



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i
Microbiologia**

Facultat de Medicina

Programa de Microbiologia Mèdica 2005-2007

**Resistencia antibiòtica associada a integrones de clase 1 en
aislados humanos de enterobacterias de dos contextos
epidemiològics: zoonosis por *Salmonella enterica* e
infecció por *Klebsiella pneumoniae* adquirida en un centro
socio-sanitari**

Memoria presentada por **M^a del Mar Olga Pérez Moreno**
para optar al grado de **Doctor en Farmacia**

Director: **Dr. Joaquim Ruiz Blázquez**

Tutor: **Dr. Julià González Martín**

Barcelona 2011

El **Dr. Joaquim Ruiz Blázquez**, Assistant Research Professor del Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona e Investigador de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer del Hospital Clínic de Barcelona y el **Dr. Julià González Martín**, Profesor asociado del Departament d' Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona y Consultor Senior del Centre de Diagnòstic Biomèdic-Microbiologia del Hospital Clínic de Barcelona.

CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación que lleva por título **“Resistencia antibiótica asociada a integrones de clase 1 en aislados humanos de enterobacterias de dos contextos epidemiológicos: zoonosis por *Salmonella enterica* e infección por *Klebsiella pneumoniae* adquirida en un centro sociosanitario”** ha sido realizado bajo su dirección y tutela y cumple todos los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa delante del correspondiente tribunal.

Firmado Dr. Joaquim Ruiz Blázquez

Firmado Dr. Julià González Martín

Director de la tesis doctoral

Tutor del Departamento

Barcelona Septiembre 2011

Agradecimientos

- A Anna Jardí, mi jefa en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Verge de la Cinta y mi amiga, por alentarme a emprender este proyecto y convencerme de que podía llevarlo a buen puerto. Sin su ejemplo, sus consejos y su apoyo durante todos estos años no sería lo que soy ni como profesional ni como persona.
- Al Dr. Joaquim Ruiz, a Quim, por aceptar ser mi director de tesis a pesar de la dificultad que entrañaba la distancia física, por haber confiado en mí, por los caminos que me ha descubierto y por haberse convertido en un amigo. Y también a Mary y Claudia, por haber puesto su granito de arena.
- Al Dr. Julià González por acceder a ser mi tutor en el departamento y por su disponibilidad para ayudarme a resolver los trámites más farragosos.
- A las Dras. Carmen Torres y Yolanda Sáenz y a María y Vanesa de la Universidad de la Rioja y el CIBIR, por su generosidad, simpatía y porque sin su colaboración *upstream* del Ebro parte de este trabajo no hubiera sido posible.
- A Gloria, Conchi, Marta, Mireia, Xavi, M^a José, María, Isabel, Ester, Jesús y Vanessa, mis residentes, por su inestimable ayuda incluso a horas intempestivas, por su estímulo, por su cariño y por contagiarme su jovialidad.
- A Pilar Cid por su paciencia, porque siempre ha estado dispuesta a echarme una mano, a escucharme y a animarme en los momentos de desaliento.
- A Maribel Llovet por estar siempre ahí, por su apoyo incondicional, por su amistad y comprensión y por no perder nunca la sonrisa .
- A Ángela, Rosa Gisbert, Rosa Moreno, Joan Zaragoza y al resto de mis compañeros de ayer y de hoy del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Verge de la Cinta que me han brindado su ayuda cuando la he precisado y con los que he compartido tantas horas desde que llegué a Tortosa.
- A María Faura por su solicitud y diligencia para conseguirme el material bibliográfico y gestionar ayudas y por su sincero interés por mi trabajo.
- A las Dras. Esther Martínez y Núria Ortí y al Dr. Pau Margalef del Hospital de la Santa Creu de Tortosa por su amabilidad al haberme facilitado datos que me han resultado de gran utilidad en la realización de este proyecto.
- A mis padres, por sus desvelos y su amor y por haberme inculcado el valor de la honestidad, el esfuerzo y la entrega.
- A José Luis, por haber compartido su vida conmigo, por apreciar mi trabajo, por contagiarme su curiosidad, por suplir mis carencias en nuevas tecnologías y por tantas otras cosas.

A mis hijas Claudia y Miriam, porque son fantásticas y porque, lejos de quejarse por el tiempo y la dedicación que a veces les he escatimado, siempre me han demostrado su orgullo y su cariño y me han animado a continuar.

A mis hermanos Elsa, Juan Jesús, Óscar y Marta por ser como son, por quererme tal como soy y porque siempre puedo contar con ellos.

A Antonia, mi suegra, por su afecto entrañable y por su convicción de que lo que hago merece la pena.

A Marta Guanyabens, mi amiga, por aparecer siempre que necesito un hombro en el que apoyarme y porque cada vez que me preguntaba cuándo iba a defender la tesis, sin pretenderlo (o quizá sí), me recordaba que no había que desistir en el empeño.

Y a todos aquellos, familia, amigos, compañeros, que me han acompañado a lo largo de los años y de una u otra forma me han ayudado a llegar hasta aquí.

La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es ¡Eureka! sino "Es extraño..."

Isaac Asimov (1920-1992)

Índice



INTRODUCCIÓN	1 - 60
Preámbulo	2
Bases genéticas de la resistencia	3-16
Resistencia intrínseca y adquirida	3
Resistencia adquirida por mutaciones espontáneas o de novo	3
Resistencia por adquisición horizontal de genes de resistencia	4
Origen de los genes de resistencia	4
Transformación	5
Transducción	6
Conjugación	7
Elementos genéticos bacterianos móviles o vectores genéticos de resistencia	7-16
Plásmidos	8
Secuencias de inserción y transposones	9
Integriones y casetes génicos	11
Transferencia de genes mediada por elementos <i>ISCR</i>	14
Islas genómicas	16
Mecanismos bioquímicos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias gramnegativas	17- 31
Disminución de la permeabilidad	19
Eliminación activa	20
Modificación del antimicrobiano	22
β -lactamasas	22
Enzimas modificadores de aminoglicósidos	29
Enzima modificador del cloranfenicol	29
Modificación de la diana	30
Protección e hiperproducción de la diana	30
Factores que contribuyen a la selección, emergencia, diseminación y perpetuación de la resistencia a los antimicrobianos	32-40
Selección	32
Emergencia clínica	37
Diseminación	37
Diseminación clonal	37
Diseminación horizontal	38
Perpetuación	39
Impacto de las resistencias y estrategias para su prevención y control	41-42

<i>Salmonella enterica</i>	43-54
Descripción del género	43
Serotipos y serogrupos	44
Fagotipado y métodos de subtipificación moleculares	45
Epidemiología	46
Manifestaciones clínicas	47
Factores de virulencia	49
Resistencias antibióticas	51
Resistencia antibiótica en serotipos no tifoideos	51
Resistencia antibiótico en <i>Salmonella</i> Typhi	54
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	55-60
Descripción de la especie	55
Epidemiología	55
Tipificación	56
Factores de virulencia	56
Manifestaciones clínicas	57
Resistencias antibióticas	58
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	61-63
RESULTADOS	64-124
Artículo 1: Resistencia antibiótica asociada a integrones de clase 1 en aislados de <i>Salmonella</i> Tyhimurium de origen humano: epidemiología molecular y emergencia de integrones atípicos asociados a <i>sul3</i> .	65
Resultados relacionados con el artículo 1 no publicados: Probable adquisición <i>in vivo</i> de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en un aislado de <i>S. Typhimurium</i> multirresistente	74
Artículo 2: β -lactamasas, genes <i>qnr</i> y resistencia antibiótica mediada por integrones de clase 1 en aislados de origen humano de <i>Salmonella enterica</i> de serotipos diferente al Typhimurium.	76
Artículo 3: Epidemiología molecular, mecanismos de resistencia implicados e integrones de clase 1 en aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de un centro sociosanitario con sensibilidad disminuida a amoxicilina/clavulánico.	100
Artículo 4: Diseminación intrahospitalaria de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadora de <i>bla</i> _{DHA-1} y <i>qnrB4</i> en el seno de un integrón complejo de clase 1 de nueva estructura.	108

DISCUSIÓN	125-152
Resistencia antibiótica e integrones de clase 1 en aislados clínicos de origen humano de <i>Salmonella enterica</i> de la región Sanitaria Terres de l'Ebre	126-139
Resistencia antibiótica	126
Resistencia a quinolonas	128
β-lactamasas identificadas y resistencia a cefalosporinas de tercera generación.	130
Resistencia asociada a integrones de clase 1	133
Resistencia a amoxicilina clavulánico en aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de un centro sociosanitario: epidemiología molecular, mecanismos implicados e integrones de clase 1.	140-152
Aislados sensibles a cefalosporinas de primera generación y cefamicinas	141
Aislados productores de AmpC plasmídica	147
CONCLUSIONES	153-158
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159-184
ANEXOS	185-188
Anexo 2: Características del centro sociosanitario	186
Anexo 3: Resistencias antibióticas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en el centro sociosanitario en el periodo 2001-2008	187
Anexo 4: Consumo de antibióticos con actividad frente a gramnegativos en el centro sociosanitario durante el periodo 2002-2008	188

Introducción

PREÁMBULO

La terapia antibiótica es una de las piedras angulares de la medicina moderna que permite no sólo la curación de infecciones que antes del descubrimiento de los antibióticos eran mortales sino también hacer menos arriesgadas muchas prácticas médicas habituales.

La resistencia a los antimicrobianos no es, en ningún modo, un fenómeno nuevo; de hecho en 1945, en su discurso de aceptación del premio Nobel de Medicina, Sir Alexander Fleming ya advirtió de la facilidad con que las bacterias desarrollaban resistencia a la penicilina en el laboratorio si se las exponía a concentraciones subinhibitorias y de que esto ya había sucedido *in vivo*. Sin embargo, durante muchos años la emergencia de resistencia a los antibióticos no se reconoció como un problema relevante porque fue paralela con el descubrimiento o desarrollo de nuevas moléculas. Siete décadas después del descubrimiento de la penicilina, el escenario ha cambiado radicalmente y la resistencia a los antibióticos es considerada en la actualidad como una de las amenazas sanitarias más acuciantes: las enfermedades infecciosas son en el siglo XXI la segunda causa de muerte en el mundo y algunas de ellas son producidas por bacterias que son resistentes a todas o prácticamente todas las opciones terapéuticas disponibles. Por otro lado, el problema se ha visto agravado por la drástica disminución de las inversiones de la industria farmacéutica en la investigación en nuevos antimicrobianos, hasta el punto de que desde 1968 hasta la actualidad sólo han aparecido dos nuevas clases de antibióticos y ninguna de ellas tiene actividad sobre gramnegativos.

Nos hallamos, pues, ante un problema sanitario prioritario que se debe abordar desde un enfoque multidisciplinario y proactivo que contemple, entre otros, un uso más sensato de los antibióticos, la aplicación de intervenciones encaminadas a prevenir las infecciones nosocomiales y la diseminación de microorganismos multirresistentes y también la importancia de fomentar la investigación relacionada con los mecanismos moleculares de resistencia a los antimicrobianos. En este sentido, es conveniente recordar el papel clave de los profesionales del laboratorio de microbiología asistencial en el reconocimiento de mecanismos de resistencia emergentes o de especial transcendencia clínica y de la aparición de brotes, así como en la difusión de los datos de resistencia locales a los clínicos, lo que contribuirá a la optimización y racionalización del uso de antibióticos en el tratamiento tanto empírico como dirigido de los procesos infecciosos atendiendo a la realidad del medio en que se desenvuelven.

BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA

RESISTENCIA INTRÍNSECA Y ADQUIRIDA

Desde una perspectiva genética la resistencia de las bacterias a los antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es consecuencia de genes inherentes al microorganismo, que se encuentran de forma natural en el cromosoma bacteriano y que determinan características estructurales o fisiológicas que confieren resistencia a los antimicrobianos, como sería el caso de la resistencia a algunos β -lactámicos por producción de AmpC en enterobacterias u otros gramnegativos o de multirresistencia por la presencia de bombas de expulsión. Este tipo de resistencia es la menos preocupante desde el punto de vista clínico por ser predecible. La resistencia adquirida es aquella que se da en microorganismos que originalmente eran sensibles a un antimicrobiano y que han sido capaces de desarrollar resistencia por mutaciones espontáneas o bien por adquisición de genes de resistencia a partir de otros microorganismos y es la que realmente constituye un problema.

RESISTENCIA ADQUIRIDA POR MUTACIONES ESPONTÁNEAS O DE NOVO

Todos los organismos sufren un cierto número de mutaciones durante el proceso de replicación de ADN, proceso no exento de errores, o por la interacción con el medio ambiente, de modo que la probabilidad media de que se produzca una mutación en un gen concreto es de aproximadamente una por cada 10^9 bacterias de una población. Por azar algunas de estas mutaciones pueden dar lugar a alteraciones funcionales o estructurales que tengan como resultado resistencia a algunos antimicrobianos. En algunos casos, como en la resistencia a quinolonas por modificaciones de las topoisomerasas, una sola mutación puede ser suficiente para que se exprese un cierto grado de resistencia (Livermore 2003). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que existen bacterias con un fenotipo mutador que son defectivas en el sistema MMR o *methyl-directed mismatch repair* (sistema necesario para controlar la fidelidad en la replicación del ADN al ser capaz de reconocer los errores de transcripción del ADN y evitar la recombinación entre ADN no idénticos) en las que las mutaciones espontáneas son hasta 10^4 veces más frecuentes que en las bacterias normales. Se han encontrado proporciones particularmente elevadas de cepas con fenotipo mutador en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y otros microorganismos presentes en el pulmón de pacientes con fibrosis quística (Hall y Henderson-Begg 2006, Boerlin et al 2008). Asimismo, se ha observado que en bacterias sometidas a situaciones de estrés (déficit de nutrientes, exposición a antibióticos bacteriostáticos o concentraciones subinhibitorias de antibióticos y

mecanismos de defensa del hospedador) se activa la respuesta SOS y se incrementa la frecuencia de mutaciones. El mecanismo implicado es la expresión de una DNA polimerasa alternativa que copia el DNA con menor fidelidad. Recientemente se ha descrito que algunos antimicrobianos, como las quinolonas, también pueden actuar del mismo modo y activan la respuesta SOS, con lo que pueden favorecer la aparición de mutantes resistentes no sólo a quinolonas sino también a otros antimicrobianos (Martínez y Baquero 2002). La frecuencia de mutaciones espontáneas y, por tanto, la probabilidad de que aparezcan bacterias resistentes, también se incrementa en focos infecciosos con elevado inóculo bacteriano como los abscesos.

RESISTENCIA POR ADQUISICIÓN HORIZONTAL DE GENES DE RESISTENCIA

En la mayoría de microorganismos la adquisición de resistencia no deriva de mutaciones espontáneas sino que es fundamentalmente causada por la adquisición de nuevos genes a partir de otros microorganismos.

El **origen de los genes de resistencia** muchas veces no puede elucidarse de forma exacta pero parece que en un gran número de casos provienen de microorganismos ambientales (Cantón 2009). Si se tiene en cuenta que la mayor parte de antibióticos son productos naturales, a menudo sintetizados por microorganismos medioambientales o telúricos como *Streptomyces*, no es extraño que los genes que codifican resistencia a estas moléculas estén presentes en muchas de las bacterias que los producen o en muchas de las bacterias que comparten su nicho ecológico y que sea ésta la fuente a partir de la cual los microorganismos sensibles que ocasionan infecciones en humanos adquieran determinantes de resistencia como estrategia para eludir la acción del tratamiento. Ya en 1940 Waksman, el descubridor de la estreptomicina, sugirió que el verdadero papel ecológico de los antibióticos podría ser impedir el crecimiento de otros competidores en su mismo nicho ecológico; los microorganismos productores de antibióticos deben dotarse de mecanismos de autodefensa y los que coexisten con ellos deben desarrollar mecanismos de protección que en ambos casos suponen la aparición de genes de resistencia (este sería el caso de las β -lactamasas que ya estaban presentes mucho antes de la introducción de los β -lactámicos en clínica). Por otro lado, en los últimos años se ha podido demostrar que muchos de los mecanismos de resistencia descritos en bacterias patógenas también se han encontrado en bacterias medioambientales no productoras de antibióticos en las que estos genes no daban lugar a la expresión fenotípica de la resistencia pero en las que probablemente desempeñarían una función biológica, como se ha especulado que sucede con las bombas de expulsión activa que se han encontrado en muchos microorganismos y cuya función sería la detoxificación de

metabolitos tóxicos, biocidas, conservantes, etc. Otro ejemplo sería el de los determinantes *qnr* que codifican resistencia transferible a quinolonas por protección de la DNA girasa y cuyos progenitores se encuentran en el cromosoma de numerosas bacterias acuáticas (*Shewanella algae*, *Vibrio vulnificus* y *V. parahaemolyticus*); es posible que las proteínas Qnr sean el resultado de la evolución de otra proteína, McbG, producida por algunos microorganismos con el cometido de proteger a la DNA girasa de la acción de algunos péptidos naturales como la microcina sintetizada por ellos mismos (Jayaraman 2009, Strahilevitz et al 2009). Además de los microorganismos medioambientales, el otro reservorio fundamental de genes de resistencia es la microflora comensal, básicamente la del tracto gastrointestinal de humanos y animales, como ponen en evidencia los resultados de un trabajo realizado en Barcelona en el que se detectaron enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido en un 6,6% de las muestras de heces de humanos sanos y en un elevado número de animales de granja (Mesa et al 2006). Este reservorio con la consiguiente transferencia de determinantes de resistencia a patógenos, ampliamente demostrada, se considera una mayor amenaza que la presión selectiva directa sobre los antibióticos. De hecho, ya se ha empezado a extender el concepto “resistoma antibiótico” que introdujo D’Costa para referirse al *pool* de genes de resistencia a antibióticos de todos los microorganismos, independientemente de su patogenicidad y su procedencia, y que son un reservorio potencial a partir de la cual estos genes se incorporan en elementos genéticos móviles o movilizables. (D’Costa 2006, Jayaraman 2009, Cantón 2009).

El fenómeno de la adquisición de genes (incluidos genes de resistencia) implica la transferencia de ADN de una fuente ajena, es decir de otras bacterias, y puede conseguirse por tres mecanismos: transformación, transducción y conjugación, siendo esta última la que tiene mayor relevancia en enterobacterias y otros gramnegativos (figura 1 Y 2).

La **transformación** es el más simple de estos mecanismos y es un proceso mediante el cual algunas bacterias pueden captar, en las circunstancias adecuadas, ADN libre de su entorno ambiental que es incorporado a su genoma por recombinación homóloga mediante la proteína RecA. En algunas ocasiones la recombinación da lugar a un gen funcional que si codifica una proteína con menor afinidad por el antimicrobiano que la proteína nativa resultará en una disminución de la sensibilidad. La adquisición de genes de resistencia mediante transformación es un mecanismo con un impacto clínico muy limitado, en particular en gramnegativos, pues hay pocas bacterias capaces de llevarlo a cabo de forma natural. El ejemplo más relevante es el de la resistencia a β -lactámicos en *Streptococcus pneumoniae* por recombinación entre genes propios que codifican una PBP normal y genes de otros clones o incluso de otras especies de

Streptococcus que codifican PBP mutadas (Levy y Marshall 2004. Alekshun et al 2007). En este microorganismo, así como en otros géneros de la misma familia también se ha descrito la adquisición de resistencia a quinolonas por este mecanismo (Ruiz 2003)

La adquisición de genes de resistencia por **transducción** está mediada por bacteriófagos, que son virus que pueden incorporar fragmentos de DNA procedente de un microorganismo al que hayan parasitado previamente y transferirlos, generalmente junto con sus propios genes, a otra bacteria a la que infecten posteriormente. Los fragmentos de DNA que se incorporan son pequeños y pueden corresponder a fragmentos de DNA cromosómicos adyacentes al sitio de integración del fago o bien a piezas de DNA cromosómico de otras regiones o a plásmidos de un tamaño adecuado. Los principales ejemplos de adquisición de resistencia por transducción son los de la transferencia de los genes de resistencia de la isla genómica SGI1 de *S. Typhimurium* DT104 a otros fagotipos e incluso a otros serotipos de *Salmonella* y el de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* relacionada con el casete cromosómico SCCmec que en algunas de las variantes, como la V, por su menor tamaño puede ser empaquetado en fagos (Navarro Risueño F et al 2005).

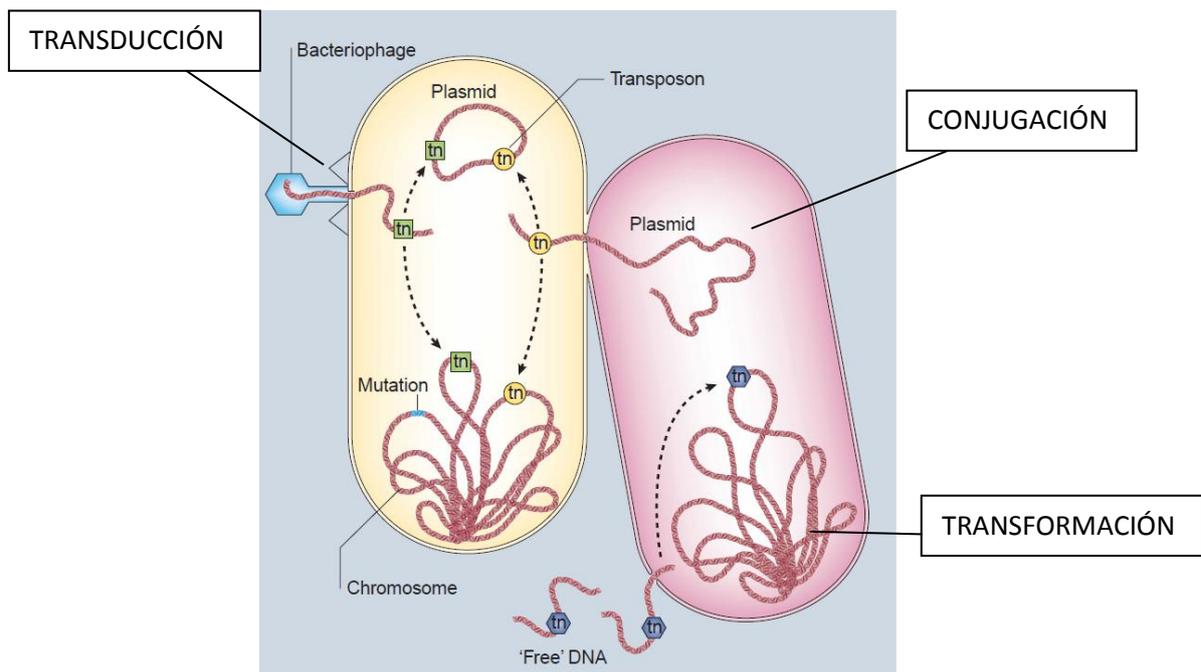


Figura 1: Mecanismos y elementos genéticos implicados en la transferencia de genes de resistencia entre bacterias (adaptado de Levy S y Marshall B. 2004)

La **conjugación** es, sin duda alguna, el mecanismo más habitual de intercambio de material genético, incluidos genes de resistencia, entre bacterias y el de mayor trascendencia epidemiológica. El proceso, dependiente de energía, supone la adquisición por una bacteria de uno o más plásmidos conjugativos procedentes de otras bacterias e implica un contacto físico entre la bacteria donante, que transfiere sus plásmidos a través de unas estructuras denominadas pilis sexuales codificados por los genes plasmídicos *traA* y *traQ*, y la bacteria receptora (Levy y Marshall 2004. Alekshun et al 2007).

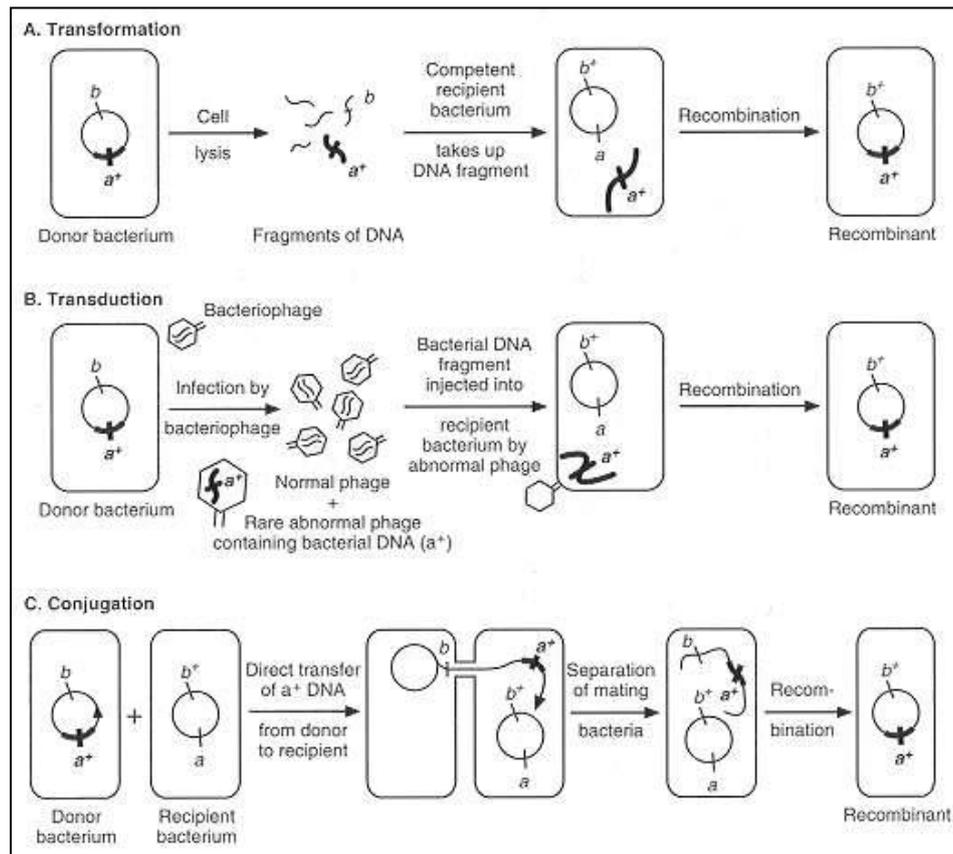


Figura 2:: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/17transforma.htm>

ELEMENTOS GENÉTICOS BACTERIANOS MÓVILES O VECTORES GENÉTICOS DE RESISTENCIA

El movimiento de los genes de resistencia puede producirse a dos niveles distintos, a nivel intracelular y a nivel intercelular (transferencia horizontal de genes de resistencia), y los elementos genéticos implicados en cada uno de estos niveles son distintos. Entre los elementos que pueden moverse entre diferentes bacterias se encuentran los plásmidos y los transposones conjugativos que se transfieren de una célula a otra por mecanismos que

implican replicación. A nivel intercelular los genes de resistencia pueden trasladarse entre diferentes localizaciones de la misma molécula o entre diferentes moléculas de ADN, incluido entre cromosomas y plásmidos, siendo los transposones, los casetes génicos incluidos en integrones, los ISCR y las islas genómicas los elementos que intervienen en este tipo de transferencia que depende de la recombinación tanto homóloga como no homóloga. Ambos niveles están en última instancia conectados y, de hecho, los plásmidos acumulan genes de resistencia a los antibióticos gracias a la actividad de los sistemas de recombinación citados.

1) PLÁSMIDOS

Los plásmidos son fragmentos extracromosómicos, generalmente circulares, de ADN de doble hebra que pueden replicarse independiente del ADN cromosómico (replicones) pero que no pueden replicarse de forma autónoma, puesto que la mayoría de las funciones replicativas las aporta la célula hospedadora. Los plásmidos, que tienen un tamaño que oscila entre 2 y 400 kb, no contienen genes que sean indispensable para el crecimiento y multiplicación de la bacteria pero sí otros que les permiten adaptarse a condiciones ambientales extraordinarias o a hospedadores que no son los habituales. Los plásmidos también pueden integrarse en el cromosoma de la célula y así incrementar la estabilidad de la información genética que codifican (episomas).

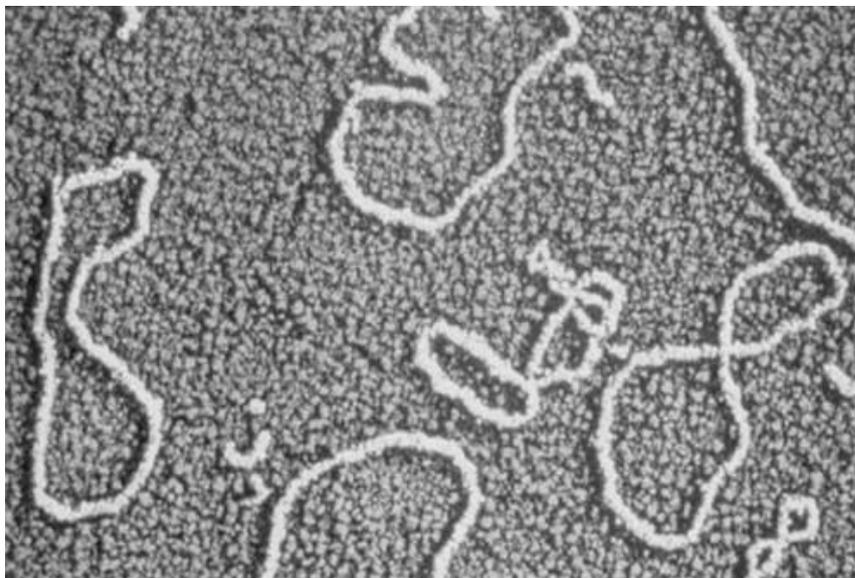


Figura 3: Fotografía al microscopio electrónico de un pequeño plásmido bacteriano (Bennett PM 2008)

Los genes de resistencia vehiculados por plásmido abarcan a prácticamente todos los antimicrobianos conocidos, tanto los usados en la actualidad como los que ya han pasado a un

segundo plano. Además, muchos de estos genes pueden estar contenidos en otros elementos movilizables como transposones o integrones, a los que nos referiremos más adelante, y que a su vez están insertados en los plásmidos. Muchos de los plásmidos de resistencia son conjugativos, es decir codifican las funciones necesarias para promover la transferencia intercelular de ADN, mientras que otros sólo son movilizables con el concurso de otro plásmido que resida en la misma célula y sea conjugativo (plásmido *helper*). Por otro lado, los plásmidos conjugativos pueden presentar un espectro de hospedador amplio, lo que permitiría el intercambio entre especies bacterianas distantes (en casos extremos incluso entre grampositivos y gramnegativos) o bien limitado circunscribiéndose el intercambio a especies similares. Los plásmidos se clasifican en grupos de incompatibilidad. Los plásmidos pertenecientes a un mismo grupo de incompatibilidad se asemejan en muchas de sus características y en su estructura básica y no pueden propagarse de forma estable en una misma línea celular pues utilizan los mismos sistemas de replicación (Carattoli 2008).

2) SECUENCIAS DE INSERCIÓN Y TRANSPOSONES

Los **transposones** de resistencia son esencialmente sistemas de genes “saltarines” que incorporan un gen de resistencia. Los transposones tienen la facultad de moverse dentro de una misma molécula o entre diferentes moléculas, de manera que pueden “saltar” de un lugar a otro del cromosoma, de un lugar a otro del plásmido y de un plásmido al cromosoma o a la inversa por un mecanismo de recombinación que, en general, no requiere homología. A este movimiento se le da el nombre de transposición y tiene lugar gracias a la transposasa. Los transposones pertenecen a una familia de elementos móviles denominados elementos transponibles que además de a éstos engloban a unos pequeños elementos críticos denominados **secuencias de inserción** y a los bacteriófagos transponibles como el bacteriófago μ . En realidad las secuencias de inserción serían los transposones más pequeños y, como éstos, tienen dos repeticiones invertidas cortas en cada uno de los extremos (IR) y una o varias pautas abiertas de lectura (*orF*) que codifican la transposasa; la diferencia entre ambos estriba en que los transposones codifican al menos una función que modifica el fenotipo de la célula de una forma predecible (un transposón de resistencia, por ejemplo, codifica resistencia a un tipo de antimicrobianos).

Los transposones tienen entre 0,7 y 40 kb de tamaño y existen dos tipos distintos, los compuestos y los complejos. Los transposones compuestos constan de una secuencia central de ADN, que no tiene capacidad intrínseca de transposición, y que en los transposones de resistencia corresponde a un gen de resistencia, flanqueada por dos secuencias de inserción iguales o muy semejantes, que pueden estar orientadas en un mismo sentido o en sentido

inverso, y para transponerse sólo necesita que una de ellas codifique una transposasa. Las secuencias repetidas e invertidas son reconocidas por la transposasa que, por lo tanto, puede movilizar todo el conjunto. Los transposones compuestos más conocidos son el Tn5 y el Tn10 que codifican, respectivamente, resistencia a aminoglicósidos y a tetraciclina y que están muy extendidos entre enterobacterias (Figura 4). Los transposones complejos no tienen IS en los extremos sino, directamente, secuencias de repetición invertidas y parecen tener mucha más antigüedad que los transposones compuestos y ser el resultado de múltiples recombinaciones que dan lugar a un elemento más compacto y más fácilmente transponible. Los transposones complejos también están muy difundidos entre enterobacterias y entre ellos están Tn1 y Tn3 que determinan resistencia a ampicilina, Tn21 que codifica resistencia a estreptomicina y sulfamidas y Tn1721 que codifica resistencia a tetraciclina (Figura 3). El potencial de este mecanismo para movilizar genes de resistencia es muy considerable, sobre todo entre plásmidos, pues las IS están muy extendidas a lo largo del genoma.

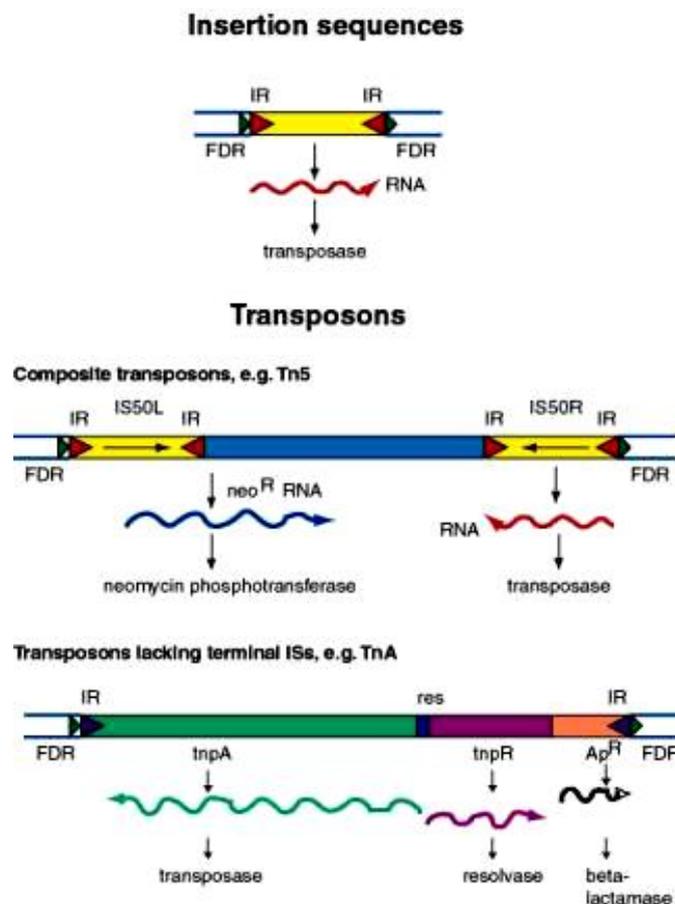


Figura 4: Representación esquemática de una secuencia de inserción, un transposón compuesto y un transposón complejo
(<http://www.personal.psu.edu/rch8/workmg/TranspositionCh9.htm>)

Se conoce un tercer tipo de transposones, los transposones conjugativos, que son los que pueden transferirse por sí mismos pues disponen de la maquinaria necesaria para realizar esta función. Los transposones conjugativos, a diferencia de los plásmidos, no pueden autoreplicarse pero sí que pueden integrarse en el cromosoma por un sistema semejante al de los ISCR. Los transposones conjugativos son uno de los principales responsables de la diseminación de resistencia a antibióticos en grampositivos y uno de los representantes más ilustrativos es el del transposón de resistencia a tetraciclina Tn916 (Livermore 2003, Boerlin et al 2003, Bennett 2008, Cantón Moreno et al 2005).

