

Fuente, 2001; White y McDermott 2001). El abuso de estos antibióticos como profilácticos o su uso empírico para tratar cuadros tan inespecíficos como la diarrea del viajero, ha repercutido también sin duda en la selección de cepas resistentes. Otros argumentos en contra de la relación del uso de antibióticos en animales y la selección de cepas resistentes son la aparición de microorganismos resistentes a un antibiótico antes de la aprobación del mismo para uso veterinario, como ocurrió con el forfenicol y la aparición de cepas de *Salmonella* resistentes al cloranfenicol (Casin *et al*, 1999) o el hecho de que las primeras cepas donde se detectara el clon multiresistente DT104 se aislaron en animales salvajes no expuestos a ningún tratamiento antibiótico.

- 2 Pero a parte del excesivo uso de estos antibióticos tanto en humanos como en animales un factor que ha contribuido de forma importantísima al incremento del número de cepas resistentes ha sido la propagación de clones multiresistente como el fagotipo DT 104. Este fagotipo que se ha distribuido con extraordinaria rapidez por todo el mundo tuvo su mayor incidencia en el año 1996 en nuestro país, y este ha sido el año de mayores valores de CMI para ciprofloxacino de *S. typhimurium* lo que hace plantearse la posibilidad de que se tratara de un brote producido por cepas pertenecientes a este fagotipo. Otros brotes por *S. typhimurium* fagotipo DT104 resistente a las quinolonas se han detectado en distintos países.

No obstante no siempre es posible relacionar el uso de antibióticos con el aumento de resistencias ya que este problema se debe a un complejo proceso multifactorial y el uso de antibióticos es sólo uno de los factores. (Baquero *et al* 1998)

Estos datos hacen plantearse la terapia empírica elegida para tratar la salmonelosis cuando esto sea oportuno; las tasas de resistencia observadas frente a ampicilina la descartan para este uso y se ofrecen como alternativas el cotrimoxazol, o las quinolonas. A pesar de la mayor frecuencia y la gran sensibilidad de *S. enteritidis* frente al cotrimoxazol (sólo 0,6% de cepas resistentes), el 13,5% de las cepas de *S. typhimurium* en nuestro hospital, son resistentes al este antibiótico lo que podría plantear algunos fracasos terapéuticos. Por otra parte, teniendo en cuenta el alto índice de resistencias de *Salmonella* al ácido nalidíxico y conociendo que es un marcador pronóstico del fracaso terapéutico de las quinolonas fluoradas no vemos oportuno usarlo como fármaco de primera elección en monoterapia, si bien es posible asociarlo a una cefalosporina de

tercera generación hasta conocer su sensibilidad. Otra posibilidad sería el uso de fluoroquinolonas ya que el número descrito de cepas resistentes a este grupo de antibióticos ha sido bajísimo y además no parece que estos fármacos contribuyan al aumento de resistencias, como ocurre con las quinolonas de primera generación, dado su gran espectro de actividad. No obstante esta pauta terapéutica debe ser establecida en función de los datos de resistencias observados en la comunidad a la que vaya dirigida el tratamiento.

## 2. ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DE LA RESISTENCIA

La resistencia múltiple a los antibióticos con frecuencia reside en los llamados factores R o plásmidos de resistencia (Foster 1983). Un reflejo de la diseminación de estos plásmidos R en la población bacteriana es la aparición de brotes o epidemias nosocomiales como consecuencia de la presión selectiva ejercida por el uso indiscriminado de agentes antibacterianos. La transferencia horizontal de estos plásmidos tiene lugar mediante la conjugación, por la que el plásmido conjugativo es integrado en el cromosoma de la célula receptora por recombinación homóloga previo paso de material genético a través de pilus conjugativos. Este intercambio de material genético es más frecuente en algunas enterobacterias como *E.coli* o *P.aeruginosa* aunque se ha demostrado en muchos otros géneros entre los que se encuentra *Salmonella* spp. (Roy 1999). La conjugación ocurre con mucha más frecuencia entre bacterias que comparten nicho ecológico, por lo que es lógico encontrar en *Salmonella* genes de resistencia originarios de *E.coli* como es el caso de aquellos que codifican para  $\beta$ -lactamasas tipo TEM.

Los plásmidos que transportan los genes de resistencia a  $\beta$ -lactamasas son de gran tamaño y suelen llevar además genes que codifican resistencia a otros antibióticos (Arraque *et al* 1997). Se han descrito plásmidos conjugativos de 45, 54, 157 o 180 Kb entre otros, que transfieren la resistencia a uno o varios antibióticos. Así mientras los plásmidos más pequeños contienen genes que codifican resistencia únicamente a  $\beta$ -lactamasas tipo TEM, IRT o BLEEs, los de mayor tamaño contienen además determinantes de resistencia a otros antibióticos como el cloranfenicol, el cotrimoxazol o la gentamicina, entre otros. (Blázquez *et al* 1993; Marchandin *et al* 1999).

La conjugación de nuestras cepas con el receptor E.coli  $\alpha$ DH5 demuestra la transferencia de resistencia a ampicilina y ticarcilina únicamente. En un único caso la cepa receptora recibe también la resistencia a cotrimoxazol. El resto de las resistencias halladas en nuestras cepas no son transferidas por conjugación. Los resultados de amplificación e hibridación identifican una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM en plásmidos conjugativos de diferente tamaño.

### 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA

En la epidemiología de los serotipos no tifoideos de *Salmonella* se ha registrado en los últimos años una emergencia de cepas multirresistentes, entre las que destacan las pertenecientes al fagotipo DT104, cuyo origen se ha situado probablemente en el Reino Unido (Threlfall, 1993), y en menor medida las cepas atípicas [4,5,12:i:—] detectadas por vez primera en España (Echeíta *et al.*, 1999) y recientemente en Nueva York (Agasan *et al.*, 2002). Estas cepas parecen ser una variante monofásica de *S. typhimurium* [4,5,12:i:1,2] (Echeíta *et al.*, 2001), o del serotipo Lagos [4,5,12:i:1,5], pero podría también representar un nuevo serotipo.

Los resultados de este estudio muestran que la situación observada en la Ciudad Sanitaria “La Paz” en los últimos 11 años es un reflejo de la descrita. De las 33 cepas seleccionadas por su resistencia a ampicilina, 22 presentaban resistencia a más de tres antibióticos, 12 pertenecían al fagotipo DT104 y 2 al fagotipo relacionado DT104B. El serotipo emergente [4,5,12:i:—] ha estado representado por 4 cepas.

La resistencia moderada a la asociación amoxicilina/clavulánico ha sido también una característica de las cepas de *Salmonella* aisladas en los últimos años en diferentes países. Aunque en enterobacterias el mecanismo responsable suele ser la producción de  $\beta$ -lactamasas tipo TEM resistentes a inhibidores (IRT), no ha sido éste el caso de *Salmonella*, y sólo raramente se ha descrito la adquisición de cefalosporinasas, como se ha comentado en la Introducción (Tabla I.5). Entre las cepas resistentes a amoxicilina estudiadas, 12 presentaron un fenotipo intermedio/resistente a amoxicilina/clavulánico, asociado a la presencia de los genes que codifican  $\beta$ -lactamasa PSE-1 u OXA-1 junto con el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> (Tabla D.1)

CEPA	$\beta$ -lactamasas	CMI (A/C)
0113	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
0136	TEM	8/4 $\mu\text{g/ml}$ (S)
0212	TEM + OXA	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
0318	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
0338	TEM	8/4 $\mu\text{g/ml}$ (S)
0481	TEM + PSE	32/16 $\mu\text{g/ml}$ (R)
0511	TEM + OXA	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
0558	TEM + PSE	32/16 $\mu\text{g/ml}$ (R)
0716	TEM + OXA	32/16 $\mu\text{g/ml}$ (R)
0901	TEM + OXA	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
0929	TEM + PSE	8/4 $\mu\text{g/ml}$ (S)
1144	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
1166	TEM	4/2 $\mu\text{g/ml}$ (S)
1837	TEM	8/4 $\mu\text{g/ml}$ (S)
1838	TEM	4/2 $\mu\text{g/ml}$ (S)
2297	TEM + PSE	8/4 $\mu\text{g/ml}$ (S)

CEPA	$\beta$ -lactamasas	CMI (A/C)
2399	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
2600	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
3136	TEM + OXA	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
3344	TEM	4/2 $\mu\text{g/ml}$ (S)
3496	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
3525	TEM	4/2 $\mu\text{g/ml}$ (S)
3688	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
3727	TEM	4/2 $\mu\text{g/ml}$ (S)
3828	TEM	8/4 $\mu\text{g/ml}$ (S)
4020	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
4965	TEM + PSE	8/4 $\mu\text{g/ml}$ (S)
5055	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
5345	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
5636	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)
5651	TEM	4/2 $\mu\text{g/ml}$ (S)
5905	TEM + PSE	16/8 $\mu\text{g/ml}$ (I)

En los transconjugantes obtenidos no aparece nunca este fenotipo intermedio o resistente, lo que es coherente con el hecho de que sólo se transfiere el gen *bla*<sub>TEM-1</sub>. Además, casi todas las cepas de *S. typhimurium* que producen  $\beta$ -lactamasa TEM, pero no PSE ni OXA, presentan una CMI a amoxicilina/clavulánico de 4/2  $\mu\text{g/ml}$ , frente a 16/8 a >32/16  $\mu\text{g/ml}$  en las cepas con dos  $\beta$ -lactamasas. Aunque ninguna de las tres  $\beta$ -lactamasas citadas presenta una resistencia significativa al ácido clavulánico, está claro que la producción de dos de ellas confiere a la bacteria suficiente capacidad de hidrólisis para resistir a la asociación, como han descrito también otros autores (Poirel *et al.*, 1999). No se aprecian diferencias en la aportación de las  $\beta$ -lactamasas PSE y OXA a la CMI.

El gen *bla*<sub>TEM-1</sub> ha sido secuenciado a partir de una de las cepas con mayor resistencia a amoxicilina/clavulánico, comprobándose que corresponde a la  $\beta$ -lactamasa TEM-1; por lo tanto, se confirma una vez más la inexistencia de  $\beta$ -lactamasas IRT en *Salmonella*. Es sin duda llamativo que *Salmonella* haya escapado a la tendencia que se registra en otras enterobacterias de defenderse mediante la producción de  $\beta$ -lactamasas de clase A o de tipo IRT, resolviendo los problemas de presión selectiva mediante la

producción de dos  $\beta$ -lactamasas más comunes.

La multirresistencia de las cepas DT104 se debe principalmente al agrupamiento de genes de resistencia en la denominada "Isla Genómica de *Salmonella* 1" (SGI1), que se ha descrito en la Introducción. Efectivamente, en las 14 cepas DT104 y en una DT104B hemos detectado los dos integrones (*aadA2* *sull* y *bla*<sub>PSE-1</sub> *sull*) que flanquean la región de resistencia, y los genes *floR* y *tetG* que se localizan en el centro.

También 2 de las seis cepas del fagotipo U302 presentaban este agrupamiento génico propio de la SGI1. Se ha descrito al menos una cepa U302 de origen irlandés con un perfil de integrones idéntico a DT104 (Daly *et al.*, 2000), y en un estudio realizado en el Reino Unido 33 de 39 aislados de U302 eran portadores de los genes *bla*<sub>PSE-1</sub>, *aadA2* y *tetG* (Walker *et al.*, 2001), lo que nos sugiere que contenían la SGI1.

Aunque una de las 4 cepas [4,5,12:i:-] presentó un patrón de resistencia ApCmSmSuTcGeNiTp compatible con la presencia de SGI1, no pudo detectarse en ella ninguno de los genes de resistencia descritos. Guerra *et al.* (2001) han descrito la presencia del gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, junto a otros genes de resistencia, albergados en integrones de clase I en plásmidos de 120-140 kb (estos últimos portadores de la región *spv* característica de los plásmidos de virulencia de *Salmonella*), en las cepas atípicas [4,5,12:i:-] aisladas en el Principado de Asturias. La asociación de genes que codifican  $\beta$ -lactamasas tipo TEM y PSE al plásmido de virulencia se ha observado también en cepas de *S. typhimurium* (y raramente, de *S. enteritidis*) aisladas en Francia, y los genes de resistencia pudieron transferirse por conjugación, aparentemente en el plásmido de virulencia, aunque no se comprobó la presencia de *spv* en los transconjugantes (Llanes, 1999). Sin embargo, es muy probable que ocurra así, ya que se ha demostrado que el plásmido de virulencia de *S. typhimurium* es autotransmisible por conjugación (aunque no en todas las cepas) gracias a la presencia de genes del operón *tra* homólogos a los del plásmido F (Ahmer *et al.*, 1999). En las cepas estudiadas en este trabajo se ha comprobado la movilización del gen *bla*<sub>TEM-1</sub> a *E. coli* por conjugación (Fig. R.2.3), y su localización en plásmidos de diverso tamaño (Fig. R.2.4), pero en ninguno de los transconjugantes se ha detectado la región *spv*. Por lo tanto, aunque alguno de los plásmidos portadores de *bla*<sub>TEM-1</sub> tiene dimensiones similares, hay que descartar que se trate del plásmido de virulencia.