3) INTEGRONES Y CASSETES GÉNICOS

Los integrones no son, estrictamente, elementos móviles pero sí movilizables por otros elementos como transposones. Los integrones fueron descritos por primera vez en la década de los 80 del pasado siglo y hoy se sabe que están extendidos, sobre todo en gramnegativos, y que desempeñan un papel esencial en el desarrollo, selección y diseminación de multiresistencias, debido a su singular capacidad para agrupar y expresar genes de resistencia a los antimicrobianos con poco coste biológico para la bacteria por su relativo pequeño tamaño. Los integrones son sistemas de captura de genes que emplean una recombinación sitio-específica en lugar de una transposición. Engloban una plataforma de recombinación especializada que incluye un gen (*IntI*) que codifica una integrasa (enzima de recombinación específico de la familia de las tirosin recombinasas) y otra secuencia (*attI*) en la que se incorporan los genes en forma de casetes génicos por la acción de la integrasa. Los casetes génicos son unidades discretas que consisten en un gen seguido en el extremo 3' de un lugar de recombinación, llamado elemento de 59 pares de bases o *attC*, que son repeticiones invertidas largas de secuencia y estructura variables. Los casetes génicos se consideran elementos móviles, a pesar de no codificar ninguna proteína implicada en su movilidad. Los casetes génicos pueden existir libres como moléculas circulares cerradas covalentemente generadas por escisión mediada por la integrasa; se trata de un estado intermedio que se origina cuando los genes se trasladan de un integrón a otro o cambian de posición dentro de un mismo integrón.

Existe una gran variedad de casetes génicos que pueden hallarse en los integrones, de los cuales los de resistencia suponen alrededor de un 10 por ciento. El resto de casetes génicos codifican proteínas cuyas funciones en muchos casos se desconocen y en otros están asociadas a virulencia, funciones relacionadas con fagos, síntesis del sistema toxina-antitoxina, modificación del ADN, etc., lo que sugiere que los integrones podrían contribuir sustancialmente al potencial adaptativo de las bacterias (Carattoli 2001, Boucher et al 2007).

Hasta el momento se conocen cinco tipos de integrones que intervienen en la difusión de genes de resistencia y que se distinguen entre sí por la integrasa que codifican, siendo los de clase 1 los más prevalentes en aislados clínicos, sobre todo de enterobacterias. Los integrones de clase 1 constan de dos regiones altamente conservadas, la región 5'CS y la región 3'CS y entre ambas una región variable en la que se insertan los casetes génicos (figura 5). En la región 5'CS se encuentra el gen *int11*, *attI*, un promotor común para todos los genes casete (P1) y a veces un segundo promotor más fuerte. En el extremo 3'CS suelen encontrarse el gen *qacEΔ1* que confiere resistencia a los compuestos de amonio cuaternario y el gen *sul1* que confiere resistencia a sulfamidas (Carattoli 2001, Bennett 2008, Sabaté y Prats 2002, Fluit y Schmitz 2004, Mazel 2006), aunque hay integrones defectivos en la región 3'CS y otros descritos más recientemente, asociados a *sul3*, que en el extremo 3' tienen la estructura *qacH-IS440-sul3*, (Antunes et al 2007, Pérez Moreno et al 2009, Sáenz et al 2010). Los casetes génicos siempre están orientados en un mismo sentido, siendo el extremo 5' el más cercano a *int11*. El orden de los casetes génicos en el integrón indica el orden en que fueron insertados, siendo el más cercano a 5'CS el que primero se incorporó. Los casetes más cercanos al promotor son los que más se expresan.

Los integrones de clase 2 se encuentran en el Tn7 y en derivados de éste; el segmento conservado 5' es muy parecido al de los integrones de clase 1, el segmento 3' no contiene genes de resistencia sino 5 genes implicado en la transposición y el segmento intermedio casi siempre tiene la misma composición, *dfrA1-sat-aadA1*. Sólo se conoce un integrón de clase 3 que contiene el casete génico *bla_{IMP-1}*, que codifica una carbapenemasa (Carattoli 2001, Bennett 2008, Sabaté y Prats 2002, Fluit y Schmitz 2004).

Un cuarto tipo de integrón, que alberga cientos de casetes génicos y está asociado a *IntI4*, es el descrito en el cromosoma de *Vibrio cholerae*, que se ha visto que contiene una "isla de integrones" que consiste en agrupaciones de secuencias repetidas invertidas separadas por potenciales genes de virulencia en forma de casetes génicos. Esta estructura se ha localizado en cepas de *Vibrio* ancestrales de la era preantibiótica y se cree que *IntI4* podría ser el precursor del resto de integrasas que se habrían adaptado para adquirir genes de resistencia en un pasado mucho más reciente (Carattoli 2001). Este último integrón, al igual que el de clase 5 que está ubicado en un transposón compuesto localizado en un plásmido de *Vibrio salmonicida*, se identificó por su implicación en el desarrollo de resistencia trimetoprim, en el género *Vibrio* (Mazel 2006).

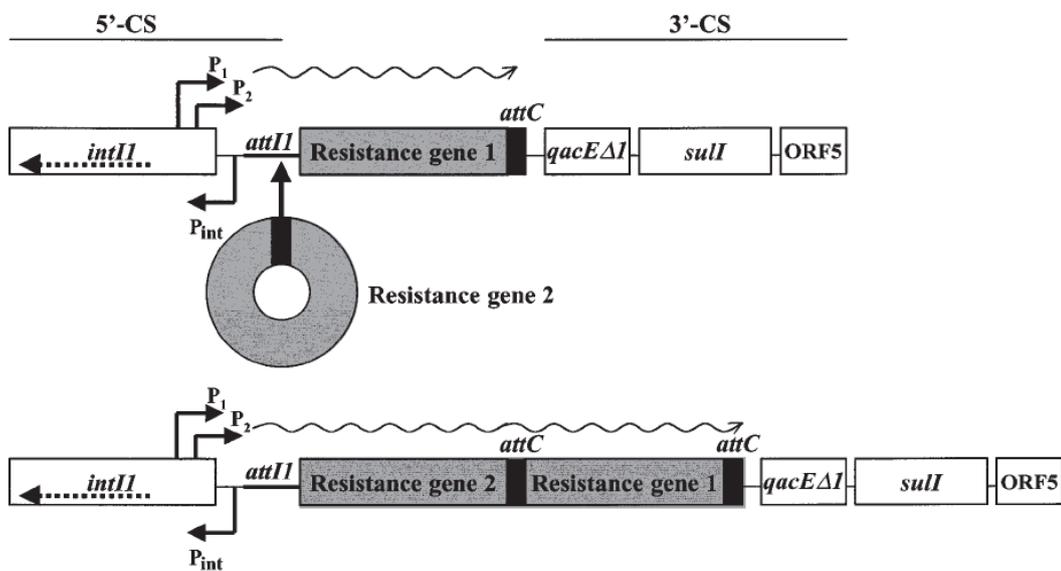


Figura 5: Representación esquemática de un integrón de clase 1 y de un modelo de adquisición de casetes génicos. En la figura se muestra el proceso por el cual un casete génico circular (gen de resistencia 2) es insertado en el sitio *attI* en un integrón de clase 1 que ya contenía otro casete génico (gen de resistencia 1). Los genes y pautas de lectura abierta (orf de open reading frames) de los extremos 5'CS y 3'CS están representados por rectángulos. Los rectángulos grises corresponden a casetes génicos y las barras verticales negras a los sitios de recombinación *attC*. P_1 y P_2 son los promotores asociados al integrón y P_{int} es el promotor del gen de la integrasa (*int11*). Los genes *qacEΔ1* y *sulI* del extremo 3'CS confieren resistencia a sulfamidas y compuestos de amonio cuaternario, respectivamente. (Carattoli 2001)

Se han descrito más de 60 casetes génicos de resistencia que pueden estar ubicados en la región variable de los integrones, siendo los más frecuentes los que codifican resistencia a aminoglicósidos y a trimetoprim (unas de las primeras familias de antimicrobianos en ser introducidas en la práctica clínica) aunque también los hay que confieren resistencia a otros antimicrobianos como cloranfenicol, β -lactámicos, rifampicina, eritromicina, fosfomicina y lincomicina (Partridge et al 2009).

Los integrones están evolucionando constantemente (de hecho en los integrones complejos se han localizado genes de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y determinantes *qnr*) para proveer a las bacterias de herramientas que les hagan resistentes a modernos antibióticos, a pesar de que su composición es más estable de lo que en un principio se había previsto y resulta intrigante que algunos de los genes de resistencia de mayor difusión como los que codifican las β -lactamasas de la familia TEM o *sul2* no estén asociados a integrones,

mientras que si lo están *bla*_{OXA}, *bla*_{PSE} y *sul3* que son mucho menos frecuentes. Probablemente los integrones se originaron a partir de bacterias ambientales y se diseminaron a un amplio abanico de hospedadores, tanto comensales como patógenos de humanos y animales, por transferencia horizontal gracias a su asociación con transposones ubicados en plásmidos de resistencia. El uso generalizado de compuestos de amonio cuaternario en el medio hospitalario y en la vida cotidiana podría haber sido un factor decisivo en la evolución de estos elementos genéticos (Boucher et al 2007).

4) TRANSFERENCIA DE GENES MEDIADA POR ELEMENTOS ISCR

Además de de los transposones de resistencia y los casetes génicos últimamente se ha reconocido al menos un tercer sistema de recombinación que contribuye al ensamblaje de multitud de genes de resistencia en los plásmidos bacterianos, se trata de unos elementos genéticos móviles denominados ISCR. Son pequeñas secuencias crípticas de un tamaño similar al de las IS, que como éstas pueden transponerse pero por un mecanismo diferente llamado transposición en *rolling circle*. Los ISCR (de *insertion sequence* y *common región* por su semejanza con las IS y el hecho de que inicialmente se pensara que su número era muy limitado) contienen un gen *transposasa-like* pero carece de las típicas secuencias IR en sus extremos y en su lugar están flanqueados y delimitados por las secuencias *oriIS* y *terIS* que determinan los sitios de inicio y terminación de la replicación y transposición. Se cree que pueden insertarse de forma aleatoria en el ADN bacteriano y que su mecanismo final de replicación no es muy exacto, lo que permite la movilización de secuencias adyacentes a estos elementos que pueden incluir genes de resistencia (Bennett 2007, Boerlin 2008). Parece que los ISCR, que pertenecen a una familia inusual de IS denominada *IS91*, han desempeñado un papel clave en la reciente emergencia y diseminación de algunas β -lactamasas de espectro extendido y de determinantes *qnr*, particularmente por su asociación con **integrones complejos** (Sabaté y Prats 2002. Wang et al 2003. Quiroga et al 2002), dando lugar a agrupaciones de genes de resistencia a los antimicrobianos que no hubieran sido posibles con el único concurso de los integrones clásicos.

Los integrones complejos tienen dos características fundamentales: aproximadamente la mitad de su estructura corresponde a un típico integrón de clase 1 con las regiones 5'CS y 3'CS y la región variable seguida de una copia de *ISCR1* y a continuación otra región variable con genes de resistencia (generalmente *bla*_{CMY}, *bla*_{DHA}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*) que no están en forma de casetes génicos y una segunda copia de 3'CS (Toleman et al 2006 (a), (b)).

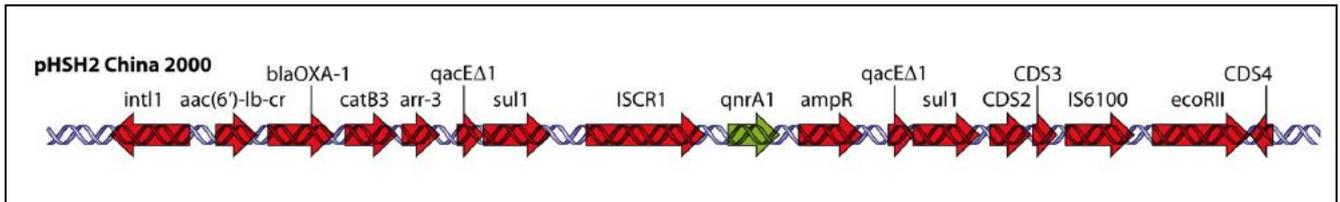


Figura 6: Esquema de la estructura del integrón complejo In37 identificado en un aislado clínico de *Escherichia coli* en Shanghái (Strahilevitz et al 2009)

El acoplamiento de los distintos mecanismos de transferencia horizontal de resistencia a los que nos hemos referido hasta ahora dota a las bacterias de una maquinaria genética extraordinariamente flexible y poderosa que permite que los plásmidos puedan proveerse de una gran variedad de genes de resistencia y ensamblarlos: los casetes génicos pueden insertarse en integrones que a su vez forman parte de transposones portados por plásmidos (figura 7). El transposón Tn21, portador de un integrón encontrado en un plásmido en una de las primeras cepas de *E. coli* multirresistentes en la década de los 60, es uno de los primeros ejemplos. La actividad de los ISCR puede incorporar nuevos genes de resistencia al sistema por la interacción con secuencias del integrón y el complejo en su conjunto puede ser transferido de una bacteria a otra (Bennett 2008),

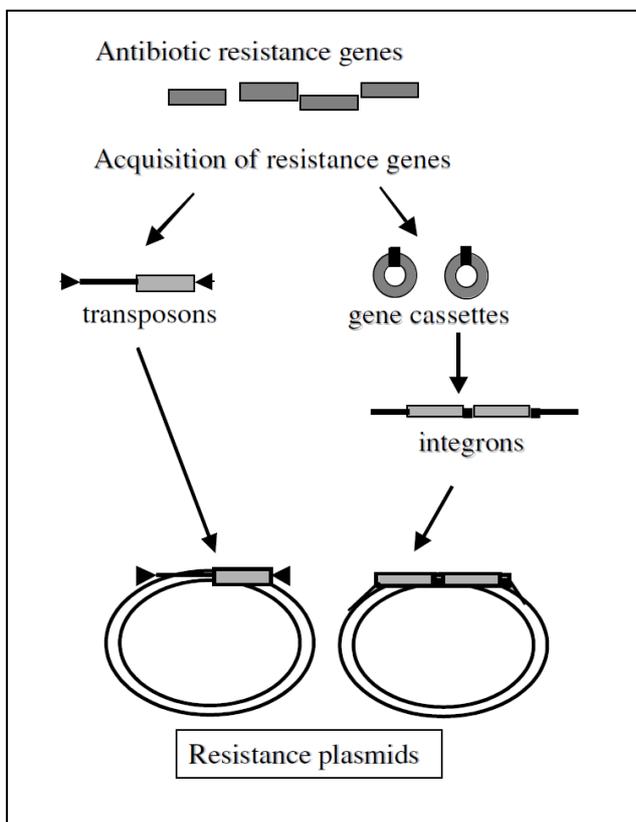


Figura 7: Esquema de la incorporación de genes de resistencia a un plásmido mediada por integrones y transposones (De Carattoli, 2003)

5) ISLAS GENÓMICAS

Las islas genómicas son elementos discretos de ADN con tamaños de entre 10 y 500 kb, presentes en ciertas cepas de una especie pero ausentes en otras, y que confieren notables ventajas adaptativas para ocupar nichos ecológicos. Muchas islas genómicas se asemejan a enormes transposones atípicos, que se insertan preferentemente en o cerca de ciertos genes cromosómicos (como p. ej., genes de ARNt), que están enmarcados por secuencias cortas repetidas (similares a las que usan ciertos fagos, como el fago λ), y que de hecho codifican una enzima de tipo integrasa como la del propio fago λ . Algunas de estas islas, a su vez, pueden transferirse activamente a otras células se cree que mediante bacteriófagos o en ocasiones de forma activa al poseer genes que codifican sistemas de transferencia y que permitan que no sólo se transfiera la isla genómica sino también fragmentos cromosómicos. Las islas genómicas son de varios tipos en función de la ventaja adaptativa que confieren a las cepas que las albergan, así existen islas de patogenicidad, de simbiosis, metabólicas o de resistencia. Entre las islas genómicas de resistencia más conocidas por su papel para la diseminación de resistencias están la SGI1 (*Salmonella* Genomic Island 1) a la que nos referiremos más adelante y el SCCmec (Staphylococcal cassette chromosome) en el que se localiza el gen *mecA* que codifica una PBP de baja afinidad y es responsable de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina. Las islas genómicas cumplirían un papel semejante al de los plásmidos conjugativos en la transferencia horizontal de resistencias, pero con ciertas ventajas como, por ejemplo, el hecho de encontrarse integradas en el cromosoma del hospedador hace que no necesiten estar constantemente replicándose para asegurar su mantenimiento en la célula, además de que sólo es necesaria una copia de la isla genómica por genoma. Todo ello, reduce en un menor coste energético para la célula hospedadora con respecto al coste requerido por un plásmido. (Boerlin et al 2008, Juhas et al 2009).

MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

Existen más de 15 clases de antibióticos, cuyas dianas están implicados en funciones fisiológicas o metabólicas esenciales para la célula bacteriana (tabla 1) y ninguno de ellos ha podido hasta el momento soslayar el fenómeno de la resistencia (Levy y Marshall 2004).

Tabla 1: Mecanismos de acción de los antimicrobianos

Mecanismo de acción	Familias de antibióticos
Interferencia con la síntesis de la pared bacteriana	β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactámicos), Glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina), fosfomicina
Inhibición síntesis proteínas	
<ul style="list-style-type: none"> • Unión a la subunidad 50S del ribosoma 	Macrólidos, ketólidos, lincosamidas, estreptograminas, cloranfenicol, oxazolidinonas.
<ul style="list-style-type: none"> • Unión a la subunidad 30S del ribosoma 	Aminoglicósidos, tetraciclina
<ul style="list-style-type: none"> • Unión a la isoleucil-tRNA sintetasa 	Mupirocina
Inhibición síntesis de ácidos nucleicos	
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición síntesis DNA 	Quinolonas
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición síntesis tRNA 	Rifampicina
Inhibición competitiva de la síntesis ácido fólico	
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición competitiva dihidropteroico sintetasa 	Sulfonamidas
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición dihidrofolato reductasa 	Trimetoprim
Disrupción de la membrana bacteriana	Polimixinas, daptomicina
Otros	Metronidazol, nitrofurantoina

Los mecanismos bioquímicos responsables de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos son también muy variados y los genes que los codifican pueden encontrarse tanto en el cromosoma como en elementos móviles del genoma bacteriano. Algunos de estos mecanismos afectan específicamente a un solo tipo de compuestos, mientras que otros

afectan a varios grupos de antimicrobianos simultáneamente. A continuación describimos los diferentes mecanismos involucrados en la resistencia adquirida a antibacterianos en bacterias gramnegativas, que también se resumen en la tabla 2 y se ilustran en la figura 8.

Tabla 2: Principales mecanismos de resistencia adquirida a antimicrobianos en gramnegativos

Antimicrobiano	Tipo resistencia	Mecanismo resistencia	Base genética
β-lactámicos	Disminución penetración	Cambios en la permeabilidad membrana	Mutación
	Expulsión activa	Hiperexpresión bombas expulsión multidroga	Mutación
	Modificación antimicrobiano	Desrepresión o hiperproducción AmpC	Mutación
		Producción B-lactamasas adquiridas	Transferencia horizontal
Aminoglicósidos	Disminución penetración	Cambios en la permeabilidad membrana	Mutación
	Expulsión activa	Hiperexpresión bombas expulsión multidroga	Mutación
	Modificación diana	Metilación RNA ribosómico	Transferencia horizontal
	Modificación antimicrobiano	Enzimas modificadores aminoglicósidos	Transferencia horizontal
Quinolonas	Expulsión activa	Hiperexpresión bombas expulsión multidroga	Mutación
		QepA, OqxAB	Transferencia horizontal
	Modificación diana	Alteraciones topoisomerasas	Mutación
	Protección diana	Proteínas familia Qnr	Transferencia horizontal
Modificación antimicrobiano	Acetilasa Aac(6')-Ib-cr	Transferencia horizontal	
Tetraciclina	Expulsión activa	Hiperexpresión bombas expulsión activa específicas o multidroga	Transferencia horizontal o mutación
	Modificación de la diana	Modificación ribosoma (TetM o TetO)	
Cloranfenicol	Expulsión activa	Transportadores membrana (CmlA, FloR)	Transferencia horizontal
	Modificación antimicrobiano	Acetiltransferasas del cloranfenicol (CAT)	Transferencia horizontal
Trimetoprim	Modificación diana	Alteración dihidrofolatoreductasa	Transferencia horizontal
	Hiperproducción diana	Hiperproducción dihidrofolatoreductasa	Mutación
Sulfamidas	Modificación diana	Alteración dihidropteroatosintetasa	Transferencia horizontal
	Hiperproducción diana	Hiperproducción dihidropteroatosintetasa	Mutación

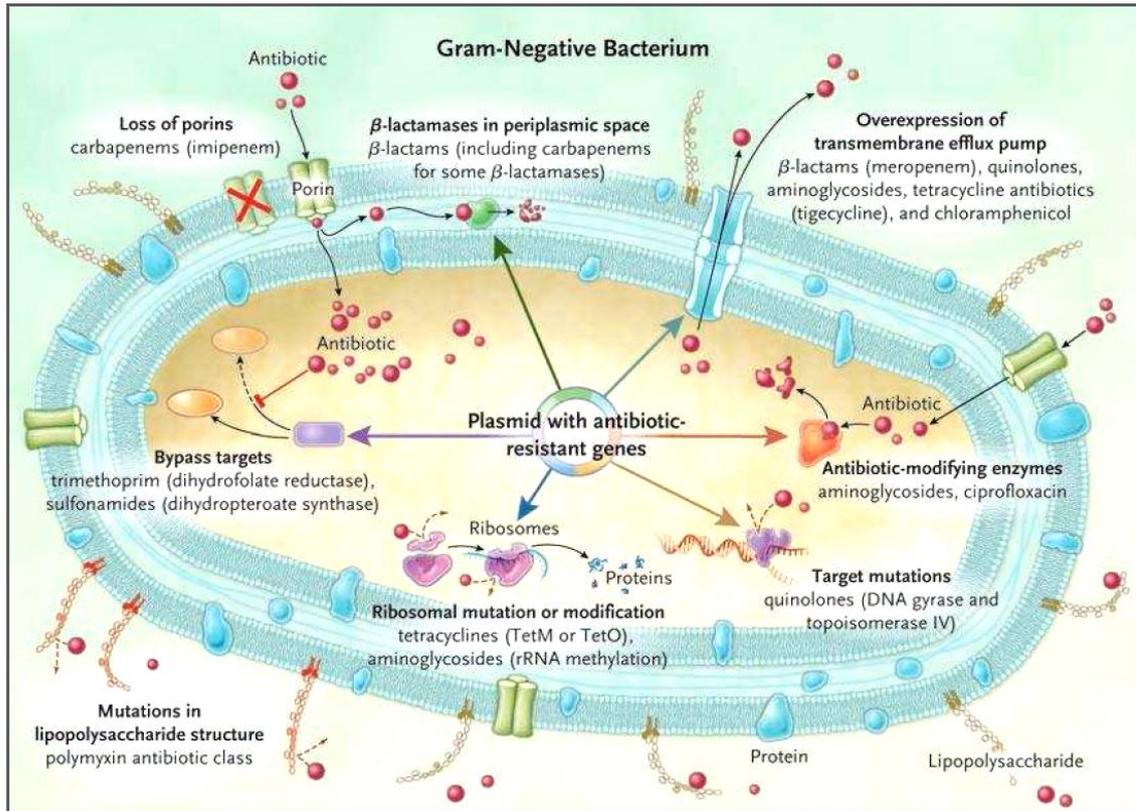


Figura 8: Mecanismos de resistencia en Gramnegativos y antibióticos afectados (de Peleg AY y Hooper DC 2010)

Disminución de la permeabilidad

Todas las bacterias gramnegativas tienen una membrana externa que debe ser atravesada por los antimicrobianos para alcanzar la membrana citoplasmática. La penetración de los antimicrobianos tiene lugar a través del lipopolisacárido o de las porinas que son canales hidrófilos. La disminución del número de estas porinas o su alteración estructural disminuye la penetración de los antimicrobianos y puede conferir resistencia de bajo nivel y contribuir a un aumento franco de la resistencia cuando coexiste con otros mecanismos. Se trata de un mecanismo que puede afectar a varias moléculas hidrófilas (como sucede en el caso de la pérdida de porinas en las enterobacterias -OmpF en *Escherichia coli*- que compromete a aminoglicósidos, quinolonas y β -lactámicos) o a un solo grupo de compuestos como ocurre con la pérdida de OprD que confiere resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*.

Eliminación activa (Sistemas de expulsión activa)

La expulsión activa como un mecanismo de resistencia a los antimicrobianos fue inicialmente descrita en las tetraciclinas (MacMurry et al 1980), pero en la actualidad es uno de los mecanismos más estudiados y se sabe que es uno de los más extendidos.

Los microorganismos poseen unas proteínas situadas en la membrana citoplasmática que actúan como bombas de expulsión dependientes de ATP bombeando al medio externo los antimicrobianos que han penetrado en su interior y cuya sobreexpresión confiere resistencia, habitualmente de bajo nivel, a los antibióticos y biocidas. La mayoría de estas proteínas se agrupan en cinco familias diferentes: RND (*resistance-nodulation-cell division*), MF (*major facilitator*), SMR (*staphylococcal/small multidrug-resistance*), ABC (*ATP-binding-cassette*) y MATE (*multidrug and toxic compound structure*) (figura 9) y puede distinguirse entre las que constituyen un sistema de eflujo de un único componente (como la de los sistemas transportadores de tetraciclina), que generalmente poseen un limitado perfil de sustrato, y las que requieren de dos proteínas adicionales (una proteína que actúa como canal para expulsar al antimicrobiano y otra que actúa como proteína acopladora) para ejercer su función y que suelen ser bombas de expulsión multidroga. Los genes que codifican estas proteínas son cromosómicos y suelen formar parte de un mismo operón.

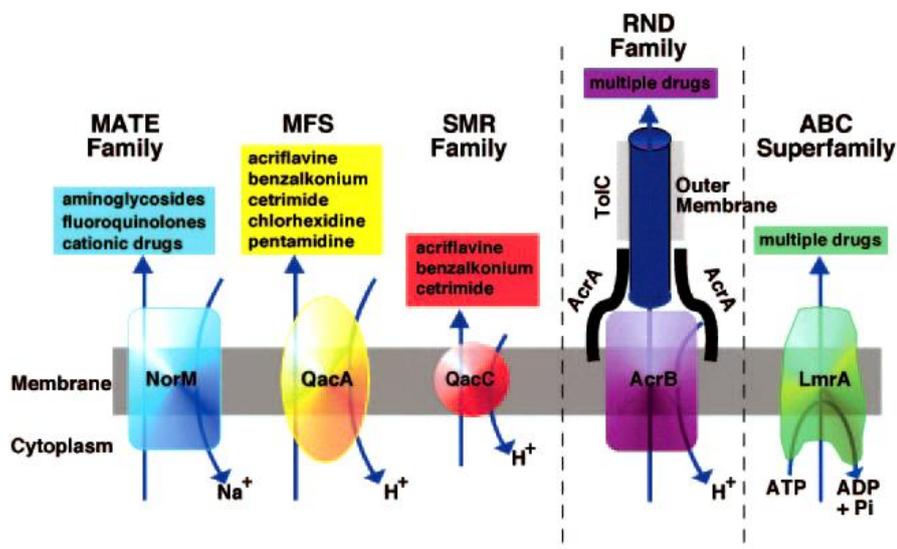


Figura 9: Comparación esquemática de las cinco familias de bombas de expulsión (Pidcock 2006)

Entre los principales **sistemas de expulsión activa multidroga** que se encuentran en bacterias gramnegativas de importancia clínica están MexAB-oprM (β -lactámicos y fluoroquinolonas), MexCD-OprJ (cefepime), MexEF-OprN (fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim, triclosan, imipenem), MexJK-OprM (ciprofloxacino, tetraciclina, eritromicina, triclosan), MexVW-OprM

(fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, bromuro de etidio y acriflavina) y MexXY-OprM (aminoglicósidos y tigeciclina), todas ellas pertenecientes a la familia RND, en *P. aeruginosa*; AdeABC en *Acinetobacter baumannii* (aminoglicósidos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cefotaxima, cloranfenicol, eritromicina y trimetoprim) o AcrAB-TolC (fluoroquinolonas, β -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, acriflavina y triclosan) en *E. coli* y *K. pneumoniae* (Piddock LJV et al 2006, Alekshun et al 2007).

Se conocen más de 20 sistemas de bombas de eflujo para **tetraciclina** que se han englobado en seis grupos y que se encuentran tanto en bacterias grampositivas (TetK, TetL, TetP, TetV, TetZ, Tet33) como gramnegativas (Tet A-L, TetY, Tet30, Tet31, Tet34, Tet35, Tet39). La expresión de las proteínas del grupo 1, entre las que se encuentra TetG, característica de las cepas de *Salmonella* Typhimurium 104 portadoras de SGI1, es controlada por el transcriptor represor TetR. El antibiótico inactiva el represor y permite la expresión de la bomba de eflujo. La síntesis de las bombas TetK y TetL de grampositivos es inducida por tetraciclinas mediante mecanismos de atenuación de la transcripción y reiniciación.

En el caso de las **quinolonas** se ha descrito recientemente la existencia de una bomba de expulsión activa denominada Qep A (*quinolone efflux pump*) dependiente de protones que confiere resistencia a quinolonas hidrofílicas como norfloxacin, ciprofloxacino o enrofloxacin, con aumentos de entre 32 y 64 veces la concentración mínima inhibitoria. Esta proteína, aparentemente poco prevalente, está codificada por el gen *qepA* que parece estar insertado en algún elemento transponible junto con un gen que codifica una metilasa ribosomal de aminoglicósidos. (Poirel et al 2008). OqxAB es otra bomba de expulsión, codificada por los genes *oqxA* y *oqxB*, que confiere resistencia al promotor de crecimiento oleaquinodox y también a fluoroquinolonas y cloranfenicol. Se describió originalmente en un plásmido conjugativo de aislados de *E. coli* porcinos y más tarde en aislados humanos y en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae*, a partir del cual podría haberse movilizado (Kim et al 2009).

Se conocen al menos ocho sistemas de expulsión específicos para **anfencíoles** (E1-E8). CmlA es una bomba de expulsión activa, descrita en la década de los 80, y ampliamente distribuida en *Salmonellas* y *E. coli* de origen animal, que confiere resistencia a cloranfenicol y que es codificada por el gen *cmIA*, que a menudo se encuentra ubicado en integrones localizados en plásmidos conjugativos en forma de casetes génicos, que tienen la peculiaridad de contar con su propio promotor y de que su expresión sea regulada por atenuación translacional. (Bishoff et al 2005). Incluidas en el grupo E3 están varias bombas que confieren resistencia a

cloranfenicol y florfenicol y una de ellas es la codificada por el gen *floR* (Schwarz et al 2004) que se encuentra en el *cluster* cromosómico de resistencia de la SGI1 característico de *S. Typhimurium* del fagotipo DT104 (Mulvey et al 2006) y que se identificó originalmente en un plásmido de un aislado acuático de *Pasteurella piscicida* (Toleman et al 2006 (b)).

Modificación del antimicrobiano

Se han descrito un gran número de enzimas bacterianas capaces de modificar los antibióticos, ya sea degradándolos como ocurre con las β -lactamasas o bien modificándolos como es el caso de las proteínas modificadoras de aminoglicósidos.

β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico ocasionando la pérdida de actividad de los compuestos afectados y constituyen el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos en bacterias gramnegativas. Se han descrito cientos de variantes de estas enzimas (que pueden consultarse en www.Lahey.org) que pueden ser de codificación plasmídica o cromosómica, producirse de forma constitutiva o inducible, ser codificadas por genes de dotación intrínseca o adquirida, tener un amplio o un reducido espectro de actividad e inhibirse o no por ciertos compuestos específicos (ácido clavulánico, EDTA, cloxacilina o borónico). Atendiendo a todas estas características en 1995 Bush, Jacoby y Medeiros propusieron una clasificación funcional que se ha actualizado en 2010 (tabla 6). Las β -lactamasas también se pueden clasificar en 4 clases moleculares de acuerdo a su secuencia de proteínas (A, B, C y D). Las β -lactamasas A, C y D poseen una serina en su centro activo, mientras que las de la clase B son metaloenzimas dependientes de zinc como cofactor (Bush y Jacoby 2010).

Una estrategia eficaz para eludir la resistencia mediada por algunas β -lactamasas es el empleo de combinaciones de β -lactámicos e inhibidores suicidas de las β -lactamasas, moléculas de estructura muy semejante a la de los β -lactámicos y que protegen a éstos de la hidrólisis inducida por las β -lactamasas bacterianas al unirse de forma irreversible al sitio activo del enzima y ocasionar su inactivación permanente. El ácido clavulánico, aislado a partir de *Streptomyces clavuligerus*, fue el primero de los inhibidores de β -lactamasas introducido en clínica hace ya tres décadas y tiene muy poca actividad antibacteriana intrínseca, mientras que el sulbactam y el tazobactam son sulfonas del ácido penicilínico desarrolladas como productos sintéticos por la industria farmacéutica algunos años más tarde. Los tres

compuestos son efectivos frente a las β -lactamasas de la clase A y generalmente menos efectivos o muy poco efectivos frente a las de las clases B, C y D (Drawz y Bonomo 2010).

Las principales β -lactamasas que encontramos en enterobacterias son:

- GRUPO 1 (cefalosporinas): son enzimas de la clase molecular C, que reciben el nombre de AmpC, más activas frente a cefalosporinas que a penicilinas, activas frente a cefamicinas, habitualmente no inhibidas por ácido clavulánico y codificadas en el cromosoma de prácticamente todas las enterobacterias excepto *Salmonella*, *Klebsiella* y *Proteus mirabilis*. En muchas enterobacterias como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Providencia* spp. o *Morganella morganii* su expresión es baja pero inducible por ciertas moléculas como cefoxitina o imipinem, mientras que en *E. coli* y *Shigella* el enzima no es inducible y su nivel de expresión es extremadamente bajo por lo que no confiere resistencia de trascendencia clínica. La hiperproducción de AmpC (rara en *E. coli* en el que puede deberse a la presencia de múltiples copias del gen o a mutaciones en el gen regulador y bastante más común en las especies con enzimas inducibles en los que surge por mutaciones del locus *ampD* y puede dar lugar a mutantes establemente desreprimidos) amplía el espectro de resistencia a todos los β -lactámicos excepto carbapenemes (Navarro et al 2010). La sensibilidad a carbapenemes puede llegar a verse afectada cuando coexiste una pérdida de porinas. También se incluyen en este grupo las cefamicinasas de codificación plasmídica (CMY, ACT, DHA, FOX, MI), cada día más frecuentes en enterobacterias (Livermore 1995, Navarro et al 2010).
- GRUPO 2 (serin- β -lactamasas de las clases moleculares A y D)
 - Subgrupo 2b: enzimas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación y son fuertemente inhibidas por ácido clavulánico (IC₅₀ 0,08 μ M) y tazobactam. Incluye TEM-1, TEM-2 y SHV-1, las β -lactamasas plasmídicas más frecuentes en enterobacterias.
 - Subgrupo 2be: incluye las denominadas β -lactamasas de espectro extendido, enzimas de amplio espectro inhibidas por ácido clavulánico (propiedad que se aprovecha para su detección fenotípica), que tienen actividad frente a penicilinas y cefalosporinas (incluidas las de tercera y cuarta generación) y aztreonam. Hasta el momento se han descrito más de 200 variantes, siendo el grupo más amplio y el primero en ser identificado el de las β -lactamasas derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1 por la sustitución en uno a algunos aminoácidos, aunque hoy en día las β -lactamasas de espectro extendido más prevalentes y diseminadas sean las de tipo CTX-M que están

relacionadas con β -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera* y que, a diferencia de las anteriores, hidrolizan con mayor facilidad cefotaxima que ceftazidima. Estos enzimas se encuentran mayoritariamente en *E. coli* y *K. pneumoniae* y más raramente en otras enterobacterias como *Salmonella*, *Proteus*, *Enterobacter* o *Citrobacter* (Bush y Jacoby 2010).

- Subgrupo 2br (penicilinasas resistentes a inhibidores): β -lactamasas de amplio espectro que derivan fundamentalmente de TEM-1 y más raramente de TEM-2 (enzimas IRT o inhibitor-resistant-TEM) o de SHV y han adquirido resistencia al ácido clavulánico ($IC_{50} \geq 1 \mu M$), sulbactam y tazobactam como consecuencia de mutaciones en los genes que modifican las β -lactamasas nativas, aunque mantienen una actividad equivalente o algo inferior a las enzimas del grupo 2b. La sustitución en uno a más residuos de aminoácidos en las posiciones 69, 130, 244, 275 y 276 dan lugar a cambios estructurales en el enzima que afecta a su afinidad por los inhibidores pero que producen sólo ligeras modificaciones en su punto isoeléctrico y en su afinidad por otros β -lactámicos. También se han descrito sustituciones en otras posiciones como la 127, 165, 182 y 261 pero que no parecen contribuir al fenotipo IRT. Los aislados productores de IRT son resistentes a amoxicilina, intermedios o resistentes a amoxicilina/clavulánico y generalmente a piperacilina y ticarcilina/ clavulánico pero se mantienen sensibles a cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemes y en la mayoría de casos a piperacilina/tazobactam. Hasta el momento se han identificado 35 variantes derivadas de TEM (tabla 4) y 6 derivadas de SHV (tabla 5), fundamentalmente en *E. coli* y con mucha menor frecuencia en *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*. (Chaibi et al 1999, Lemozy et al 1995, Cantón et al 2008, Drawz y Bonomo 2010 et al 2010).
- Subgrupo 2bre: comprende enzimas denominados CMT (Complex mutant TEM β -lactamasas), que se han descrito recientemente y que son el resultado de la concurrencia de mutaciones en bla_{TEM} propias de las β -lactamasas de espectro extendido y de las IRT. Se han identificado en aislados de *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* y *E. aerogenes*. (Cantón et al 2008, Drawz y Bonomo 2010).
- Subgrupo 2c: penicilinasas caracterizadas por hidrolizar carbenicilina o ticarcilina con una velocidad de al menos el 60% de la velocidad con la que hidrolizan bencilpenicilinas que son eficazmente inhibidas por ácido clavulánico. El principal representante es PSE-1 que se identifica sobre todo en *S. Typhimurium*.
- Subgrupo 2ce: contiene la carbenicilinasas de espectro extendido descrita recientemente RTG-4 (CARB-10) con actividad frente a cefepime y cefpirona.

Tabla 4: β -lactamasas IRT (Inhibitor-resistant TEM) identificadas (Drawz y Bonomo 2010)

β -lactamasas	Aminoácidos en posición especificada														
	21	39	69	104	12	130	165	182	221	238	244	261	265	275	276
TEM-1	Leu	Glu	Met	Glu	Ile	Ser	Trp	Met	Leu	Gly	Arg	Val	Thr	Arg	Asn
TEM-30 (IRT-2)											Ser				
TEM-31 (IRT-1)											Cys				
TEM-32 (IRT-3)			Ile					Thr							
TEM-33 (IRT-5)			Leu												
TEM-34 (IRT-6)			Val												
TEM-35 (IRT-4)			Leu												Asp
TEM-36 (IRT-7)			Val												Asp
TEM-37 (IRT-8)			Ile												Asp
TEM-38 (IRT-9)			Val											Leu	
TEM-39 (IRT-10)			Leu				Arg								Asp
TEM-40(IRT-11)			Ile												
TEM-44 (IRT-13)		Lys									Ser				
TEM-45 (IRT-14)			Leu											Gln	
TEM-51 (IRT-15)											His				
TEM-54											Leu				
TEM-58											Ser	Ile			
TEM-59 (IRT-17)		Lys				Gly									
TEM 65 (IRT-16)		Lys									Cys				
TEM-67	Ile	Lys									Cys				
TEM-73 (IRT-18)		Phe									Cys		Met		
TEM-74 (IRT-19)		Phe									Ser		Met		
TEM-76 (IRT-20)						Gly									
TEM-77 (IRT-21)		Leu									Ser				
TEM-78 (IRT-22)		Val					Arg								Asp
TEM-79											Gly				
TEM-80 (IRT-24)		Leu			Va										Asp
TEM-81			Leu		Va										
TEM-82			Val											Gln	
TEM-83			Leu				Cys							Gln	
TEM-84															Asp
TEM-103(IRT-28)														Leu	
TEM-122														Gln	
TEM-145								Met			His				
TEM-159	Phe		Ile												
TEM-160		Lys	Val					Thr							

Tabla 5: Penicilinasas resistentes a inhibidores derivadas de SHV (Drawz y Bonomo 2010)

β-lactamasa	Aminoácido en posición especificada										
	35	69	130	140	146	187	192	193	234	238	240
SHV-1	Leu	Met	Ser	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Gly	Glu
SHV-10			Gly	Arg			Asn	Val		Ser	Lys
SHV-26						Thr					
SHV-49		Ile									
SHV-56	Gln								Arg		
SHV-72					Val				Arg		

- Subgrupo 2d: incluye β-lactamasas que se distinguen por su capacidad de hidrolizar cloxacilina u oxacilina a una velocidad más de 50 veces superior a la velocidad a la que hidrolizan a las bencilpenicilinas, por lo que reciben el nombre de OXA (OXA-1, OXA-2, OXA-10), y por hidrolizar también eficientemente carbenicilina y ticarcilina. Son pobremente inhibidas por ácido clavulánico ($IC_{50} \geq 1 \mu M$) y además de sobre penicilinas tienen alguna actividad sobre cefuroxima y cefepime. En la actualidad es el segundo familia más amplia de β-lactamasas y una de las más diseminadas.
- Subgrupo 2de: enzimas derivados de OXA-10, identificados sobre todo en *P. aeruginosa* en Francia y Turquía, con un mayor espectro de actividad que abarca a oximino β-lactámicos pero no a carbapenemes y que en general confieren mayor resistencia a ceftazidima que a cefotaxima o a aztreonam.
- Subgrupo 2df: enzimas de tipo OXA, escasamente inhibidos por clavulánico, capaces de hidrolizar débilmente carbapenemes. Se encuentran principalmente en *Acinetobacter baumannii*, en el que la codificación acostumbra a ser cromosómica, aunque también se han identificado enzimas de codificación plasmídica pertenecientes a este grupo en Enterobacterias.
- Subgrupo 2e: enzimas que se caracterizan por su habilidad para hidrolizar penicilinas, cefuroxima y cefalosporinas de amplio espectro pero no aztreonam y que son inhibidas por ácido clavulánico. Comprende las cefalosporinasas cromosómicas inducible de *P. vulgaris*, *P. penneri* y *Citrobacter koseri*.
- Subgrupo 2f: compuesto por carbapenemasas de la clase molecular A, que son mejor inhibidos por tazobactam que por clavulánico. Incluye, entre otras, las β-lactamasas cromosómicas de la familia SME de *Serratia marcescens*, IMI-1 y NMC-1 de *E. cloacae* y L-2 de *Stenotrophomonas maltophilia*, que apenas hidrolizan a las cefalosporinas de amplio espectro pero que si inactivan a aztreonam. También se incluyen algunas de las enzimas plasmídicas GES y las KPC. Estas últimas, que inicialmente se identificaron

en *K. pneumoniae*, pueden hidrolizar a todos los β -lactámicos, son inhibidas por ácido borónico y discretamente por clavulánico y están adquiriendo gran relevancia en los últimos tiempos pues han producido varios brotes nosocomiales y se están diseminando universalmente en varias especies de enterobacterias y otros gramnegativos (Bush y Jacoby 2010).

- GRUPO 3 (Metalobetalactamasas)

Las metalobetalactamasas son un grupo único de β -lactamasas tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Se diferencian del resto de β -lactamasas en que requieren de la presencia de un ión de Zinc en el sitio activo del enzima.

- Subgrupo 3a: comprende enzimas que no son inhibidos por clavulánico pero si por EDTA, son capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos, incluidos carbapenemes, a excepción de aztreonam y a menudo se producen junto a otras β -lactamasas. En este grupo se incluyen además de la enzima cromosómica L-1 de *S. maltophilia*, las enzimas de codificación plasmídica de las familias IMP y VIM que se han expandido globalmente y que no sólo se encuentran en gramnegativos no fermentadores, en los que se identificaron originalmente, sino en muchas especies de enterobacterias a menudo asociadas a integrones. En ocasiones confieren sólo resistencia de bajo nivel a carbapenemes por lo que su presencia puede pasar inadvertida (Bush y Jacoby 2010). También se incluyen en el grupo las β -lactamasas NDM descritas recientemente en aislados de *K. pneumoniae* y otras enterobacterias en pacientes procedentes de la India, que tienen unas características similares a las anteriores pero que han adquirido notoriedad debido a ser prácticamente panresistentes (Lascols et al 2011).
- Subgrupo 3b: incluye las carbapenemasas de *Aeromonas*, cuya característica diferencial es que hidrolizan mucho más efectivamente carbapenemes que penicilinas o cefalosporinas.

Tabla 6: Esquema de clasificación de las β-lactamasas bacterianas (Bush y Jacoby 2010)

Grupo Bush-Jacoby (2010)	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Clase molecular	Sustrato preferente	Inhibición por			Características	Enzimas representativos
				Clav o Tzb	EDTA			
1	1	C	Cefalosporinas	No	No		Hidrólisis cefalosporinas > penicilinas; Hidrólisis cefamicinas	Amp <i>E. coli</i> , ACT-1; CMY-2.; FOX-1; MIR-1; DHA-1
1e	No incluido	C	Cefalosporinas	No	No		↑ hidrólisis ceftazidima y otros oximino β-lactámicos	GC1, CMY 37
2a	2a	A	Penicilinas	Sí	No		Hidrólisis penicilinas > cefalosporinas	PC1 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas 1ª gen	Sí	No		Hidrólisis penicilinas ≡ cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas amplio espectro, monobactámicos	Sí	No		↑ hidrólisis oximino β-lactámicos	TEM-3; SHV-2; CTX-M-15; PER-1; VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No		Resistencia clav, Tzb, sulbactam,	TEM-30; SHV-10
2ber	No incluido	A	Cefalosporinas amplio espectro, monobactámicos	No	No		↑ hidrólisis oximino β-lactámicos y resistencia a clav. Tzb, sulbactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sí	No		↑ hidrólisis carbenicilina	PSE-1; CARB-3
2ce	No incluido	A	Carbenicilina, Cefepime	Sí	No		↑ hidrólisis carbenicilina y cefepime	RTG-4 (CARB-10)
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No		↑ hidrólisis cloxacilina y oxacilina	OXA-1; OXA-10
2de	No incluido	D	Cefalosporinas amplio espectro,	Variable	No		Hidrólisis oxacilina, cloxacilina y oximino β-lactámicos	OXA-11; OXA-15
2df	No incluido	D	Carbapenemes	Variable	No		Hidrólisis oxacilina, cloxacilina y oximino β-lactámicos	OXA-23; OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas amplio espectro	Sí	No		Hidróliza cefalosporinas pero no aztreonam inhibido por clav	CepA
2f	2f	A	Carbapenemes	Variable	No		↑ hidrólisis carbapenemes, oximino β-lactámicos y cefamicinas	KPC-2; IMI-1; SME-1
3a	3	B (B1, B3)	Carbapenemes	No	Sí		Hidrólisis amplio espectro incluidos carbapenemes pero no aztreonam	IMP-1; VIM-1; CcrA; IND-1; FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenemes	No	Sí		Hidrólisis preferente carbapenemes	CphA, Sfh-1

Enzimas modificadores de aminoglicósidos

Se conocen un gran número de enzimas modificadores de aminoglicósidos, codificados generalmente por genes localizados en elementos transferibles, que constituyen el principal mecanismo de resistencia a estos compuestos en gramnegativos. Los enzimas modificadores de aminoglicósidos modifican la estructura de estos compuestos por O-fosforilación [fosfotransferasas (APH)], O-nucleotidización [nucleotidil o adeniltransferasas (ANT) o N-acetilación [acetiltransferasas (AAC)] y de este modo los vuelven inactivos al disminuir su capacidad de unirse al ribosoma. Hasta el momento se han identificado siete fosfotransferasas mayores [APH (3'), APH (2''), APH (3''), APH (6), APH (9), APH (4) y APH (7'')], cuatro adeniltransferasas [ANT (6), ANT (3''), ANT (4') y ANT (2'')] y cuatro acetiltransferasas [AAC (2'), AAC (6), AAC (1) y AAC (3)] y un enzima bifuncional capaz de acetilar y fosforilar [AAC (6')-APH (2'')] que suele expresarse en aislados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Una misma enzima puede modificar diferentes aminoglicósidos y, a la inversa, un mismo aminoglicósido puede ser modificado por diferentes enzimas, lo que dificulta su detección fenotípica para la que es indispensable incluir una amplia batería de compuestos, incluidos algunos de poca o nula utilización clínica. Entre los enzimas responsables de resistencia adquirida a aminoglicósidos en enterobacterias, los más frecuentes son APH(3'')-I que confiere resistencia a estreptomycin, ANT (3'')-I que confiere resistencia a estreptomycin y espectinomycin, APH (3')-I que confiere resistencia de alto nivel a kanamicina y neomicina y AAC (3)-II que confiere resistencia de alto nivel a gentamicina, tobramicina y netilmicina y moderada a kanamicina. Algunas de estas proteínas se producen de forma natural en ciertas enterobacterias, como AAC (2')-I en *Providencia* y ACC(6')-I en *Serratia* (Navarro et al 2010). Por último, recientemente se ha descrito una variante plasmídica de la acetilasa AAC(6')-Ib, la AAC(6')-Ib-cr que puede acetilar quinolonas con un anillo piperazínico, como ciprofloxacino o norfloxacino, además de tobramicina, kanamicina y amikacina (Poirel et al 2008).

Enzima modificador (acetiltransferasa) del cloranfenicol

El principal mecanismo de resistencia a cloranfenicol es la producción de enzimas inactivadoras, acetil transferasas, que acetilan la molécula del antibiótico impidiendo su unión a los ribosomas bacterianos. Este mecanismo es extracromosómico, mediado por plásmidos. Determina resistencia de alto nivel y puede ser encontrada en una gran variedad de microorganismos como *Haemophilus* spp., *Shigella* spp. y *Salmonella typh* (Martínez-Martínez y Calvo 2010).

Modificación de la diana

- La inmensa mayoría de las resistencias clínicamente relevantes a **quinolonas** son debidas a alteraciones en las dianas de estos antimicrobianos, la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, provocadas por mutaciones en las regiones QRDR (*quinolone-resistance determining region*) de los genes cromosómicos que las codifican (*gyrA* y *gyrB* para la ADN-girasa y *parC* y *parE* para la topoisomerasa IV). Estas mutaciones son resultado de errores de transcripción durante la replicación del cromosoma y en las bacterias salvajes se dan con una frecuencia entre 10^{-6} y 10^{-9} . La resistencia es cruzada entre los diferentes compuestos del grupo y fenotípicamente se establece de forma escalonada; la primera mutación produce aumentos de 4 a 8 veces la CMI, mientras que su efecto es menor con las siguientes mutaciones. Esta primera mutación suele afectar a la diana principal que en el caso de los gramnegativos es la ADN-girasa (Bambeke et al 2005, Ruiz 2003).
- Otro ejemplo de resistencia por modificaciones en la diana, aunque mucho menos extendido en aislados clínicos, es la resistencia a **aminoglicósidos** por genes que codifican metilasas (RmtA, RmtB y ArmA) responsables de la metilación postranscripcional de la subunidad 16S del RNA ribosómico. Se trata de un mecanismo emergente de resistencia en gramnegativos muy específico para cada tipo de aminoglicósidos y que no da lugar a resistencias cruzadas (Rice y Bonomo 2007).
- La actividad antibacteriana de **sulfamidas y trimetoprim** también puede verse comprometida por la adquisición de genes que codifican variantes de los enzimas dihidropteroico sintetasa y dihidrofolato reductasa, respectivamente, con menor afinidad por estos antibióticos. Los determinantes de resistencia a sulfamidas más prevalentes en aislados de origen humano son *sul1* (íntimamente asociado a integrones de clase 1) y *sul2*, mientras que *sul3* es más prevalente en aislados de animales de granja y está presente en la región 3' de algunos integrones atípicos. También son muy comunes en integrones de clase 1 y 2 los más de 20 determinantes *dfr* responsables de la resistencia a trimetoprim (Alekhshun et al 2007).

Protección e hiperproducción de la diana

- El ejemplo mejor conocido de resistencia por protección de la diana es la resistencia a **quinolonas** especificada por los determinantes plasmídicos *qnr* descritos inicialmente en *K. pneumoniae* y posteriormente en *E. coli*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella* y otras

enterobacterias, así como en otros microorganismos como *Aeromonas* spp. o *Pseudomonas* spp., muchas veces formando parte de integrones complejos. Estos genes codifican proteínas Qnr (A, B, C, D y S) que pertenecen a la familia de los pentapéptidos repetitivos y que parecen proteger a la ADN-girasa y a la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas. Qnr confiere bajo nivel de resistencia a quinolonas pero favorece la selección de mutantes resistentes por alteraciones en las dianas. (Martínez-Martínez et al 1998, Ruiz 2003, Poirel 2008, Strahilevitz et al 2009).

- Por último, como modelo de resistencia por hiperproducción de la diana cabe citar el de la resistencia a sulfamidas por hiperproducción de la dihidropteroico sintetasa y a trimetoprim por hiperproducción de la dihidrofolato reductasa por mutaciones en el promotor de los genes que codifican estos enzimas (Rice y Bonomo 2007).

FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA SELECCIÓN, EMERGENCIA, DISEMINACIÓN Y PERPETUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

SELECCIÓN

La evolución de las bacterias hacia la resistencia a los antibióticos, incluida la multirresistencia, es inevitable pues supone un aspecto general de su evolución que es ineludible. Un número ingente de bacterias de diversos tipos y origen viven y compiten entre ellas en el universo, tanto en el medio ambiente como en el hombre o en los animales y cada una de ellas compete con las demás en su nicho ecológico. Cualquier mutación o adquisición de material genético extraño que provoque un cambio en alguna de sus proteínas podrá permitirle mejorar su adaptación o bien tolerar mejor alguna peculiaridad de su nicho ecológico y, por lo tanto, gozará de una ventaja selectiva respecto a sus competidores y se multiplicará con más éxito que éstos. Esto es lo que sucede con los microorganismos resistentes a los antibióticos, con la particularidad de que la exposición a antibióticos, es decir la presión selectiva, se produce en prácticamente todos los nichos.

El uso de antibióticos en sí mismo no causa la aparición de resistencias, que como hemos dicho es ineludible, pero es, sin lugar a duda, el factor de mayor influencia en la selección y emergencia de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos y es evidente que para que se produzca el fenómeno de la resistencia deben concurrir dos factores: el antibiótico que actúa como factor selectivo y el microorganismo que posee el gen de resistencia (O'Brian 2002). Es importante señalar que el consumo de antibióticos no sólo incide directamente en la selección de una subpoblación resistente o de los microorganismos que por algún evento genético han adquirido genes de resistencia en el individuo tratado (tanto en la flora patógena como en la comensal), sino que afecta indirectamente al resto de individuos al aumentar el riesgo de que éstos sean infectados o colonizados por cepas resistentes, de modo que podemos afirmar que los antibióticos son los únicos fármacos cuyos efectos indeseables pueden presentarse en individuos que no los han consumido (figura 10). En consecuencia, se puede considerar que el problema de la resistencia a los antibióticos tiene una vertiente con implicaciones clínicas y terapéuticas individuales, pero también otra de implicaciones sociales y de salud pública. Conviene, asimismo, recordar que el uso de un antibiótico concreto puede seleccionar la resistencia a otros agentes no relacionados, bien porque estemos delante de bacterias multirresistentes o bien por la alteración del equilibrio de los diferentes componentes de la flora endógena al inhibir a las especies sensibles al antibiótico y favorecer el crecimiento de otras resistentes a éste y simultáneamente a otros antibióticos (Lipsitch y Samore l 2002).

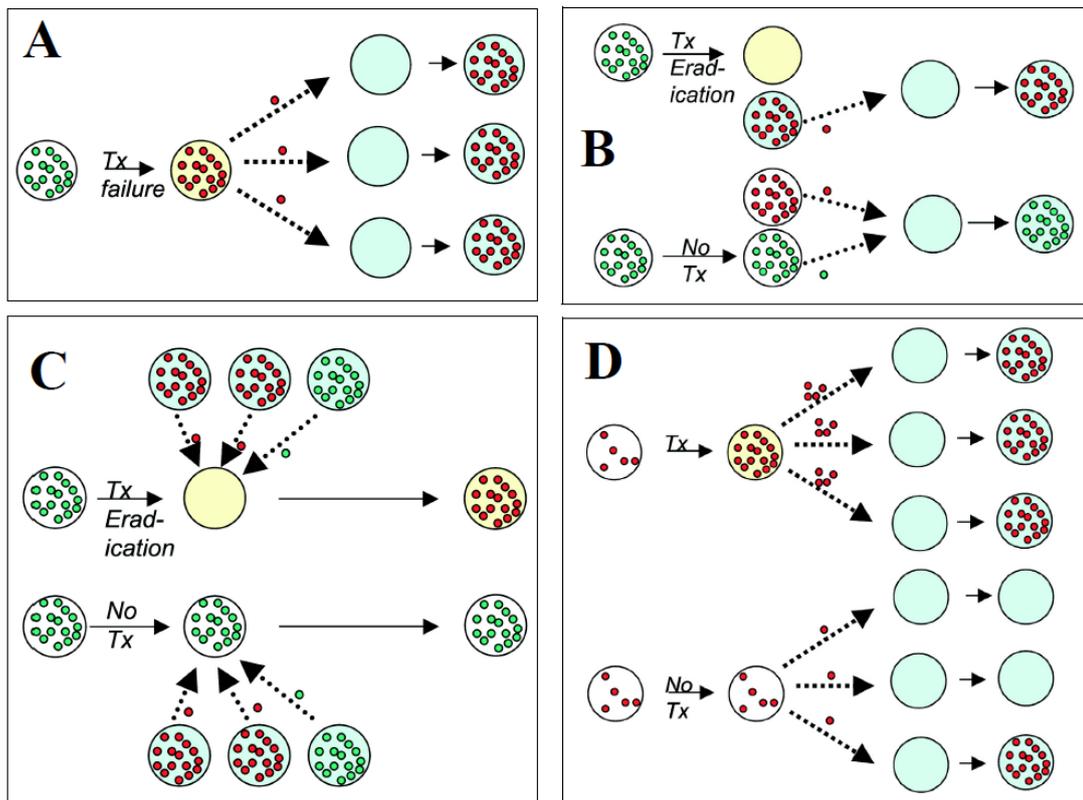


Figura 10: Cuatro mecanismos por los que el tratamiento antibiótico puede crear una presión selectiva en la población, mostrando efectos directos (aumento de resistencia en los pacientes tratados (círculos amarillos) frente a los no tratados (círculos blancos)) e indirectos (aumento de resistencia en otros individuos susceptibles (círculos azules) como consecuencia del tratamiento específico de los pacientes). **(A)** Sobrecrecimiento de una subpoblación bacteriana resistente (puntos rojos), que puede ser transmitida a otros hospedadores susceptibles, en un paciente infectado por una cepa sensible (puntos verdes) predominante como consecuencia de un fracaso terapéutico. **(B)** El éxito del tratamiento de un paciente infectado por una cepa sensible disminuye la capacidad de éste de transmitir la infección a otros individuos susceptibles que, a su vez, tendrán más probabilidad de ser infectados por patógenos resistentes. **(C)** El tratamiento de una infección conduce a la erradicación de la flora comensal sensible del paciente haciéndole más susceptible en ciertos contextos (como durante un brote epidémico) que un paciente no tratado a la adquisición de una nueva cepa resistente. **(D)** El tratamiento de una infección en un individuo previamente colonizado por bacterias resistentes puede conducir a un sobrecrecimiento de éstas si la flora competitiva es inhibida por el antibiótico y al consiguiente incremento del riesgo del paciente de sufrir una infección por las bacterias resistentes y del riesgo de otros individuos susceptibles de ser colonizados (de Lipsitch y Samore 2002)

El **impacto del consumo de antibióticos en medicina humana**, tanto en el medio hospitalario como comunitario, en la aparición y selección de resistencias es difícil de evaluar pues depende de un gran número de variables, pero existen algunos trabajos que demuestran una asociación significativa entre ellos. Así, por ejemplo, Albrich et al comprobaron que el porcentaje de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a β -lactámicos y macrólidos en diferentes países de la comunidad europea estaba relacionado con el consumo total de dichos antibióticos en cada uno de estos países (Albrich C et al. 2004) y Cuevas et al observaron que el rápido incremento en el consumo comunitario de levofloxacin, moxifloxacin y amoxicilina/clavulánico en el estado español estaba asociado con un aumento del aislamiento de *E. coli* resistente a estos antibióticos en bacteriemias registradas en los hospitales españoles integrantes de la red EARSS (Cuevas et al 2011). Sin embargo es en el medio hospitalario, y particularmente en las unidades de cuidados intensivos, donde se concentra la mayor densidad de antimicrobianos y también de microorganismos multirresistentes y de huéspedes vulnerables y, por lo tanto, donde la selección y diseminación de resistencias se erige como un problema de especial relevancia (Peleg y Hooper 2010). Otro caso particular dentro de las instituciones sanitarias lo constituyen los centros sociosanitarios, en los que suelen coexistir unidades de convalecencia, de cuidados paliativos, de larga estancia, de psicogeriatría y a veces residencias geriátricas asistidas, y en los que, tanto por las características de los pacientes atendidos (edad avanzada, alto grado de dependencia, instrumentalización y comorbilidad) como por el elevado consumo de antibióticos de amplio espectro, a veces inapropiado, es muy frecuente la colonización y la infección por microorganismos multirresistentes (*S. aureus* resistentes a meticilina, enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido, *Clostridium difficile*) que suponen un importante reservorio de elementos de resistencia que pueden extenderse a otros centros asistenciales y a la comunidad (Gudiol F 2010, Bonomo 2000).

Por otra parte, el **uso no humano de antibióticos**, principalmente el consumo en animales, y su presencia en el medio ambiente también pueden contribuir de forma significativa a la selección de resistencias y a su emergencia en patógenos humanos (Torres C et al 2010, Anónimo. FAO/OIE/WHO 2003).

Aproximadamente el 50% de los antibióticos empleados en los países de la Unión Europea son administrados a animales, con datos muy variables en el consumo total y en los agentes utilizados entre los diferentes países de los que se dispone de información, que dependen no sólo del tipo de ganado que se cría, sino también de los diferentes hábitos de prescripción o formulaciones disponibles (Figura 11). Los antibióticos de uso veterinario más extendido en la Unión Europea son tetraciclinas, cotrimoxazol y β -lactámicos (todos ellos empleados en

medicina humana) y el mayor uso de antibióticos en animales productores de carnes se da en ganado porcino (Grave et al 2010).

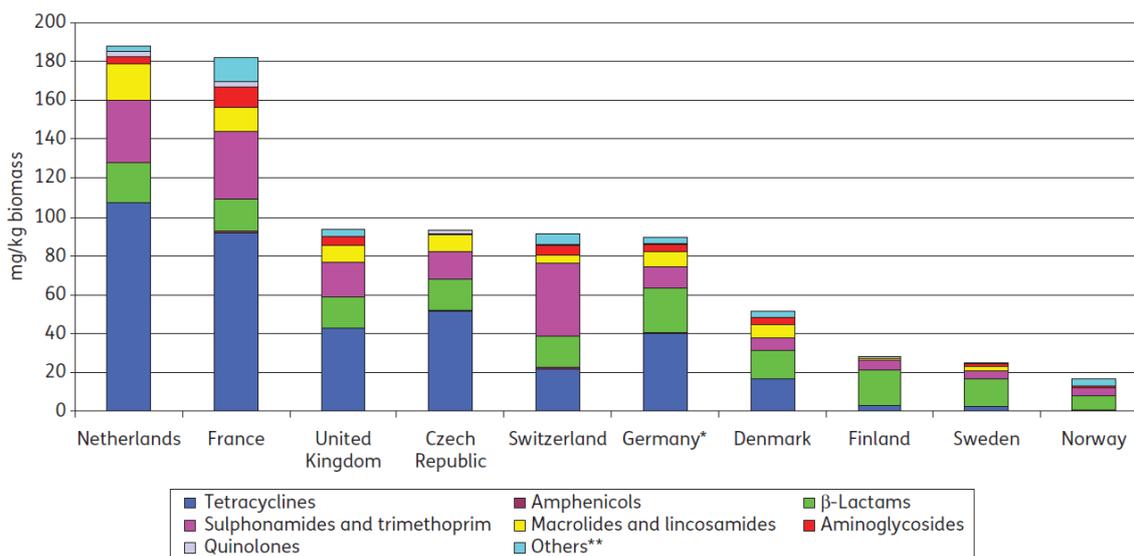


Figura 11: Cantidades expresadas en miligramos de antibióticos para veterinaria vendidos en 2007 por kilogramo de biomasa de productos de carne de cerdo, aves y vacuno más peso estimado de vacas lecheras (Grave K et al 2010).

Estos antibióticos no sólo se han usado para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas, sino también como promotores del crecimiento a concentraciones subterapéuticas, aunque en la Unión Europea (pero no en Estados Unidos ni en otros países) su uso con esta finalidad ha quedado totalmente prohibido desde el año 2006 y anteriormente ya se había vetado el de las sustancias con aplicación terapéutica en humanos y veterinaria. Uno de los ejemplos más ilustrativos de la selección de patógenos resistentes a los antibióticos provocada por el empleo de éstos como promotores del crecimiento fue la emergencia de Enterococos resistentes a glicopéptidos relacionado con el uso de la avoparcina (un análogo de este grupo de antibióticos) que se constató no sólo en los animales a los que se les había suministrado, sino también en la flora fecal de humanos sanos y de mascotas. Respecto al uso terapéutico de antibióticos en veterinaria, si bien en términos relativos es mucho menor que en humanos, las particulares condiciones de administración en algunos animales de granja como aves y cerdos (tratamientos orales prolongados, a veces a dosis subterapéuticas, a un gran número de individuos) favorecerían la selección de aislados resistentes. El impacto ejercido por el uso de antibióticos en animales en la selección de resistencias en patógenos humanos es evidente en bacterias causantes de zoonosis como *Campylobacter* y *Salmonella* que se transmiten al hombre primordialmente a través de la ingestión de productos cárnicos

contaminados y que suelen presentar resistencia a los antibióticos empleados en los animales de los que proceden (quinolonas en pollos y tetraciclina en pollos y ganado porcino) (Ungermaich et al 2006, Van de Bogaard et al 2000), pero también en otras especies que forman parte de la flora comensal intestinal de los animales destinados a consumo, que se ha demostrado que es un importante reservorio de *E. coli* productor de β -lactamasas de espectro extendido, sobre todo CTX-M, y AmpC plasmídicas (Briñas et al 2003, Carattoli 2008).

Antibióticos como la estreptomicina y las tetraciclinas también se aplican como pesticidas en agricultura y otros como florfenicol, trimetoprim o sulfadiazinas en acuicultura. La presión selectiva del uso de antibióticos en estos ámbitos se ve además agravada por otra circunstancia, como es la excreción de antibióticos no degradados al medio ambiente que, por lo tanto, continúan ejerciendo su presión selectiva en una segunda fase “post-tratamiento” de una forma incluso más eficaz pues están muy diluidos y el tiempo disponible para la selección de resistencias es mucho mayor (Levy et al 2002, Baquero et al 2008).

Por último, además de los antibióticos existen otras sustancias con actividad antibacteriana que se encuentran en multitud de productos utilizados en limpieza doméstica o como desinfectantes entre los que destacan el triclosan y los compuestos de amonio cuaternario y se ha demostrado que a menudo la resistencia a estos agentes es cruzada con la resistencia a algunos antimicrobianos, como sucede en el caso de la sobreexpresión de la bomba de flujo AcrAB de *E. coli* (Levy 2002) y es posible que su uso generalizado haya favorecido la selección de bacterias portadoras de integrones de tipo1 que típicamente poseen genes implicados en la resistencia a los compuestos de amonio cuaternario (Baquero et al 2008).

Conviene señalar que no todos los antibióticos tienen la misma capacidad para seleccionar resistencias (las quinolonas son uno de los agentes más proclives a la coselección de resistencias por su capacidad para inducir la expresión de bombas de flujo y activar el sistema SOS) y la importancia no sólo del consumo global de antibióticos sino también de su dosificación y pautas de administración. El tratamiento antibiótico óptimo debe reducir al máximo la probabilidad de que se seleccionen mutantes resistentes, lo cual ocurre con más facilidad a concentraciones subterapéuticas, y por lo tanto debe cumplir los siguientes requisitos: (a) administrarse de forma temprana para impedir el aumento del inóculo y la formación de biofilms; (b) permitir alcanzar concentraciones en el lugar de la infección por encima de la concentración preventiva de aparición de mutantes (concentración de antibiótico a la cual ningún mutante puede crecer cuando se testa *in vitro* a una concentración de 10^{10} bacterias y que sería la concentración de antibiótico que restringiría la emergencia de mutantes resistentes de “primer escalón” en una población sensible) para inhibir tanto a la población sensible como a la que presenta algún nivel de resistencia y (c) evitar y limitar el

tiempo en que la concentración del antibiótico en el lugar de la infección se encuentra dentro de la ventana de selección de mutantes (concentración justo por encima de la CMI que inhibiría a las bacterias sensibles pero permitiría multiplicarse a los pocos mutantes espontáneos de la población bacteriana infectante) para disminuir la posibilidad de que se seleccione la subpoblación resistente (Peterson 2005, Cantón y Morosini 2011).