El integrón In-t2, portador de los genes *aadA1* y *oxa1*, ha sido también localizado hasta ahora en plásmidos FI de *S. typhimurium*, aparentemente asociado al integrón In-t1, que codifica resistencia a kanamicina y cloranfenicol (Tosini *et al.*, 1998; Carattoli *et al.*, 2001; Villa *et al.*, 2002). En este estudio hemos caracterizado un integrón similar (In-C) pero los resultados negativos obtenidos en la hibridación con DNA plásmidico y en la detección en transconjugantes indican que se localiza en el cromosoma de *S. typhimurium*. La similitud entre los genes *aadA1* y *oxa1* de In-C e In-t2 es muy alta (98,5-99%), pero en el caso del gen que codifica la integrasa es más limitada (91%), lo que sugiere que el origen de ambos integrones no necesariamente ha de ser único, pudiendo haber captado de forma independiente los mismos genes de resistencia. Hemos detectado In-C en cepas de distintos fagotipos (U302, 193, 203, PNR y no tipable), y una de ellas (U302) corresponde al serotipo atípico emergente [4,5,12:i:-]. Esta diversidad se observa también en los patrones de resistencia, ya que las cinco cepas sólo muestran en común la resistencia mediada por In-C (ampicilina, estreptomicina y sulfamidas), así como en los patrones de PFGE, distintos para cada cepa U302.

Cuatro de las cepas portadoras de In-C carecen de otros integrones, pero de la restante (*S. typhimurium* 0716) se amplificó un pequeño fragmento de 190 nt (amplicón D) que mostró identidad con el sitio de integración del In0, un integrón descubierto en *Pseudomonas aeruginosa* (Bissonnette y Roy, 1992). In0 es un integrón “descargado”, es decir, que no contiene ningún gen en la región central, y se le ha considerado por ello como modelo del integrón ancestral. Si realmente el amplicón D pertenece a un integrón completo, se trataría también de un integrón descargado, ya que la amplificación con los cebadores utilizados, correspondientes a las regiones constantes 5' y 3', detectaría cualquier gen localizado en la región central. Está pendiente la secuenciación de la región que rodea al amplicón D para confirmar esta hipótesis.

#### 4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Los patrones de PFGE obtenidos en este estudio muestran bastante divergencia entre las cepas estudiadas (a excepción de la pertenecientes al fagotipo DT104), ya que la similitud oscila entre el 69,57% y el 90%. La presencia o ausencia de integrones se muestra muy ligada a las relaciones entre cepas.

Un grupo homogéneo es el formado por las cepas de fagotipo DT104, junto con las de los fagotipos relacionados DT104B y U302 (portadora de la SGI1). Este resultado coincide con el obtenido por Daly y colaboradores (2000) mediante PCR aleatoria sobre cepas aisladas en Irlanda, ya que observaron el agrupamiento de todas las cepas DT104, DT104b y la única PT U302 analizada, que mostraba el mismo perfil de integrones que DT104.

Se ha propuesto que la presencia de la SGI1 en distintos fagotipos puede ser debida a cambios en la sensibilidad a fagos más que a la transferencia horizontal de la isla, basándose en que los perfiles de PFGE son similares entre las cepas portadoras de la SGI1, independientemente del fagotipo, y diferentes entre cepas del mismo fagotipo con distintos patrones de resistencia. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis de clonalidad, ya que sólo una cepa portadora de la SGI1 (fagotipo DT193) aparece alejada del grupo de cepas SGI1(+). Por el contrario, las cepas U302 y DT104B se agrupan en función de contener o no la SGI1. En el análisis más completo de cepas U302 que conocemos (Walker *et al.*, 2001) se llega a la misma conclusión: las cepas U302 con perfil de resistencia tipo DT104 se agrupan con ese fagotipo, y las restantes muestran patrones diversos de PFGE. Puede pensarse que la presencia de la SGI1, que ocupa 43 kb, tenga un peso elevado en el perfil de PFGE. Sin embargo, su presencia se caracteriza en la digestión con *Xba*I principalmente por la aparición de un fragmento de 10-12 kb (Briggs y Fratamico, 1999; Lai-King *et al.*, 1999), y en el análisis que hemos realizado no se han considerado fragmentos inferiores a 50 kb (¿es así? corrígelo si no).

En cualquier caso, la SGI1 puede ser transducida por fagos del tipo P22, y ésta es la explicación más lógica de su presencia en otros serotipos, como Paratyphi B o Agona (Meunier *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2001).

La presencia del integrón In-C parece también relacionada con el grado de parentesco, con independencia del fagotipo, pero sólo se han analizado 3 cepas.

Más reducido ha sido aún el análisis de las cepas [4,5,12:i:-] pero han sido comparadas con una variedad de cepas de *S. typhimurium*. En otros casos la comparación se ha hecho fundamentalmente con DT104 (Agasan *et al.* 2002), o las cepas [4,5,12:i:-] presentaban un perfil homogéneo de multirresistencia (Guerra *et al.*, 2000). Estas diferencias pueden explicar que, en nuestro estudio, las dos cepas se distribuyan de un modo que parece depender del fenotipo de resistencia, o seguir simplemente un patrón aleatorio, más que reflejar un carácter propio del serotipo. En este aspecto, el resultado apoyaría la hipótesis de que [4,5,12:i:-] deriva de *S. typhimurium* (Echeíta *et al.*, 2001), pero también en este caso es evidente que no pueden sacarse conclusiones del análisis de dos cepas.

En resumen, la muestra de cepas analizada, que corresponde a un período de 2 años y a infecciones externas, muestra un patrón muy diverso en el que los casos de clonalidad parecen ligados a la presencia de determinados integrones de resistencia.

# CONCLUSIONES

---

1. La evolución de serogrupos de *Salmonella* aislados en la Ciudad Sanitaria “La Paz” muestra un predominio claro del D 9 de manera creciente en los últimos años con respecto al B 4, pero en 1996 se produjo una inversión en esta tendencia. Otros serogrupos minoritarios aislados han sido C1-7 y C2-8.
2. Este predominio no se corresponde con el nivel de resistencia, que ha sido mayor en el serogrupo B 4 para la mayoría de los antibióticos.
3. Los antibióticos para los que se observa una tendencia ascendente en el porcentaje de cepas resistentes desde el comienzo del estudio han sido la ampicilina y el ácido nalidíxico.
4. La resistencia a ampicilina es transmisible por conjugación en la mayoría de los casos (71%), y se debe a la presencia del gen *bla*<sub>TEM</sub> en plásmidos de diversos tamaños. El 52% de las cepas posee también el gen *bla*<sub>PSE-1</sub> y un 1,5% el gen *oxa-1*, pero en ninguna cepa coexisten estos dos genes.
5. La resistencia a amoxicilina/clavulánico no parece atribuirse en estas cepas a la producción de  $\beta$ -lactamasas de tipo IRT, según se deduce de la secuencia del gen *bla*<sub>TEM</sub> de una cepa elegida al azar, sino a la asociación de dos  $\beta$ -lactamasas, TEM y OXA o TEM y PSE.
6. El gen *bla*<sub>PSE-1</sub> se localiza en un integrón asociado a la denominada “Isla Genómica de *Salmonella-1*” (SGI 1) junto con genes que codifican resistencia a tetraciclina y florfenicol/cloranfenicol y otro integrón portador del gen *aadA2* de resistencia a estreptomicina. El gen *oxa1* forma parte de un integrón, denominado In-C, que contiene también el gen *aadA1* de resistencia a estreptomicina. Todos estos genes se localizan en el cromosoma bacteriano.
7. La presencia de la isla genómica de resistencia se relaciona estrechamente con el fagotipo 104, mientras que no hay relación entre la presencia del integrón In-C y el fagotipo.
8. Las cepas portadoras de la isla genómica de resistencia muestran una distribución clonal, según se deduce del análisis por PFGE, mientras que el resto de las cepas estudiadas muestran poca relación entre sí.

# MATERIAL Y METODOS

---

## 1. ESTUDIO DE EVOLUCIÓN DE RESISTENCIAS

Se realizó con los datos obtenidos de aislados de muestras remitidos al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario “La Paz” durante el periodo comprendido entre el 1 Enero del año 1990 y el 31 diciembre del año 2001.

- El aislamiento de las cepas de *Salmonella* se realizó en medio selectivos diferenciales según las muestras.
- La identificación bioquímica de los aislados se realizó por el sistema semiautomático GNI (*Gram negative identification*) Vitek® o el sistema Wider® a partir del año 2000.
- El serogrupo se determinó con los antisueros específicos (Difco®, Laboratorios) mediante aglutinación en porta.
- La sensibilidad a los distintos antibióticos se realizó por el método PASCO® (Francisco Soria Melguizo S.A.) hasta 1999 y con el sistema semiautomático WIDER ® (BioMerieux) a partir del año 2000. Ambos utilizan el sistema de microdiluciones y siguen los criterios de la NCCLS para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los distintos antibióticos.

**Tabla M.1:** Puntos de corte determinados por la NCCLS para los distintos antibióticos

Antibiótico	CMI (µg/ml)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Ampicilina	≤8	16	≥32
Amoxicilina/clavulánico	≤8/4	16/8	≥32/16
Cefazolina	≤8	16	≥32
Cefuroxima	≤8	16	≥32
Gentamicina	≤4	8	≥16
Nitrofurantoína	≤32	64	≥128
Trimetoprin/sulfametoxazol	≤2/38	-	≥4/76
Tetraciclina	≤4	8	≥16
Cloranfenicol	≤8	16	≥32

- Las cepas fueron conservadas en viales CRYOBANK® (Mast diagnostics) según las indicaciones del fabricante a una temperatura de -70 °C desde su aislamiento hasta el momento de su estudio.
- Los datos recogidos fueron los siguientes:

DATOS CORRESPONDIENTES AL PACIENTE:

Edad

Sexo

Servicio de procedencia

Enfermedad de base en caso de sepsis por *Salmonella spp.*

DATOS CORRESPONDIENTES A LA MUESTRA:

Fecha de aislamiento

Tipo de muestra.

DATOS CORRESPONDIENTES AL AISLADO:

Serogrupo.

Sensibilidad a los siguientes antibióticos:

Ampicilina

Amoxicilina/clavulánico

Piperacilina

Cefazolina

Cefuroxima

Cefotaxima

Acido nalidíxico

Ciprofloxacino

Gentamicina

Cotrimoxazol

## 2. ESTUDIO MOLECULAR

Realizado en el departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia en la Universidad Complutense de Madrid.

### 2.1.MEDIOS UTILIZADOS PARA EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS:

- MEDIO LB (LURIA BERTANI).

Composición:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	10 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Se ajustó el pH a un valor de 7 con NaOH 0,1 N y se esterilizó el medio en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y a 1 atmósfera.

El medio sólido se preparó de la misma manera añadiendo 20 g/l de agar.

- MEDIO CON ANTIBIÓTICOS

Se preparó medio con antibióticos para seleccionar los transconjugantes tras la conjugación y para crear presión antibiótica que permitiera a las células conservar el plásmido.

CONCENTRACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRE DE ANTIBIÓTICOS:

ampicilina	100 mg/ml
ácido nalidíxico	25 mg/ml

Se añadió en todos los casos 1 µg/ml de solución madre al medio base LB para conseguir la concentración final de 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de ácido nalidíxico.

### 2.2. CONJUGACIÓN

Se realizó la conjugación de las cepas seleccionadas con *E.coli* αDH5 para comprobar si los plásmidos objeto de estudio eran o no conjugativos.

La cepa receptora mostraba resistencia al ac.nalidíxico y era sensible a ampicilina. Las cepas de *Salmonella* eran todas resistentes a ampicilina y sensibles a ac.nalidíxico.