EMERGENCIA CLÍNICA

Hasta que los pacientes empezaron a poder ser tratados con antibióticos, hace unos 65 años, apenas se encontraban genes de resistencia en las bacterias que les causaban infecciones. Sin embargo, muy poco después de que cualquier antibiótico comience a ser usado emerge algún o algunos genes que confieren resistencia a éste, lo que significa que el gen de resistencia, sea cual sea su origen (bacterias ambientales o saprofitas), se ha diseminado lo suficiente como para alcanzar a una cepa de una especie con significación clínica que fue aislada y reconocida como resistente en un laboratorio clínico. (O'Brien. 2002)

DISEMINACIÓN

Una vez producida la emergencia y selección de bacterias resistentes su diseminación puede tener lugar a dos niveles distintos, el nivel de la bacteria (diseminación clonal) o el de los vectores de resistencia (diseminación horizontal), que coexisten en la naturaleza y que presentan un efecto exponencial al asociarse con la duplicación del DNA (Courvalain 2005).

Diseminación clonal

Cuando un gen de resistencia emerge en el cromosoma de una bacteria, su diseminación será clonal y depende principalmente de las características de la cepa en cuestión, del coste que le supone la emergencia de la resistencia, y de su capacidad de adaptación a diferentes ecosistemas. La diseminación clonal de resistencias se verá facilitada en escenarios en que hay una elevada presión antibiótica y en los que el clon resistente, una vez que colonice a nuevos huéspedes, seguirá disfrutando de una ventaja selectiva frente a los clones sensibles, a los que podrá desplazar. Esta es la situación que se da en las explotaciones avícolas y ganaderas intensivas, en las unidades de cuidados intensivos o en los centros sociosanitarios en los que, por otro lado, la transmisión cruzada entre pacientes a través de las manos del personal sanitario magnifica la dispersión de los clones resistentes, mientras que en la comunidad la cadena alimentaria, el hacinamiento y los viajes son los que facilitan la dispersión. La diseminación de las resistencias puede circunscribirse al ámbito local o en algunos casos alcanzar una distribución mucho más amplia, como sucede con algunos clones epidémicos que se han diseminado internacionalmente con gran éxito, como los clones USA 400 y USA 300 de

S. aureus resistentes a meticilina de adquisición comunitaria, *K. pneumoniae* del serotipo K25 productora de SHV-4, *S. Typhimurium* pentarresistente del fagotipo DT104, con los neumococos resistentes a penicilina del serotipo 23F o con las cepas de *E. coli* del clon O15:K52:H1 productoras de CTX-M-15. Las razones para el éxito de la diseminación de estos clones no han podido ser totalmente aclaradas, pero se cree que algunos de los factores podrían ser: un aumento de su capacidad de adherencia a las células del huésped o al material protésico, una mayor tolerancia a la desecación y resistencia a los desinfectantes, una mayor virulencia y una mejor adaptación al coste biológico de la resistencia y una mayor habilidad para traspasar barreras ecológicas (Livermore 2003, Rasmussen et al 2005, Cantón y Coque 2006, Martínez et al 2002).

Diseminación horizontal de resistencias

La transferencia horizontal de genes de resistencia mediada por plásmidos, transposones, integrones o ISCR, a la que ya nos hemos referido anteriormente, ha dado lugar a lo que se ha dado en llamar la epidemia de los genes y aumenta espectacularmente la probabilidad de diseminación de genes de resistencia y el espectro de bacterias y nichos ecológicos a los que puede acceder, además de ser menos errática y más prolongada en el tiempo que la dispersión clonal. Un gen de resistencia que ha emergido o se ha insertado en un plásmido puede ser transferido a otras cepas o especies presentes en nichos ecológicos difícilmente accesibles para la cepa huésped original. Los genes de resistencia podrán, así mismo, transferirse a otros plásmidos transportados por diferentes cepas y especies, incluso a plásmidos o integrones portadores de otros genes de resistencia, y de este modo la eficacia de la diseminación aumentará de modo exponencial. La evolución de los vectores genéticos de resistencia y su interrelación para formar plataformas que incrementan su eficacia y capacidad de adaptación implica múltiples eventos de recombinación que se producen de forma secuencial y que tienen mayor probabilidad de ocurrir en ecosistemas con amplias poblaciones bacterianas sometidas a una intensa presión antibiótica selectiva como el intestino tanto de animales como humano (O'Brian 2002) Un ejemplo de esta evolución lo constituirían la diseminación de algunas β -lactamasas CTX-M y cefamicinasas plasmídicas gracias a la localización de los genes que las codifican en integrones complejos que contienen ISCR1 y están asociados a transposones (Cantón et al 2006).

En resumen, las rutas de transmisión de resistencia son muy complejas y dinámicas e implican interacciones entre genes y elementos genéticos, entre bacterias patógenas y comensales y entre diferentes huéspedes y nichos ecológicos. Existen muchas pruebas de la transmisión directa de bacterias resistentes o de genes de resistencia entre diferentes grupos humanos en

la comunidad o en las instituciones sanitarias e indirecta a través de la cadena alimentaria o el entorno y también de la transmisión entre animales y seres humanos y todo hace prever una continua expansión de estas rutas como consecuencia de los cambios sociales y en nuestro estilo de vida (incremento en la movilidad de las personas entre diferentes países tanto por flujos migratorios como por viajes de ocio, aparición de nuevas bolsas de pobreza en los países desarrollados, aumento de la población más susceptible a las infecciones y de la frecuencia de traslados entre instituciones sanitarias y dentro del mismo hospital, modificación de los ecosistemas por el hombre, cambios tecnológicos en la producción de alimentos o el abuso o mal uso de los antibióticos en medicina, veterinaria o agricultura).

PERPETUACIÓN

Está ampliamente aceptado que la adquisición de nuevos determinantes de resistencia constituye, por regla general, un coste biológico añadido para la bacteria, ya sea por porque supone un requerimiento adicional de energía para mantener a los vectores que la vehiculan o por entrañar una cierta incompatibilidad con sus condiciones de vida previas. Es probable, de todos modos, que sólo se lleguen a detectar los genes de resistencia cuyo coste biológico es asumible, por ejemplo los vehiculados por plásmidos en los que se logra un equilibrio adecuado entre epidemicidad e infectividad y así, por ejemplo, la resistencia de alto nivel a quinolonas es muy infrecuente en *S. enterica* al implicar una gran reducción de la adaptación biológica mientras que es muy común en *Campylobacter* para el que el coste biológico es inexistente (Zhang et al, 2006). Esto significa que en un medio libre de antibióticos las bacterias resistentes habitualmente estarán en desventaja respecto a las bacterias salvajes sensibles que tenderán a desplazarlas. Se ha comprobado, sin embargo, que el coste biológico de la presencia de nuevos vectores genéticos de resistencia es compensado al cabo de muy pocas generaciones por mutaciones compensatorias que permiten la fijación de los determinantes de resistencia en la población, aún en ausencia de presión selectiva, y que la resistencia se perpetúe. La rapidez con la que las bacterias son capaces de compensar el coste biológico de la adquisición de resistencias es consecuencia de la gran plasticidad del genoma bacteriano, aunque es plausible que sólo se seleccionen aquellos mecanismos de resistencia susceptibles de ser compensados. (Martínez et al 2002, Courvalin 2005). Puede suceder, incluso, que las mutaciones compensatorias resulten en bacterias mejor adaptadas al medio que sus progenitoras sensibles como se ha demostrado en *S. Typhimurium*, o incluso que haya bacterias en que la adquisición de resistencias incremente su adaptación, lo que explicaría los resultados de recientes estudios que han constatado la presencia de genes de resistencia adquiridos en bacterias aisladas de animales y seres humanos residentes en zonas remotas del

planeta con escasa o nula exposición a los antibióticos. Otras hipótesis que justificarían estos hallazgos serían la de que los genes de resistencia ubicados en plásmidos podrían mantenerse, en ausencia de presión selectiva ejercida por los antibióticos, debido a su asociación con genes que confieren otras ventajas selectivas en el nicho ecológico (determinantes que proporcionan resistencia a metales pesados o que posibilitan vías metabólicas alternativas) o a la presencia de sistemas de adición de plásmidos o de muerte postsegregacional que garantizan la perpetuación del plásmido en la progenie (Pallecchi et al 2008). También hay que tener presente que ante microorganismos resistentes a múltiples antibióticos, la exposición a cualquiera de ellos seleccionará la resistencia al resto y que los genes de resistencia pueden fijarse de forma estable al incorporarse a integrones o en el cromosoma. En suma, mientras que la emergencia de resistencias en respuesta al consumo de antibióticos se establece generalmente en muy poco tiempo, la disminución en la frecuencia de resistencias tras la reducción o abolición de su empleo puede llegar a ocurrir (Gottesman et al 2009, Mimica Natanovic et al 2010) pero es mucho menos evidente y no siempre termina por producirse (Cantón et al 2005, Andersson 2006).

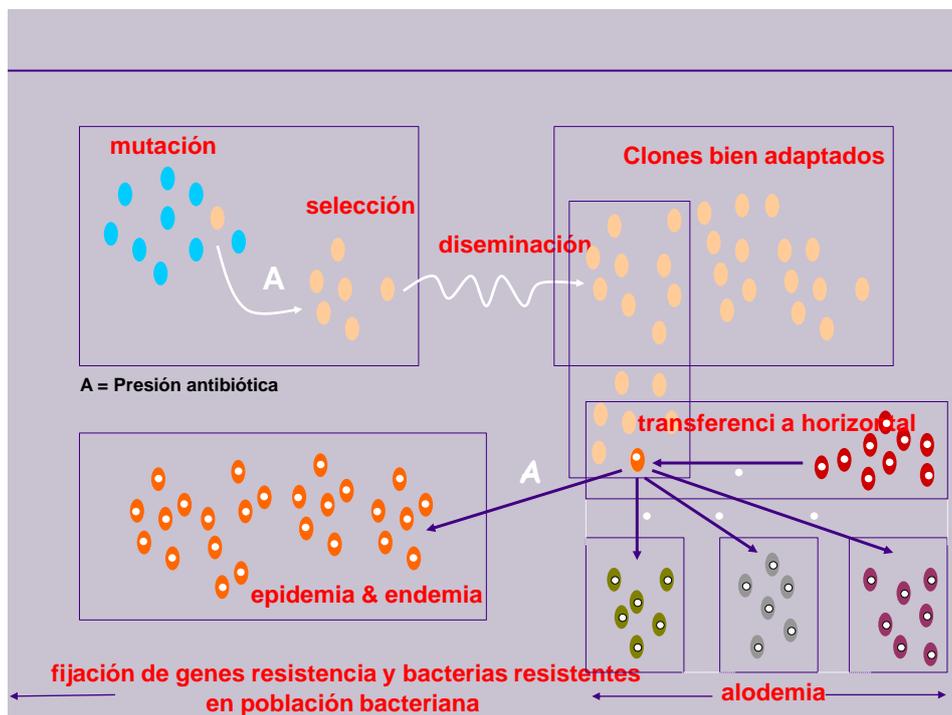


Figura 12: Representación esquemática de las diferentes fases que van desde la emergencia a la fijación de la resistencia a antimicrobianos en bacterias (adaptado de Cantón R. 5th ESCMID School of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Santander 2006).

IMPACTO DE LA RESISTENCIA Y ESTRATEGIAS PARA SU PREVENCIÓN Y CONTROL

El axioma proclamado por Paul Ehrlich "*Frappet fort et frapper vite* "(golpear fuerte y golpear rápido) sigue siendo válido a la hora de abordar el tratamiento de las enfermedades infecciosas con antibióticos. Sin embargo, la creciente prevalencia en la resistencia a los antibacterianos, particularmente en las bacterias gramnegativas en las que ya nos encontramos ante cepas que presentan resistencia a todos los antibióticos disponibles, ha conducido a una progresiva disminución de la efectividad de los agentes de espectro reducido y, en consecuencia, dificulta extraordinariamente la selección de un tratamiento adecuado, que se ha convertido en un reto para el clínico (Harbarth et al 2007).

El principal impacto clínico de las resistencias bacterianas es el aumento de la morbilidad y mortalidad de los pacientes que sufren una infección por una bacteria resistente, que es debida básicamente a dos factores: la menor probabilidad que tiene de haber recibido tempranamente un tratamiento antibiótico adecuado y el hecho de que los tratamientos alternativos son generalmente menos activos, más tóxicos o no están avalados por una suficiente experiencia clínica. Otros efectos indirectos son el aumento de los costes asociados por el alargamiento de la estancia hospitalaria, la necesidad de administrar tratamientos más costosos, el aumento de la carga de trabajo del laboratorio y la mayor complejidad de los procedimientos de control de infección (Livermore 2003, Goldman et al 2007, Slama 2008). A modo de ejemplo, en un estudio de casos-control se evidenció un aumento significativo del coste y la duración de la estancia hospitalaria, la mortalidad durante el periodo de hospitalización y el retraso en recibir un tratamiento antibiótico adecuado en un grupo de 99 pacientes con bacteriemia por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido al compararlo con otro grupo de 99 pacientes con bacteriemia por enterobacterias que no producían estas enzimas (Schwaber et al 2006). Por otro lado, la emergencia de bacterias resistentes obliga al uso de moléculas de mayor espectro, lo que puede conducir a la selección de microorganismos con mecanismos de resistencia adicionales y aumentar las poblaciones resistentes que a su vez podrán colonizar a nuevos huéspedes (Lipsitch y Samore 2002).

Como ya hemos dicho, la aparición y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos es un efecto indeseable pero inevitable derivado de su uso, que se ha visto agravado desde la década de los 70 por la drástica disminución de las inversiones de la industria farmacéutica en la investigación en nuevos antimicrobianos (de hecho, desde entonces sólo se han comercializado dos nuevas familias -oxazolidinonas y lipopéptidos- que únicamente tienen

actividad frente a grampositivos) pero que puede minimizarse si se aplican algunas medidas básicas como promover el uso racional de antibióticos, aplicar medidas estrictas de control de la infección en el medio hospitalario, desarrollar e implantar métodos rápidos de diagnóstico microbiológico, fomentar la investigación relacionada con la resistencia a los antibacterianos (genes, reservorios, sistemas de vigilancia) y el desarrollo de nuevas moléculas (Vila et al 2010). Respecto a las medidas encaminadas a promover un uso racional de los antibióticos estarían algunas como: (a) elegir el tratamiento empírico inicial de acuerdo a los gérmenes con mayor probabilidad de estar implicados en el proceso, las particularidades del paciente y a los patrones de resistencia locales; (b) sustituir el tratamiento inicial por un tratamiento de espectro más reducido siempre que sea posible según los resultados microbiológicos; (c) prescribir antibióticos sólo cuando esté justificado; (d) administrar los antibióticos a una dosificación adecuada teniendo en cuenta parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos para evitar la selección de bacterias resistentes; (e) diversificar el uso de antibióticos y restringir el uso de aquellos más proclives a seleccionar cepas multirresistentes como quinolonas o cefalosporinas de amplio espectro; (f) evitar alargar innecesariamente los tratamientos y (g) controlar y minimizar el uso de antibióticos y otras sustancias bactericidas en animales y agricultura (Livermore 2004; Vila J et al 2010).

SALMONELLA ENTERICA

DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae* y se reconocen desde hace mucho tiempo como destacados patógenos zoonóticos de gran importancia y repercusión tanto en animales como en el hombre. Su nombre procede del anatomopatólogo Salmon que fue el primero en aislarla.

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos no formadores de esporas. Al igual que el resto de Enterobacterias producen ácido en la fermentación de la glucosa y reducen los nitratos a nitritos, producen sulfuro de hidrógeno y no producen citocromooxidasa. Todas, excepto *S. Gallinarum-Pollorum*, son móviles gracias a flagelos peritricos y la mayoría no fermentan la lactosa. Para su aislamiento se emplean medios de selectividad baja que contienen sales biliares y permiten poner de manifiesto la fermentación de la lactosa como el agar MacConkey (figura 13) y agar desoxicolato y otros de sensibilidad intermedia como Hektoen o Salmonella-Shigella que además permiten detectar la producción de sulfuro de hidrógeno (figura 14) y también puede recurrirse a medios líquidos de enriquecimiento, como el caldo selenito, para mejorar la sensibilidad.



Figura 13: *Salmonella* en agar MacConkey

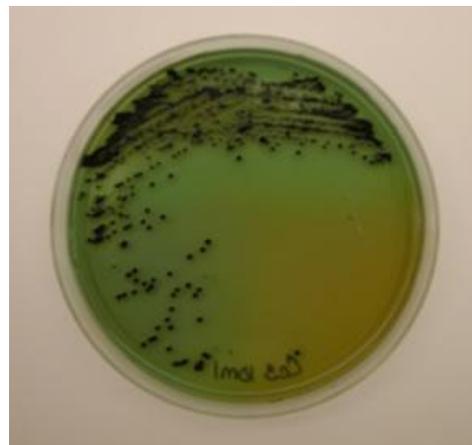


Figura 14: *Salmonella* en agar Hektoen

El género *Salmonella* se divide en la actualidad en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. *Salmonella enterica* se subdivide a su vez en seis subespecies: *S. enterica* subesp. *enterica* (I), *S. enterica* subesp. *salmae* (II), *S. enterica* subesp. *arizonae* (III_a), *S. enterica* subesp. *diarizonae* (III_b), *S. enterica* subesp. *houstenae* (IV) y *S. enterica* subesp. *indica* (VI). *S. bongori* corresponde a la antigua subespecie V. Los miembros de la subespecie I suelen aislarse a partir de humanos

y animales de sangre caliente, mientras que los de las restantes subespecies se aíslan de animales de sangre fría o del medio ambiente. La subespecie I comprende la práctica totalidad de los aislados que producen infecciones en humanos. Las características bioquímicas que permiten diferenciar a cada una de las especies y subespecies se resumen en la tabla 7.

Tabla 7: Diferenciación bioquímica de las especies y subespecies de *Salmonella*

Test	Especies y subespecies						
	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	I	II	III _a	III _b	IV	VI	
Dulcitol	+	+	-	-	-	±	+
Lactosa	-	-	-	+	-	±	-
ONPG	-	-	-	-	-	±	-
Salicilina	-	-	-	-	+	-	-
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Mucato	+	+	+	-	-	+	+
Crecimiento en KCN	-	-	-	-	+	-	+
Hidrólisis gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Tartrato	+	-	-	-	-	-	-

SEROTIPOS Y SEROGRUPOS

Cada una de las seis subespecies de *Salmonella* se divide en serogrupos y en múltiples serotipos o serovares de acuerdo a sus antígenos somáticos (O), de superficie (Vi) y flagelares (H). Cada serotipo es una particular combinación de antígenos somáticos y flagelares que dan lugar a una fórmula antigénica determinada. Tradicionalmente, los serotipos se han designado utilizando nombres representativos del origen geográfico donde el serotipo fue aislado por primera vez, del proceso infeccioso donde se aisló, etc., escribiéndose con caracteres romanos y la primera letra en mayúscula. Actualmente, esta tradición ha quedado restringida a aquellas cepas pertenecientes a la subespecie *enterica* o Sub.I. La fórmula antigénica de *Salmonella* según el esquema de Kauffman-White, que se actualiza anualmente, se expresa del siguiente modo: antígeno(s) O, antígeno de superficie (si está presente): antígeno(s) flagelares de fase I. antígeno(s) flagelares de clase II (si están presentes). La fórmula antigénica de *S. Typhimurium*

correspondería a [4,5,12:i:1,2]. En la actualidad se reconocen más de 2500 serotipos de *Salmonella*, de los que la mayoría (más de 1500) corresponden a la subespecie I.

El antígeno O es un antígeno carbohidratado termoestable y es el componente mayoritario de la capa de lipolisacárido de la membrana externa de la bacteria. Se trata de un polímero de subunidades O y cada una de estas subunidades está compuesta por uno a seis azúcares. Los antígenos O se clasifican en mayores y menores; los mayores son los que definen un grupo antigénico o serogrupo, mientras que los antígenos menores tienen menor valor discriminativo. Los aislados del grupo B comparten el antígeno somático O:4, los del grupo C1 el antígeno O:7, los del grupo C2 el O:8 y los del grupo D el O:9. La determinación del serogrupo O puede resultar útil para la confirmación de la identificación de los aislados de *Salmonella* y puede realizarse en los laboratorios clínicos asistenciales, pero la caracterización del serotipo, de gran utilidad epidemiológica en salud pública, sólo suele llevarse a cabo en laboratorios de referencia. El antígeno Vi es un polisacárido capsular termolábil, muy útil para la identificación presuntiva de *Salmonella* serotipo Typhi, aunque también puede estar presente en *S. Dublin*, *Paratyphi C* y algunas cepas de *Citrobacter* (Nataro et al 2007).

FAGOTIPADO Y MÉTODOS DE SUBTIPIFICACIÓN MOLECULARES

Para la mayoría de los serovares menos prevalentes el serotipado puede ser suficiente para caracterizar aislados agrupados en el tiempo o presuntamente integrantes de un brote, sin embargo para los serotipos más comunes, como Typhimurium, Enteritidis, Virchow, Hadar o Newport, se requieren métodos de tipificación adicionales, entre los cuales la fagotipia es el más empleado. La fagotipia se basa 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. Este método sólo está disponible en laboratorios de referencia, ya que se debe contar con una colección de fagos adecuada y completa y mantenerla operativa y además debe llevarse a cabo en unas condiciones ambientales muy estrictas, que si no se respetan pueden dar lugar a alteraciones en la sensibilidad de los fagos y conversiones en el fagotipo relacionadas con la pérdida del polisacárido (Baggesen et al 1997) o adquisición de fagos (Ridley et al 1996).

Entre los métodos de tipificación molecular el que se considera de referencia es la electroforesis en campo pulsado (Swaminathan et al 2001), aunque por su laboriosidad y el precio del equipamiento necesario no está al alcance de la mayor parte de laboratorios

asistenciales, y presenta problemas de discriminación para el serotipo Enteritidis y para algunos fagotipos del serotipo Typhimurium como el 104 que muestran una gran clonalidad (Doran G et al 2005). En este último caso, algunos autores han propuesto la utilización de métodos más asequibles basados en la amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa, como la rep-PCR en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas aleatoriamente a lo largo del cromosoma de muchas enterobacterias, tales como las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC), que proporcionan buenos resultados para las cepas procesadas en un mismo experimento aunque pueden presentar problemas de reproducibilidad interserie (Woo y Lee 2006). Otra técnica de tipificación molecular basada en la PCR, aunque también requiere de instrumentación sofisticada, que se ha introducido en los últimos años y que parece mejorar la capacidad discriminatoria en *S. Typhimurium* del fagotipo 104 y relacionados y no verse afectada por cambios en el genotipo de resistencia, es el análisis del número variable de repeticiones en tándem, que se ha mostrado muy útil en el estudio de brotes ocasionados por este fagotipo (Linstedt et al 2003 (a)).

EPIDEMIOLOGÍA

S. Typhi y *S. Paratyphi* sólo colonizan humanos y por lo tanto la infección sólo puede contraerse a través de una persona que ha padecido la fiebre tifoidea o es portador crónico por contacto directo o mediante fómites. Generalmente la infección, más propia de países en vías de desarrollo con malas condiciones de salubridad, se adquiere a partir del agua o alimentos contaminados con heces. La enfermedad es endémica en muchos países del subcontinente indio, el sureste asiático, América central y del Sur y África.

El reservorio más común de *Salmonella* no tifoidea es el trato gastrointestinal de un gran número de animales domésticos y salvajes. Las infecciones por *Salmonella* no tifoidea en humanos se relacionan con el consumo de alimentos de origen animal crudos, poco cocinados o no conservados a una temperatura adecuada, incluidos carne, huevos o lácteos, que se hayan contaminado en cualquier momento desde el sacrificio y despiece de los animales hasta las distintas fases de su procesamiento o con la ingesta de alimentos que han sufrido contaminación cruzada. **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 la salmonelosis es mucho más frecuente en verano donde la temperatura es más favorable. Otros modos de transmisión menos comunes son el contacto directo con las heces o cadáveres de animales

colonizados o infectados, el contacto directo entre personas, el contagio nosocomial o el contacto con mascotas exóticas, sobre todo reptiles, que es una forma emergente de transmisión (Peguesy Miller 2010).

El serotipo más común de *S. enterica* en infecciones humanas en España y otros países de la Unión Europea y en América del Norte es Enteritidis, seguido de Typhimurium y ya a mucha distancia otros serotipos como Virchow, Hadar, Virchow, Newport, [4,5,12:i:-,-] (variante monofásica de *S. Typhimurium*) e Infantis (Echeita et al 2007). El principal reservorio de *S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. Hadar* y *S. Infantis* son las aves de corral y el de *S. Typhimurium*, *S. Rissen*, *S. Newport* y *Salmonella* serotipo [4,5,12:i:-] el ganado porcino, aunque la mayoría de serotipos de *S. enterica* de la subesp. I tienen un amplio rango de hospedadores. Los cambios en el consumo alimentario y el crecimiento del tráfico de productos alimentarios agrícolas han facilitado la diseminación de algunos serotipos relacionados con frutas y verduras frescas y cada vez son más frecuentes los brotes a gran escala producidos por alimentos manufacturados. En los últimos años se ha observado en la Unión Europea una disminución total del número de casos de Salmonelosis humana con un considerable incremento en el porcentaje de casos de salmonelosis por *S. Typhimurium* y una llamativa disminución de los ocasionados por *S. Enteritidis*, probablemente debido a la implantación de programas de control de salmonelosis en aves y mejora de las prácticas de seguridad alimentaria que incluyen la retrotrazabilidad de los huevos y la prohibición de usar huevos que no provengan de gallinas criadas en explotaciones en las que esté instaurado uno de estos programas de control (Anónimo. EFSA 2011 (a), ECDC Salmonella surveillance Quarterly report 2008). En nuestro laboratorio el cambio en la incidencia de estos dos serotipos ha sido espectacular y pasamos de un porcentaje de aislados del 51,9% para el serotipo Enteritidis y de un 39,5% para el serotipo Typhimurium en 2001 al 20,7% y 59,8%, respectivamente en 2009 (datos no publicados).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA SALMONELOSIS

S. entérica es una de las causas más frecuentes de gastroenteritis infecciosa en humanos junto a *Campylobacter* con una incidencia media en España de 8,2 casos por 100. 000 habitantes (figura 15).

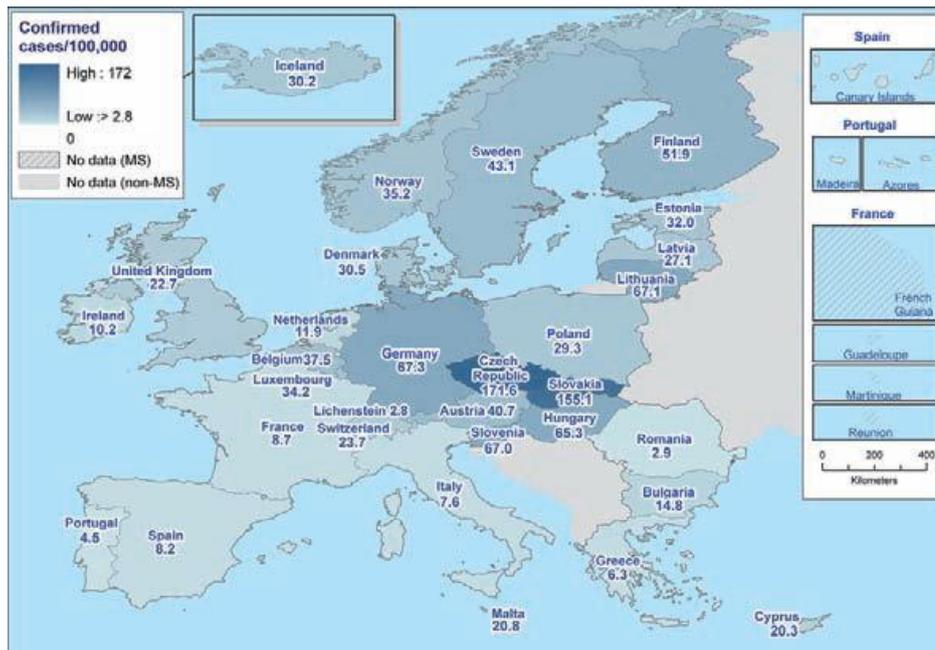


Figura 15: Tasas de notificación de salmonelosis en humanos (por 100000 habitantes) en 2007 en la Unión Europea (EFSA Journal 2009)

Las cepas de *Salmonella* no tifoideas suelen causar una infección gastrointestinal, que afecta en mayor medida a niños y jóvenes, generalmente acompañada de fiebre, diarrea y calambres intestinales, con un periodo de incubación de entre 6 y 72 horas y que puede durar una semana o algo más y suele ser autolimitada y no requerir tratamiento antibiótico. Aproximadamente un 5% de pacientes desarrollan bacteriemia que es una entidad grave y potencialmente fatal.

Los pacientes inmunocomprometidos, entre los que se encuentran los afectados por el VIH, tienen un mayor riesgo de ser infectados por cepas resistentes a los antibióticos, de sufrir bacteriemia y también de desarrollar infecciones focales entre las que se encuentran meningitis, artritis séptica, osteomielitis, colangitis, neumonía y endoarteritis infecciosa, una de las formas más temidas, en particular las que afectan a la aorta abdominal, que suelen requerir reemplazamiento valvular. Otros factores que favorecen el desarrollo de bacteriemias sería la presencia de patologías propias de países de baja renta, como la malaria o la esquistosomiasis. Los serotipos Cholerasuis y Dublin, muy adaptados a bovino y porcino respectivamente, raramente causan infección en humanos pero cuando lo hacen suelen ser graves y diseminarse extraintestinalmente. El tratamiento de elección de la Salmonelosis extraintestinal son las fluorquinolonas y cefalosporinas de amplio espectro (Hohmann 2001, Pegues y Miiller 2010).

La fiebre tifoidea es una infección sistémica causada por *S. Typhi*, que es común en los países en vías de desarrollo pero no en los países occidentales. La fiebre tifoidea acostumbra a cursar

con fiebre alta y cefalea; en adultos no suele acompañarse de diarrea y suele ser más leve en niños. El periodo de incubación es muy variable y oscila entre una y seis semanas. Los serotipos Paratyphi A, B y C causan un síndrome similar a la fiebre tifoidea. (Pegues y Miller 2010).

FACTORES DE VIRULENCIA

La acción patogénica de *S. enterica* implica la penetración de la barrera intestinal y la interacción con células del sistema inmune donde actúa como parásito intracelular por lo que sus mecanismos de virulencia son complejos. Los factores de virulencia pueden englobarse en dos grupos, las estructuras superficiales de la bacteria que son, a su vez, dianas del sistema inmune del hospedador y los genes específicos de virulencia localizados en el cromosoma o en plásmidos.

En el primer grupo se incluyen: el **lipopolisacárido** con acción citotóxica; los **flagelos** que permiten que la bacteria migre hacia el epitelio intestinal mediante quimiotaxis y que penetre la espesa capa de mucina contribuyendo al proceso inflamatorio; la **cápsula** íntimamente relacionada con la capacidad invasiva de *S. Typhi* y las **fimbrias** que son estructuras con superficie de naturaleza proteica consideradas como adhesinas por facilitar la unión de la bacteria a receptores específicos de la célula hospedadora (Pegues y Miiller 2010).

Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco **islas de patogenicidad**. Varios genes involucrados en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación dependientes de MAP cinasas se encuentran en el centisoma 63, formando la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). Los genes localizados en las islas SPI-2 y SPI-3 regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de fagocitos y células epiteliales. La isla SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo I y se cree que participa en la adaptación a ambientes intracelulares. Finalmente, la isla SPI-5 codifica factores involucrados en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal. Debido a una regulación coordinada y precisa de los genes de virulencia *Salmonella* logra adaptarse a cambios ambientales que se le presentan durante el proceso infeccioso (Figueroa Ochoa y Verdugo Rodríguez 2005).

Por otro lado, La existencia de **plásmidos de virulencia** (plásmidos V) en *S. enterica* (pS-V) se puso por primera vez de manifiesto en el serotipo Typhimurium (pSLT) en el año 1982, y posteriormente se encontró en un número limitado de otros serotipos, todos pertenecientes a la subespecie 1. Algunos de ellos son particularmente frecuentes en infecciones humanas, como Enteritidis (pSEV; 60kb), Choleraesuis (pSCV; 50kb), Dublin (pSDV; 80kb), además de

Typhimurium (pSLT, pSTV; 90kb). Los plásmidos V poseen una región de 7,8 kb, altamente conservada, que contiene los genes *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) necesarios para la multiplicación y supervivencia de la bacteria en los macrófagos durante la fase sistémica de la enfermedad en hospedadores específicos. El locus *spv* está formado por 5 genes designados *spvRABCD*. El gen *spvR* codifica un regulador positivo esencial para la expresión de los otros genes *spv*. El producto de *spvB* es una ADP-ribosiltransferasa que actúa sobre la actina, provocando una desestabilización del citoesqueleto de células eucarióticas. Dependiendo del serotipo, los plásmidos V pueden contener otros genes asociados a virulencia como son: a) El operón *pefBACDI* (plasmid-encoded fimbriae), implicado en la síntesis de un tipo de fimbrias que intervienen en la adherencia de la bacteria a las células epiteliales del intestino delgado; b) los genes *rsk* y *rck* podrían estar implicados en la resistencia de *Salmonella* a la acción bacteriolítica del suero; c) el locus *spf*, presente en 3 plásmidos V (pSTV, pSEV y pSCV) e implicado en la supresión de la activación de la respuesta inmune del hospedador; d) otros genes V son *mig-5*, *tlpA* y *srgA*, que relacionados con la actividad de macrófagos y la biogénesis de fimbrias. (Mendoza et al 2009).

La aparición relativamente reciente de **plásmidos híbridos de virulencia y resistencia** (plásmidos VR) puede considerarse un nuevo hito en la evolución de la ingeniería genética de *Salmonella*. Se han detectado plásmidos VR en los serotipos Typhimurium y Cholerasuis. Uno de los plásmidos híbridos más estudiados es el plásmido pUO-StVR2 de *S. Typhimurium* descubierto en la Universidad de Oviedo. Este plásmido tiene un tamaño aproximado de 130 kb, es conjugativo, pertenece al grupo de incompatibilidad IncFII y porta la mayor parte de los genes propios de pSTV. Se cree que este plásmido podría haberse originado a partir de pSTV por la ganancia de una región de resistencia compleja en la que se localizarían un integrón de 2 kb y tres transposones con diferentes determinantes de resistencia a los que haremos mención en el siguiente apartado. Procesos de transposición y/o recombinación entre pSTV y diferentes plásmidos R han conducido a la emergencia de otros plásmidos híbridos de resistencia y virulencia, como el plásmido pUO-StVR3 del grupo de incompatibilidad IncN detectado en la variante monofásica de *S. Typhimurium* [4,5,12:i:-] que incluye el locus *spv* y una región de resistencia con un integrón de clase 1 de región variable *dfrA12-orF-aadA2*. Es interesante destacar que la presencia de plásmidos híbridos VR en *Salmonella* no tifoidea comporta ventajas adaptativas puesto que permite la coselección de determinantes R en situaciones infectivas pero en ausencia de antimicrobianos y la de determinantes V en situaciones no infectivas pero con exposición a antimicrobianos (Mendoza et al 2009).

RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS

Resistencia antibiótica en serotipos no tifoideos

No se aconseja el tratamiento antibiótico de los cuadros de gastroenteritis no complicados producidos por *Salmonella* no tifoidea; sin embargo, un tratamiento precoz y adecuado puede ser crucial para aquellos pacientes con enfermedad invasiva. A pesar de que hasta los años 70 del siglo pasado la mayor parte de aislamientos clínicos de *Salmonella* mostraban una sensibilidad exquisita a los antibióticos, la resistencia a los antimicrobianos en *S. enterica* es un problema cada vez más extendido, a menudo asociado a integrones (Carattoli 2003, Krauland et al 2009), y directamente relacionado con el uso de antibióticos en animales (en los países desarrollados el consumo en humanos tiene una influencia marginal) que se manifiesta tanto en los aislados de reservorios animales como en humanos (van den Bogaard et al 2000), y que ya afecta a los antibióticos considerados de primera elección en el tratamiento de infecciones sistémicas como fluoroquinolonas (Giraud et al 2006) y cefalosporinas de amplio espectro (González-Sanz et al 2009).

En el caso particular de *S. Typhimurium*, los primeros casos de multiresistencia en el Reino Unido se registraron en los años 60 en el fagotipo 29 (resistencia a ampicilina, estreptomina, tetraciclina, sulfamidas y furazolidona) y afectaron a humanos y ganado bovino. En las décadas posteriores fueron los fagotipos 204, 204c y 293 los involucrados en diversos brotes epidémicos en bovinos y humanos ocasionados por aislados con resistencia a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim. La aparición de las resistencias, que se produjo de forma secuencial por la adquisición de plásmidos o transposones de resistencia, siguió a la introducción de algunos de estos antibióticos o sus análogos (por ejemplo del análogo de los aminoglicósidos apramicina) en ganadería. Estas cepas epidémicas se extendieron a diversos países europeos hasta que su prevalencia empezó a declinar al final de los años 80. Fue entonces cuando emergió el clon de *S. Typhimurium* del fagotipo 104 con resistencia a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomina y sulfamidas que dio lugar a una epidemia de diseminación prácticamente universal que ha llegado hasta nuestros días. (Threlfall et al 2002). Los primeros casos de *S. Typhimurium* fagotipo 104 pentarresistentes se detectaron en el Reino Unido a principios de los años 80 en aves exóticas y de aquí se extendió al ganado bovino y más tarde, a partir de 1989, a ganado porcino, ovino, aves de corral y humanos. En 1996 se identificó en los Estados Unidos y a partir de entonces las cepas epidémicas se extendieron por todos los continentes excepto Australia (Threlfall 2000). Los genes responsables del fenotipo de resistencia están ubicados en una región del cromosoma denominada *Salmonella Genomic Island 1* (SGI1) que

clásicamente (SGI1A) contiene dos integrones de clase 1 que transportan los casetes génicos *aadA2* (resistencia a estreptomicina y espectinomicina) y *bla_{PSE-1}* (resistencia a ampicilina), así como una región situada entre ambos integrones en que se encuentran los determinantes que confieren resistencia a cloranfenicol (*floR*) y tetraciclina (*tetG*) (Cloeckaert A 2001, Mulvay MR 2006). En los últimos años se han identificado multitud de variantes de esta isla genómica en diversos serotipos de *Salmonella*, que suponen la pérdida, ganancia o reordenamiento de los casetes génicos de resistencia dentro de la estructura por eventos recombinatorios o de delección (Mulvay 2006, Vo et al 2006, Vo et al 2010).

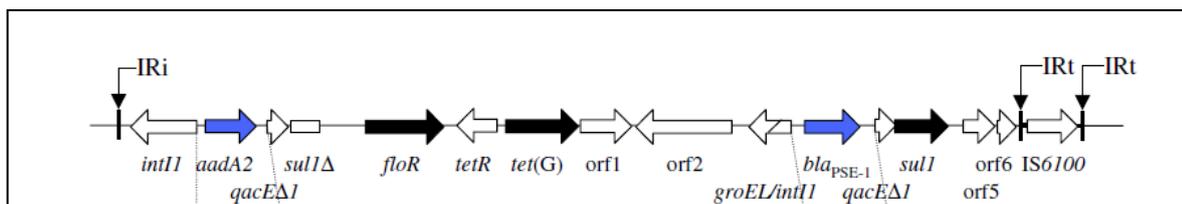


Figura 16: Representación esquemática de la estructura de la SGI1 (*Salmonella* Genomic Island 1) (Mulvay MR 2006)

Resulta particularmente preocupante la aparición de cepas con resistencia adicional a trimetoprim y disminución de sensibilidad a ciprofloxacino (Molbak 1999, Walker 2000) que fue precedida de la aprobación del uso de de enrofloxacino en veterinaria (van den Bogaard et al 2000) y del empleo de trimetoprim en el tratamiento de infecciones por *S. Typhimurium* 104 en ganado vacuno (Threlfall et al 1997). En España y en Portugal en los últimos años se ha asistido a la emergencia de otras cepas de *S. Typhimurium*, estrechamente relacionadas epidemiológicamente, que comparten el mismo fenotipo de resistencia que las cepas portadoras de la SGI1 pero con un genotipo distinto aunque también asociado a un integrón de clase 1. En este caso las cepas contienen un integrón de 2 kb que transporta *bla_{OXA-1}* (resistencia a ampicilina) y *aadA1* (resistencia a estreptomicina y espectinomicina), ubicado en plásmidos conjugativos híbridos de resistencia y virulencia en los que también están ubicados en dos transposones distintos los genes *catA1* y *tet (B)* que codifican resistencia a cloranfenicol y tetraciclina respectivamente (Antunes et al 2004; Pérez- Moreno et al 2005; Herrero et al 2006, Herrero et al 2008).

Las resistencias a los antimicrobianos son menos frecuentes en *S. Enteritidis*, probablemente porque el reservorio suelen ser las aves en las que no acostumbra a ocasionar síntomas clínicos y, por lo tanto, reciben menos antibióticos (Van den Bogaard et al 2000). Sin embargo, en este serotipo, igual que en *S. Hadar* y *S. Virchow*, cuyo reservorio son también las aves de

corral y que acostumbran a ser multirresistentes, es muy frecuente la resistencia a ácido nalidíxico y disminución de sensibilidad a fluorquinolones, muy extendida en España (tabla 8), lo que resulta muy preocupante por la propensión del serotipo Virchow a causar infecciones invasivas, y se ha relacionado con el uso de fluorquinolones (enrofloxacino y difloxacino) en avicultura (Soler et al 2006).

Otros ejemplos de multirresistencia en serotipos no tifoideos de *Salmonella* son los del serotipo emergente [4,5,12:i:-] (variante monofásica de *S. Typhimurium* originalmente descrita en España) de los fagotipos 193 y 120 con resistencia a ampicilina, estreptomina, tetraciclina y sulfamidas que ya han causado muchos brotes en países europeos relacionados con el consumo de carne de cerdo y que parecen haber reemplazado al fagotipo 104 (Hopkins et al 2010); la emergencia en Estados Unidos de un clon multirresistente de *S. Newport* con resistencia a cefalosporinas de amplio espectro mediada por la producción de CMY-2 (Zhao et al 2003) que ha llegado a otros países o la del clon de *S. Virchow* fagotipo 19, portador de *bla*_{CTX-M-9} en un integrón complejo, ampliamente distribuido en España (Herrera-León et al 2010).

Tabla 8: Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en *Salmonella* enterica en España (2001-2003) (Soler et al 2006)

	Total Salmonella (n= 5777)	<i>S. Enteritidis</i> (n= 349)	<i>S. Typhimurium</i> (n=1211)	<i>S. Hadar</i> (n=147)
Ampicilina	28.4	11.7	76	70.1
Cloranfenicol	14.2	0.5	56.4	0.0
Sulfonamidas	22.3	2.7	78.7	1.4
Gentamicina	2,6	1,0	3,1	0,0
Ácido nalidíxico	35	49.9	7.5	91.2
Ciprofloxacino	0.0	0.0	0.0	0.0
Kanamicina	1.6	1.1	1.2	1.4
Estreptomina	19.5	1.8	61.4	89.1
Cefalotina	3.2	1.0	1.9	57.1
Cefotaxina	0.1	0.0	0.2	0.0
Tetraciclina	27.3	5.0	80.4	91.8
Cotrimoxazol	6,0	1,7	10,7	0,7
Número de resistencias				
Ninguna	34,3	37,3	13,5	4,7
Una	36,8	55,2	6,2	1,4
Dos	4,1	4,4	3,3	0,0
Tres o más	24,8	3,1	77,0	93,9

Resistencia antibiótica en *Salmonella Typhi*

En *S. Typhi* la resistencia a los antibióticos, al contrario de lo que sucede en los serotipos no tifoideos, está estrechamente relacionada con su consumo en humanos, sobre todo con el consumo en países en vías de desarrollo, y los brotes de fiebre tifoidea producidos por cepas multirresistentes se asocian con una elevada morbi-mortalidad. En 1970 se produjeron en Méjico y el subcontinente indio epidemias de *S. Typhi* resistentes a cloranfenicol. En 1989 emergieron en el subcontinente indio, sudeste asiático y África aislados con resistencia plasmídica a cloranfenicol, ampicilina y trimetoprim, que pertenecían a diversos fagotipos pero que en todos los casos poseían un plásmido conjugativo del grupo de incompatibilidad H1. Más recientemente se han descrito la aparición de resistencias a ciprofloxacino, tanto de origen cromosómico como plasmídico, entre aislados del *S. Typhi* del subcontinente indio, Vietnam y Tajikistan, relacionados con el uso de fluoroquinolonas para tratar infecciones por cepas multirresistentes (Pegues et al 2010).

KLEBSIELLA PNEUMONIAE

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Klebsiella pneumoniae es una de las tres especies, junto a *K. oxytoca* y *K. granulomatis*, del género *Klebsiella* que causa enfermedad en humanos. Los microorganismos antes conocidos como *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* se consideran en la actualidad subespecies de *K. pneumoniae* que no fermentan la lactosa. *K. pneumoniae* es un bacilo gramnegativo de la familia Enterobacteriaceae que fermenta la lactosa, a excepción de las dos subespecies citadas, es citrato, tartrato, ureasa y Vogues-Proskauer positivo e hidroliza la esculina. La mayoría de aislados producen colonias muy mucoides debido a la producción de una cápsula de abundante polisacárido. (Abbott 2006).

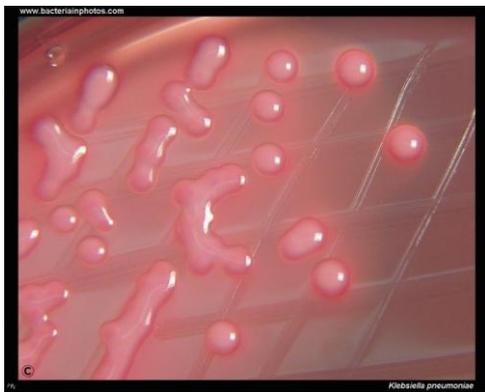


Figura 17: Colonias de *K. pneumoniae* en agar MacConkey



Figura 18: Aspecto microscópico de *K. pneumoniae*

EPIDEMIOLOGÍA

K. pneumoniae es un microorganismo ubicuo cuyo hábitat natural engloba la tierra, las plantas, superficies húmedas y el intestino de los mamíferos. En el hombre *K. pneumoniae* está presente como saprófito en la nasofaringe y el tracto gastrointestinal, mientras que sólo se considera un colonizador transitorio de la piel. El porcentaje de detección de *K. pneumoniae* en las heces de pacientes sanos oscila entre un 1 y un 6%. Las tasas de colonización se elevan considerablemente en pacientes hospitalizados o sometidos a tratamiento con antibióticos, llegando a ser del 77% en heces, del 19% en la nasofaringe y del 42% en las manos de pacientes. Por otro lado, *K. pneumoniae* está muy bien adaptado al medio hospitalario por tener mayor capacidad que otras enterobacterias para sobrevivir en las manos del personal sanitario y pacientes y su facilidad para ser transmitida entre pacientes, lo que hace que sea

una de las especies más implicadas en brotes nosocomiales (Podschum y Ullmann 1998). En el medio hospitalario el principal reservorio lo constituyen el tracto gastrointestinal de los pacientes y las manos del personal sanitario. Los pacientes colonizados a menudo son asintomáticos y actúan como fuente de infección para otros pacientes que en caso de ser vulnerables podrán desarrollar infecciones clínicas (Csewell y Philipps 1981).

TIPIFICACIÓN

La tipificación de *K. pneumoniae* suele basarse en la presencia de antígenos capsulares, de los que se han descrito hasta 77 variedades antigénicas, que permiten tipificar la mayor parte aislados clínicos. Los principales inconvenientes de esta técnica son su gran laboriosidad, la existencia de reacciones débiles y reacciones cruzadas entre diferentes antígenos y la no comercialización de los antisueros por lo que sólo está disponible en laboratorios de referencia (Podschum y Ullmann 1998) y hoy se prefiere recurrir a técnicas de genotipado como la electroforesis en campo pulsado, técnica de referencia, y la rep-PCR que es mucho más asequible y arroja resultados comparables a la anterior (Gazouli et al 1997, Mantilla et al 2004).

FACTORES DE VIRULENCIA

El principal factor de virulencia identificado en *K. pneumoniae* es **su cápsula de polisacárido** que protege a la bacteria de la acción fagocítica de neutrófilos y de la acción bactericida del suero mediada por el complemento, como también se cree que sucede con algunos antígenos somáticos. Las cepas que expresan los antígenos K1 y K2 parecen ser especialmente virulentas y se cree que el grado de virulencia conferido por un antígeno capsular depende de su contenido en manosa.

Las **fimbrias** constituyen el primer paso en la adherencia de las enterobacterias a las células que deben infectar. *K. pneumoniae* posee tres tipos de fimbrias, siendo las de tipo I las responsables de la unión al mucus y células epiteliales del tracto urogenital, respiratorio y tracto gastrointestinal que juega un importante papel en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario y la neumonía.

El hierro es esencial para crecimiento de las bacterias en los tejidos de las células infectadas. Sin embargo, el aporte de hierro libre por parte de las células hospedadoras es muy bajo, ya que este elemento está unido con gran afinidad a proteínas extracelulares como ferritina, hemoglobina y hemosiderina y a proteínas intracelulares como lactoferrina y transferrina. Para asegurarse el aporte necesario de hierro, muchas bacterias, entre las que se encuentra *K.*

pneumoniae, secretan quelantes de hierro de bajo peso molecular denominados **sideróforos**, que son capaces de competir con las proteínas del huésped en la captura de hierro. Los sideróforos presentes en *K. pneumoniae* son la enterobactina y la aerobactina (Podschem y Ullmann 1998).

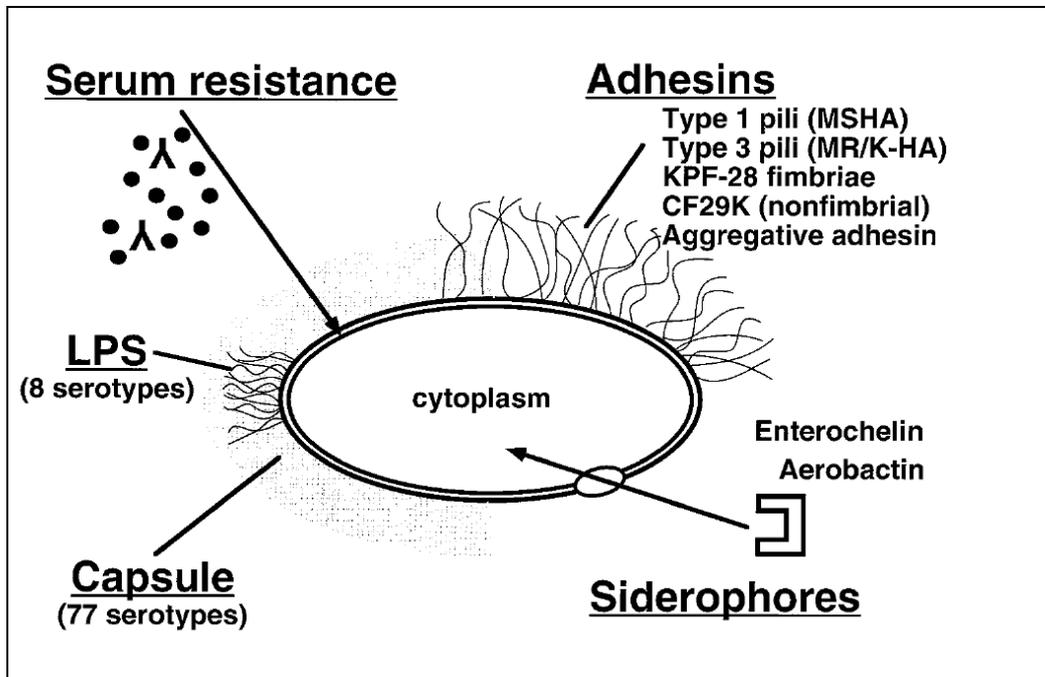


Figura 19: representación esquemática de los factores de virulencia de *Klebsiella spp.* (Podschem R et al 1999)

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

K. pneumoniae es un importante agente etiológico de infección del tracto urinario y neumonía en pacientes previamente sanos. Sin embargo *K. pneumoniae* suele comportarse como un patógeno oportunista que sobre todo ocasiona infecciones en pacientes hospitalizados o con enfermedades subyacentes o inmunosupresión, previamente colonizados por el microorganismo. Además de la neumonía y la infección del tracto urinario otras infecciones producidas por esta especie son las infecciones de herida, infecciones relacionadas con dispositivos intravasculares y otros dispositivos invasivos, infecciones de vías biliares, peritonitis y meningitis. *K. pneumoniae* es después de *E. coli* el principal agente de bacteriemia por gramnegativos (Donnenberg 2010).

Una forma emergente de infección comunitaria por *K. pneumoniae* son los abscesos hepáticos piogénicos con o sin metástasis sépticas, que se vienen describiendo desde hace 20 años, particularmente en Taiwán, pero también en Asia, Europa y América del Norte. Las cepas

causantes de esta entidad pertenecen predominante al serotipo K1, que también se ha convertido en un agente común de meningitis adquirida en la comunidad en adultos taiwaneses, y presentan un fenotipo hipermucoviscoso (mag A). Se ha especulado que este fenotipo puede estar asociado con un aumento de virulencia y que la especial distribución geográfica de la infección puede estar relacionada con una predisposición genética (Keynan y Rubinstein 2007).

RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS

Todos los aislados de *K. pneumoniae* son intrínsecamente resistentes a aminopenicilinas como resultado de la producción de una β -lactamasa de codificación cromosómica SHV-1 con actividad preferentemente penicilinas que es eficazmente inhibida por ácido clavulánico. La resistencia a ésta y otras asociaciones de β -lactamasas e inhibidores suicidas puede deberse a la hiperproducción de TEM-1 o TEM-2 o más raramente a la hiperproducción de SHV-1, que también afectaría a cefalosporinas de primera y segunda generación (Livermore 1995, Espinasse F et al 1997), mientras que la producción de enzimas resistentes a inhibidores derivados de TEM o SHV es casi anecdótica (Lemozy et al 1995; Dubois V et al 2004, Dubois V et al 2008). La producción de OXA-1, frecuentemente concomitante con la de CTX-M-15, y la adquisición de cefamicinasas de codificación plasmídica son otros mecanismos que confieren resistencia a combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas (Cantón 2008).

Una de las principales características de *K. pneumoniae* es su facilidad para diseminarse clonalmente y producir brotes nosocomiales, probablemente por su capacidad de sobrevivir en la piel, así como para adquirir determinantes de resistencia de codificación plasmídica y transferirlos a otras especies. De hecho, muchas de las β -lactamasas de espectro extendido se han identificaron por primera vez en esta especie (Livermore 1995), e igual ha sucedido con las carbapenemasas KPC (Yigit et al 2001) y NDM (Kumarasamy et al 2010) o los determinantes *qnr* (Martínez-Martínez et al 1998).

Uno de los problemas más extendidos en *K. pneumoniae* es la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam por la producción de β -lactamasas de espectro extendido, codificadas por genes vehiculados por plásmidos de resistencia de gran tamaño, que frecuentemente se asocia a resistencia a otros antimicrobianos como aminoglicósidos, cotrimoxazol y sobre todo fluoroquinolonas. De acuerdo a los datos de la red de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos EARS-Net (European antimicrobial resistance surveillance system)- España, el porcentaje de aislados invasivos de *K. pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido se ha mantenido estable en los últimos años y en el año 2010 se situaba próxima al 10% (figura 20), un dato similar al de los países de nuestro entorno.

En un estudio multicéntrico, realizado en 2006 en 44 hospitales españoles, la prevalencia de β -lactamasas de espectro extendido entre el total de aislados de *K. pneumoniae* era de un 4% y se había doblado respecto al anterior estudio realizado en el año 2000, siendo la mayoría de casos (a diferencia de lo que ocurría en *E. coli*) de adquisición nosocomial (Díaz et al 2009). Respecto a la prevalencia de los diferentes tipos de β -lactamasas de espectro extendido en *K. pneumoniae*, en la actualidad las predominantes en España son las de tipo CTX-M (particularmente CTX-M-9 y CTX-M-1), seguidas de SHV-12, SHV-5 y enzimas derivadas de TEM (Diestra et al 2008). La detección de este tipo de enzimas por el laboratorio, al menos mediante técnicas fenotípicas, es interesante desde el punto de vista epidemiológico y del control de la infección, y también para orientar el tratamiento, pues hay estudios que sugieren que el tratamiento con β -lactámicos no carbapenemes puede conducir a fracasos terapéuticos, independientemente de los resultados de sensibilidad in vitro, y que, por lo tanto, la categoría clínica debe ser reinterpretada (Paterson et al 2004). Si bien la actual recomendación de algunas sociedades científicas como EUCAST es la de informar la categoría clínica sin modificar, de acuerdo a los puntos de corte de la concentración mínima inhibitoria que han sido redefinidos a la baja, el seguimiento de esta recomendación no es unánime por la posible influencia del inóculo bacteriano en el foco de infección en la respuesta clínica (Navarro et al 2011).

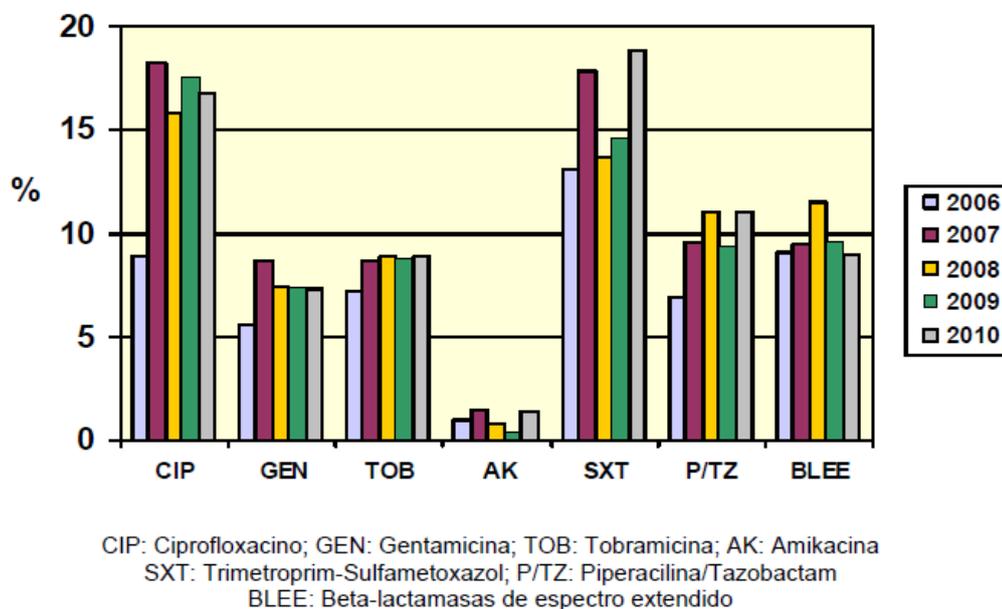


Figura 20: Evolución de la prevalencia de cepas no sensibles a distintos antimicrobianos en aislamientos invasivos de *Klebsiella pneumoniae*. EARS- Net España 2006-2010 (Memoria EARS-Net España 2010).

La presión selectiva ejercida por el uso de carbapenemes en el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido ha conducido a la emergencia de aislados resistentes a este grupo de antimicrobianos, en particular en *K. pneumoniae*, en la que los aislados productores de VIM son muy frecuentes en algunos países como Grecia (Cornaglia et al 2011). Un problema emergente es el de los aislados multirresistentes de *K. pneumoniae* productores de las diferentes variantes de las carbapenemasas plasmídicas KPC, identificadas por primera vez en una cepa de Carolina del Norte y que desde Estados Unidos se han diseminado a aislados de *K. pneumoniae* de procedencias geográficas muy diversas y también a otras enterobacterias e incluso a *Pseudomonas aeruginosa* gracias a su presencia en el transposón Tn4401 transportado por plásmidos conjugativos. Estas enzimas son inhibidos de forma variable por ácido clavulánico pero no por EDTA y confieren resistencia a todos los β -lactámicos. Su detección por el laboratorio puede resultar dificultosa si no se incluye ertapenem en el antibiograma, pues el grado de hidrólisis de otros carbapenemes es variable, de forma que la resistencia puede no ser detectada por algunos sistemas automáticos (Nordman et al 2009). Las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones producidas por *K. pneumoniae* productor de KPC son muy limitadas y a menudo se reducen a colistina y tigeciclina. En España se ha descrito recientemente la emergencia de KPC-3 en dos clones de *K. pneumoniae* en Madrid (Curiao et al 2010).

Por último, la resistencia plasmídica a quinolonas, mediada por genes *qnr* y *aac (6')-1b-cr* asociados a *bla_{OXA-1}* dentro de integrones complejos, en aislados productores de cefamincinasas plasmídicas o β -lactamasas CTX-M se ha comunicado en diversos aislados esporádicos de *K. pneumoniae* de muy diferentes procedencias geográficas (Verdet et al 2006, Quiroga et al 2007, Machado et al 2006) y recientemente se ha descrito la diseminación en integrones complejos de clase 1 de *bla_{OXA-2}* y *bla_{IMP-4}* junto con determinantes de resistencia a trimetoprim, aminoglicósidos y cloranfenicol y *qnrB* en aislados multirresistentes de *K. pneumoniae* procedentes de Argentina, Chile, Uruguay y Australia (Chowdhury et al 2011).

Justificación y objetivos

En un estudio previo realizado en aislados de *S. enterica* de origen humano productores de β -lactamasas recuperados entre 2000 y 2001 en el laboratorio de microbiología del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta (Pérez-Moreno et al 2005) pudimos constatar la amplia diseminación en el serotipo Typhimurium de los aislados con fenotipo de resistencia (resistencia a amoxicilina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomina y sulfamidas) y perfil de integrones (1 kb/ *aadA1* y 1,2 kb/*bla*_{PSE-1}) típicos del clon DT104 de distribución mundial y la emergencia e inusual frecuencia de aislados multirresistentes del mismo serotipo portadores de un integrón de clase 1 que contenía los casetes génicos de resistencia *bla*_{OXA-1} y *aadA1* en su región variable, que hasta entonces sólo se habían identificado esporádicamente en algunos países del sur de Europa, aunque ya había algunas publicaciones que sugerían su emergencia en España y Portugal, atribuible fundamentalmente a diseminación clonal. En nuestra serie, sin embargo, se daba la circunstancia de que ambos perfiles de integrones se encontraban en aislados de *S. Typhimurium* de distintos fagotipos, lo que permitía sospechar la posibilidad de su transferencia horizontal con la consiguiente repercusión en la salud pública que esto podría suponer. Cabe señalar que la detección de integrones no se limitó al serotipo Typhimurium, serotipo en el que parecen estar más extendidos y en el que se han llevado a cabo la mayor parte de estudios sobre prevalencia de estos elementos genéticos, sino que también se observó, aunque en mucha menor medida, en aislados multirresistentes de *S. Enteritidis* y de algunos serotipos poco prevalentes.

Por otra parte, en el curso de uno de los estudios de vigilancia de resistencia a los antibióticos que se realizan periódicamente en el laboratorio de microbiología del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, se puso de manifiesto un aumento muy significativo de la resistencia a amoxicilina/clavulánico en aislados de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de pacientes de un centro sociosanitario, que en el 2004 llegó a superar el 60%. Un análisis más detallado del fenotipo de resistencia reveló que la mayoría de los aislados eran sensibles a cefamicinas, cefazolina y al resto de cefalosporinas, lo que sugería que el mecanismo subyacente era la producción de penicilinasas resistentes a inhibidores, y que había un subgrupo de aislados muy homogéneo que se caracterizaban por presentar sensibilidad disminuida a cefepime y resistencia a quinolonas y tobramicina (ver datos de evolución de resistencias en el centro en el anexo 2). El perfil de multirresistencia y la disminución de sensibilidad a cefepime de este subgrupo de aislados era sugestivo de la presencia de un gen *bla*_{OXA} ubicado junto al resto de determinantes responsables del fenotipo de resistencia en un mismo vector genético, probablemente un integrón.

Los hallazgos expuestos anteriormente nos hicieron plantearnos el interés de seguir la evolución de la situación en los aislados de enterobacterias objeto de los estudios preliminares

y la necesidad de profundizar en el papel desempeñado por los integrones en la emergencia, diseminación y coselección de resistencias en dos escenarios aparentemente tan distantes como la zoonosis por *Salmonella* y la infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae*.

Objetivo general:

Establecer la contribución de los integrones de clase 1 a la resistencia a antibióticos en aislados clínicos de enterobacterias de dos contextos epidemiológicos bien diferenciados: zoonosis por *Salmonella enterica* e infección por *Klebsiella pneumoniae* en pacientes de un centro sociosanitario.

Objetivos específicos:

- Conocer la evolución de la prevalencia, las características y la contribución a la resistencia antibiótica de los integrones de clase 1 en aislados clínicos de origen humano de *S. enterica* serotipo Typhimurium recuperados en la zona de influencia del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta e investigar la epidemiología molecular de los aislados portadores de estos elementos genéticos.
- Estudiar la prevalencia, características y contribución a la resistencia antibiótica de los integrones de clase 1 en aislados clínicos de origen humano de *S. enterica* de serotipos no Typhimurium recuperados en la zona de influencia del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, así como rastrear la presencia de genes *qnr* e identificar las β -lactamasas producidas por los aislados resistentes a amoxicilina.
- Investigar la epidemiología molecular, los mecanismos de resistencia subyacentes y la eventual implicación de los integrones de clase 1 en aislados de *Klebsiella pneumoniae* de un centro sociosanitario con sensibilidad disminuida a amoxicilina/clavulánico y sensibles a cefazolina.
- Identificar los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a β -lactámicos y quinolonas, así como caracterizar su entorno genético y la eventual implicación de integrones de clase 1 en tres aislados multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* del mismo centro sociosanitario con fenotipo sugestivo de la producción de una β -lactamasa AmpC plasmídica y de la presencia de determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas.

Resultados

ARTÍCULO 1 Y OTROS RESULTADOS RELACIONADOS NO PUBLICADOS

Resistencia antibiótica asociada a integrones de clase 1 en aislados de *Salmonella* Typhimurium de origen humano: epidemiología molecular y emergencia de integrones atípicos asociados a *sul3* (Int J Antimicrob Agents 2009; 34:381-383).

En este trabajo se investigó la frecuencia y estructura de los integrones de clase 1 en los 92 aislados de *S. Typhimurium* de origen humano, incluyendo tres de la variante monofásica [4,(5),12:i:-], recuperados consecutivamente de muestras clínicas en el laboratorio de microbiología del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta entre 2004 y 2006, así como la relación epidemiológica entre los aislados de este serotipo portadores de integrones típicos, incluyendo para este propósito 35 aislados adicionales obtenidos entre 2000 y 2001.

Nueve de los 92 aislados (9,8%) fueron sensibles a todos los antimicrobianos estudiados, seis aislados (6,5%) fueron resistentes a un único antibiótico, otros seis (6,5%) a dos antimicrobianos y 71 (77,2%) presentaron resistencia a tres o más antibióticos no relacionados. Los antibióticos que mostraron las tasas de resistencia más elevadas fueron tetraciclina (84,8%), amoxicilina (81,5%), estreptomina (79,4%), sulfamidas (77,2%) y cloranfenicol (60,9%). La frecuencia de resistencia a amoxicilina/clavulánico, cotrimoxazol y ácido nalidíxico fue del 16,3%, 13% y 3,3% respectivamente y sólo dos aislados presentaron disminución de sensibilidad a ciprofloxacino (MIC entre 0.5 y 1 mg/mL). 36 de los 75 aislados resistentes a amoxicilina producían OXA-1, 24 TEM-1, 14 PSE-1 y uno producía PSE-1 y TEM-1.

Se detectó la presencia de integrones de clase 1 en 56 aislados (60,9% del total de aislados y 78,9% de los multirresistentes), de los que 51 correspondieron a integrones típicos asociados a *qacΔE1-sul1* y el resto a integrones atípicos asociados a *qacH-sul3*. Se identificaron cuatro perfiles de integrones típicos ([I, 2 kb/ *bla*_{OXA-1}-*aadA1*]; [Ia, 2 kb/ *bla*_{OXA-1}-*aadA1*+ 1.6 kb/ *dfrA1-aadA1*]; [II, 1kb/ *aadA2* + 1.2 kb/ *bla*_{PSE-1}]; [III, 1.2 kb/ *bla*_{PSE-1}]), mientras que los cinco integrones atípicos compartían la estructura [5'CS-*dfrA12-orfF-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-IS440-sul3*] (perfil IV). Todos los aislados con perfil de integrones II eran resistentes a amoxicilina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol y sulfamidas, mientras que los del perfil I mostraban resistencia adicional a nitrofurantoina y los del perfil Ia a nitrofurantoina y cotrimoxazol. La presencia de *floR* y *tetG* (característicos de SGI1) se pudo evidenciar en todos los aislados con el integron de región variable 1,2 kb/ *bla*_{PSE-1}. El perfil de integrones más frecuente fue el perfil I que se observó en 33 aislados (35,9% del total y 58,9% de los *int11* positivos), mayoritariamente del fagotipo 104b o no tipificables, seguido del II que se observó en 13 aislados (14,1% del total y 23,2% de los *int11* positivos) mayoritariamente del fagotipo U302 o no tipificables (sólo un aislado era del fagotipo 104). Los perfiles Ia, III y IV se

identificaron en 3 (3,3% del total y 5,4% de los *intI1* positivos), 2 (2,2% del total y 3,6% de los *intI1* positivos) y 5 (5,4% del total y 8,9% de los *intI1* positivos) aislados, respectivamente. La comparación con los datos previos obtenidos con aislados del 2000 y 2001 mostraban un incremento significativo de los aislados que albergaban el integrón *bla_{OXA-1}⁻ aadA1* (20.8% vs. 39.2%; $p=0.01$), un descenso no significativo de los que albergaban el integrón de región variable *bla_{PSE-1}* (24% vs. 16.3%) y la emergencia de nuevos perfiles de integrones (Ia, III) y, en particular de integrones atípicos asociados a *sul3*, que no estaban presentes en el periodo anterior.