### 2.2.1. CONJUGACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

- Se incubaron las cepas a conjugar y la cepa receptora (*E.coli*) en medio líquido LB durante 18 horas y a 37 °C en agitación.
- En una placa de LB sin antibióticos se depositaron 200 µl de *E. coli* y sobre él, 20 µl de *Salmonella* sin extender por la placa y procurando que la gota quedara lo más delimitada posible.
- Se incubó la placa a 30 °C durante 4 horas. Pasado este tiempo se sembró la gota en un medio selectivo con ampicilina y ac. nalidíxico y se incubó a 37 °C durante 24 horas. En este medio crecen únicamente las colonias de *E. coli* que han adquirido el plásmido de resistencia a ampicilina de las cepas de *Salmonella* correspondientes.
- Se estudiaron las resistencias de las colonias resultantes mediante el sistema WIDER®.

### 2.2.2 CONJUGACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

- Se partió de los cultivos en fase exponencial y se centrifugaron para eliminar el sobrenadante con los restos de antibiótico.
- Se resuspendieron las células en un volumen igual de LB estéril y se incubó una mezcla de 900 µl de *E. coli* y 100 µl de *Salmonella* a 30 °C durante 4 horas.
- De este medio original se realizaron diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ .
- Se sembraron 100 ml de cada dilución en LB con ampicilina y ácido nalidíxico y se estudiaron las resistencias de las colonias resultantes mediante el sistema WIDER®.

## 2.3. EXTRACCIÓN Y VISUALIZACIÓN DEL DNA.

### 2.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE BACTERIAS.

Para ello se siguió el procedimiento descrito por Ausbel (Ausbel *et al.*, 1993). Se cultivaron las bacterias hasta fase estacionaria, posteriormente se lisaron y se eliminaron las proteínas por tratamiento con proteinasa K. Los restos de membrana, polisacáridos y restantes proteínas se eliminaron mediante precipitación selectiva con CTAB (N-cetil-N, N,N-trimetil-amonio bromuro), y el DNA del sobrenadante obtenido se precipitó con isopropanol.

### DESCRIPCION DEL MÉTODO

1.- Cultivar el microorganismo en medio LB durante toda la noche a 37 °C, con agitación (200 rpm) y en las condiciones adecuadas de selección de antibiótico.

2.- Recoger las células de 3 ml de cultivo centrifugando 1 minuto a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante.

3.- Resuspender el precipitado en 550 µl de tampón TE.

4.- Añadir 30 µl de SDS al 10% y 3 µl de proteinasa K para obtener una concentración final de 100 µg/ml de proteinasa K en SDS al 0,5%. Mezclar e incubar 1 hora a 37 °C (en el caso de que se parta de 10 ml de cultivo se multiplicarán todas estas cantidades por 10).

5.- Añadir 100 µl de NaCl 5 M y mezclar vigorosamente. Este paso es muy importante, ya que si la concentración de sal se encuentra por debajo de 0,5 M el CTAB formará un complejo insoluble con el DNA precipitándolo.

6.- Añadir 80 µl de la solución CTAB/NaCl previamente redissuelto en un baño a 65 °C y mezclar. Incubar durante 10 minutos a 65 °C.

7.- Añadir 300 µl de cloroformo/alcohol isoamílico y 30 µl de fenol. Mezclar vigorosamente hasta que adquiera un color blanquecino y centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm. En este paso se eliminan los complejos CTAB-proteínas/polisacáridos.

8.- Recoger la fase acuosa con mucho cuidado de no tocar la interfase y añadir igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico, mezclar y centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm. En algunas especies bacterianas la interfase que se forma tras la extracción con cloroformo no es lo suficientemente compacta dificultando la separación de la fase acuosa. En estos casos se puede eliminar la interfase con un palillo estéril (libre de DNAsas) antes de recoger la fase acuosa.

9.- Los restos de los complejos insolubles de CTAB son eliminados mediante una nueva extracción con fenol/cloroformo.

10.- Transferir la fase acuosa a un eppendorf y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol previamente enfriado a -20 °C. No es necesario añadir sales ya que la cantidad de NaCl presente en a solución es suficiente para precipitar el DNA. Tras añadir el isopropanol invertir varias veces el eppendorf hasta que aparezca un precipitado blanquecino (hebras de DNA).

11.- Centrifugar 15 minutos a 13.000rpm y lavar el precipitado con 100-200  $\mu$ l de etanol al 70% para eliminar los restos de CTAB.

12.- Secar el DNA y resuspender en 100  $\mu$ l de tampón TE o agua bidestilada. La resuspensión puede tardar una hora debido al elevado peso molecular del DNA. Para facilitarla se puede llevar a 65 °C 10 minutos y posteriormente al hielo.

13.- Conservar a -20 °C.

#### SOLUCIONES NECESARIAS PARA EL ENSAYO

##### **-Solución de CTAB/NaCl**

Disolver 4,1 g de NaCl 0,7 M en 80 ml de agua y añadir 10 g de CTAB al 10%.

Si es necesario calentar a 65 °C para disolverlo.

Ajustar el volumen a 100 ml.

#### **2.3.2. EXTRACCION DE DNA PLASMIDICO DE *Escherichia coli***

Se utilizó el método descrito por Birboim y Doly (1979) con algunas modificaciones que se especifican a continuación:

#### DESCRIPCION DEL MÉTODO

1.- Cultivar la bacteria en 10 ml de LB, suplementado si es necesario con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37 °C y con agitación (200 rpm).

2.- Recoger las células por centrifugación a 6.000 rpm durante 5 minutos.

3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 200  $\mu$ l de la solución de **lisis I** previamente enfriada. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

4.- Añadir 400  $\mu$ l de la solución de **lisis II**, mezclar por inversión suave del tubo, añadir 10  $\mu$ l de RNasa e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

5.- Añadir 300  $\mu$ l de la solución de **lisis III** previamente enfriada, mezclar por inversión suave del tubo e incubar 10 minutos en hielo.

6.- Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm y recoger el sobrenadante. Si quedan restos de precipitado centrifugar nuevamente en las mismas condiciones. Precipitar el DNA por adición de 500  $\mu$ l de isopropanol, enfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

7.- Centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 200  $\mu$ l de TE. Añadir 200  $\mu$ l de LiCl 5 M e incubar 5 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

8.- Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm, recoger el sobrenadante y precipitar el DNA por adición de 2 volúmenes de etanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 0,1 volumen de acetato sódico 3 M. Incubar durante al menos 20 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 200  $\mu$ l de etanol al 70% enfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm, eliminar el sobrenadante y secar el DNA al vacío. Resuspender en 20  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) o agua.

Normalmente 1  $\mu$ l de esta solución contiene el DNA suficiente para visualizarlo en un gel.

#### SOLUCIONES NECESARIAS PARA EL ENSAYO

##### **-Solución de lisis I**

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl 25 mM	pH 8.0

##### **-Solución de lisis II**

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Debe prepararse antes de su uso a partir de NaOH 2 N y SDS al 10%.

##### **-Solución de lisis III**

Acetato potásico	29,4 g
Acético glacial	11,5 ml
H <sub>2</sub> O	hasta 100 ml

#### **2.3.3. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE *Salmonella*.**

Se utilizó el método de Kado y Liu (1981).

### DESCRIPCION DEL MÉTODO

- 1.- Cultivar el microorganismo en 3 ml de LB a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 12 horas.
- 2.- Recoger 2 ml de cultivo por centrifugación durante 5 minutos a 6000 rpm.
- 3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 200 µl de TE.
- 4.- Lisar las células por adición de 400 µl de la solución de lisis (lauril-sulfato sódico al 3% en Tris-HCl 50 mM, pH 12,6) mezclando por inversión suave del tubo. Incubar a 60 °C durante 20 minutos.
- 5.- Añadir 1 volumen de fenol/cloroformo (v/v) y centrifugar a 13.000 rpm, 5 minutos.
- 6.- Recoger la fase acuosa y proceder igual que en el punto anterior.
- 7.- Tratar la fase acuosa con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm y recoger la fase superior.
- 8.- Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol de 98° previamente enfriado, y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M. Incubar a -20 °C durante al menos 20 minutos.
- 9.- Centrifugar durante 15 minutos a 13.000 rpm. Lavar el precipitado con etanol al 70% y secar al vacío.
- 10.- Resuspender en 20 µl de agua o TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM)

### **2.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.**

Se añadió al DNA 1 µl de tampón de carga por muestra y se realizó la electroforesis según las técnicas descritas por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

Para observar el DNA extraído se cargó en geles de agarosa al 0,7% con bromuro de etidio, se visualizó en un transiluminador de 310 nm de longitud de onda y se fotografió con película Polaroid y filtro rojo.

Como marcador de pesos moleculares se empleó el marcador de DNA 1 kb Plus DNA Ladder, suministrado por la casa comercial Boheringer Mannheim.

### PREPARACION DEL TAMPON DE CARGA

- 15 g sacarosa 50%
- 3 ml EDTA 0,5M
- Trazas de azul de bromofenol
- 30  $\mu$ l SDS 10%

### **2.5. EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.**

- Realizar una electroforesis del DNA en geles de agarosa ultrapura, *Seakem GTG*, suministrada por la marca comercial FMC Bio Products.
- Teñir el gel con bromuro de etidio en un baño durante 15 minutos, tras esto irradiar con luz ultravioleta mediante una lámpara o transiluminador, cortar las bandas que interesen por tamaño e introducir en un eppendorf.
- Para la elución del DNA se siguieron las instrucciones de los fabricantes del *Sephaglas Band Kit* (Pharmacia).

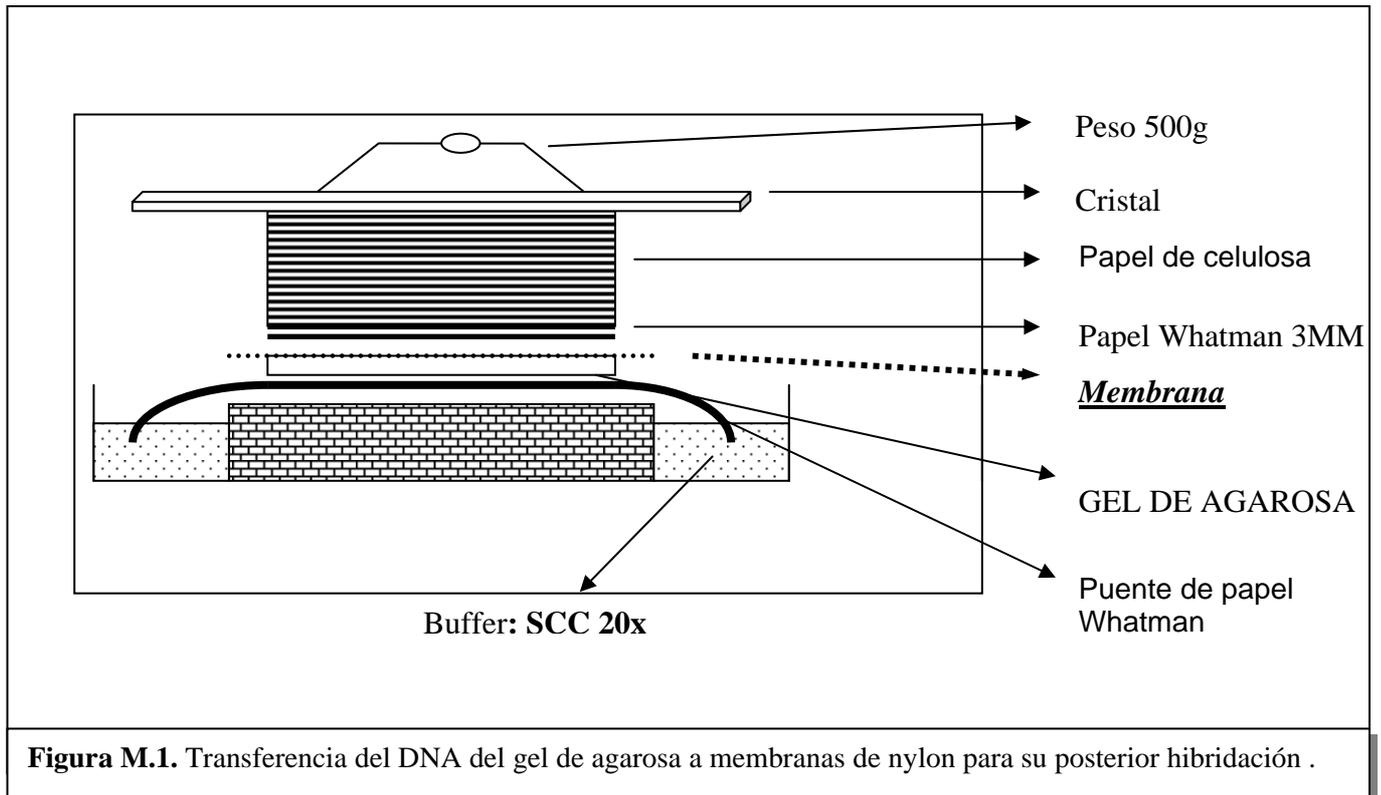
### **2.6. HIBRIDACIÓN DE MEMBRANAS CON SONDAS ESPECÍFICAS**

#### **2.6.1. TRANSFERENCIA DE DNA DE GEL A MEMBRANA.**

Para la transferencia de DNA de los geles de agarosa a soportes sólidos se utilizaron membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer) y se siguió el método de transferencia capilar de Southern 1975.