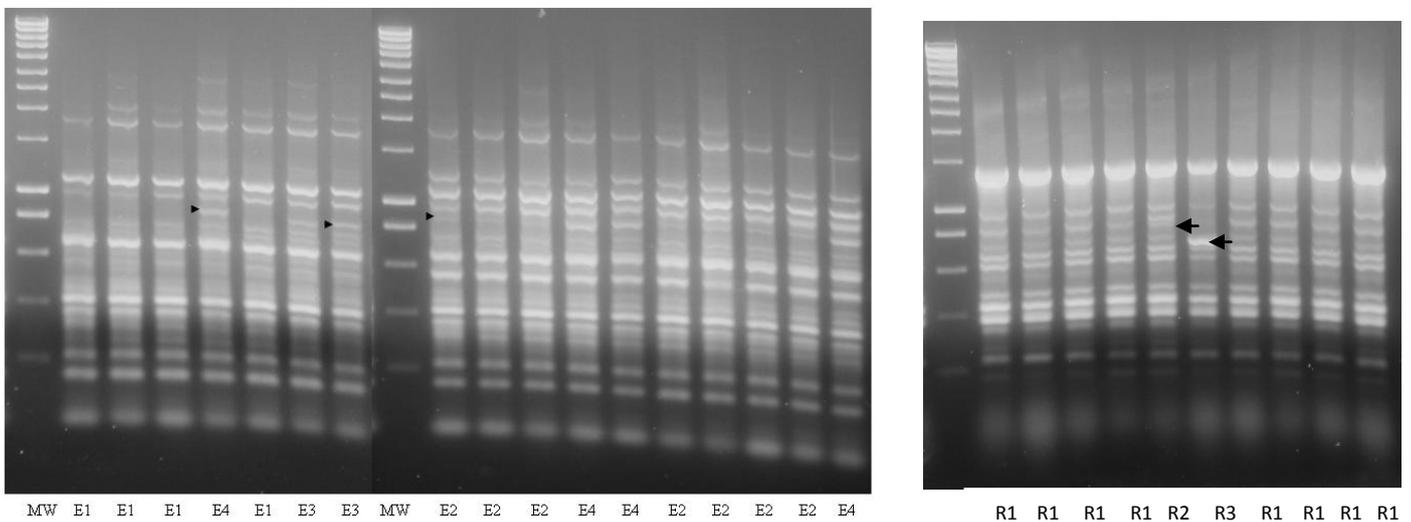
El análisis combinado de los patrones ERIC y REP-PCR de 86 aislados portadores de integrones típicos de clase 1 (los 51 obtenidos entre 2004 y 2006 y 35 de los 43 de la colección de 2000-2001) permitió adscribirlos a seis genotipos distintos (tabla 9 y figuras 21 y 22). La mayor parte de los aislados (79%) compartían el patrón E2+R1, independientemente del perfil de integrones (tabla 9), fagotipo (tabla 10) o año de aislamiento (tabla 9), mientras que los cinco patrones minoritarios eran específicos de los aislados de un determinado perfil de integrones, se circunscribían a periodos limitados en el tiempo y sólo se detectaron en aislados no tipificables o de patrón de lisis no reconocido. Estos resultados sugerían que la diseminación de aislados multirresistentes de *S. Typhimurium* portadores de integrones en nuestro ámbito geográfico era fundamentalmente debida a la diseminación de un clon predominante, aunque también parecía haberse producido una diseminación horizontal de estos vectores de resistencia.

Tabla 9: distribución de genotipos en los aislados de *S. Typhimurium* portadores de integrones de clase 1 asociados a *sul1* agrupados por perfil de integrones y año de aislamiento

Perfil integrones	Año	Patrones combinados ERIC-PCR y REP-PCR					
		E1+R1	E2+R1	E3+R1	E4+R1	E2+R2	E2+R3
I (2 kb/ <i>bla_{OXA-1}⁺ aadA1</i>)	2000-01	2	14	-	2	-	-
	2004	-	11	-	5	-	-
	2005	2	3	-	1	-	-
	2006	-	10	1	-	-	-
	Total	4 (7,8%)	38 (74,5%)	1 (2%)	8 (15,6%)	0 (0%)	0 (0%)
Ia (2 kb/ <i>bla_{OXA-1}⁺ aadA1</i> ; 1,6 Kb/ <i>dfrA1</i> + <i>aadA1</i>)	2005	-	1	-	-	-	-
	2006	-	2	-	-	-	-
	Total	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
II (1kb/ <i>aadA2</i> ; 1,2 kb/ <i>bla_{PSE-1}</i>)	2000-01	-	13	3	-	1	-
	2004	-	5	-	-	-	1
	2005	-	3	-	-	-	-
	2006	-	4	-	-	-	-
	Total	0 (0%)	25 (83,3%)	3 (10%)	0 (0%)	1 (3,3%)	1 (3,3%)
III (1,2 kb/ <i>bla_{PSE-1}</i>)	2006	-	2	-	-	-	-
	Total	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total		4 (4,6%)	68 (79,1%)	4 (4,6%)	8 (9,3%)	1 (1,2%)	1 (1,2%)

Tabla 10: Distribución de genotipos entre los distintos fagotipos identificados en los aislados de *S. Typhimurium* portadores de integrones de clase 1 asociados a *sul1*

Fagotipo	Patrones combinados ERIC-PCR y REP-PCR					
	E1+R1	E2+R1	E3+R1	E4+R1	E2+R2	E2+R3
104	-	6	-	-	-	-
104b	-	13	-	-	-	-
U302	-	11	-	-	1	-
U311	-	3	-	-	-	-
120	-	1	-	-	-	-
193	-	1	-	-	-	-
204c	-	1	-	-	-	-
NT	2	18	2	7	-	1
PNR	2	14	2	1	-	-



Figuras 21 (izquierda) y 22 (derecha): Patrones ERIC-PCR (izquierda) y REP-PCR (derecha) de aislados seleccionados de *S. Typhimurium* portadores de integrones de clase 1 típicos asociados a *sul1*. Las flechas indican las bandas polimórficas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados bacterianos: Los 92 aislados de *S. Typhimurium*, incluyendo tres de la variante monofásica de fórmula antigénica [4,(5),12:i:-], de un total de 309 aislados de *S. enterica* recuperados en el laboratorio de microbiología del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta entre 2004 y 2006 fueron incluidos en el estudio. Se consideró un único aislado por paciente o brote conocido. Para los análisis de epidemiología molecular se incluyeron 35 aislados adicionales de *S. Typhimurium* portadores de integrones de clase 1 típicos obtenidos en 2000 y 2001, Los aislados, que fueron identificados mediante pruebas bioquímicas convencionales y serotipados y fagotipados en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* del centro Nacional de Microbiología, procedían de muestras clínicas (91 muestras de heces y una de sangre) de pacientes atendidos en el Hospital de Tortosa Verge de la Cinta o en cualquiera de los centros de Atención Primaria de la Región Sanitaria Terres de l'Ebre cuyas muestras se procesan en el laboratorio de microbiología de dicho hospital.

Pruebas de sensibilidad *in vitro*: La sensibilidad a amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, cotrimoxazol, gentamicina, tobramicina, amikacina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomina, espectinomicina, kanamicina y sulfamidas se estudió por microdilución en caldo mediante los paneles comerciales 95W y 93W (Francisco Soria Melguizo. Madrid. España) o por difusión en agar siguiendo las recomendaciones y aplicando los puntos de corte establecidos por el CLSI. Se consideró que un aislado era multirresistente cuando presentaba resistencia a tres a o más familias de antibióticos.

Detección de genes de resistencia y detección y caracterización de integrones de clase 1:

La presencia de los genes *bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{TEM-1}, que codifican las β-lactamasas TEM-1, OXA-1 y PSE-1 respectivamente, y la de los genes *tetG* (resistencia a tetraciclina), *floR* (resistencia a cloranfenicol), *sul1* y *sul3* (genes de resistencia a sulfamidas asociados a integrones de clase 1) se investigó mediante PCR y secuenciación, utilizando los siguientes cebadores: *bla*_{TEM-1}: 5'- TTG GGT GCA CGA GTG GGT- 3' y 5'- TAA TTG TTG CCG GGA AGC- 3'; *bla*_{OXA-1}: 5'- ACC AGA TTC AAC TTT CAA-3' y 5'- TCT TGG CTT TTA TGC TTG-3'; *bla*_{PSE-1}: 5'- AAT GGC AAT CAG CGC TTC-3' y 5'- GGG GCT TGA TGC TCA CTC-3'; *tetG*: 5'- GCT CGG TGG TAT CTC TGC-3' y 5'-AGC AAC AGA ATC GGG AAC-3' ; *floR*: 5'-CAC GTT GAG CCT CTA TAT-3' y 5'-ATG CAG AAG TAG AAC GCG-3'); *sul1*: 5'-TGG TGA CGG TGT TCG GCA TTC-3' y 5'- GCG AGG GTT TCC GAG AAG GTG-3'; *sul3*: 5'- CAT TCT AGA AAA CAG TCG TAG TTC G-3' y 5'- CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA-3' y las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo inicial de 5

minutos a 94° C; 30 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 55° C durante 30 segundos y 72° C durante 30 segundos; 1 ciclo final de 72° C durante 5 minutos.

La caracterización de los casetes génicos incluidos en la región variable de los integrones de clase 1 se realizó mediante PCR y posterior secuenciación empleando los cebadores 5'CS (5'-GGC ATC CAA GCA GCA AGC-3') y 3'CS (5'-AAG CAG ACT TGA CCT GAT-3') y el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo inicial de 5 minutos a 94° C; 30 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 55° C durante 30 segundos y 72° C durante 2 minutos y 30 segundos; 1 ciclo final de 72° C durante 5 minutos. En aquellos aislados positivos para *int11* en los que no se obtuvieron amplicones empleando los cebadores 5'CS y 3'CS, la caracterización de la región variable de los integrones se llevó a cabo mediante ensayos de PCR solapante y posterior secuenciación empleando los cebadores 5'CS y *cmlA reverse* (5'- ATC AGG CAT CCC ATT CCC AT -3') y *sul3 forward* (5'- CAT TCT AGA AAA CAG TCG TAG TTC G- 3') y *cmlA forward* (5'- TGT CAT TTA CGG CAT ACT CG-3') y el mismo programa de amplificación que para la detección de integrones de clase 1 convencionales.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo Cl₂ Mg 1,5 mM; tampón PCR 1x; 0,2 mM de cada uno de los nucleósidos trifosfato, 0,5 mM de cada uno de los correspondientes cebadores, 1,5 U de Taqpolimerasa (Ecogen. Barcelona. España) y 25 µL de lisado bacteriano, obtenido tras someter a ebullición a 100° C durante 10 minutos una suspensión de tres colonias, procedentes de un cultivo fresco en agar sangre, en 50 µL de agua bidestilada estéril y posterior centrifugación a 14000 rpm durante 20 segundos.

Los productos finales de cada PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con 0,5 mg/mL de bromuro de etidio. El tamaño de los amplicones generados se calculó por comparación con el patrón de tamaño molecular Supperladder-Mid 1 100 pb (Gensura. San Diego. EUA)

Definición diferentes perfiles de integrones: Los diferentes perfiles de integrones obtenidos al analizar los aislamientos estudiados se definieron de acuerdo al número, tamaño de los amplicones generados y genes de resistencia detectados en la región variable de los integrones.

Ensayos de epidemiología molecular: La relación clonal de los aislados portadores de integrones de clase 1 convencionales asociados a *sul11* se estudió mediante *Enterobacterial repetitive intragenic consensus* (ERIC) -PCR y *Repetitive extragenic palindromic* (REP)-PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo Cl₂ Mg 3,5 mM (ERIC) o 3mM (REP); tampón PCR 1x; 0,2 mM de cada uno de los nucleósidos trifosfato, 1 mM

(ERIC) o 2mM (REP) de cada uno de los correspondientes cebadores ; 2 U (ERIC) o 1,5 U (REP) de Taqpolimerasa (Ecogen. Barcelona. España) y 25 μ L de lisado bacteriano, obtenido tras someter a ebullición a 100° C durante 10 minutos una suspensión de una colonia, procedente de un cultivo fresco en agar sangre, en 50 μ L de agua bidestilada estéril y posterior centrifugación a 14000 rpm durante 20 segundos. Para la ERIC-PCR se emplearon los cebadores ERIC-1 (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') y ERIC-2 (5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') y las siguientes condiciones de amplificación: 30 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 52° C durante 1 minuto y 65° C durante un minuto y 1 ciclo de extensión final de 65° C durante 16 minutos. Para la REP-PCR se utilizó el cebador REP-1 (5'- GCG CCG ICA TGC GGC ATT -3') y las siguientes condiciones de amplificación: 30 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 40° C durante 1 minuto y 6 ° C durante un minuto y 1 ciclo de extensión final de 65° C durante 16 minutos.

Se consideró que dos aislados estaban relacionados epidemiológicamente cuando compartían el mismo patrón por ERIC-PCR y REP-PCR. Para confirmar la reproducibilidad de ambas técnicas todos los aislados fueron analizados al menos dos veces.

Análisis estadístico: Se aplicaron las pruebas de χ^2 o el test exacto de Fisher para estudiar la diferencia entre proporciones y se asignó significación estadística a valores de $p \leq 0,05$.

Author's personal copy

Letters to the Editor / International Journal of Antimicrobial Agents 34 (2009) 380–393

381

set up as a pilot study, which is why sample sizes were relatively small. Although the role of artemisinins in leishmaniasis has been observed previously [6,7], this study failed to show a significant difference between the two arms.

Acknowledgments

The authors are very grateful to all the patients for their cooperation.

Funding: Dafra Pharma NV/SA, Turnhout, Belgium.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: This study received ethical clearance from the Research Board at the Faculty of Medicine, University of Khartoum, Sudan.

References

- [1] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366:1561–77.
- [2] Markell E, John D, Krotoski W. *Markell and Vogle's medical parasitology*. 8th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 1999.
- [3] Berman J. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6:1381–8.
- [4] Keiser J, Utzinger J. Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:605–12.
- [5] Adam I, Elhaddad OA, Elhadi MO, Abdalla E, Elmardi KA, Jansen FH. The antischistosomal efficacies of artesunate-sulfamethoxy-pyrazine-pyrimethamine and artemether-lumefantrine administered as treatment for uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 2008;102:39–44.
- [6] Yang DM, Liew FY. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology* 1993;106:7–11.
- [7] Avery MA, Muraleedharan KM, Desai PV, Bandyopadhyaya AK, Furtado MM, Tekwani BL. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 8. Design, synthesis, and CoMFA studies toward the development of artemisinin-based drugs against leishmaniasis and malaria. *J Med Chem* 2003;46:4244–58.

Ishag Adam*

P.O. Box 102, Faculty of Medicine, University of Khartoum,
Khartoum, Sudan

Amel A. Hagelnur

Omdurman Hospital for Tropical Diseases, Omdurman, Sudan

* Corresponding author. Tel.: +249 91 216 8988;
fax: +249 1 8377 1211.

E-mail address: ishagadam@hotmail.com (I. Adam)

doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.03.013

Re: a VIM-1-metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in an acute hospital in Germany

Keywords:
Carabenem
Resistance
Klebsiella pneumoniae
Germany

Weile et al. [1] report the first detection of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Germany owing to the presence of a VIM-1-metallo- β -lactamase (MBL). To my knowledge, the first carbapenem-resistant *K. pneumoniae* from Germany owing to production of MBL was reported by Albert-Braun and Wichelhaus in 2006 in *Chemotherapie Journal* (the journal of the Paul-Ehrlich Society for Chemotherapy) [2]. It was isolated in August 2004 from the urine of a patient who had been pre-treated with ampicillin/sulbactam, meropenem, vancomycin, ciprofloxacin, metronidazole, fluconazole and voriconazole. Mini-

mum inhibitory concentrations (MICs) for aztreonam, meropenem and imipenem were determined by Etest. MBL was detected by testing imipenem alone and with ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) [3]. This strain had a MIC of >32 mg/L against meropenem and imipenem. Addition of EDTA did not change the MIC. Its MIC against aztreonam was 0.5 mg/L. The authors also describe a second patient with carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*.

In the same journal, Burak et al. report an outbreak due to carbapenem-resistant *K. pneumoniae* in an Intensive Care Unit [4]. The authors collected strains isolated from February 2002 to March 2004. They report two different strains. The first strain was isolated in 2002 and was sensitive to carbapenems, whereas the second strain isolated in 2004 was resistant to imipenem (MIC = 8 mg/L). This resistance was due to changes in outer membrane porins.

Furthermore, Timmerbeil et al. report another carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strain [5]. This strain had a MIC of 32 mg/L against imipenem and ertapenem and its MIC against meropenem was 8 mg/L. The mechanism of resistance was not elucidated [5].

Funding: No funding sources.

Competing interests: An honorarium was received from Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (publisher) for editorship of *Chemotherapie Journal*, and from Pohl-Boskamp and Janssen-Cilag for talks given in 2007/2008.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Weile J, Ohler S, Schönthal S, Knabbe C, A VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in an acute hospital in Germany. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:389–91.
- [2] Albert-Braun S, Wichelhaus TA. Nachweis von zwei Carbapenem-resistenten Enterobacteriaceae-Isolaten in einem deutschen Krankenhaus. *Chemotherapie J* 2006;15:13–6 [in German].
- [3] Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40:2755–9.
- [4] Burak S, Engelhart S, Exner M, Marklein G, Purr I, Putensen C, et al. Nosokomiale Ausbrüche multiresistenter *Klebsiella-pneumoniae*-Stämme auf Intensivstationen. *Chemotherapie J* 2006;15:12–8 [in German].
- [5] Timmerbeil BS, Saager B, Scherpe S, Stürenburg E, Heisig P. Nachweis eines Carbapenem-resistenten *Klebsiella-pneumoniae*-Isolats in Norddeutschland. *Chemotherapie J* 2007;16:186–8 [in German].

Pramod M. Shah*

Gutzkowstrasse 69, Frankfurt 60594, Germany

*Tel.: +49 69 6657 5950.

E-mail address: infektiologie@online.de

28 April 2009

doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.04.013

Multidrug resistance related to class 1 integrons in human *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates and emergence of atypical *sul3*-associated integrons

Sir,

Salmonella enterica serotype Typhimurium is one of the leading causes of food-borne disease in developed countries. Multidrug resistance, which is generally linked to the presence of integrons and is often related to antibiotic use in food animals, has been increasingly reported in this serovar within the last 20 years [1]. Integrons are versatile genetic elements that play an important role in the dissemination of multidrug-resistant (MDR) Gram-negative microorganisms and in the co-selection of resistance. Most integrons found in clinical isolates of *Salmonella* spp., as in other Enterobacteriaceae, belong to class 1 and possess the *sul1* sulphonamide resistance gene in the 3' conserved segment (3'CS)

Author's personal copy

382

Letters to the Editor / International Journal of Antimicrobial Agents 34 (2009) 380–393

Table 1
Features of the 56 class 1 integron-carrying (*int1*-positive) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates recovered between 2004 and 2006.

Integron profile ^a	Resistance phenotype ^b	Phage type
I (2 kb/ <i>bla</i> _{OXA-1} - <i>aadA1</i>)	A(Amc)TSt/SpSulCNf (n = 32) ATSt/SpSulCNfSxt (n = 1)	104b (10); 120 (1); 193 (1); 204c (1); NT (13); RDNC (6) 104b
Ib (2 kb/ <i>bla</i> _{OXA-1} - <i>aadA1</i> ; 1.6 kb/ <i>aadA1</i> - <i>dfrA1</i>)	ATSt/SpSulCNfSxt (n = 1) AAmcTSt/SpSulCNfSxtGenTb (n = 2)	RDNC RDNC
II (1 kb/ <i>aadA2</i> ; 1.2 kb/ <i>bla</i> _{PSE-1}) ^c	A(Amc)TSt/SpSulC (n = 10) ATSt/SpSulCSxt (n = 2) ATSt/SpSulCNalK (n = 1)	104 (1) ^d ; U302 (4) ^e ; NT (4); RDNC (1) U302 (1); NT (1) U311
III (1.2 kb/ <i>bla</i> _{PSE-1}) ^c	AAmcTSulC (n = 2)	U311
No amplicon (<i>dfrA12</i> ; <i>aadA2</i> ; <i>cmlA1</i> ; <i>aadA1</i> ; <i>sul3</i>) ^f	ATSt/SpSulCSxt (n = 1) AST/SpSulCSxt (n = 1) TSt/SpSulCSxt (n = 2) TSt/SpSulCSxtK(n = 1)	RDNC 120 120 (1); 104b (1) 120 ^d

PCR, polymerase chain reaction; NT, non-typeable; RDNC, reaction-does-not-conform.

^a In parentheses, size of amplicons and resistance genes inserted in the variable region of class 1 integrons amplified by PCR using 5'CS and 3'CS primers [4]: *bla*_{OXA-1} and *bla*_{PSE-1}, β-lactam resistance; *aadA1* and *aadA2*, streptomycin and spectinomycin resistance; *dfrA1* and *dfrA12*, trimethoprim resistance; *cmlA1*, chloramphenicol resistance; *sul3*, sulphonamide resistance.

^b Resistance phenotypes: A, amoxicillin; Amc, amoxicillin/clavulanic acid; T, tetracycline; St, streptomycin; Sp, spectinomycin; Sul, sulphonamides; C, chloramphenicol; Nf, nitrofurantoin; Sxt, trimethoprim/sulfamethoxazole; Gen, gentamicin; Tb, tobramycin; Nal, nalidixic acid; K, kanamycin.

^c All isolates were positive for *tet(G)* and *floR*.

^d Isolates belonging to monophasic variant.

^e Included one isolate presenting *bla*_{TEM-1} (β-lactam resistance).

^f No amplicons generated by PCR with 5'CS and 3'CS primers. Resistance genes carried by the integron were identified by PCR mapping assays and nucleotide sequencing.

[2]; however, atypical *sul3*-associated integrons containing several different cassette arrays have recently been described [3]. In this work, we investigated the frequency, features and molecular epidemiology of class 1 integron-carrying human *S. Typhimurium* isolates from our geographical area.

The 92 non-duplicate clinical isolates of *S. Typhimurium* (including 3 isolates of the [4,(5),12;:-] monophasic variant) collected at our laboratory between 2004 and 2006 from patients from the Health Region of Terres de l'Ebre (north-eastern Spain) were screened for the presence of class 1 integrons by polymerase chain reaction (PCR) amplification using specific primers aimed to detect the *int1* gene. The number of integrons and the size of their variable region (VR) were analysed by PCR employing the 5'CS and 3'CS set of primers [4]. Gene integron content within the VR of class 1 integrons was assessed by PCR using 5'CS or 3'CS primers in combination with a number of specific primers that targeted resistance genes known to be associated with integrons. Gene content was subsequently confirmed by nucleotide sequencing. Class 1 integrons were present in 54 biphasic and 2 monophasic variant *S. Typhimurium* isolates (78.9% of MDR isolates and 60.9% of total isolates) recovered over the study period. The features of these 56 isolates are summarised in Table 1. Only four different VR and four different integron profiles were identified among the 51 strains exhibiting *sul1*-type class 1 integrons. Overall, the 2 kb *bla*_{OXA-1}-*aadA1* was the most prevalent VR, observed in 36 strains (39.1% of total strains and 64.3% of *int1*-positive strains). The 15 remaining isolates (16.3% of total isolates and 26.8% of *int1*-positive isolates) harboured the 1.2 kb *bla*_{PSE-1} VR integron, almost always accompanied by a second 1 kb integron containing *aadA2* VR, and the resistance determinants *tet(G)* and *floR*, which are characteristic of the chromosomal *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) carried by the worldwide spread MDR *S. Typhimurium* strains belonging to phage type 104 [1]. These results corroborate that *S. Typhimurium* isolates bearing the plasmid-borne 2 kb *bla*_{OXA-1}-*aadA1* integron have become endemic in Spain [5] and are displacing pandemic SGI1 isolates to second place. DNA fingerprinting of 86 typical class 1 integron-carrying isolates (the 51 isolates recovered between 2004 and 2006 and 35 of the 43 PSE-1- or OXA-1-producing isolates recovered during 2000 and 2001 [4]) was performed by enterobacterial repetitive intragenic consensus (ERIC)-PCR and repetitive

extragenic palindromic (REP)-PCR [6]. Combined ERIC- and REP-PCR patterns revealed six different genotypes and, interestingly, most isolates (79%), irrespective of their integron profile, phage type or year of isolation, were ascribed to a main genotype, whilst the five minority genotypes were specific of a certain integron profile and were only discovered in non-typeable or reaction-does-not-conform (RDNC) isolates. These findings suggest that multidrug resistance related to class 1 integrons in *S. Typhimurium* isolates from our geographical region is mainly due to the spread of a predominant clone, although horizontal transfer of genetic resistance elements may have also contributed.

Finally, four biphasic and one monophasic *S. Typhimurium* isolates (5.4% of the total isolates) that were positive for *int1* but failed to generate amplicons with the 5'CS and 3'CS primers were found. The five isolates were positive for *sul3*, and nucleotide sequencing of amplicons yielded by PCR mapping assays demonstrated that they possessed a class 1 integron with an unusual 3' end and the following structure: 5'CS-*dfrA12*-*orfF*-*aadA2*-*cmlA1*-*aadA1*-*qacH*-IS440-*sul3*. This integron was identical to the integron located in large conjugative epidemic plasmids recently reported in Portuguese MDR isolates of *S. Typhimurium*, *S. Rissen*, *S. Haifa* and IIIb:65:lv:enx215 from different sources, including human samples [3], and in a Thai *S. Stanley* isolate from swine [7]. To our knowledge, this is the first description of such atypical class 1 integrons among Spanish isolates of *S. enterica*.

In summary, the high prevalence of multidrug resistance in human *S. Typhimurium* isolates from our health region is strongly associated with the presence of class 1 integrons, particularly with the 2 kb integron containing *bla*_{OXA-1}-*aadA1* VR, and is chiefly attributable to the spread of a predominant clone. Furthermore, the emergence of MDR *S. Typhimurium* isolates carrying unusual class 1 integrons linked to *sul3*, which had not previously been documented in Spain, represents an additional threat to public health.

Acknowledgments

The authors thank M. Pilar Cid Ventura and Carmen López Escorihuela for their excellent technical support in the conduct of this study as well as Donna Pringle for editorial assistance. They are

Author's personal copy

Letters to the Editor / International Journal of Antimicrobial Agents 34 (2009) 380–393

383

grateful to the Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain) for serotyping and phage typing of *Salmonella* isolates. JR is supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Spain) (project CP05/0130).

Funding: This work was partially supported by Fundació Dr Ferran (2004 Research on Health Sciences Grant).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:141–8.
- [2] Sabaté M, Prats G. Structure and function of integrons [in Spanish]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:341–5.
- [3] Antunes P, Machado J, Peixe L. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1545–8.
- [4] Pérez-Moreno MO, Carulla-Pont M, Pérez-Moreno M, Jardí-Baiges AM, Llovet-Lombarte MI, Tejedor-Ganduxé X, et al. Class 1 integrons among *Salmonella enterica* isolates producing different types of β -lactamases from the health region of Tortosa (Spain) [in Spanish]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23:259–65.
- [5] Herrero A, Rodicio MR, Echeitia MA, Mendoza MC. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pJOU-StVR): a new multidrug-resistant group endemic in Spain. *Int J Med Microbiol* 2008;298:253–61.
- [6] Vila J, Marcos MA, Jiménez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* 1996;44:482–9.
- [7] Chuanchuen R, Koowatananukul C, Khemtong S. Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008;39:419–24.

Mar Olga Pérez-Moreno^{a,*}
 María José Centelles-Serrano^a
 María Cortell-Ortolá^a
 Joaquim Ruiz^{b,c}
 Maria Isabel Llovet-Lombarte^a
 Anna Maria Jardí-Baiges^a
 Isabel Fort-Gallifa^a

^a Servicio Análisis Clínicos, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, C/Esplanetes s/n, 43500 Tortosa, Tarragona, Spain

^b Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), IDIBAPS/Hospital Clinic, Barcelona, Spain

^c CIBER, Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

* Corresponding author. Tel.: +34 977 519 103.

E-mail address: marolga@terra.es (M.O. Pérez-Moreno)

10 February 2009

doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.05.001

Clearance of intravenous 5-fluorocytosine during continuous venovenous haemodiafiltration in a patient with hepatosplenic candidiasis

Sir,

One of the oldest antifungal agents remaining in use is 5-fluorocytosine (flucytosine; 5-FC), a fluorinated analogue of cytosine. 5-FC itself has no antifungal activity but it rapidly penetrates into fungal cells and is converted to 5-fluorouracil leading to the inhibition of fungal DNA and RNA synthesis. Many yeasts (including *Candida* and *Cryptococcus* spp.), *Aspergillus* spp. and chromomycosis-causing dematiaceous fungi are susceptible to 5-FC [1]. 5-FC is now mostly used as dual or rescue therapy owing to the frequent development of resistance when used as monotherapy. Therapeutic drug monitoring (TDM) is recommended to optimise dosing and is essential to minimise the development of toxicities, including bone marrow suppression and hepatotoxicity.

Like other hydrophilic drugs, appropriate dosing of 5-FC is particularly challenging in critically ill patients. 5-FC has high oral bioavailability (76–89%) and a half-life ($t_{1/2}$) of 3–4 h in patients with normal renal function where 90% of drug clearance occurs [2]. In patients with renal failure, the $t_{1/2}$ can increase to 85 h, which can complicate dosing in patients with renal dysfunction or receiving dialysis [3]. We are unaware of any data to guide dose reduction during continuous venovenous haemodiafiltration (CVVHDF), a form of continuous renal replacement therapy used in critically ill patients.

Recently, we prescribed 5-FC as rescue therapy for hepatosplenic candidiasis in a 36-year-old woman with stage IVB Hodgkin's lymphoma (weight 75 kg, height 172 cm). She presented to our multidisciplinary Intensive Care Unit with an enlarging mediastinal mass and respiratory failure requiring invasive ventilation. After receiving induction chemotherapy (ifosfamide, carboplatin, etoposide and methylprednisolone), she developed profound neutropenia (>14 days) in addition to multiple organ dysfunction syndrome including acute kidney injury requiring CVVHDF. Following recovery of her white cell count her course was complicated by persistent multiorgan failure. *Candida lusitanae* was cultured from blood and ascitic fluid. Abdominal imaging revealed multiple, poorly attenuating lesions in the liver and spleen owing to metastatic fungal infection. Treatment with intravenous (i.v.) caspofungin (70 mg loading dose followed by 50 mg daily) was commenced for 3 days, and 5-FC (25 mg/kg; 1875 mg i.v. every 6 h) was then added as rescue therapy.

During a 6-h dosing interval on Day 2 of therapy (sixth dose), four plasma samples were drawn for TDM (Fig. 1). Throughout this period the patient remained on CVVHDF (Nephral ST, AN69 membrane, surface area 1.05 m²; Gambro) (pump speed 200 mL/min, dialysis flow rate 1000 mL/h, ultrafiltration rate 2000 mL/h).

The plasma pharmacokinetic data for 1875 mg 5-FC administered every 6 h as a 30-min i.v. infusion were as follows: maximum concentration (C_{max}) 120 mg/L (suggested TDM targets 50–100 mg/L); minimum concentrations (C_{min}) 74 mg/L and 82 mg/L, respectively (suggested TDM targets 25–50 mg/L); terminal elimination half-life ($t_{1/2}$) 12.6 h; elimination rate constant (k_{el}) 0.055 h; total clearance (CL_{tot}) 3.15 L/h; and apparent volume of distribution during terminal phase (V_z) 57.3 L (or 0.76 L/kg). To our knowledge, this is the first report of the pharmacokinetics of 5-FC during CVVHDF. Our data suggest that given the half-life published from data in healthy patients with normal renal function (3–4 h [2]), a dose of 25 mg/kg every 12 h could be considered appropriate for use in patients with oliguric acute (or chronic) kidney injury receiving CVVHDF with similar settings to those described here.

Funding: This research was supported in part by a grant from the Australian National Health and Medical Research Council, Australia (NHMRC Project Grant 519702). The funding source had no role in

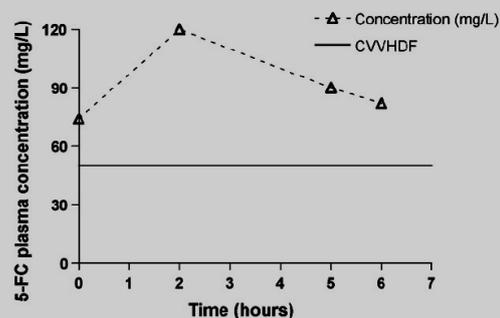


Fig. 1. Changes in plasma concentration of 5-fluorocytosine (5-FC) versus time for one dose interval (dose 1875 mg every 6 h). CVVHDF, continuous venovenous haemodiafiltration.

Otros resultados relacionados con el artículo 1 no incluidos en la publicación

Probable adquisición in vivo de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en un aislado de *S. Typhimurium* multirresistente (Resultados presentados en el XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica .Resumen en *Enferm Infecc Micrbiol Clin* 2010 (Espec Cong 1): 237-238).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los genes implicados en la adquisición *in vivo* de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, cefoxitina y amoxicilina-clavulánico en una cepa de *S. Typhimurium* fagotipo U311 aislada de una muestra fecal de una paciente con gastroenteritis.

Uno de los aislados de *S. Typhimurium* incluido en el artículo 1, perteneciente al fagotipo U311, con perfil de integrones (1 kb/aadA2 + 1,2 kb/*bla*_{PSE-1}), *flor* y *tetG* positivo y resistencia a amoxicilina, estreptomycin, espectinomycin, tetraciclina, cloranfenicol, sulfamidas, ácido nalidíxico y sensibilidad disminuida a ciprofloxacino, se recuperó en el año 2006 a partir de las heces de una paciente de cinco meses atendida en el servicio de urgencias del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta e ingresada en el servicio de pediatría por gastroenteritis con fiebre (aislado A). Se inició tratamiento con fosfomicina y diez días después, al no remitir la diarrea, se cursó otro coprocultivo del que se aisló nuevamente *S. Typhimurium* con idéntico antibiograma, por lo que se cambió el tratamiento a amoxicilina/ácido clavulánico que se pautó durante una semana. Veintitrés días más tarde se aisló en un coprocultivo de control *S. Typhimurium* del fagotipo U311 que presentaba resistencia adicional a ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina y amoxicilina/ácido clavulánico (aislado B). Los patrones obtenidos por ERIC, REP-PCR y electroforesis en campo pulsado con *SpeI* y *XbaI* (Sáenz et al 2004) eran indistinguibles en los aislados A y B, que pertenecían a la secuencia tipo ST19. Se demostró mediante PCR y secuenciación (Stapleton et al 1999; Pérez-Pérez et al 2002) que el aislado B presentaba el mismo perfil de integrones que el aislado A y que poseía el gen *bla*_{CMY-2}, codificante de una AmpC plasmídica, en el siguiente entorno genético: *ISEcp1* + *bla*_{CMY-2} + *blc*. Se realizaron ensayos de conjugación en medio líquido empleando la cepa *E. coli* J53 resistente a azida como receptora y los aislados A y B como donantes y sólo se obtuvieron transconjugantes del aislado B que portaban la estructura *ISEcp1* + *bla*_{CMY-2} + *blc*, pero en los cuales no se detectó la presencia de integrones; los transconjugantes eran resistentes a amoxicilina, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina y amoxicilina/clavulánico y sensibles a estreptomycin, espectinomycin, tetraciclina, cloranfenicol, sulfamidas, ácido nalidíxico y ciprofloxacino. El tipado plasmídico por Plasmid-based-replicon-typing (Carattoli et al 2005; García-Fernández et al 2009) reveló la presencia de un plásmido de tipo colE_{TP} en los aislados A

y B, así como la de un plásmido del grupo IncK en la cepa B y sus transconjugantes, en el que presumiblemente está ubicado el gen *bla*_{CMY-2}, aunque está pendiente demostrarlo mediante ensayos de hibridación.

Los hallazgos presentados son sugestivos de la adquisición horizontal *in vivo* en el curso del tratamiento con amoxicilina/clavulánico de un plásmido portador de *bla*_{CMY-2}, probablemente a partir de otros microorganismos de la flora intestinal de la paciente, por parte de un aislado multirresistente de *S. Typhimurium* fagotipo U311 con un genotipo de resistencia característico de la SG11.

ARTÍCULO 2

β -lactamasas, genes *qnr* y resistencia antibiótica mediada por integrones de clase 1 en aislados de origen humano de *Salmonella* enterica de serotipos diferentes al Typhimurium (trabajo remitido para su publicación a *International Journal of Antimicrobial Agents*)

En el presente trabajo se investigó la prevalencia y las características de los integrones de clase 1 en los aislados clínicos de origen humano de *S. enterica* de serotipos distintos al Typhimurium (se consideró un único aislado por paciente o brote conocido) recuperados en el laboratorio de microbiología del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta en los 10 primeros meses de 2001 y entre 2004 y 2009, así como las β -lactamasas producidas por los aislados resistentes a amoxicilina y la presencia de determinantes *qnr*.

Se incluyeron en el estudio 382 aislados, de un total de 632 aislados de *S. enterica*, de los que 272 correspondían al serotipo Enteritidis y 110 a otros 40 serotipos diferentes.

132 aislados (34,6%) fueron sensibles a todos los antibióticos estudiados, 187 fueron resistentes a uno o dos grupos de antibióticos (49%) y 63 (16,5%) presentaron resistencia a tres o más familias de antimicrobianos y fueron considerados multirresistentes. Los antibióticos que mostraron las tasas más altas de resistencia fueron ácido nalidíxico (41,1%), amoxicilina (24,3%), tetraciclina (17,5%), estreptomycin (14,2%), sulfamidas (11%) y cotrimoxazol (9,9%). TEM-1 fue la β -lactamasa más común entre los aislados resistentes a amoxicilina (84/93); se detectó la producción de una β -lactamasa de espectro extendido en cuatro aislados (CTX-M-9 en un aislado de *S. Virchow* y otro de *S. Grumpensis*, CTX-M-15 en un aislado de *S. Kapemba* y SHV-12 en un aislado de *S. Enteritidis*) y la de la cefamicinasa plasmídica DHA-1 en un aislado de *S. Newport*, mientras que en cuatro aislados (tres *S. Rissen* y una *S. Mikawasima*) no se identificó ninguna de las β -lactamasas investigadas. Esta es la primera descripción de β -lactamasas de espectro extendido en los serotipos Kapemba y Grumpensis. El 39,3% de los aislados presentaron sensibilidad disminuida a ciprofloxacino y tres aislados del serotipo Kentucky procedentes de pacientes que habían viajado al Norte de África fueron resistentes (CMI > 2 mg/L), mientras que se identificaron determinantes *qnr* en el aislado de *S. Grumpensis* productor de CTX-M-9 (*qnrA1*) y en el de *S. Newport* productor de DHA-1 (*qnrB4*).

Se demostró la presencia de integrones de clase 1 en 35 aislados (9,2%) que pertenecían a 15 serotipos distintos, entre ellos Kapemba, Mikawasima y [9,12:lv:i:-] en los que nunca se había descrito la presencia de integrones. La frecuencia de aparición de integrones de clase 1 fue significativamente más elevada en los aislados multirresistentes que en los no

multirresistentes (54% vs 0.3%; $p < 0,0001$) y de hecho todos los aislados que albergaban integrones, excepto uno, fueron multirresistentes. Se identificaron 11 integrones distintos (ocho integrones típicos asociados a *sul1*, dos atípicos asociados a *sul3* y un integrón que carecía de *sul1* y *sul3*), siendo los de región variable *dfrA1-aadA1*, *dfrA17-aadA5* y *dfrA12-orfF-aadA2* los más prevalentes y ampliamente distribuidos entre distintos serotipos. Siete integrones se detectaron en un único serotipo: *dfrA7* (*S. Enteritidis*), *aadA2* (*S. Derby*), *aadB-aadA2* (*S. Grumpensis* productora de CTX-M-9), *dfrA16-aadA2* (*S. Virchow* productora de CTX-M-9), *aadA13-sat* (*S. Grumpensis*) y los dos integrones atípicos asociados a *sul3* de estructura 5'CS-*dfrA12-orfF-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-IS440-sul3* (tres aislados de *S. Enteritidis*) y 5'CS-*estX-psp-qacH-IS440-sul3* (dos aislados de *S. Rissen*). Dos de estos integrones (los de región variable *aadA13-sat* y *estX-psp*) no se habían descrito previamente en *S. enterica*. El entorno genético de *bla*_{CTX-M-9} era compatible con el de un integron complejo en los dos aislados productores de esta enzima ya que en ambos se comprobó la presencia de *sul1* y de *ISCR1* (*orf513*) upstream de *bla*_{CTX-M-9}.

Se consiguió la transferencia de los integrones por conjugación en 17 de los 35 aislados. La resistencia a β -lactámicos (incluidas cefalosporinas de amplio espectro), a ciprofloxacino mediada por *qnr* y prácticamente siempre a tetraciclina se cotransfirieron con los integrones. Los plásmidos identificados en los transconjugantes que albergaban integrones pertenecían en su mayoría a los grupos de incompatibilidad IncK e IncN.

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Antimicrobial Agents
Manuscript Draft

Manuscript Number: IJAA-D-11-00740

Title: β -lactamases, qnr genes and class 1 integron-mediated antibiotic resistance in human clinical *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes.

Article Type: Original Article

Keywords: Human clinical isolates; non-Typhimurium *Salmonella enterica* serotypes; β -lactamase; qnr; antimicrobial resistance; class 1 integrons.

Corresponding Author: Dr. Mar Olga Pérez- Moreno,

Corresponding Author's Institution: Hospital de Tortosa Verge de la Cinta

First Author: Mar Olga Pérez- Moreno

Order of Authors: Mar Olga Pérez- Moreno; Isabel Fort-Gallifa; Ester Picó-Plana; María de Toro; María Jesús Pons; Cláudia Gomes; Yolanda Sáenz; Joaquim Ruiz; Carmen Torres; Anna Jardí-Baiges

Abstract: The aim of this work was to investigate the occurrence and features of class 1 integrons among 382 clinical *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes, as well as to screen for qnr genes and to characterize the β -lactamases produced by amoxicillin-resistant isolates. These isolates were recovered in 2001 and between 2004 and 2009 from patients from the health-region of Terres de l'Ebre (Catalonia, Spain) and comprised 41 different serotypes, mostly of *S. Enteritidis* (n=272), being 16.5% (n= 63) multidrug resistant (MDR). Among the 93 amoxicillin-resistant isolates, 84 produced TEM-1, four produced an extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-9 in a *S. Grumpensis* isolate and in a qnrA1-harboursing *S. Virchow*, CTX-M-15 in *S. Kapemba* and SHV-12 in *S. Enteritidis*), one produced DHA-1 (qnrB4-positive *S. Newport*) and none of the investigated β -lactamases was detected in four isolates. Overall, 35 isolates (9.2%) belonging to 15 different serotypes carried class 1 integrons that were transferred by conjugation in 17 isolates. MDR and resistance to amoxicillin, cefotaxime, ceftazidime, tetracycline, streptomycin, gentamicin, tobramycin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole and sulphonamides were strongly associated with class 1 integrons. Eleven distinct cassette arrays were identified within integrons, with dfrA1-aadA1, dfrA17-aadA5 and dfrA12-orfF-aadA2 being the most prevalent and widely distributed ones. Atypical sul3-associated integrons were detected in five isolates of serotypes Rissen and Enteritidis. Moreover, the presence of integrons in serotypes Kapemba, Mikawasima and [9,12:lv:i:-], of the aadA13-sat and estX-psp (linked to sul3) cassette arrangements in *S. enterica* and of extended-spectrum β -lactamases in *S. Kapemba* and *S. Grumpensis* is reported here for the first time.

A-M Geddes
Editor-in-Chief
International Journal of Antimicrobial Agents

4th September 2011

Dear Editor,

We are pleased to submit our manuscript entitled “ **β -lactamases, *qnr* genes and class 1 integron-mediated antibiotic resistance in human clinical *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes**”, which we would like to be considered for publication in the International Journal of Antimicrobial Agents.

I affirm that all named authors have read and approved the manuscript in its current form and that all those acknowledged as contributors have agreed to their inclusion. Further, the data have not been presented elsewhere and the manuscript is not under consideration for publication by any other journal

We look forward to your opinion as to the suitability of our manuscript.

Yours sincerely,

Mar Olga Perez-Moreno
Servei Anàlisis Clíniques,
Hospital de Tortosa Verge de la Cinta,
C/Esplanetes 44-58,
43500 Tortosa,
Spain
E-mail: marolgap@terra.es

***Competing Interest Declarations**

Journal: International Journal of Antimicrobial Agents

Author name: Mar Olga Pérez-Moreno

Declarations

The following additional information is required for submission. Please note that failure to respond to these questions/statements will mean your submission will be returned to you. If you have nothing to declare in any of these categories then this should be stated.

Please state any conflict of interests. A conflict of interest exists when an author or the author's institution has financial or personal relationships with other people or organisations that inappropriately influence (bias) his or her actions. Financial relationships are easily identifiable, but conflicts can also occur because of personal relationships, academic competition, or intellectual passion. A conflict can be actual or potential, and full disclosure to The Editor is the safest course.

Conflict of interests: none declared

Please state any sources of funding for your research

M. de T. has a predoctoral fellowship from the Instituto de Salud Carlos III of Spain (Ministerio de Ciencia e Innovación) (grant number FI08/00506).

J.R. has a Miguel Servet fellowship (CP05/0130) from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Spain)

Please state whether Ethical Approval was given, by whom and the relevant Judgement's reference number

Not required

If you are submitting a Randomized Controlled Trial, please state the International Standard Randomised Controlled Trial Number (ISRCTN)

*Manuscript

1 **β -lactamases, *qnr* genes and class 1 integron-mediated antibiotic resistance in**
 2 **human clinical *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes.**

3

4 Mar Olga Pérez-Moreno^{a,b}✉, Isabel Fort-Gallifa^{a,b}, Ester Picó-Plana^{a,b}, María de Toro^{c,d}, María Jesús
 5 Pons^e, Cláudia Gomes^e, Yolanda Sáenz^d, Joaquim Ruiz^{e,f}, Carmen Torres^{c,d}, Anna Jardí^{a,b}

6

7 ^a Servicio de Análisis Clínicos, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa, Spain

8 ^b Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain

9 ^c Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

10 ^d Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño,
 11 Spain.

^e Centre de Recerca en Salut Internacional (CRESIB), Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi
 i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic, Barcelona, (Spain).

^f CIBER, Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain.

✉ Mar Olga Pérez- Moreno

Servei Anàlisis Clíniques. Hospital de Tortosa Verge de la Cinta

C/Esplanetes s/n. 43500 Tortosa (Tarragona). Spain

Tf: 0034977519103

e-mail: marolgap@terra.es

12

13 **RUNNING TITTLE:** β -lactamases, *qnr* and integrons in non-Typhimurium *Salmonella enterica*

14

1

15 **ABSTRACT**

16 The aim of this work was to investigate the occurrence and features of class 1 integrons among 382 clinical
17 *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes, as well as to screen for *qnr* genes and to
18 characterize the β -lactamases produced by amoxicillin-resistant isolates. These isolates were recovered in
19 2001 and between 2004 and 2009 from patients from the health-region of Terres de l'Ebre (Catalonia,
20 Spain) and comprised 41 different serotypes, mostly of *S.* Enteritidis (n=272), being 16.5% (n= 63) multidrug
21 resistant (MDR). Among the 93 amoxicillin-resistant isolates, 84 produced TEM-1, four produced an
22 extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-9 in a *S.* Grumpensis isolate and in a *qnrA1*-harbouring *S.* Virchow,
23 CTX-M-15 in *S.* Kapemba and SHV-12 in *S.* Enteritidis), one produced DHA-1 (*qnrB4*-positive *S.* Newport)
24 and none of the investigated β -lactamases was detected in four isolates. Overall, 35 isolates (9.2%)
25 belonging to 15 different serotypes carried class 1 integrons that were transferred by conjugation in 17
26 isolates. MDR and resistance to amoxicillin, cefotaxime, ceftazidime, tetracycline, streptomycin,
27 gentamicin, tobramycin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole and sulphonamides were
28 strongly associated with class 1 integrons. Eleven distinct cassette arrays were identified within integrons,
29 with *dfrA1-aadA1*, *dfrA17-aadA5* and *dfrA12-orfF-aadA2* being the most prevalent and widely distributed
30 ones. Atypical *sul3*-associated integrons were detected in five isolates of serotypes Rissen and Enteritidis.
31 Moreover, the presence of integrons in serotypes Kapemba, Mikawasima and [9,12:lv:i:-], of the *aadA13-*
32 *sat* and *estX-psp* (linked to *sul3*) cassette arrangements in *S. enterica* and of extended-spectrum β -
33 lactamases in *S.* Kapemba and *S.* Grumpensis is reported here for the first time.

34

35 **Key words:** Human clinical isolates, non-Typhimurium *Salmonella enterica* serotypes, β -
36 lactamases, *qnr*, antimicrobial resistance, class 1 integrons.

37

38

39

40 1. INTRODUCTION

41 Non-typhoidal *Salmonella enterica* are one of the chief causes of food-borne disease in human related to
42 the ingestion of contaminated food products of animal origin (1). Although most cases of *S. enterica*
43 infections are confined to the gastrointestinal tract and are self-limiting, treatment of more serious or
44 invasive illness may be hampered by the increase in the occurrence of isolates exhibiting multidrug-
45 resistance (MDR) and particularly resistance to antimicrobials of relevance for treatment of severe human
46 infections, specially to fluoroquinolones and to extended-spectrum β -lactams (2, 3). Amounting evidences
47 demonstrate that, except for *S. Typhi*, the use of antimicrobials in food animals has been a major factor in
48 the development of decreased susceptibility to antibiotics in *Salmonella* (1, 4).

49 Over the past few years many investigations have highlighted the main role of integrons in the acquisition
50 and dissemination of MDR in *Salmonella* and other Gram-negative bacteria, owing to its ability to capture
51 one or more gene cassettes by an integrase-mediated site-specific recombination mechanism and its usual
52 location on mobile genetic elements carrying other resistance determinants. Among the five classes of
53 antibiotic-resistance-encoding integrons reported to date, each with its own integrase, class 1 integrons
54 are the commonest in clinical isolates (5). Class 1 integrons generally possess the *gacEA1* and *sul1* genes
55 conferring resistance to ammonium quaternary compounds and sulphonamides, respectively, in the
56 3' conserved segment (CS) (5). The most paradigmatic and exhaustively researched case of MDR associated
57 with integrons in *Salmonella* spp. is that of strains belonging to *S. Typhimurium* phage type 104 (DT104)
58 which have spread worldwide (4). However, class 1 integrons, including atypical *sul3*-associated integrons,
59 have also been reported in other *S. Typhimurium* phage types and, less frequently, in other serotypes of
60 different geographical origins (6,7) in which they contribute to the extent of antimicrobial resistance.

61 In a previous work we documented the high prevalence of integrons in human isolates of *S. Typhimurium*
62 and its monophasic variant from our geographical setting (8). The aim of the present work was to
63 investigate the occurrence and features of class 1 integrons among human antimicrobial-drug resistant
64 clinical *S. enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes from the health-region of Terres de l'Ebre

65 (Catalonia. Spain) as well as to screen for *qnr* genes and to characterize the β -lactamases produced by
66 amoxicillin-resistant isolates.

67

68 2. MATERIAL AND METHODS

69 **2.1. Bacterial isolates:** All human clinical isolates of *S. enterica* were consecutively collected at the
70 Microbiology Laboratory of Hospital de Tortosa Verge de la Cinta during the first ten months of 2001 and
71 between 2004 and 2009. Among a total of 632 *S. enterica* isolates, those 382 isolates belonging to
72 serotypes different to Typhimurium or its monophasic variant (77 from 2001 and 305 from 2004-2009)
73 were included in the study. Only one isolate per patient or per known outbreak was considered. The
74 isolates, that comprised 272 *S. Enteritidis* and 110 isolates of other 40 different serotypes (table 1), were
75 recovered from clinical specimens (374 faeces, 3 blood, 3 abscesses, 1 ascitic fluid and 1 urine) from
76 patients attending either the referral hospital or any of the associated primary healthcare centres of the
77 health region of Terres de l'Ebre (north-eastern Spain). Isolates were identified by conventional
78 biochemical methods and serotyped at the National Reference Centre for *Salmonella* and *Shigella*
79 (Majadahonda. Madrid. Spain).

80 **2.2. Antimicrobial susceptibility:** In vitro susceptibility to amoxicillin, cefoxitin, ceftazidime, cefotaxime,
81 cefepime, tetracycline, streptomycin, spectinomycin, chloramphenicol, a sulphonamide compound
82 (sulfadiazine, sulfathiazole and sulfamerazine sodium), trimethoprim/sulfamethoxazole, nalidixic acid,
83 ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, kanamycin and nitrofurantoin was studied by the WIDER
84 commercial microdilution system using the 95W and 93W panels (Soria Melguizo. Madrid Spain) or by the
85 disk diffusion method following the guidelines and criteria of the CLSI (9). A double-disk synergy test was
86 performed with amoxicillin/clavulanic acid disks placed 30 mm apart from cefotaxime, ceftazidime,
87 cefepime and aztreonam disks to detect extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in all isolates showing
88 decreased susceptibility to broad-spectrum cephalosporins.

89 **2.3. Detection of class 1 integrons and of resistance genes:** PCR amplification followed by nucleotide
90 sequencing was performed under conditions and with primers previously described to screen for genes
91 encoding TEM, OXA-1, SHV and PSE-1 (10) in all amoxicillin-resistant isolates and also to screen for genes
92 encoding CTX-M (11) and plasmid-mediated AmpC β -lactamases (12) in those with decreased
93 susceptibility to extended-spectrum cephalosporins. *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* (plasmid-mediated quinolone
94 resistance) genes were examined by PCR and sequencing (10) in isolates showing the classic resistance
95 phenotype [susceptibility to nalidixic acid (MIC \leq 16 mg/L) together with diminished susceptibility to
96 ciprofloxacin (MIC $>$ 0.06 mg/L)] (13) and in isolates with reduced susceptibility to broad-range
97 cephalosporins because of the frequent association of genes coding for ESBLs. The genetic environment of
98 the *bla*_{CTX-M-9} genes was determined by PCR and sequencing with specific primers designed according to
99 reported surrounding structures (11).

100 The presence of class 1 integrons was investigated in all isolates resistant to at least one antibiotic by PCR
101 amplification aimed to detect the *int1* gene as well as the *sul1*, *sul3* and *qac Δ 1* genes linked to 3' CS of
102 class 1 integrons (10). Gene content within the variable region (VR) of class 1 integrons was assessed by
103 PCR and subsequent nucleotide sequencing using the 5'- and 3'- CS set of primers (10) or by PCR mapping
104 assays followed by nucleotide sequencing, employing 5'CS or *sul3* forward primers in combination with
105 primers targeting resistance genes known to be associated with integrons.

106 Template DNA of all isolates was prepared with the whole cell boiled lysate procedure and final products of
107 PCR assays were resolved by gel electrophoresis on 1.5% agarose gels with 0.5 g/L of ethidium bromide.

108 **2.4. Conjugation assays and analysis of integron-carrying plasmids**

109 Transfer of class 1 integrons was tested by conjugation experiments carried out in Luria–Bertani broth
110 using the azide-resistant *Escherichia coli* J53 as the recipient strain and all integron-carrying *Salmonella*
111 isolates as donor strains. Transconjugants were selected on trypticase soy agar plates containing 150 mg/L
112 sodium azide and 100 mg/L amoxicillin or 350 mg/L sulphadiazine. The resistance phenotype and the
113 presence and content of class 1 integrons in transconjugants were assessed as described above. Detection

114 and classification of plasmids according to their incompatibility group was accomplished by a series of PCR
115 assays as described by Carattoli et al (14) in transconjugants obtained from selected isolates representing
116 each of the different combinations of serotypes and integrons identified in this study.

117 2.5. Statistical analysis:

118 χ^2 or exact Fisher tests were applied to study the relationship between qualitative variables. Differences
119 were considered significant at $p \leq 0.05$.

120 3. RESULTS

121 3.1. Antimicrobial susceptibility and resistance genes

122 The percentage of isolates resistant to the antibiotics studied and the β -lactamases and *qnr* determinants
123 detected among the different serotypes identified in this work are shown in table 1. Sixty-three isolates
124 (16.5%) exhibited resistance to three or more antimicrobial families and were considered MDR. The
125 antibiotics showing the highest rates of resistance were nalidixic acid (41.1%), amoxicillin (24.3%),
126 tetracycline (17.5%), streptomycin (14.2%), sulphonamides (11%) and trimethoprim/sulfamethoxazole
127 (9.9%). The most common resistance patterns were single resistance to nalidixic acid (112; 41.2%) or
128 amoxicillin (38; 14%) in *S. Enteritidis* isolates and resistance to amoxicillin, tetracycline, streptomycin and
129 nalidixic acid (8; 7.3 %); to amoxicillin, tetracycline, streptomycin, chloramphenicol,
130 trimethoprim/sulfamethoxazole and sulphonamides (7; 6.4%) or to amoxicillin, streptomycin,
131 trimethoprim/sulfamethoxazole and sulphonamides (6; 5.5%) for the remaining serotypes. Statistical
132 analysis did not show any significant changes in the frequency of MDR or in resistance to individual
133 antibiotics over the period investigated, except for resistance to nalidixic acid in *S. Enteritidis* isolates,
134 which dropped from 49.3% in 2001 to 15.8% ($p = 0,002$) in 2009.

135 Eighty-four of the 93 amoxicillin-resistant isolates were TEM-1 producers. SHV-12, CTX-M-9 and CTX-M-15
136 ESBLs were detected in one isolate of *S. Enteritidis*, two isolates of serotypes Virchow and Grumpensis, and
137 one isolate of *S. Kapemba* from an abdominal abscess, respectively, whereas another isolate of *S. Newport*

6

138 was found to produce the AmpC β -lactamase DHA-1 and the presence of none of the β -lactamases
139 investigated could be demonstrated in four isolates (three *S. Rissen* and one *S. Mikawasima*) although
140 phenotypic resistance to amoxicillin was confirmed repeatedly.

141 The structure of the genetic environment of *bla*_{CTX-M-9} was consistent with that of complex class 1 integrons
142 in the two positive isolates (*S. Virchow* and *S. Grumpensis*), and specifically with that of the In60 complex
143 integron in *S. Virchow* (15). The *sul1* gene and the *ISCR1* element (*orf513*) were detected upstream of
144 *bla*_{CTX-M-9} in both isolates, whereas the *orf3*-like sequence followed by *orf1005* was detected downstream of
145 the *bla*_{CTX-M-9} only in the *S. Virchow* isolate.

146 Complete resistance to ciprofloxacin (MIC ≥ 2 mg/L) was observed only in the three isolates belonging to
147 serotype Kentucky and recovered from patients having travelled to Northeast African countries, but 147 of
148 the 157 nalidixic acid-resistant isolates showed decreased susceptibility to ciprofloxacin (MICs ranged from
149 0.12 to 1 mg/L). Qnr determinants were only identified in two broad-spectrum cephalosporin-resistant
150 isolates, specifically in *S. Grumpensis* (*qnrA1*) and in *S. Newport* (*qnrB4*) that appeared susceptible to
151 nalidixic acid and whose MIC of ciprofloxacin was 1 mg/L.

152 3.2. Detection and characterization of class 1 integrons

153 The distribution of integrons amongst the different *S. enterica* serotypes and the features of integron-
154 carrying isolates are summarized in tables 1 and 2, respectively. In total, 35 isolates (9.2%), belonging to 15
155 different *S. enterica* serotypes, were positive for *int11* and 29 of them carried typical class 1 integrons, while
156 five isolates presented atypical class 1 integrons linked to *sul3* and one lacked both *sul1* and *sul3*. The
157 occurrence of class 1 integrons remained steady along the study period, although in *S. Enteritidis* these
158 elements were only present in isolates recovered in 2005, 2006 and 2007.

159 Occurrence of class 1 integrons was significantly higher in MDR isolates than in non-MDR isolates (54% vs
160 0.3%; $p < 0.0001$), indeed all but one of the integron-bearing isolates were MDR. Non-susceptibility was
161 significantly associated with the presence of integrons not only for antibiotics for which resistance was

162 conferred by genes inserted in their VR (i.e: streptomycin/spectinomycin [*aadA1*, *aadA2*, *aadA5* and
 163 *aadA13*], gentamicin/tobramycin [*aadB*], trimethoprim [*dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA16* and *dfrA17*] and
 164 chloramphenicol [*cmIA1*]) but also for amoxicillin, cefotaxime, ceftazidime and tetracycline (table 3).

165 Overall, 11 different cassette arrangements were identified amongst class 1 integrons-carrying isolates,
 166 with *dfrA1-aadA1* being the most prevalent (31.4%) and the most widely distributed since it was detected
 167 in seven distinct serotypes, followed by *dfrA17-aadA5* and *dfrA12-orff-aadA2* (17.1% each) which were
 168 present in three and two different serotypes respectively. Seven cassette arrangements were noticed in a
 169 sole serotype, namely *dfrA7* (*S. Enteritidis*), *aadA2* (*S. Derby*), *aadB-aadA2* (CTX-M-9 producing *S.*
 170 *Grumpensis*), *dfrA16-aadA2* (CTX-M-9 producing *S. Virchow*), *aadA13-sat* (*S. Grumpensis*), and the two
 171 arrangements of the atypical *sul3*-associated integrons with the following structures: 5'CS-*dfrA12-orff-*
 172 *aadA2-cmIA1-aadA1-qacH-IS440-sul3* (three isolates of *S. Enteritidis*) and 5'CS-*estX-psp-qacH-IS440-sul3*
 173 (two isolates of *S. Rissen*). One *S. Grumpensis* harboured two integrons (*aadA13-sat* and *dfrA17-aadA5*
 174 arrangements).

175 3.3 Conjugative transfer and integron-carrying plasmids

176 Transfer of class 1 integrons by conjugation was only achieved in 50% of the isolates. The resistance
 177 profiles acquired by the transconjugants are shown in table 2. Resistance to β -lactams, including extended-
 178 spectrum cephalosporins, was systematically cotransferred with integrons and likewise occurred with
 179 diminished susceptibility to ciprofloxacin mediated by *qnrA1* in the CTX-M-9 producing *S. Grumpensis*
 180 isolate and almost always with resistance to tetracycline. Plasmids of five different replicon types were
 181 identified in integron-carrying transconjugants, with IncK and IncN that were detected simultaneously in
 182 transconjugants from five different serotypes, being the most prevalent (table 2).

183 4. DISCUSSION

184 The results of the present work demonstrate that, although to a lesser extent than in *S. Typhimurium* (8),
 185 MDR is quite common amongst human *S. enterica* isolates belonging to other serotypes recovered in our

186 geographical area and is often related to the presence of class 1 integrons. Observed resistances to
187 individual antimicrobial agents and MDR, which was scarce in S. Enteritidis, were comparable to those
188 reported in a global Spanish collection of human S. Enteritidis and S. Hadar isolates (2) but considerably
189 higher than those found for amoxicillin and nalidixic acid in S. Enteritidis from an European multicentre
190 survey carried out in 2009 (3). In the same line, Mølbak et al confirmed that quinolone resistance in Danish
191 patients suffering from S. Enteritidis infections was higher in those returning from Spain than in patients
192 with domestic-acquired infections or having travelled to other countries (16). Despite overt
193 fluoroquinolone-resistance being rare and confined to S. Kentucky, the elevated rate of resistance to
194 nalidixic acid (41%), almost always accompanied by decreased susceptibility to ciprofloxacin, encountered
195 in serotypes of predominant poultry origin was probably related to the past use of these compounds in this
196 field and is of real concern since it has been associated with reduced effectiveness of ciprofloxacin (17).
197 Emergence of fluoroquinolone resistance in isolates of S. Kentucky recovered from travelers returning
198 from northeast and eastern Africa has already been noticed by other authors (18). Further, plasmid-
199 mediated quinolone resistance owing to *qnr* genes, observed in two isolates, although apparently still rare
200 in S. enterica and generally associated with resistance to extended-spectrum cephalosporins, is
201 increasingly reported worldwide (13,19) and may favour the selection of mutants with high level of
202 resistance to quinolones. Nevertheless, we cannot rule out the possibility of the prevalence of the former
203 resistance mechanism having been underestimated in the present work, since, due to the criteria followed
204 to select screened isolates, some isolates fully resistant to nalidixic acid -which might harbour *qnr* genes in
205 addition to mutations in the *gyrA* or *parC* genes- could have been missed out, although this eventuality
206 seems to be very uncommon (19).

207 As it has been described elsewhere (20), TEM-1 was by far the commonest β -lactamase in the S. enterica
208 isolates studied, whereas PSE-1 or OXA-1 enzymes, that were frequent in S. Typhimurium from our health
209 region (8), were not detected. Curiously, three isolates of S. Rissen and the single isolate of S. Mikawasima
210 showing a resistance phenotype consistent with the production of a classic plasmid-mediated β -lactamase

211 were negative for *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV} and *bla*_{PSE-1} and, therefore, the mechanism responsible for
 212 resistance to amoxicillin could not be elucidated. Fortunately, resistance to broad-spectrum cephalosporins
 213 was unusual (1.3%) and was due to the production of SHV-12 (*S. Enteritidis*), CTX-M-15 (*S. Kapemba*), CTX-
 214 M-9 (*S. Grumpensis* and *S. Virchow*) and DHA-1 (*S. Newport*). All these β -lactamases have been previously
 215 communicated in *S. enterica* (21), but as far as we know, this is the first report of ESBL in serotypes
 216 Grumpensis and Kapemba.

217 Regarding the contribution of class 1 integrons, which were present in 9.1% of isolates, to the acquisition
 218 and spread of resistance in *S. enterica*, our data are in agreement with those of other authors (9, 22) :
 219 there was a clear association between the presence of these genetic elements and MDR or resistance to
 220 antibiotics conferred by gene cassettes embedded in their VR. Nevertheless, it should be noted that the
 221 same association was observed for resistance to β -lactams and to tetracycline, although this was not
 222 mediated by determinants located within class 1 integrons. This phenomenon could be explained by the
 223 eventual structural linkage between resistance genes included into integron structures and other
 224 resistance determinants placed on the same mobile elements, as suggested by the results of conjugation
 225 experiments. These experiments demonstrated that e.g., the *bla*_{CTX-M-9} gene, probably included in a
 226 complex *sul1*-type integron, and the *qnrA1* gene were co-transferred by conjugation and that resistance to
 227 tetracycline as well as *bla*_{TEM-1} and *bla*_{CTX-M-15} were transferred along with integrons. This fact constitutes a
 228 worrisome threat since it means that selective pressure posed by antimicrobials extensively used in food
 229 animals may select resistance to drugs that are of choice in the treatment of human salmonellosis.
 230 Conversely, up to 46% of MDR *S. enterica* did not carry integrons, including *S. Hadar* isolates
 231 characteristically resistant to amoxicillin, streptomycin and tetracycline as has been noted by other
 232 investigators (20).

233 One of the main findings of the current study was the widespread occurrence and variety of class 1
 234 integrons amongst non-Typhimurium *S. enterica* serotypes. Indeed, 11 distinct class 1 integrons were
 235 identified in 15 different serotypes, including *S. Kapemba*, *S. Mikawasima* and serotype [9,12:iv:i-], in

236 which, to our knowledge, they had not been reported before. All typical class 1 integrons identified in this
237 study, except for the 1.8 kb/*aadA13-sat* VR integron found in a *S. Grumpensis* isolate and previously only
238 documented in an *E. coli* isolate recovered from the wastewater of a slaughterhouse (23), have already
239 been identified in *Salmonella*. In accordance with other studies (20, 24), integrons with *dfrA1-aadA1* and
240 *dfrA17-aadA5*, mainly associated with IncK, IncN and IncI1 plasmids, and *dfrA12-orF-aadA2* cassette
241 arrangements were the most frequent and were shared by different serotypes. These results hint at the
242 role of integrons in horizontal gene transfer, although clonal expansion may also have taken place since, in
243 many instances, we were not able to obtain integron-carrying transconjugants and in some cases multiple
244 isolates belonging to the same serotype and carrying the same type of integron had been recovered
245 within a short period of time. With respect to the integrons carried by the two CTX-M-9 producing isolates,
246 it is interesting to point out that the integron with the *dfrA16-aadA2* cassette arrangement was detected in
247 *S. Virchow* and that an integron containing the *aadB-aadA2* cassette array, previously described in non-
248 ESBL producing *S. enterica* of other serotypes (25, 26), was also identified in the *S. Grumpensis* isolate. The
249 *dfrA16-aadA2* gene cassette arrangement is characteristic of CTX-M-9- producing *E. coli* and *S. Virchow*
250 isolates from both human and animal sources recovered in Spain (11, 21, 27, 28). The emergence of a
251 multiresistant CTX-M-9- synthesizing *S. Virchow* PT19 clone in this country seems to be linked to the spread
252 of closely related plasmids holding the In60 complex integron and that, in contrast with the plasmids of
253 our *S. Virchow* transconjugant, which were assigned to the IncK and IncN groups, share the HI2 replication
254 system (28). Finally, the emergence of plasmid-borne *sul3*-associated integrons is of note. These integrons
255 accounted for up to 14.3% of those recognized in the current series and were found in *S. Enteritidis* and *S.*
256 *Rissen*. Unusual *sul3* integrons carried by conjugative plasmids are increasingly communicated and have
257 been identified in human and animal *E. coli* isolates (29,30) and in a number of *S. enterica* serotypes of
258 different origins (6,8), including *S. Rissen* (6), but not in *S. Enteritidis*. Reported *sul3*-integron structures are
259 diverse but still limited and the genes allocated within them are *estX*, *psp* and *dfrA12*, *aadA2*, *aadA1* and
260 *cmIA1* resistance cassettes. Interestingly, to the best of our knowledge, the unusual *estX-psp-qacH-IS440-*

261 sul3 arrangement found in two *S. Rissen* isolates whose transconjugants beared IncF and IncN plasmids,
262 has been identified for the first time recently ,although associated to IncI1 plasmids, in two CTX-M-14-
263 producing clinical *E. coli* strains of human source (30) and had not been described previously in *S. enterica*.