El grado de transferencia del DNA depende de la concentración de agarosa así como del tamaño de los fragmentos del DNA que se quieran transferir, tamaños del orden de 1 Kb se transfieren desde un gel del 0,7% en una hora, fragmentos mayores del 15 Kb requieren al menos 18 horas, e incluso a veces, la transferencia es incompleta. Esto se puede solventar depurinizando parcialmente el DNA con un ácido fuerte, la hidrólisis se completa con un tratamiento con un álcali fuerte que romperá los enlaces fosfodiéster en los sitios donde se haya producido la depurinización. Tras este tratamiento los fragmentos grandes de DNA tienen un tamaño no mayor de 1 Kb de longitud, permitiendo su transferencia de una forma eficaz. La transferencia por capilaridad se realizó por condiciones neutras o por condiciones alcalinas.

Los fragmentos de DNA son arrastrados del gel mediante un flujo de líquido por la acción capilar establecida por una pila de papel absorbente seco según ilustra la figura M.1.



#### PREPARACIÓN DEL GEL ANTES DE LA TRANSFERENCIA

Para transferir el DNA del gel a membrana deben utilizarse geles sin bromuro de etidio; para visualizar el DNA se tiñe el mismo en un baño de BrEt 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 10 minutos. Posteriormente se lava el gel con agua bidestilada y se deja en una solución de HCl 0,25 M durante 15 minutos a T<sup>a</sup> ambiente para lograr la depurinización.

#### DESCRIPCIÓN DEL METODO

- Añadir **solución 1** y dejar 30 minutos en agitación. Eliminar la solución y repetir la operación otros 30 minutos.
- Lavar el gel con agua destilada
- Añadir **solución 2** y dejar 30 minutos en agitación. Repetir la operación.

## SOLUCIONES NECESARIAS PARA EL ENSAYO

### **-Solución 1**

87,6 g NaCl  
20 g NaOH  
agua destilada csp 1l.  
Autoclavar la solución

### **-SSC 20x**

175,5 g NaCl  
88,22 g Citrato trisódico  
agua destilada csp 1l.  
Autoclavar la solución.

### **-Solución 2**

157,6 g tris HCl  
87,6 g NaCl  
agua bidestilada csp 1l.  
Ajustar el pH a 7  
Autoclavar la solución.

Después de una noche, se puede desmontar el dispositivo.

Secar la membrana entre dos papeles Whatman

Fijar a 80 °C durante un tiempo no menor a 1 hora.

## **2.6.2. MARCAJE DEL DNA SONDA PARA LA HIBRIDACIÓN**

El DNA se marcó por incorporación al azar de dUTP unido a la digoxigenina. La cantidad de DNA marcado depende de la cantidad de prueba de la que se haya partido, así para 1 µg de DNA prueba se obtienen 260 ng de DNA marcado. La sonda así marcada se puede almacenar sin pérdida de eficiencia a -20 °C durante 1 año.

Se partió de 2 a 3 µg de DNA sonda que se desnaturalizó por calentamiento a 100 °C durante 10 minutos, enfriándolo a continuación inmediatamente en hielo.

Se añadieron 2 µl de hexanucleótidos aleatorios, 2 µl de la mezcla de dNTPs de marcaje, agua estéril hasta 19 µl, y 1 µl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E.coli*. Se incubó de 16 horas a 37 °C. La reacción se paró añadiendo 2 µl de EDTA 0,2 M pH 8 y se precipitó a continuación el DNA marcado. El pelet obtenido se resuspendió en 50 µl de TE.

### 2.6.3. HIBRIDACIÓN DE LA MEMBRANA CON SONDAS ESPECÍFICAS

#### PREHIBRIDACIÓN

Se incubó la membrana en rotación durante 2 horas a 65 °C con 50 ml de **solución de prehibridación** y 125 µl de esperma de salmón previamente desnaturalizado a 100 °C. Se separaron dos alícuotas, una para la prehibridación y la segunda para utilizar junto con la sonda para la hibridación.

El esperma de salmón así como el agente bloqueante de la solución de prehibridación tienen la función de unirse de forma inespecífica al DNA recubriéndolo por completo. Cuando la sonda híbrida con su zona específica, desplazará tanto al agente bloqueante como al esperma de salmón consiguiéndose así una unión más específica y reduciendo en lo posible el ruido de fondo que pudiera existir.

#### HIBRIDACIÓN

Se añadió a la segunda alícuota de la solución anterior la sonda específica en cada caso, previamente desnaturalizada (100 °C durante 10 minutos) y se incubó en las mismas condiciones durante toda la noche..

#### LAVADOS DE HIBRIDACIÓN

Se realizaron en este paso varios lavados para eliminar el exceso de sonda que no se había fijado a las zonas específicas del DNA de la siguiente forma:

- Lavar cada membrana 2 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con 25 ml de **solución de lavado 1**.
- Lavar cada membrana 2 veces durante 15 minutos a 65 °C con 25 ml de **solución de lavado 2**.
- Enjuagar cada membrana con 25 ml de **Buffer 1 1x**

#### EQUILIBRADO

En esta etapa se añadieron los anticuerpos antidigoxigenina que se unirán a los antígenos presentes en la sonda marcada:

- Añadir 25 ml de **Buffer 2** a cada botella y dejar 30 minutos a temperatura ambiente.

- Eliminar.
- Añadir 25 ml de Buffer 2 más 5  $\mu$ l de anticuerpos antidigoxigenina a cada botella.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar cada membrana 2 veces durante 15 minutos a temperatura ambiente con 25 ml de Buffer 1.

#### REVELADO

Para ello se utiliza el sustrato quimioluminiscente CSPD® (Roche) que permite detectar de una forma rápida y sensible distintas biomoléculas, imprimiendo la señal en un film que es posteriormente revelado. Este proceso se realizó en las siguientes etapas:

- Lavar cada membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente con 24 ml de **solución 3**.
- Preparar por membrana 1 ml de solución 3 más 10  $\mu$ l de CSPD® y colocar sobre las mismas en el soporte fotográfico.
- Cerrar e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Preincubar 37 °C durante 10 minutos para incrementar la reacción de luminiscencia.
- Colocar el film fotográfico en oscuridad.
- Esperar 30 minutos para el revelado.
- Revelar el film fotográfico.

Una vez revelado y seco se puede limpiar con lejía para observar las bandas con mayor nitidez.

#### DESHIBRIDACIÓN

Las membranas se pueden deshibridar para volver a hibridar posteriormente con otras sondas.

Para ello se procede del siguiente modo:

- Colocar las membranas de nuevo en las botellas.
- Lavar cada membrana con 25 ml de agua bidestilada.

- Añadir 25 ml de **solución de deshibridación** en cada botella e incubar durante 15 minutos a 65 °C.
- Lavar cada membrana 3 veces con SSC 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Conservar el SSC 2x en bolsas cerradas herméticamente.

SOLUCIONES NECESARIAS PARA EL ENSAYO

**-Solución de hibridación**

12,5 ml de SSC 20x  
 0,5 g agente bloqueante  
 200 µl SDS 10%  
 0,1 g laurilsarcosina  
 agua bidestilada csp 50 ml

**-Solución de lavado 1**

5 ml de SSC 20x  
 0,5 ml de SDS 10%  
 agua bidestilada csp 50 ml

**-Solución de lavado 2**

0,25 ml de SSC 20x  
 0,5 ml de SDS 0,1%  
 agua bidestilada csp 50 ml

**-Solución 3**

5 ml de **Buffer 3**  
 1,75 ml Cloruro de Magnesio 1 M  
 agua bidestilada csp 50 ml

**-Buffer 1 10x**

58 g Ac maleico 100 mM  
 4,383 NaCl 150 mM  
 0,3% Tween 20  
 agua bidestilada csp 500 ml  
 Ajustar pH a 7,5

**-Buffer 2**

75 ml Buffer 1  
 0,75 agente bloqueante

**-Buffer 3**

30,27 ml Tris HCl 100 mM  
 14,5 ml NaCl  
 agua bidestilada csp 500 ml  
 Ajustar pH a 9,5

**-Solución de deshibridación**

0,25 ml SDS 10%  
 2,5 ml NaOH 2 N  
 agua bidestilada csp 25 ml

**Las cantidades especificadas son para 1 membrana**

**-SONDAS UTILIZADAS:** TEM, PSE, SPV.

Se obtienen de los productos de PCR con los cebadores TEM-1 y 2 , PSE-1 y 2 y SPV-1 y 2 respectivamente (Tabla M.3) y el marcaje se realiza como se menciona en el apartado 2.6.2.

## 2.7. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DE DNA.

### 2.7.1. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

Se realizó la restricción del DNA cromosómico para hacer la transferencia a membrana y posterior hibridación con sondas específicas

La digestión del DNA realizó según lo indica Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989), empleando el material distribuido por Boehringer Mannheim.

Se utilizó la enzima de restricción EcoRV que tiene 100% de actividad en Buffer B.

Las proporciones utilizadas fueron las siguientes:

Buffer B	Enzima EcoRV	RNAsa	Agua bidestilada	DNA cromosómico
2 µl	0,5 µl	1,5 µl	16 µl	40 µl

La mezcla permaneció a 37 °C durante toda la noche (el tiempo puede oscilar entre 4 y 24 h).

### 2.7.2. AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación del DNA se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando el termociclador Perkin Elmer Cetus modelo DNA Thermal Cycler.

Los dNTP's fueron suministrados por la casa comercial Boehringer Mannheim.

El DNA molde utilizado es el procedente de la suspensión de una colonia del cultivo en 100 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Mediante este método se consigue disminuir los preparativos para montar una reacción de PCR, ya que se evitan las etapas de extracción de DNA y su posterior purificación (Tabla M.2.).

**Tabla M.2:** Componentes necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
H <sub>2</sub> O destilada estéril	20 µl	
Tampón II PCRx10	10 µl	1x
DGTP 2,5 mM	2 µl	0,05 mM
DCTP 2,5 mM	2 µl	0,05 mM
DATP 2,5 mM	2 µl	0,05 mM
DTTP 2,5 mM	2 µl	0,05 mM
Cebador 1	10 µl	5 picomoles/µl
Cebador 2	10 µl	5 picomoles/µl
DNA molde	10 µl	

Se desnaturaliza el DNA molde por calentamiento a 97 °C durante 10 minutos. Mientras tanto se prepara los restantes componentes de la reacción de PCR:

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
H <sub>2</sub> O destilada estéril	23 µl	
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	8 µl	2 mM
DNA Polimerasa	1 µl	

Esta mezcla de la enzima DNA polimerasa, del MgCl<sub>2</sub> y del H<sub>2</sub>O destilada estéril, se añade una vez han transcurrido los 10 minutos de desnaturalización a 97 °C para no someter a la enzima a altas temperaturas durante más tiempo del necesario. Las DNA polimerasas utilizadas fueron la *Taq* DNA polimerasa<sup>TM</sup> (Boehringer Mannheim), y la Expand High fidelity PCR system de Roche cuando el producto de la PCR iba a ser secuenciado.

A continuación se describen las fases que tiene lugar durante la reacción de amplificación:

#### Fase de desnaturalización:

- Temperatura: 92 °C; permite la separación de las dos hebras de DNA molde.

- Tiempo: 2 minutos. No es conveniente prolongar excesivamente los periodos de desnaturalización porque, aunque la *Taq* polimerasa es resistente a estas temperaturas, una excesiva exposición a las mismas reduce su actividad.

**Fase de hibridación:** Es la fase más crítica, ya que existen muchos factores que pueden interferir en la unión de los cebadores. La eficiencia del proceso está condicionada a la fuerza iónica, concentración de los cebadores, disponibilidad de sitios de alineamiento y presencia de posiciones competidoras.

- Temperatura: Depende de la temperatura de desnaturalización de los oligonucleótidos, que se puede calcular según la fórmula:  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ . La temperatura que se empleará en esta fase será de 8 °C inferior a la  $T_m$  calculada. Para evitar problemas de especificidad y eficacia en la reacción de amplificación, se deberán diseñar pares de oligos con  $T_m$  similares.
- Tiempo: 30 segundos.

**Fase de síntesis:** En esta fase la *Taq* polimerasa sintetiza la cadena complementaria.

- Temperatura: 72 °C.
- Tiempo: Depende de la longitud del fragmento a sintetizar; segmentos de 500 pb se pueden elongar en 30 segundos, mientras que en el caso de que sean de 500-1500 pb, habrá que prolongar esta fase a 60 segundos, y fragmentos mayores requerirán 90 segundos o más.

Estas tres fases que constituyen un ciclo se repiten 29 veces, para generar una cantidad suficiente de producto amplificado, mientras la *Taq* polimerasa se mantenga activa.

Se realiza un último ciclo con una fase de desnaturalización y de alineamiento idéntica a las de los apartados anteriores, pero con una fase de síntesis a 72 °C que dura 10 minutos con el fin de completar zonas no sintetizadas en los ciclos anteriores.

Por último se cargaron 5 µl de la reacción en un gel de agarosa para verificar que se había producido la amplificación.

Los cebadores empleados dependen del objetivo de la PCR (Tabla M.3.).

**Tabla M.3:** Cebadores empleados para las diferentes amplificaciones.

<b>OBJETIVO DE LA PCR</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
Amplificación del gen <i>bla<sub>TEM</sub></i>	<b>TEM 1 (T-1)</b> AAAGATGCTGAAGATAAGTTG	<b>TEM 2 (T-2)</b> GTCTGACAGTTACCAATGCTT
Amplificación del gen <i>bla<sub>PSE</sub></i>	<b>PSE 1 (P-1)</b> AATGGCAATCAGCGCTTCCC	<b>PSE 2 (P-2)</b> GGGGCTTGATGCTCACTCCA
Búsqueda de integrones	<b>5'CS (I-1)</b> GGCATCCAAGCAGCAAG	<b>3'CS (I-2)</b> AAGCAGACTTGACCTGA
Amplificación de los genes <i>tet</i> y <i>flo</i>	<b>CL-1 (C-1)</b> CACGTTGAGCCTCTATATGG	<b>TET-2 (T-2)</b> AGCAACAGAATCGGGAACAC
Amplificación del gen <i>sul</i>	<b>SUL 1 (S-1)</b> TCGGATCAGACGTCGTGGA	<b>SUL 2 (S-2)</b> CCAGCCTGCAGTCCGCCT
Amplificación del gen <i>spv</i>	<b>SPV 1</b> ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA	<b>SPV 2</b> TGTCTTCTGCATTTGCCCACCATCA

## 2.8. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

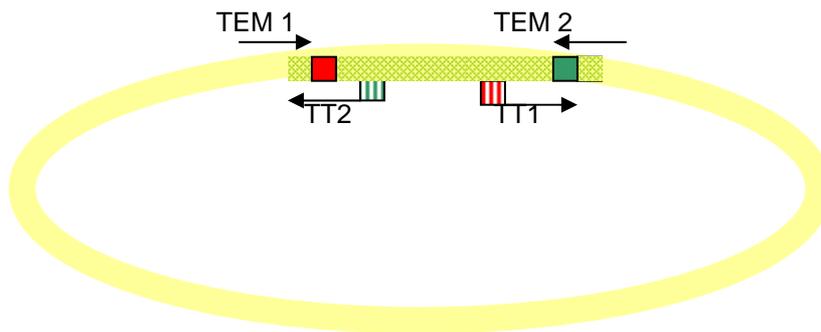
Mediante esta técnica se consigue eliminar del producto de PCR todos los reactivos sobrantes de la reacción (sales, restos de cebadores...) de esta forma conseguimos purificar el fragmento amplificado. Se utilizó para ello el sistema GeneClean® II de la casa comercial Q Biogene siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.9. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL DNA.

La secuenciación automática se realizó en el secuenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).

### 2.9.1. SECUENCIACION DE DNA PLASMÍDICO

Se realizó la extracción según lo descrito en el apartado 2.3.3. y se secuenció el DNA plásmidico utilizando los cebadores TEM 1 y TEM 2 (Tabla M.3) Con objeto de mejorar la secuencia de los extremos del gen *bla<sub>TEM</sub>* se diseñaron los cebadores internos TT1 y TT2 que permitieron completar la secuencia sin ambigüedades (Figura M.2.).



**Figura M.2:** Esquema de secuenciación del gen  $bla_{TEM}$  partiendo de DNA plasmídico.

TT1: TTACTCTAGCTTCCCGGCAA; T<sub>m</sub> 63,6 °C

TT2: GATGCTTTTCTGTGACTGGTGAG ; T<sub>m</sub> 64,9 °C

## 2.9.2. SECUENCIACION DE PRODUCTOS DE PCR

### 2.9.2.1. SECUENCIACION DE LOS DOS AMPLICONES (A Y B)

Los dos integrones se encontraron simultáneamente en las mismas cepas y debido a su similar tamaño hubo que recurrir a diferentes estrategias para su separación y posterior secuenciación. Se denominó al amplicón de menor tamaño A (1000 pb), y al de mayor tamaño B (1200 pb).

#### AMPLICÓN A:

Se cargó el producto de PCR en un gel de agarosa al 1% para permitir una mayor separación entre las bandas. Tras la electroforesis se procedió a la elución de la banda siguiendo el procedimiento detallado en el punto 6 y tras la obtención de la misma se realizó una PCR del resultado de la elución para conseguir una mayor concentración para realizar la secuenciación. El producto de la PCR se pasó por una columna de cromatografía como se detalla en el punto 10 y se secuenció con los cebadores I-1 e I-2 (Tabla M.3.)

Para terminar la secuencia y eliminar las ambigüedades se diseñaron dos cebadores internos que permitieron la secuencia completa del producto de PCR en doble cadena.

IA-1: CGCTGCCGGACCTACCAA; T<sub>m</sub> 69,6 °C

IA 2: ATGACATTCTTGCGGGTATCT; T<sub>m</sub> 62,2 °C

### AMPLICÓN B:

Se intentó la misma estrategia que en el caso anterior, pero cuando se realizó la PCR de la banda eluída se amplificaron de nuevo los dos integrones, probablemente como consecuencia del arrastre de la banda pequeña.

Se recurrió a una segunda estrategia que consistió en realizar una PCR con los cebadores I-1 y P-2 (Tabla M.3.) de la colonia que portaba este integrón. Para terminar la secuencia y eliminar las ambigüedades se diseñaron dos cebadores internos IB-1 e IB-2 que permitieron la secuencia completa del producto de PCR en doble cadena de igual modo que muestra la figura M.3.

IB-1: ATCAGGCTCAATACGGTCTA; Tm 58.7 °C

IB 2: TAGACCGTATTGAAGCCTGAT; Tm 58.7 °C

### **2.9.9.2. SECUENCIA DEL AMPLICÓN C.**

Debido al gran tamaño del amplicón, se realizaron seis cebadores internos que permitieron la secuencia del fragmento completo en doble cadena.

IC 1: GGATAACGCCACGGAATGATGT; Tm 68,7 °C

IC 11: GGCCGTCCCGACTTGATTGAA; Tm 72,2 °C

IC 111: GCGAAACCCAAACAACAGAAAATT; Tm 67.5 °C

IC 2: GGAACAGCAATCATACACCAA; Tm 62,3 °C

IC 22: GCGATCACCATTCTAAACACACTA; Tm 63.8 °C

IC 222: GGTATCTTCGAGCCAGCCACG; Tm 70.0 °C

### **2.10. SOPORTE INFORMÁTICO.**

Se consultaron bancos de genes y proteínas del EMBL (European Molecular Biology Laboratory) y bancos de secuencias internacionales interconectados. A través de la red Internet suministrada por la U.C.M. se emplearon los programas de búsqueda de secuencias homólogas depositadas en los bancos de datos correspondientes.

Direcciones de páginas web visitadas:

**Homología de secuencias:** <http://www.ncbi.nlm.nih/BLAST>

**Biología molecular:** <http://www.queensu.ca/micr/faculty/Kropinski/online.html>

**Filogenia molecular:** <http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>

### 3. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

El estudio epidemiológico se realizó en el Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda.

#### 3.1. SEROTIPIFICACIÓN:

Se realiza la aglutinación de las cepas con los correspondientes sueros (Difco) que contienen los anticuerpos que aglutinan con los antígenos específicos de cada serogrupo.

Para determinar el antígeno flagelar se hace un pase previo de la cepa al medio GELOSA-MOVILIDAD, y de la colonia crecida en ese medio se procede a realizar la aglutinación con los sueros específicos.

#### REALIZACIÓN DEL MEDIO GELOSA –MOVILIDAD.

Triptosa soja agar	30 g
Glucosa	1 g
Extracto de levadura	1 g
Extracto de carne	5 g
Bacto agar	5 g
Desoxicolato sódico	0,350 g
Agua destilada	csp.1 l

Ajustar pH a 7,6 y autoclavar.

#### 3.2. FAGOTIPIFICACIÓN

Para la realización del fagotipo se utiliza la prueba de la gota de Adams. La sensibilidad de una cepa bacteriana a un determinado fago se demuestra por la aparición de un área de lisis que puede variar desde placas aisladas o lisis semiconfluente a lisis confluyente (Figura M.5.)

El patrón de susceptibilidad de una cepa bacteriana a un conjunto determinado de bacteriófagos se denomina FAGOTIPO.

#### REALIZACIÓN DEL ENSAYO:

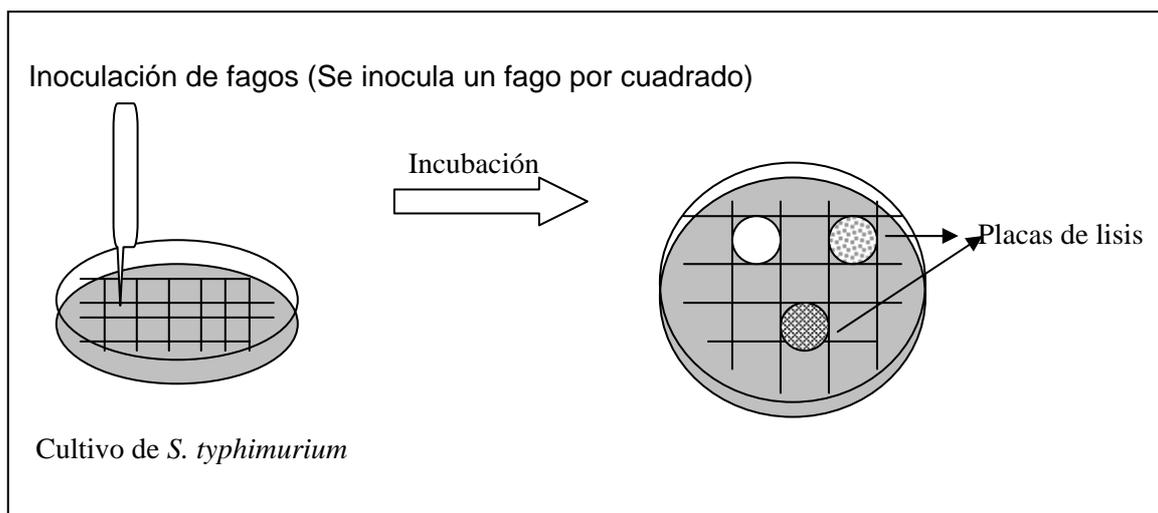
- Incubar las cepas en LB suplementado con CINA durante 1 hora a 37 °C y en agitación.
- Sembrar el cultivo anterior en toda la placa, con asa Digrafski y dejar secar.

- Inocular 13  $\mu$ l de cada fago de la colección en las placas sobre una cuadrícula. Para el caso de *S. typhimurium* la colección consta de 31 fagos + 5 adicionales (A: 1, 22, 3, 10, 18).
- Incubar a 37 °C durante 18 horas y observar placas de lisis

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 1-6 placas: poner el nº placas
- 7-20 placas: +/-
- 20-40 placas: +
- 40-80 placas: ++
- >80 placas: +++
- >50% de la gota: SC (Semiconfluente)
- 90-100% de la gota: CI (Confluente)

En función del perfil obtenido se asignará uno u otro fagotipo según el esquema de Anderson (1997). Si el perfil no se ajusta a ningún patrón, el resultado será PNR (patrón no reconocido).



**Figura M.5:** Esquema de realización del fagotipado de *S. typhimurium*

### 3.3. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO PFGE

Día 1: Preparación de las cepas.

Sembrar las cepas en **TSA** e incubar a 37 °C durante 24 horas.

Día 2: Preparación de los bloques / lisis de la bacteria.

- Hacer una suspensión de las colonias en 2 ml de **Buffer SE** hasta conseguir una turbidez 6 de MacFarland.
- Preparar agarosa para los bloques partiendo de agarosa multipurpose ó D5 a una concentración final de 1% en Buffer SE. Llevarla a 56 °C hasta que licúe totalmente.
- Mezclar 0,5 ml de suspensión con 0,5 ml de agarosa en un eppendorf y añadir a los moldes.
- Dejar enfriar en hielo o a 4 °C hasta que solidifiquen totalmente.

LISIS DE LA BACTERIA

- Preparar el **Buffer de lisis** añadiéndole 1mg/ml de proteinasa K antes de su utilización.
- Colocar los bloques en un tubo con buffer de lisis suficiente para cubrirlos e incubar a 56 °C hasta el día siguiente.

Día 3: Cambio de Buffer

- Cambiar el Buffer de lisis y añadir nuevo Buffer.
- Incubar en las mismas condiciones otras 24 horas.

Día 4: Lavados

- Lavar los bloques con **Buffer TE** 8 veces a intervalos aproximados de media hora manteniendo los bloques entre cada lavado a 4 °C.
- Después del último lavado mantener los bloques a 4 °C. Duran hasta 1 año en estas condiciones.

Día 5: Digestión y electroforesis

- Cortar una porción del bloque del mismo tamaño que el pocillo del gel donde se va a cargar posteriormente.
- Poner dicha porción en un eppendorff con 200 µl de **buffer de digestión** preparado de la siguiente manera: 180 µl de agua + 20 µl de buffer de la enzima correspondiente a la concentración de 10 x. (El buffer empleado es "Buffer H" SvRE/Cut for restriction enzymes Roche®)

- Dejar el bloque equilibrando media hora aproximadamente y pasado ese tiempo eliminar el buffer.
- Preparar un nuevo buffer y añadir la endonucleasa Xba I 20.000U (10U/ $\mu$ l) Roche®).
- Dejar actuar la enzima 18 horas a 37 °C. (Se puede hacer una segunda digestión dejando en ésta la enzima actuando de 3-4 horas)
- La reacción se para, poniendo el bloque en contacto con 200 ml **TBE** 0,5 x de 10-15 minutos en nevera.
- Prepara el gel a una concentración final de agarosa de 1,2% (1,8 g agarosa en 150 ml de TBE 0,5 x)
- Colocar el bloque en el pocillo del gel sellándolo con agarosa licuada a 60 °C. En el primer pocillo se coloca la cepa control MW.
- La electroforesis se realiza a 12 °C durante 28 horas.
- Teñir el un baño de bromuro de etidio durante 10 minutos y visualizar.

#### SOLUCIONES NECESARIAS PARA EL ENSAYO

##### - Buffer SE

15 ml ClNa 5M  
50 ml EDTA 0,5M  
Agua bidestilada csp 1 l.  
Ajustar pH a 7,5  
Esterilizar por filtración y guardar a 4 °C

##### - Buffer de lisis

5 ml tris ClH 1M  
10 ml EDTA 0,5M  
Lauril sarcil 1%( w/v)  
Agua bidestilada csp 100ml  
Ajustar pH a 9,5  
Esterilizar por filtración y guardar a 4 °C

**- Buffer TE**

10 ml de Tris HCl 1M

2 ml EDTA 0,5M

Agua bidestilada csp 1 l.

Ajustar pH 8

Esterilizar por filtración y guardar a T °C ambiente.

**-Buffer TBE**

108 g TMS

4,65 EDTA 0,5M

55,6 g ac.bórico

Agua bidestilada csp 1l.

Ajustar pH 8,5

Esterilizar por filtración

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

- 
- **Agasan A., Kornblum J., Williams G., Pratt C-C., Fleckenstein P., Wong M. y Ramon A.** 2002. Perfil of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:l:-strains causing Food-borne infeccions in New York City. *J Clin Micorbiol*; 40(6): 1924-1929.
  - **Ahmer M.B., Tran M. y Hefforn F.** 1999. The virulence of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol*; 181(4): 134-1368.
  - **Almuth L., Prager R., Streckel W., Rabsch W., Gerike B. y Tschäpe.** 1997. Wird der *Salmonella-enterica*-Stamm DT104 des serovar Typhimurium der neue Führende epidemiety in Deutschland. *Robert Koch Institute Info*; 1(6): 10.
  - **Alubo S.O.** 1994. Death for sale: a study of drug poisoning and deaths in Nigeria. *Soc Sci Med*; 38: 97-103.
  - **Ambler R.P.** 1980. The esturcture of betalactamases. *Philos Trans R Soc Lond*; 289: 321-331.
  - **Ambler R.P.**1980 The esturcture of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond*; 289: 321-331.
  - **Anderson E.S., Ward L.R., De Saxe M.J. y De Sa J.D.** 1997. Bacteriophage typhimg designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg*; 78: 297-300.
  - **Angulo F.J. y Griffin P.M.** 2000. Changes in a antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Emerg Infect Dis*; 6: 436- 437.
  - **Araque B., Nieves B., Ruiz O. y Dagert M.** 1997. Caracterización de plásmidos que median la resistencia a múltiples antibióticos en bacterias gramnegativas de origen nosocomial. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;15: 299-305.
  - **Arcangioli M.A., Leroy-Setrin S., Martel J.L. y Chaslus-Dancla E.** 1999. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Let*; 174: 327-332.

- 
- **Alvseike O. y Skerve E.** 2002. Prevalence of a *Salmonella* subspecies *diarizonae* in Norwegian sheep herds. *Prev Vet Med.* Jan 22;52(3-4):277-85.
  - **Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. y Struhl K.** 1991. *Currents protocols in molecular Biology*. New York: Greene Publishing associates and Wiley-Interscience. Supp 13, Unit 2.4.1.- 2.4.5.
  - **Baggesen D.L., Wegener H.C. y Madsen M.** 1997. Correlation of conversion of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* 1, 4 or 6 phage type with loss of lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol*; 35: 330-333.
  - **Balis E., Vatopoulus A.C., Kanelopoulou M., Mainas E., Hatzoudis G., Kontogianni V., Malamou H., Kitsou-Kiriakopoulou S. y kalapothaki V.** 1996. Indications of in vivo transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora. *J Clin Microbiol*; 34(4): 977-979.
  - **Baquero F., Negri M.C., Morosini M.I. y Blázquez J.** 1995. Antibiotic selective environments; *Clin Infec Dis.* 27(suppl 1): S5-11.
  - **Baraniak A., Sadowy E., Hryniewicz W y Gniadkowski M.** 2002. Two different extended-spectrum betalactamases (ESBLs) in one of the first ESBL-producing *Salmonella* isolates in Poland. *J Clin Microbiol*; 40 (3): 1095-1097.
  - **Barnaud G., Arlet G., Verdet C., Gaillot O., Lagrange P.H. y Philippon A.** 1998. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible betalactamase DHA-1 with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 42(9): 2352-2358.
  - **Bautista M.F., Martinez-Brocal A., Usera M.A., Fernández M.C., Manrique F., Yeste R., Escabias M.F. y de la Rosa M.** 2002. Serotipos y susceptibilidad a antimicrobianos de *Salmonella* sp. en la provincia de Granada. *Enferm Infec Microbiol Clin*; 20 (1) 151.
  - **Ben Redjeb S., Bejaoui M., Lakhaounah A., Philippon A. y Labia R.** 1998. Synergy between clavulanic-acid and newer beta-lactam on nine clinical isolates of

---

*K.pneumoniae*, *E.coli* and *S. typhimurim* resistant to third-generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother; 21: 263-266.

- **Berdonces P., Echevarría M.J., Mendoza F., López de Goicoechea M.J. y Ayarza R.** 2001. Empiema por *Salmonella enterica* serotipo *enteritidis*. Enferm Infecc Microbiol Clin; 19 (5): 238.
- **Bermudes H., Jude F., Chaibi E.B. y cols.** 1998. TEM-60, a novel TEM-derived inhibitor resistant  $\beta$ -lactamase in a clinical isolate of *K.oxytoca*. 38<sup>th</sup> ICAAC, San Diego California; abstr C-4.
- **Besser T., Gay C., Gay J.M., Hancock D., Rice D., Pritchett C. y Erickson D.** 1997. Salmonellosis associated with *S.typhimurium* DT 104 in the USA. Vet Rec; 140: 75.
- **Bissnete L y Roy P.H.** 1999. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. J Bacteriol; 174(4): 1248-1257.
- **Bhutta Z.A., Naqui S.H. y Mzaffar T. T Farooqui B.J.** 1991. Neonatal sepsis in Pakistan. Acta Pediatr Scand; 80: 596-601.
- **Birnboim H.C. y Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res; 7(6): 1513-23.
- **Biswas A.K. y Mukherji S.** 1985. Penicilium action stimulation growth and metabolism in seedlings of rice. Can J Botany; 63: 1150-1156.
- **Blazquez J., Baquero M.R., Cantón R., Alós I. y Baquero F.** 1993. Characterization of a new TEM type beta-lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and Tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli* Antimicrob Agents Chemother; 37(10): 2059-2063.
- **Blázquez J., Morosini M., Negri M.C., González-Leiza M. y Baquero F.** 1995. Single aminoacid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother; 39: 145-149.

- 
- **Blázquez J., Morosini M.I., Negri M.C., González-Leiza M. y Baquero F.** 1995. Single aminoacid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 145-149.
  - **Bogaard A.E. y Stobberingh E.E.** 1996. Is it time to ban all antibiotics as animal growth-promoting agents? *Lancet*: 348-619.
  - **Bojalil R y Calva J.J.** 1994. Antibiotic misuse in diarrhea. A household survey in a Mexican community. *J Clin Epidemiol*; 47: 147-56.
  - **Boletín Epidemiológico Semanal.** 1999. Análisis de las cepas de *Salmonella* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España; 7 (5): 545-556.
  - **Bosch Mestres J., Carbonell Estrany X., Esque Ruiz M.T y Alvarez Dominguez E.** 1993. Sepsis neonatal por *Salmonella enterica* . *An Esp Pediatr*; 39: 157-158.
  - **Bradford P., Yang Y., Sahm D., Grope I., Gardovska D y Storch G.** 1997. CTX-M-3 a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an out-break of *S.typhimurium* in Latvia. C-186, p.78.in Abstracts of the 37<sup>th</sup> Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
  - **Boyd DA., Peters GA., Ng L. y Mulvey MR.** 2000. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 15;189(2):285-91.
  - **Bradford P., Yang Y., Sahm D., Grope I., Gardobska D. y Storch G.** 1998 .CTX-M-5 a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother*; 42(8): 1980-1984.
  - **Briggs C.E. y Fratamico P.M.** 1999 Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT 104. *Antimicrob Agents Chemother*; 43(4): 646-849.

- 
- **Brisson-Nöel A., Arthur M. y Courvalin P.** 1998. Evidence for natural gene transfer from Gram-positive cocci to *E. Coli*. *J Bacteriol*; 170: 1739-1745.
  - **Brown A., Butterworth D., Cole M., y cols.** 1979. Naturally-occurring betalactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*;29: 668-669.
  - **BSAC.** Working Party on Antibiotic Sensitivity Testing. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC standardized disc sensitivity testing method. Newsletter of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, 1999.
  - **Bush K., Jacoby G.A. y Medeiros A.A.** 1995. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 1-3.
  - **Cabie A., Jouanelle J. y Saintaime C.** 1989. Beta-lactamase à spectre èlargi (CTX-1) chez *Salmonella panama* à fort-de France (Martinique). *Med Mal Infect*; 19: 418-420.
  - **Campo P., Gutierrez A. y Ladrón de Guevara C.**1997. Evolucion of susceptibility of non-typhi Salmonella in a spanish hospital (1992-1994) and report of a Salmonella ser Typhimuirum siolate resistant to quinolones. *Eur J Epidemiol*; 1997(2): 239-241.
  - **Carattoli A., Villa L., Pezzella C., Bordi E. y Visca P.** Expanding drug resistance through integron acquisition by IncFI plasmids of Salmonella enterica Typhimurium. *Emerg Infect Dis.* 2001 May-Jun;7(3):444-7.
  - **Casin I., Breuil J., Brisabois A., Moury F., Grimont F. y Collatz E.** 1999. Multidrug-resistance human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France Belong predomianantly to a DT 104 clone with the chromosome- and integron-encoded betalactamase PSE-1. *J Infect Dis*; 179: 1173-1182.
  - **CDC (Center for Disease Control).** 1982. Multirresistant *Salmonella* and other infections in adopted infants from India. *MMWR (Morb Mortal Wkly Rep)*; 31: 285-287.

- 
- **CDC (Center for Disease Control).** 1996. Department of health and human services. *Salmonella* surveillance. Annual Tabulation Summary.
  - **Chaibi E.B., Peduzzi J., Farzaneh S., Barthelemy M., Sirot D. y Labia R.** 1988. Clinical inhibitor-resistant mutants of the  $\beta$ -lactamase TEM-1 at amino-acid position 69. Kinetic analysis and molecular modelling. *Biochim Biophys Acta*; 1382: 38-46.
  - **Clewell D.B.** 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in Enterococci. *Eur J Microbiol Infect Dis*; 9: 90-120.
  - **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** Communiqué 1999.
  - **Coque T.M., Varela M.C., Oliver A., Morosini M., Baquero F. y Cantón R.** 2002. Cambio epidemiológico en las BLEE. Hospital Ramón y Cajal (1988-2000): de SHV a CTX-M. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20 (Supl 1): 137.
  - **Cormican M., Butler C., Morris D., Corbett-Feeney G. y Flynn J.** 1998. Antibiotic resistance amongst *Salmonella enterica* species isolated in the Republic of Ireland. *J Antimicrob Chemother*; 42: 116-118.
  - **Couper M.R.** 1997. Strategies for the rational use of antimicrobials. *Clin Infect Dis*; 24 (Supl 1): S154-6.
  - **Craigie J. y Yen C.H.** 1938. The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of Type II-Vi phage 1. *Can J Pub Health*; 29: 448-463.
  - **Craigie J. y Yen C.H.** 1938. The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of Type II-Vi phage 2. *Can J Pub Health*; 29: 484-496.
  - **Cuevas O., Cercenado E., Guinea J., Marín M., Martín-Pedroviejo J., García F. y Bouza E.** 2002. Resistencia a amoxicilina/clavulánico en *E.coli* : aumento de  $\beta$ -lactamasas IRT y cefalosporinasas de clase C. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20 (Sup 1): 138.

- 
- **Daly M, Fanning S.** 2000.Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Appl Environ Microbiol*;66(11): 4842-4848.
  - **Davies J.** 1992. Another look at antibiotic resistanse. *J Gen Microbiol*; 138: 1553-9.
  - **Davies M.A., Hancock D.D., Besser T.E., Rice D.H., Gay J.M., Gearhart L. y Digiacomo R.** 1999. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from human and cattle in the northwertern United States, 1982-1997. *Emerg Infec Dis*; 5 (6): 802-806.
  - **Díez P. y Calderón V.** 1997. Empleo de antibióticos en veterinaria. *Rev Esp Quimioterap*; 10: 275-280.
  - **Echeita A., Aladueña A., Cruchaga S. y Usera M.A.** 1999a. Emergence and spread of an antypical *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J Clin Microbiol*; 37(10): 3425.
  - **Echeita M.A., Díez R. y Usera M.A.** 1999. Distribución de serotipos de *Salmonella* spp. aislados en España durante un periodo de 4 años (1993-1996). *Enferm Infec Microb Clin*; 17: 9-14.
  - **Echeita M.A., Herrera S. y Usera M.A.** 2001. Atypical *fljB*-negative *Salmonella enteida* subsp. *enterica* appears to be a monophasic vaariant of Serovar Typhimurium. *J Clin Microbiology*; 39(8): 2981-2983.
  - **Edelman R. y Levine M.** 1986. Summary of an international workshop on typhoid fever. *Infect Dis*; 8: 329-349.
  - **Espinasse F., Gheorghiu R., Poiata A. y Nicolas-Chanoine M.H.** 1997. Reduced susceptibility to co-amoxiclav in *E.coli*, *S.typhimurium* and *K.pneumoniae* isolated in Romania between 1985 and 1993. *J Antimicrob Chemother*; 39: 103-106.
  - **Fennema Owen.** 1996. Food chemistry, 3<sup>rd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc., New York; 791-792.

- 
- **Fey P., Safranek T., Rupp M.E., Dunne E., Ribot E., Iwen P.C., Bradford P.A., Angulo F.J. y Hinrichs S.H.** 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a children from cattles. *N England J Med*; 342: 1242-1249.
  - **Fierer J., Krause M., Tauxe R. y Guiney D.** 1992. *Salmonella typhimurium* bacteriemia: association with the virulence plasmid. *J Infecc Dis*; 166: 639-641.
  - **Foster T.J.** 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev*; 47: 361-409.
  - **Frost J.A., Kelleher A. y Rowe B.** Increasing ciprofloxacin resistance in salmonellas in England and Wales 1991-1994. 1996. *J Antimicrob Chemother*; 37: 85-91.
  - **Gazouli M., Tzelepi E., Markogiannakis A., Legakis N.J. y Tzouveleki L.S.** 1998. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6 ) from *S. typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett*; 165: 289-293.
  - **Gladston I.M., Ehrenkranz R.A., Edberg S.C. y Baltimore R.S.** 1990. A ten year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatric Infect Dis J*; 9: 819-825.
  - **Glynn M.K., Boop C., Dewitt W., Dabney P., Mokhtar M. y Angulo F.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT 104 infections in the United States. *N Engl J Med*; 338: 1333-1338.
  - **Goope N.V., Adesiyun A.A., y Caesar K.** 2000. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *J Wildl Dis*; 36: 284-293.
  - **Gracey M., Iveson J.B. y Suharyono S.** 1980. Human *Salmonella* carriers in a tropical urban environment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 74: 479-82.
  - **Guerra B., Laconcha Iodia., Soto S., Gonzalez-Hevia M.A.y Mendoza M.C.** 2000. Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype (4,5,12:l-) organism causing human salmonellosis; *FEMS Microbiol Lett*; 342-347.

- 
- **Hakanen A., Koitilainen P., Huovinen P., Helenius H. y Siitonen A.** 2001. Reduced fluorquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from southeast Asia. *Emerg Infect Dis*; 7 (6): 996-1003.
  - **Hall R.M. y Stokes H.W.** 1993. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica*; 90: 115-132.
  - **Hammami A., Arlet G., Ben Redjeb S., Grimont F., Ben Hassen A., Reckik A. y Philippon A.** 1991. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in a neonatal intensive care unit in Tunisia caused by multiply drug resistant *Salmonella* producing SHV-2  $\beta$ -lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 10: 642-646.
  - **Heineman J.A.** 1991. Genetics of gene transfer between species. *Trends Genet*; 7: 181-185.
  - **Heisig P., Kratz B., Halle E., Graser Y., Altwegg M., Rabsch W. y Faber J.P.** 1995. Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistance isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. *Microb Drug Res*; 1: 211-218.
  - **Hernández J.R., Pascual A., Martínez L. y GEIH (Grupo de estudio de Infección Hospitalaria)** Proyecto GEIH-BLEE 2000. Aislamiento de *E.coli* y *K.pneumoniae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en hospitales españoles. 2002. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20 (Supl 1): 125.
  - **Holmberg S.D, Osterholm M.H., Senger K.A. y Cohen M.L.** 1984. Animal to man transmission of anti-microbial resistant *Salmonella*: Investigations of U.S. outbreaks. *New Engl J Med*; 311: 617-622.
  - **Howarth F. y Poulter D.** 1996. Vancomycin resistance; Time to ban avoparcin?. *Lancet*; 347: 1047.
  - **Israel ministry of Health.** Central Laboratories. *Salmonella* reference laboratory. Annual reports. 1994-1995-1996.

- **Jack G.W. y Richmond M.H.** 1970. A comparative study of eight distinct betalactamases synthesized by Gram negative bacteria. *J Gen Microbiol*; 61: 43-61.
- **Kado C.I. y Liu S.T.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* ;145(3): 1365-1373.
- **Karpiskova R., Benes C. y Dedicova D.** 1999. Aparición de *Salmonella typhimurium* DT 104 resistente a múltiples fármacos en la República Checa. *Eurosurveillance*; 4: 56-58.
- **Koeck J.L., Ariet A., Philippon A., Basmociogullari S., Vu Thien H., Buisson Y. y Cavallo J.D.** 1997. A plasmid-mediated CMY-2- $\beta$ -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. *FEMS Microbiol Lett*; 152: 255-260
- **Laconcha I., Baggesen D.L., Rementeria A. y Garaizar J.** 2000. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* seotype Enteritidis phage types 1, 4, 6 y 8 isolated from animal and human resources in three european countries. *Vet Microbiol*; 75: 155-165.
- **Land T.** 1992. Combating counterfeit drugs. *Nature*; 355:192.
- **Lansang M.A., Lucas-Aquino R., Tupasi T.E., Mina V.S., Salazar L.S. y Joban N, et al.** 1990. Purchase of antibiotics without prescription in Manila, the Philippines. Inappropriate choices and dosis. *J Clin Epidemiol*; 43: 61-67.
- **Lawson A., Dassama M., Ward L. y Threfall J.** 2002. Multiply resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 12 and DT 120: A case of MR DT 104 in disguise?. *Emerg Infect Dis*; 8 (4): 434-436.
- **Le Minor L., Veron M. y Popoff M.Y.** 1982. Taxonomie des *Salmonella*. *Ann Microbiol (Inst. Pasteur)* 133 B: 223-243 and 245-254.
- **Le Minor L., Popoff M.Y., Lauren B. y Hermant D.** 1986. Individualisation d'une septième sous-espèce de *Salmonella*: *S.choleraesuis* subs *indica* subsp nov. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 137: B:211-217.

- 
- **Le Minor L. y Popoff M.Y.** 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. nom. rev. as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int J Sys Bact, 357: 465-468.
  - **Lee P.R., Lurie P., Silverman M.M. y Lydecker M.** 1991. Drug promotion and labeling in developing countries: an update. J Clin Epidemiol; 44 Suppl; 2: 49S-55S.
  - **Levine W.C., Buehler J.M., Bean N.H. y Tause R.V.** 1991. Epidemiology of nontyphoidal *Salmonella* bacteriemia during the human immunodeficiency virus epidemic. Infect Dis; 164: 81-87.
  - **Lipsitch M., Singer R. y Levin B.** 2002. Antibiotics in agriculture: When is time to close the barn door?. PNAS 99 (9): 5752-5754.
  - **Livermore D.M.** 1995.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev; 8: 557-584.
  - **Llanes C., Kirchgessner V. y Plesiat P.** 1999. Propagation of TEM and PSE type beta-lactamases among amoxicillin resistant *Salmonella* spp. isolated in France Antimicrob Agents Chemother; 43(10): 2430-2436.
  - **Mäkelä P.H. y Stocker B.A.D.** 1984. Genetics of lipopolysaccharide *In*: Handbook of endotoxin, vol 1. E.T. Rietschel (ed.) pp. 59-137. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
  - **Marchandin H., Carrier C., Sirot D., Jean-Pierre H. y Darbas H.** 1999. TEM-24 Produced by four different species of *Enterobacteriaceae* including *Providencia rettgeri* in a single patient. Antimicrob Agents Chemother; 43(8): 2069-2073.
  - **Martin J.F y Liras P.** 1989. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. Annu Rev. Microbiol. 43: 173-206.

- 
- **Martínez R., Orden B. Y Millán R.** 2002. Evolución de la resistencia de *Salmonella enterica* en atención primaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20 (1): 179.
  - **Mazel D. y Davies J.** 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci*; 56: 742-754.
  - **Mazel D., Dychinco B., Webb V.A y Davies J.** 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280: 605-608.
  - **Medders W.M., Wooley R.E., Gibbs P.S., Shotts E.B. y Brown J.** 1998. Mutation rate of avian intestinal coliform bacteria when pressured with fluorquinolones. *Avian Dis*; 42: 146-53.
  - **Metzer E., Agmon V., Andoren N y Cohen D.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage-type DT 104 among salmonellae causing enteritis in Israel. *Epidemiol Infect*; 121: 555-559.
  - **Meunier D., Boyd D., Mulvey M., Baucheron S., Mammina C., Nastasi A., Chaslus-Dancla E. y Cloeckaert A.** 2002. *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in serotype paratyphi B. *Emerg Infect Dis*; 8 (4): 430-433.
  - **Mirelis B., Miró E., Gómez L., García A., Navarro F. y Prats G.** 2002. Incidencia de BLEE en enterobacterias aisladas de heces. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20 (Sup 1): 340.
  - **Moreno A., Gastell J.M. y Mensa J.** 1994. Incidencia de enteropatógenos en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin*; 102: 205-208.
  - **Morosini M., Cantón R., Martínez B., Negri M., Perez-Díaz J., Baquero F. y Blázquez J.** 1995. New extended-spectrum TEM type beta-lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 458-461.

- 
- **Nakamura S.** 1995. Veterinay use of new quinolones in Japan. *ASM News*; 60: 350-351.
  - **Natasi A. y Mammina C.** 2001. Presence of Class I integrons in multidrug resistant low prevalence *Salmonella* serotypes. *Emerg Infect Dis*; 8(3): 430-433.
  - **National Committee for Clinical Laboratory Standars.**2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th ed., vol. 20. Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne.
  - **Navarro L., Rodríguez J., Martínez L., Pascual A., Romero L., Perea E. y Muniain M.A.** 2002. Epidemiología clínica de la infección / colonización por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20 (Supl 1): 124.
  - **Nei M. y Li, W.H.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-73.
  - **Newsom S.W.B.** 1969. Carbenicillin-resistant *Pseudomonas*. *Lancet* ii:1140.
  - **Orden Gutiérrez J.A. y de la Fuente López R.** 2001. Repercusiones en salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Rev Esp Salud Pública*; 75 (4) : 313-320.
  - **Organización Mundial de la Salud.** 1998. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health . Informe de una reunión de la OMS. Junio 2-5; Ginebra, Suiza.
  - **Pérez Gorricho B. y Baquero F.** 1998. Antibióticos como aditivos a piensos. *Rev Esp Quimioter*; 1: 98-99.
  - **Piddock L.J.** 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antimicrobial-resistance bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy?. *J Antimicrob Chemother*; 38: 1-2.

- 
- **Platt D.J., Sommerville J.J. y Gribben J.** 1984. Sequential acquisition of R-plasmid *in vivo* by *Salmonella typhimurium*. J Antimicrob Chemother; 13: 65-69.
  - **Poirel L., Guibert M., Bellais S., Naa T. y Nordmann, P.** 1999. Integron- and carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT 104 from french patients. Antimicrob Agents Chemother; 43(5): 1098-1104.
  - **Poppe C., Smart N., Khakharia R., Johnson W., Spika J. y Prescott J.** 1998. *Salmonella typhimurium* DT 104: a virulent and drug-resistant pathogen. Can Vet J; 39: 559-565.
  - **Poppof M. y Le Minor L.** 1997. Antigen formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research, Institute Pasteur, Paris, France.
  - **Pourpart M., Chanal C., Sirot D., Labia R. y Sirto J.** 1991. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from *Salmonella mbanddaka* isolate. Antimicrob Agents Chemother; 35: 1498-1500.
  - **Prinarakis E., Miriagou V., Tzelepi E., Gazouli M. y Tzouvelekis L.** 1997. Emergence of an inhibitor resistant b-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. Antimicrob Agents Chemother; 41: 838-840.
  - **Ramos J.M., Cuenca-Estrella M., Alós J.M. y Soriano F.** 1998. Perfil epidemiológico de la salmonelosis no tifoidea en un hospital del área urbana de Madrid (1980-1994). Enferm Infecc Microbiol Clin; 14: 345-351.
  - **Recchia D.G. y Hall R.M.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology; 141: 3015-3027.
  - **Reeves M., Evin G., Heiba A., Plikaytis, B. y Farmer III J.J.** 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. Nov. J Clin Microbiol 27: 313-320.

- **Reguera J. A., Baquero F., Pérez-Díaz J.C., Martínez J.L.** 1991. Factors determining resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*; 27: 569- 575.
- **Reyes H., Guiscafre H., Muñoz O., Pérez-Cuevas R., Martinez H. y Gutierrez G.** 1997. Antibiotic noncompliance and waste in upper respiratory infections and acute diarrhea; 50: 1297-1304.
- **Richmond M.H., y Sykes R.B.** 1973. TEM betalactamase of Gram negative bacteria and their possible physiological role. En: Rose A.H., Tempest D.W. (Eds.). *Advances in microbial physiology*, Vol 9. Academic Press, Londres.
- **Ridley A.M., Punia P., Ward L.R., Rowe B. y Threlfall E.J.** 1996. Plasmid characterization and pulsed-field electrophoretic analysis demonstrate that ampicillin-resistant strains of *Salmonella enteritidis* phage type 6a are derived from *Salm. enteritidis* phage type 4. *J Appl Bacteriol*; 81(6): 613-638.
- **Rivera M.J., Rivera N., Castillo J., Rubio M.C. y Gómez-Lus R.** 1997. Molecular and epidemiological study of *Salmonella* clinical isolates. *J Clin Microbiol*; 29: 927-932.
- **Rodríguez D., Tauxe R. Y Rowe B.** 1990. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic?. *Epidemiol Infect*; 105: 21-27.
- **Ronal A.R., Turck M. y Petersdorf R.G.** 1966. A critical evaluation of nalidixic acid in urinary tract infections. *N Engl J Med*; 275: 1081-1089.
- **Rowe-Magnus D.A. y Mazel D.** 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Genomics*; 565-569.
- **Roy H.** 1999. Horizontal transfer of genes in bacteria. *Microbiology today*; 26: 168-170.
- **Ruiz M., Rodríguez J.C., Elía M. y Royo G.** 2000. Infecciones extraintestinales producidas por serotipos no tifoideos de *Salmonella*. Experiencia de 9 años. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 18: 219-222.

- 
- **Sabaté M., Miró E., Navarro F., Mirelis B., Barbé J. y Prats G.** 2002. Caracterización de un nuevo integrón In60 portador de una  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado ( $bla_{CTXM9}$ ). *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20 (Supl 1): 348.
  - **Sallen B., Rajoharison A., Desvarenne S. y Mabilat C.** 1995. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist*; 1: 195-202.
  - **Sambrook J., Fritsch E.F., y Martiniatis T.** 1989. *Molecular cloning. A Laboratory Manual* (2<sup>o</sup> edición ). Apéndice A 10.
  - **Sandvang D., Aarestrup F.M. y Jensen L.B.** 1997. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT 104. *FEMS Microbiol Let*; 160: 37-41.
  - **Sandvang D., Jensen L.B., Baggesen D.L y Baloda S.B.** 2000. Persistence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clone in danish pig, production units and farmhouse environment studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *FEMS Microbiol Let*; 187: 21-25.
  - **Saves I., Burlet-Schiltz O., Swaren P. y cols.** 1995. The asparagine to aspartic acid substitution at position 276 of TEM-35 and TEM-36 is involved in the  $\beta$ -lactamase resistance to clavulanic acid. *J Biol Chem*; 270: 18240-18245.
  - **Shakkor O., Taylor R.B. y Behrens R.H.** 1997. Assessment of the incidence of substandard drugs in developing countries. *Trop Med Int Health*; 2: 839-845.
  - **Sirot D.** 1995. Extended spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*; 36 (Suppl): 19-34.
  - **Sirot D., Chanal C., Henquell C., Labia R., Sirto., y Cluzel R.** 1994. Clinical isolates of *Escherichia coli* producing multiple TEM mutants resistance beta-lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother*; 33: 1117-1126.

- 
- **Southern E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*; 98: 503-517.
  - **Stockstad, E.L. y Jukes T.H.** 1950. Further observations on the animal protein factor. *Proc Soc Exp Biol Med*; 73: 523-528.
  - **Stokes H.W., O'Gorman D.B., Gavin D., Parsekhian M. y M.Hall. R.** 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Molecular Microbiol*; 26(4): 731-745.
  - **Strang J.K.** 1996. Tracing patients in rural Africa. *Lancet*; 348: 1083-1084.
  - **Sykes R.B. y Matthew M.** 1976. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*; 2 : 115-1157.
  - **Taddei F., Radman M., Maynard-Smith J., Toupance B., Gouyon P.H. y Godelle B.** 1997. Role of mutator changes in adaptive evolution. *Nature*; 387: 700-702.
  - **Taylor R.B., Shakoore O. y Behrens R.H.** 1995. Drug quality, a contributor to drug resistance?. *Lancet*; 346: 122.
  - **Tena D., Pérez-Pomata M.T., Gimeno C., Rodríguez E., González-Praetorius A., Alén M.J., Robres P. y Bisquert J.** 2001. Meningitis por *Salmonella* sp. en el adulto. Presentación de un caso y revisión de la bibliografía. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 19 (5): 238-240.
  - **Threlfall E.J., Rowe B. y Ward L.R.** 1993. A comparison of multiple drug resistance in salmonellas from humans and food animals in England and Wales, 1981-1990. *Epidemiol Infect*; 11: 189-197.
  - **Threlfall E.J., Ward L.R., Skinner J.A. y Rowe B.** 1997. Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal Salmonellas from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996. *Microb Drug Resist*; 3: 263-266.

- **Tocalli L., Nardi G., Mammino A. y Salvagio L.** 1991. Salmonellosis diagnosed by the laboratory of the hospital of Milan in patients with HIV disease. *Eur J Epidemiol*; 7: 690-695.
- **Tosini F., Visca P., Luzzi I., Dionisi A.M., Pésela C., Petruca A. y Carattoli A.** 1998. Class 1 Integron-Borne Multiple-Antibiotic resistance carried by IncF1 and IncL/M plasmid in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*; 42(12): 3053-3058.
- **Turnidge J.** 1995. Epidemiology of quinolone resistance. Eastern hemisphere. *Drugs*; 49: 43-47.
- **Usera M.A., Rodríguez A., Echeita A. y Cano R.** 1998. Multiple analysis of a foodborne outbreak caused by infant formula contaminated by an atypical *Salmonella virchow* strain. *Eur J Microbiol Infect Dis*; 17: 551-555
- **Usera M.A., Cano R. y Echeita A.** 1995. Análisis de los serotipos de *Salmonella* spp. aislados en España en el período 1986-1992. *Enf Infecc Microbiol Clin*; 13: 138-145.
- **Van den Bogaard A.E.** 1997. Antimicrobial resistance-relation to human and animal exposure to antibiotics; *J Antimicrob Chemother*: 453-454.
- **Verdet C., Arlet G., Barnaud G., Lagrange P. y Philippon A.** 2000. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar enteritidis, carrying the *bla* DHA-1 gene and its regulator gene *ampR* originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 44(1): 222-225.
- **Vesikari T., Janas M., Grönroos P., Tuppurainen N., Renlund M., Kero P., Koivisto H., Kunnas M., Heinonen K., Nyman R., Pettay O. y Österlund K.** 1985. Neonatal septicemia. *Arch Dis Child*; 60: 542-546.
- **Villa L., Visca P., Tosini F., Pésela C. y Carattoli A.** 2002. Composite integron array generated by insertion of an ORF341-type integron within a Tn21-like element. *Microb Drug Resist*; 8(1): 1-8.

- 
- **Villar R.G., Macek M.D. y Simons S. et al.** 1999. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT 104 infections linked to raw milk cheese in Washington state. *J Amer Med Associ*; 281: 1811-1816.
  - **Walker R.A., Lindsay E., Woodward M.J. Ward L.R y Threlfall E.J.** 2001. Variaton in clonality and antibiotic-resistnace genes among multirresistnat *Salmonella enterica* seotype typhimurium phage-typhe U320 (MR U302) from humans, animals, and foods. *Microb Drug Resist*; 7(1): 13-21.
  - **Wall P.G., Morgan D. y Lamden K. et al.** 1994. A case control study of infection with an epideemic strain of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 in England and Wales. *Comunicable Disease Report* 4: R130-R140.
  - **Wall P.G., Threlfall E.J., Ward L.R., y Rowe B.** 1996. Multirresistant *Salmonella typhimurium* DT 104 in cats. A public health risk; *Lancet*: 348-471.
  - **Webb L.A. y Davies J.** 1998. Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes?. *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 2379-2384.
  - **Wegener H.C., Aaestrup F.M., Germer-Smidt P. y Bager F.** 1999. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta Vet Scan*; Supl 92: 51-57.
  - **White D.G. y McDermott P.F.** 2001. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J Dairy Sci*; 84 (Suppl ): E151-E155.
  - **World Helath Organization.** Multidrug resistance *Salmonella tyhpimurium*. WHO Fact Sheet; 139: 1-4.
  - **Yildirmak T., Yazgan A. y Ozceengiz G.** 1998. Multiple drug resistance patterns and plasmid profiles of non-tyhpi salmonellae in Turkey. *Epidemiol Infect*; 121: 303-307.