264 In summary, sul1- and sul3-associated class 1 integrons, exhibiting a considerable variety of resistance
265 cassette arrays, are widely spread among human clinical *S. enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes,
266 including some serotypes of low-prevalence in which they had not been documented formerly, and
267 contribute to a great extent to the emergence, co-selection and dissemination of antibiotic resistance in
268 these zoonotic pathogens.

269 ACKNOWLEDGEMENTS

270 The authors thank M. Carulla Pont, X. Tejedor Ganduxé, M. J. Centelles Serrano, M. Cortell Ortolá, M. Pilar
271 Cid Ventura and Carmen López Escorihuela for excellent technical support in the conduct of this study as
272 well as Donna Pringle for editorial assistance. They are grateful to the Laboratorio Nacional de Referencia
273 de *Salmonella* y *Shigella* (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain) for serotyping of
274 *Salmonella* isolates They also thank J. Calvo Montes (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander,Spain) for
275 kindly providing *E. coli* J53-AzR.

276

277 Funding:

278 M. de T. has a predoctoral fellowship from the Instituto de Salud Carlos III of Spain (Ministerio de Ciencia e
279 Innovación) (grant number FI08/00506).

280 J.R. has a Miguel Servet fellowship (CP05/0130) from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Spain).

281

282 Conflict of interests: None to declare.

283

284 Ethical approval: Not required.

285

12

286 **REFERENCES**

- 287 [1] Anonymous. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections
288 EFSA Journal 2009; 7: 1372.
- 289 [2] Soler P, González-Sanz R, Bleda MJ, Hernández G, Echeíta A, Usera MA . Resistance in non-
290 typhoidal *Salmonella* from human sources, Spain, 2001–2003. J Antimicrob Chemother 2006; 58:
291 310–314.
- 292 [3] Anonymous. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and
293 indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal
294 2011; 9:2154
- 295 [4] Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and
296 water-borne infections. FEMS Microbiol Reviews 2002; 26: 141-148.
- 297 [5] Mazel D. Integrons: Agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol 2006; 4: 608- 618.
- 298 [6] Antunes P, Machado J, Peixe L. Dissemination of *su13*-containing elements linked to class 1
299 integrons with unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. Antimicrob
300 Agents Chemother 2007; 51:1545–8.
- 301 [7] Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH . Integron-mediated multidrug resistance in a
302 global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* osolates. Emerg Infect Dis 2009; 15: 388-396.
- 303 [8] Pérez-Moreno MO, Centelles-SerranoMJ, Cortell-Ortolá M , RuizJ, Llovet- Lomabarte MI, Jardí-
304 Baiges AM. Multidrug resistance related to class 1 integrons in human *Salmonella enterica* serotype
305 Typhimurium isolates and emergence of atypical *su13*-associated integrons. Int J Antimicrob Agents
306 2009; 34:381–383.
- 307 [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility*
308 *Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
- 309 [10] Pérez-Moreno MO, Centelles-Serrano MJ, Cortell-Ortolá M, Fort-Gallifa I, Ruiz J, Llovet-Lombarte
310 MI, Picó-Plana E, Jardí-Baiges AM. Molecular epidemiology and resistance mechanisms involved in

- 311 reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a
312 chronic care centre. Int J Antimicrob Agents 2011; 37: 462-466. .
- 313 [11] Vinué L, Lantero M, Sáenz Y, Somalo S, De Diego I, Pérez F et al . Characterization of extended-
314 spectrum β -lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. J Med
315 Microbiol 2008; 57: 916-920.
- 316 [12] Pérez-Pérez FJ, Hansoni ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -Lactamase genes in clinical
317 isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 2153–2162.
- 318 [13] Herrera-León S, González-Sanz R, Herrera-León L, Echeita A. Characterization of multidrug-resistant
319 Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. J
320 Antimicrob Chemother 2011; 66: 287–290.
- 321 [14] Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-
322 based replicon typing. J Microbiol Methods 2005; 63: 219-228.
- 323 [15] Sabaté M, Navarro F, Miró E, Campoy S, Mirelis B, Barbé J, Prats G. Novel Complex *su11*-type
324 integron in *Escherichia coli* carrying *bla*CTX-M-9. Antimicrob Agents Chemother 2002. 46: 2656-
325 2661.
- 326 [16] Mølbak K, Gerner-Smidt P, Wegener HC. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica*
327 serotype Enteritidis. Emerg Infect Dis 2002; 8: 514–515.
- 328 [17] Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging
329 mechanisms and resistance prevention strategies. Microbes Infect 2006; 8: 1937–1944.
- 330 [18] Weill FX, Bertrand S, Guesnier F, Baucheron S, Cloeckaert A, Grimont PA. Ciprofloxacin-resistant
331 *Salmonella* Kentucky in travelers. Emerg Infect Dis. 2006; 12:1611-1612.
- 332 [19] Gay K, Robiscsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ et al. Plasmid-mediated quinolone
333 resistance in non-typhi serotypes of *Salmonella enterica*. Clin Infect Dis 2006; 43::297–304.

- 334 [20] Rodríguez I, Rodicio MR, Herrera-León S, Echeita A, Mendoza MC. Class 1 integrons in multidrug-
335 resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002 and 2004. Int J
336 Antimicrob Agents 2008; 32: 158–164.
- 337 [21] González-Sanz R, Herrera-León S, de la Fuente M, Arroyo M, Echeita MA. Emergence of extended-
338 spectrum β -lactamases and AmpC-type β -lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from
339 2001 to 2005. J Antimicrob Chemother 2009; 64: 1181–1186.
- 340 [22] Nógrády N, Gado' I, Tóth A, Pászti J. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-
341 typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. Int J Antimicrob
342 Agents 2005; 26: 126-132.
- 343 [23] Moura A, Henriques I, Ribeiro R, Correia A. Prevalence and characterization of integrons from
344 bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. J Antimicrob Chemother
345 2007; 60: 1243–1250.
- 346 [24] Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2
347 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. J Antimicrob
348 Chemother 2006; 58: 297–304.
- 349 [25] Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-
350 resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. J Antimicrob Chemother
351 2005; 56:1025–1033.
- 352 [26] Cabrera R, Ruiz J, Ramírez M, Bravo L, Fernández A, Aladueña A, Echeita A, Gascón J, Alonso PL,
353 Vila J. Dissemination of *Salmonella enterica* serotype Agona and multidrug-resistant *Salmonella*
354 *enterica* serotype Typhimurium in Cuba. Am J Trop Med Hyg 2006; 74: 1049–1053.
- 355 [27] Riaño I, Moreno MA, Teshager T, Sáenz Y, Domínguez L, Torres C. Detection and characterization
356 of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain.
357 J Antimicrob Chemother 2006; 58: 844-847.

- 358 [28] Herrera-León S, González-Sanz R, Rodríguez I, Rodicio MR, Echeita MA . Spread of a multiresistant
359 CTX-M-9-producing *Salmonella enterica* serotype Virchow phage type 19 in Spain. Eur J Clin
360 Microbiol Infect Dis 2010 ; 29:901–905.
- 361 [29] Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, Martínez S, Rojo-Bezares B, Zarazaga M, Torres C. Class 1
362 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human
363 origins. Vet Microbiol 2010; 144:493-497.
- 364 [30] Curiao T, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Baquero F, Coque MT. Association of
365 composite IS26-*sul3* elements with highly transmissible IncI1 plasmids in extended-spectrum- β -
366 lactamase-producing *Escherichia coli* clones from humans. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55:
367 2451-2457.

Table 1: Occurrence of antimicrobial drug resistance and class 1 integrons by serotypes in non-Typhimurium *Salmonella enterica* isolates

Serotype (n)	Number of isolates resistant to the following number of antimicrobial families:			Percentage of non-susceptible isolates												β-lactamases/ <i>qnr</i> (n)	Number and percentage of integron positive isolates
	None	One or two	Three or more	AMX	CTX-CAZ	NAL	CIP	GEN-TOB	STR	KAN	TET	CHL	SXT	SUL	NIT		
Enteritidis (272)	93 (34.2%)	168 (61.8%)	11 (4%)	19.1	0.4	46.3	0 (45.2) ^a	0.4	1.8	0.7	4.4	1.8	3.3	3.7	1.1	TEM-1 (51) SHV-12 + TEM-1 (1)	7 (2,6%)
Rissen (17)	1 (5.9%)	9 (52.9%)	7 (41.2%)	47.1	0	0	0	0	35.3	0	88.2	17.6	41.2	47.1	0	TEM-1 (5) Unknown (3)	6 (35.3%)
Hadar (16)	0	3 (18.8%)	13 (81.3%)	56.3	0	93.7	0 (93.7) ^a	0	81.3	0	81.3	0	0	0	0	TEM-1 (9)	0 (0%)
Bredeney (8)	2 (25%)	0	6 (75%)	25.0	0	0	0	0	50	0	50	0	50	50	0	TEM-1 (2)	4 (50%)
Newport (6)	5 (83.3%)	0	1 (16.7%)	16.7	16.7	0	0 (16.7) ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	DHA-1/ <i>qnrB4</i> (1)	0 (0%)
Virchow (5)	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	40	20	80	0 (80) ^a	0	20	20	40	0	20	40	60	TEM-1 (1) CTX-M-9 + TEM-1 (1)	1 (20%)
Brandenburg (4)	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	50	0	0	0	0	50	0	50	0	75	50	0	TEM-1 (2)	2 (50,0%)
Mikawasima (4)	3 (75%)	0	1 (25%)	25	0	0	0	0	25	0	0	0	25	25	0	Unknown (1)	1 (25%)
Derby (3)	2 (66.7%)	0	1 (33.3%)	0	0	0	0	0	33.3	0	33.3	0	0	33.3	0	-	1 (33,3%)
Give (3)	2 (66,7%)	0	1 (33.3%)	33.3	0	0	0	0	33.3	0	33.3	0	33.3	33.3	0	TEM-1 (1)	0 (0%)
Grumpensis (3)	1 (33.3%)	0	2 (66.7%)	66.7	33,3	0	0 (33.3) ^a	66.7	66.7	0	33.3	0	33.3	66.7	0	TEM-1 (1) CTX-M-9/ <i>qnrA1</i> (1)	2 (66,7%)
Kentucky (3)	0	2 (66,7%)	1 (33.3%)	33.3	0	100	100	0	0	33.3	0	0	0	0	0	TEM-1 (1)	0 (0%)
9,12:ivi- (3)	0	0	3 (100%)	100	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100	0	TEM-1 (3)	3 (100%)
Blockley (2)	0	0	2 (100%)	0	0	100	0	0	100	100	100	100	0	0	0	-	0 (0%)
Goldcoast (2)	0	0	2 (100%)	100	0	50	0	0	100	0	100	0	100	100	0	TEM-1 (2)	2 (100,0%)
Stanley (2)	0	0	2 (100%)	100	0	100	0 (100) ^a	0	0	50	100	100	100	100	0	TEM-1 (2)	2 (100,0%)
Goettingen (1)	0	0	1 (100%)	100	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100	0	TEM-1 (1)	1 (100,0%)
Indiana (1)	0	0	1 (100%)	100	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	0	TEM-1 (1)	1 (100%)
Kapemba (1)	0	0	1 (100%)	100	100	100	0 (100) ^a	0	100	0	100	0	100	100	100	CTX-M-15 (1)	1 (100%)
London (1)	0	1 (100,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	-	0 (0%)
Mbandaka (1)	0	0	1 (100%)	100	0	100	0 (100) ^a	0	100	0	100	0	0	0	0	TEM-1 (1)	0 (0%)
Muenchen (1)	0	0	1 (100%)	100	0	100	0 (100) ^a	0	0	0	100	100	0	0	0	TEM-1 (1)	0 (0%)
Paratyphi A (1)	0	1 (100%)	0	0	0	100	0 (100) ^a	0	100	0	0	0	0	0	0	-	0 (0%)
9,12:-- (1)	0	0	1 (100%)	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	100	0	-	1 (100,%)
Other serotypes * (21)	21 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0 (0%)
Total (382)	132 (34.6%)	187 (49.0%)	63 (16.5%)	24.3	1.3	41.1	0.8 (39.3)^a	0.8	14.2	1.8	17.5	4.5	9.9	11	1.8	(93/2)	35 (9.2%)

*Infantis (3), Tennessee (2), Pomona (2), Abony, Agona, Braenderup, Cerro, Corvallis, Haifa, Kottbus, Litchfield, Montevideo, Paratyphi B, Typhi, Uganda, Utah, Worthington. AMX: amoxicillin; CTX: cefotaxime; CAZ: ceftazidime; NAL: nalidixic acid; CIP: ciprofloxacin; GEN: gentamicin, TOB: tobramycin; STR: streptomycin; KAN: Kanamycin; TET: tetracycline; CHL: chloramphenicol; SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole; SUL: sulphonamides; NIT: nitrofurantoin.

^a Percentage of isolates showing decreased susceptibility to ciprofloxacin (MIC 0,12-1 mg/L).

Unknown: none of the β-lactamases investigated were identified among those amoxicillin-resistant isolates.

Table 2: Features of the 35 class 1 integron-carrying *Salmonella enterica* isolates

Serotype	Integron Variable region ^a	Resistance phenotype ^b [Year of isolation (n)]	β -lactamases	Transfer of integrons	Replicon type of plasmids in integron-carrying transconjugants ^c
Enteritidis	1.6 / <u>dfrA1-aadA1</u> 0.9/ <u>aadA1</u> 0.7/ <u>dfrA7</u> 5/ <u>dfrA12-orF-aadA2-cmlA-aad1</u> ^d	Tet, Str/Spt, Sxt, Sul [2005 (1); 2006 (1)] Str/Spt, Sul [2005 (1)] Amx, Tet, Str, Sxt, Chl, Sul [2006 (1)] Str/Spt, Sxt, Chl, Sul , [Tet, Nal] [2005 (2); 2007 (1)]	NA NA TEM-1 NA	+ - - +	K, N, FIC NA NA Non-typeable
9,12 :- :-	1.6/ <u>dfrA1-aadA1</u>	Str/Spt, Sxt, Sul [2004 (1)]	NA	+	K, N
Rissen	1.9/ <u>dfrA12-orF-aadA2</u> 1.9/ <u>estX-ppsp</u> ^d	Amx, Tet, Str/Spt, Sxt, Chl, Sul [2007(1); 2009 (2)] Amx, Str/Spt, Sxt, Sul [2004 (1)] Amx, Tet, Str/Spt, Sxt, Sul [2005 (1); 2006 (1)]	Unknown TEM-1 TEM-1	- - +	NA NA N, F
Bredeney	1.6/ <u>dfrA17-aadA5</u>	Tet, Str/Spt, Sxt, Sul [2001 (1), 2008 (1)] Str/Spt, Sxt, Sul [2006 (1); 2008 (1)]	NA NA	- -	NA NA
9,12:iv:-	1.6/ <u>dfrA1-aadA1</u>	Amx, Tet, Str/Spt, Sxt, Chl, Sul [2004 (2); 2005 (1)]	TEM-1	+	K,N
Brandenburg	1.6/ <u>dfrA1-aadA1</u> 1.6/ <u>dfrA17-aadA5</u>	Amx, Tet, Str/Spt, Sxt, Sul [2005 (1)] Tet, Str/Spt, Sxt, Sul [2001 (1)]	TEM-1 NA	- -	NA NA
Goldcoast	1.6/ <u>dfrA1-aadA1</u>	Amx, Tet, Str/Spt, Sxt, Sul [Nal] [2007 (2)]	TEM-1	-	NA
Stanley	1.9/ <u>dfrA12-orF-aadA2</u>	Amx, Tet, Str/Spt, Sxt, Chl, Sul, Nal [Kan] [2006 (2)]	TEM-1	-	NA
Derby	0.9/ <u>aadA2</u>	Tet, Str/Spt, Sul [2008 (1)]	NA	-	NA
Grumpensis	1.6/ <u>aadB-aadA2</u> 1.6/ <u>dfrA17-aadA5</u> +1.8 / <u>aadA13-sat</u>	Amx, Ctx, Str/Spt, Gen, Tob, Sul, Cip ^e [2009 (1)] Amx, Tet, Str/Stp, Sxt, Gen, Tob, Sul [2001 (1)]	CTX-M-9 TEM-1	+ +/-	F I1
Goettingen	1.6/ <u>dfrA1-aadA1</u>	Amx, Tet, Str/Spt, Sxt, Chl, Sul [2008 (1)]	TEM-1	+	Non-typeable
Indiana	1.6/ <u>dfrA1-aadA1</u>	Amx, Tet, Str/Spt, Sxt, Sul (1) [2009 (1)]	TEM-1	-	NA
Kapemba	0.9/ <u>aadA1</u>	Amx, Ctx, Caz, Tet, Str/Spt, Sul, Nal, Nit [2004 (1)]	CTX-M-15	+	I1
Mikawasima	1.6/ <u>dfrA17-aadA5</u> ^f	Amx, Str/Spt, Sxt, Sul [2008 (1)]	Unknown	+	I1, K, N
Virchow	1.6/ <u>dfrA16-aadA2</u>	Amx, Ctx, Tet, Str/Spt, Sxt, Kan, Sul, Nal, Nit [2004 (1)]	CTX-M-9 + TEM-1	+	K, N

^asize (kb) and genes inserted in the variable region of class 1 integrons: dfrA1, dfrA7, dfrA12, dfrA16, dfrA17 (trimethoprim resistance); aadA1, aadA2, aadA5, aadA13 (streptomycin/spectinomycin resistance); aadB (gentamicin/tobramycin resistance); cmlA1 (chloramphenicol resistance); sat (streptothricin resistance).

^bResistance phenotypes: Tet, tetracyclin; Str, streptomycin; Spt, spectinomycin; Sxt, trimethoprim/sulfamethoxazole; Sul, sulphonamides; Amx, amoxicillin; Chl, chloramphenicol; Nal, nalidixic acid; Kan, kanamycin; Cip, ciprofloxacin; Ctx, cefotaxime; Gen, gentamicin; Tob, tobramycin; Caz, ceftazidime Nit, nitrofurantoin. Additional antibiotic resistances found in some but not all of the isolates are indicated by square brackets. Antibiotic resistances expressed by transconjugants are underlined and those mediated by genes carried by integrons appear in bold type.

^c Detection and classification of plasmids according to the incompatibility group ¹³ was carried out in transconjugants obtained from selected isolates representing each of the different combinations of serotypes and integrons identified in this study.

^d qacH-sul3-associated non-classic class 1 integrons

^e Isolate with decreased susceptibility to ciprofloxacin related to the presence of qnrA1 which was cotransferred by conjugation with the integron.

^f Class 1 integron lacking qacEΔ1, sul1 and sul3 genes.

NA: not applicable

Table 3: Association between resistance to antibiotics and presence of integrons

Antibiotic	Number non-susceptible isolates (% integron positive)	Number susceptible isolates (% integron positive)	P
Amoxicillin	93 (23.7%)	289 (4.5%)	<0.0001
Cefotaxime	5 (60%)	377 (8.5%)	<0.0001
Ceftazidime	5 (60%)	377 (8.5%)	<0.0001
Nalidixic acid	157 (4.5%)	225 (12.4%)	0.005
Gentamicin	3 (66.7%)	379 (8.7%)	0.001
Tobramycin	3 (66.7%)	379 (8.7%)	0.001
Streptomycin	53 (66%)	328 (0%)	<0.0001
Kanamycin	7 (28.6%)	375 (8.8%)	0.128
Tetracycline	67 (40.3%)	315 (2.5%)	<0.0001
Chloramphenicol	17 (76.5%)	365 (6%)	<0.0001
Trimethoprim/sulfamethoxazole	38 (84.2%)	344 (0.9%)	<0.0001
Sulphonamides	35 (83.3%)	340 (0%)	<0.0001
Nitrofurantoin	374 (25%)	8 (8.8%)	0.161

ARTÍCULO 3

Epidemiología molecular, mecanismos de resistencia implicados e integrones de clase 1 en aislados de *Klebsiella pneumoniae* de un centro sociosanitario con sensibilidad disminuida a amoxicilina/clavulánico y sensibles a cefazolina

(Int J Antimicrob Agents 2011; 37: 462-466).

Un estudio retrospectivo de vigilancia de resistencias a antimicrobianos reveló un llamativo aumento a partir del año 2003 en la tasa de resistencia a amoxicilina/clavulánico en aislados de *K. pneumoniae* sensibles a cefazolina y cefamicinas procedentes de pacientes de un centro sociosanitario de la región sanitaria Terres de l'Ebre. El objetivo de este trabajo era seguir la evolución de estos aislados, así como investigar su epidemiología molecular, los mecanismos de resistencia responsables de la disminución de sensibilidad a amoxicilina/clavulánico y la eventual implicación de integrones de clase 1.

Se estudiaron 171 aislados no repetidos de *K. pneumoniae* recuperados consecutivamente a partir de muestras clínicas de pacientes del centro sociosanitario entre enero de 2006 y diciembre de 2008, de los cuales 51 (29,8%) mostraron resistencia o sensibilidad disminuida a amoxicilina/clavulánico (CMI ≥ 16 mg/L). 45 de estos aislados, todos con sensibilidad intermedia a amoxicilina/clavulánico y procedentes en su mayoría de muestras de orina, eran sensibles a cefazolina y cefamicinas y fueron objeto del presente trabajo: mediante PCR y secuenciación se comprobó que 19 producían IRT-11, 26 producían OXA-1 y que todos ellos albergaban el gen *bla*_{SHV-1}.

Los aislados productores de IRT-11 eran sensibles a piperacilina/tazobactam, cefalosporinas de espectro extendido, carbapenemes, gentamicina y tobramicina y presentaban sensibilidad variable a fosfomicina, nitrofurantoina, ciprofloxacino, trimetoprim, cloranfenicol, estreptomina y sulfamidas. El análisis genotípico mediante ERIC-PCR permitió distinguir tres patrones diferentes (E1, E2 y E3) (figura 23), siendo el patrón E1 el más prevalente (63,2%). Ninguno de los aislados productores de IRT-11 poseía genes *qnr* y sólo uno presentaba un integrón de clase 1 de región variable *dfrA12-orf- aadA2*.

Todos los aislados productores de OXA-1 fueron sensible a cefotaxima, ceftazidima y cefepime (CMI entre 1 y 4 mg/L en el 61.5% de los aislados), carbapenemes y gentamicina y resistentes a tobramicina, kanamicina, estreptomina y ciprofloxacino, mientras que la resistencia al resto de antibióticos estudiado fue variable. Los 26 aislados productores de OXA-1 se pudieron clasificar en tres grupos: el primero comprendía 20 aislados que poseían *qnrS2* (resistencia plasmídica a ciprofloxacino) y un integrón típico de clase 1 de región variable [*aac(6')*]-*lb-cr* (resistencia a tobramicina, kanamicina, amikacina y disminución de sensibilidad a

ciprofloxacino); *bla*_{OXA-1} (resistencia a amoxicilina); *catB3* (resistencia a cloranfenicol); *arr3* (resistencia a rifampicina)] y que se adscribieron a dos patrones genotípicos estrechamente relacionados (E3 y E3a). El segundo grupo incluía tres aislados sensibles a sulfamidas obtenidos en el 2008 que compartían un mismo patrón ERIC (E4) y albergaban *qnrS2* y un integrón idéntico al anterior pero que era negativo para *qacEΔ1*, *sul1* y *sul3*. El tercer grupo lo integraban tres aislados sensibles a sulfonamidas obtenidos en el 2008, que se adscribieron al patrón genotípico E5 y portaban el *array aac(6')-Ib-cr-bla*_{OXA-1} pero que no presentaban integrones ni determinantes *qnr*. Ninguno de los aislados estudiado fue positivo para el elemento *orf513* y todos los aislados con resistencia a ácido nalidíxico presentaban al menos una mutación en *qyrA* o *parC* relacionada con la pérdida de sensibilidad a quinolonas.

Los genes *bla*_{IRT-11} y *bla*_{OXA-1} se pudieron transferir por conjugación en todos los casos y, además, *bla*_{OXA-1} se cotransfirió sistemáticamente junto a *aac(6')-Ib-cr* y los transconjugantes de los aislados portadores de integrones poseían *qnrS2* e integrones idénticos a los de las cepas donantes.

En resumen, la diseminación simultánea de dos clones, uno de ellos compuesto por aislados productores de IRT-11 y el otro por aislados que habían adquirido el gen *bla*_{OXA-1} ubicado en un integrón y asociado a *qnrS2* o el gen *bla*_{IRT-11}, sería la principal responsable de la elevada prevalencia de resistencia a amoxicilina/clavulánico entre los aislados de *K. pneumoniae* del centro sociosanitario.

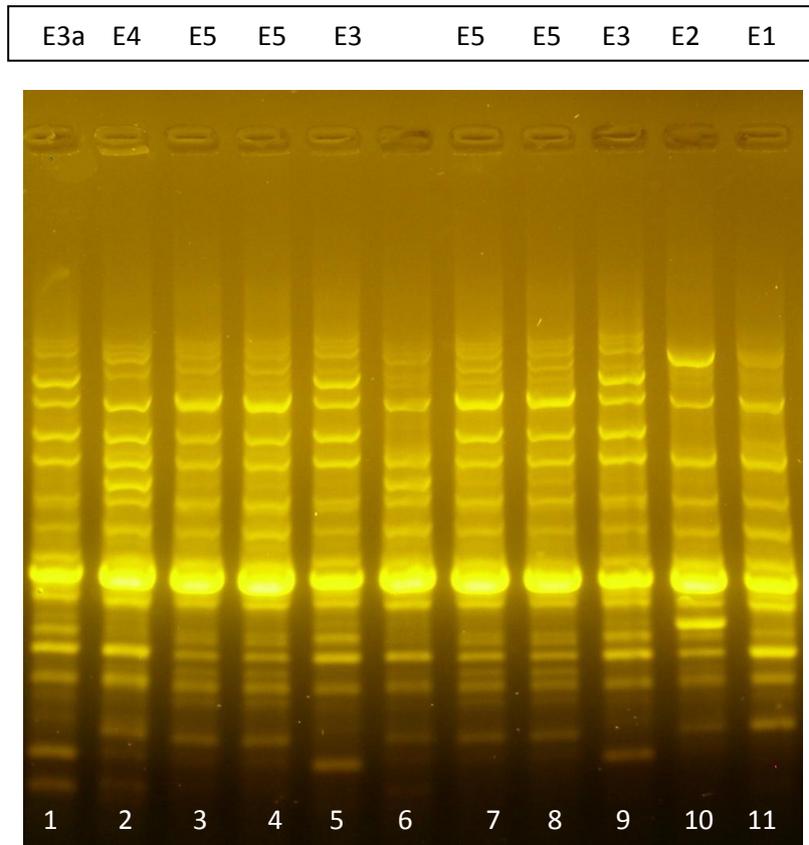


Figura 23: patrones ERIC-PCR de aislados seleccionados de *K. pneumoniae* con sensibilidad intermedia a amoxicilina/clavulánico productores de OXA-1 (carriles 1-5, 7 y 8) e IRT-11 (carriles 9-11) y de un aislado sensible a amoxicilina/clavulánico (carril 6).



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>

Short communication

Molecular epidemiology and resistance mechanisms involved in reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a chronic care centre

Mar Olga Pérez-Moreno^{a,*}, Maria José Centelles-Serrano^a, Maria Cortell-Ortolá^a, Isabel Fort-Gallifa^a, Joaquim Ruiz^{b,c}, Maria Isabel Llovet-Lombarte^a, Ester Picó-Plana^a, Anna Maria Jardí-Baiges^a

^a Servei Anàlisis Clíniques, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, C/Esplanetes s/n 43500 Tortosa, Spain

^b Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), IDIBAPS/Hospital Clinic, Barcelona, Spain

^c CIBER, Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2010

Accepted 6 December 2010

Keywords:

Klebsiella pneumoniae
Amoxicillin/clavulanic acid
Resistance
IRT-11
OXA-1
Class 1 integrons

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the molecular epidemiology and mechanisms responsible for reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid (AMC) amongst cefazolin-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients admitted to a chronic care institution. In total, 51 (29.8%) of 171 *K. pneumoniae* isolates recovered between 2006 and 2008 were non-susceptible to AMC, of which 45 were susceptible to cefazolin. Nucleotide sequencing analysis revealed that 19 produced IRT-11 and the remaining 26 were OXA-1-producers. All of the OXA-1-producing isolates harboured the *aac(6)-Ib-cr-bla_{OXA-1}* cassette array, which in 23 isolates was located together with *catB3* and *arr3* within a class 1 integron and associated with *qnrS2* (in 3 cases the integron lacked the *qac Δ 1* and *sul1* or *sul3* genes). Genotyping analysis performed by enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) identified three different patterns amongst IRT-11-producing isolates (E1 to E3), with E1 being the most prevalent (63.2%), whilst the OXA-1-producing isolates were assigned to patterns E3 and E3a (isolates carrying typical class 1 integrons), E4 (isolates carrying defective integrons) and E5 (isolates without integrons). Genes encoding IRT-11 and OXA-1 were transferred by conjugation, and *aac(6)-Ib-cr* and *qnrS2* were systematically co-transferred with *bla_{OXA-1}*. These results demonstrate that the high prevalence of decreased susceptibility to AMC amongst *K. pneumoniae* isolates from a chronic care hospital was mainly due to the simultaneous spread of two different clones, one of which comprised isolates producing IRT-11 and the other one comprised isolates that had acquired either the *bla_{OXA-1}* gene located in a class 1 integron and linked to *qnrS2* or the *bla_{IRT-11}* gene.

© 2011 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacterium that is present as a saprophyte in the nasopharynx and intestinal tract of humans at rates of 1–6% and 5–38%, respectively. However, these colonisation rates increase dramatically in hospitalised patients in direct proportion to the length of stay and antibiotic use. Moreover, *K. pneumoniae* is very well adapted to the hospital environment since it exhibits higher survivability on hands and environmental surfaces than other Enterobacteriaceae and the wherewithal to spread rapidly and provoke nosocomial outbreaks [1].

Klebsiella pneumoniae is naturally resistant to amino- and carboxy-penicillins owing to the production of a chromosomally encoded SHV-1-like β -lactamase. Most strains of *K. pneumoniae* are

susceptible to narrow-spectrum cephalosporins and to associations of β -lactams with β -lactamase inhibitors (BLIs). Hyperproduction of SHV-1 is the main mechanism responsible for resistance to these compounds in *K. pneumoniae*, whilst production of plasmid-borne enzymes conferring resistance to BLIs but not to narrow-spectrum cephalosporins, such as inhibitor-resistant TEM (IRT)-type or SHV-type β -lactamases, is uncommon in this species [2,3]. On the other hand, simultaneous production of OXA-1 β -lactamase (another enzyme poorly inhibited by clavulanic acid, tazobactam or sulbactam and with negligible activity against first-generation cephalosporins) and the *cr* variant of *Acc(6)-Ib* has recently been reported amongst *K. pneumoniae* isolates producing either plasmid-encoded cephamycinases linked to complex class 1 integrons and to *qnr* genes [4] or extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) [5].

A retrospective survey of antibiotic resistance carried out in the microbiology laboratory of Hospital Verge de la Cinta (Tortosa, Catalonia, Spain) in 2005 revealed a high rate of decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid (AMC)

* Corresponding author. Tel.: +34 977 519 103.

E-mail address: marolgap@terra.es (M.O. Pérez-Moreno).

Author's personal copy

M.O. Pérez-Moreno et al. / International Journal of Antimicrobial Agents 37 (2011) 462–466

463

amongst ceftazolin-susceptible *K. pneumoniae* isolates recovered from patients from a chronic care hospital since 2003. The aim of this study was to follow the evolution of *K. pneumoniae* isolates displaying the former β -lactam resistance phenotype and to investigate their molecular epidemiology and the underlying resistance mechanisms.

2. Material and methods

2.1. Bacterial isolates

All *K. pneumoniae* isolates with decreased susceptibility to AMC [minimum inhibitory concentration (MIC) >8/4 mg/L], recovered from clinical samples from patients admitted to a chronic care centre for whom the microbiology laboratory of the Hospital Verge de la Cinta provides its services, were prospectively collected between January 2006 and December 2008. Only one isolate per patient was considered.

2.2. Antimicrobial susceptibility

In vitro susceptibility to amoxicillin, AMC, piperacillin/tazobactam (TZP), ceftazolin, ceftoxitin, cefuroxime, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, imipenem, meropenem, nitrofurantoin, fosfomicin, tetracycline, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, ciprofloxacin, gentamicin, kanamycin and tobramycin was studied using the Wider commercial microdilution system (Francisco Soria Melguizo, Madrid, Spain) and to kanamycin, streptomycin, spectinomycin and sulfonamides by disk diffusion following the guidelines and applying the criteria for susceptibility and resistance of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [6]. AMC was tested at a 2:1 ratio and TZP was assayed at a fixed inhibitor concentration of 4 mg/L.

2.3. Detection of resistance genes and class 1 integrons

Polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by nucleotide sequencing was performed under conditions and with primers previously described (Table 1) to screen for genes encoding resistance to β -lactams (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{PSE-1}), aminoglycosides [*aac*(6')-*lb*] and sulfonamides (*sul1* and *sul3*) and for the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* (plasmid-mediated quinolone resistance), *qacE Δ 1* and *orf513* (element associated with insertion sequence ISCR1) as well as to detect mutations in the quinolone-resistance determining regions (QRDRs) of *gyrA* and *parC* genes. The presence of class 1 integrons was investigated by PCR amplification using specific primers aimed to detect the *int1* gene (Table 1). Gene integron content within the variable region of class 1 integrons was assessed by PCR using 5'-conserved segment (5'-CS) and 3'-CS set of primers or by PCR mapping assays employing 5'-CS plus *bla*_{OXA-1} reverse primers and 3'-CS plus *bla*_{OXA-1} forward primers and subsequent nucleotide sequencing (Table 1). In isolates lacking the *qacE Δ 1* gene, the *arr3* reverse specific primer (Table 1) was used instead of 3'-CS.

2.4. Molecular epidemiological analysis

DNA fingerprinting was achieved by means of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR using the ERIC-2 primer (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') and repeating reactions at least twice in each isolate. Isolates were considered epidemiologically unrelated if their patterns differed by more than one band [7].

Table 1
Primers used in this study for polymerase chain reaction (PCR).

Target	Primer	Sequence (5' → 3')
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-1	ATA AAATCTTGAAGACGAAA
	TEM-2	GACAGTTACCAATGCTTAATCA
	SHV-F	CACCTAAGGATGATTGTG
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	TTAGGCTTGCCAGTGCTCG
	SHV-R	AGCAGCGCCAGTGCACTCA
<i>bla</i> _{OXA}	OXA-F	ATTGCAAGCCCAAGTTTCC
	OXA-R	AATGCAATCAGCGCTTC
<i>bla</i> _{PSE}	OC-1	GGGCTTGATGCTCACTC
	OC-2	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA
<i>aac</i> (6')- <i>lb</i>	ACC(6')-B-F	CTCGAATGCTGGCGTGT
	ACC(6')-B-R	TGGTACCGTGTTCGGGATT
<i>sul1</i>	Sul-F	GCGAGGGTTCCGAGAAGGTG
	Sul-R	CATTCTAGAAAACAGTCGATGTCG
<i>sul3</i>	Sul3-F	CATCTGAGCTAACCTAGGGCTTTGGA
	Sul3-R	ATTTCACCGCCAGGATTTG
<i>qnrA</i>	QnrA-F	GATCGGCAAGGTTAGGTCA
	QnrA-R	GATCGTAAAGCCAGAAAGG
<i>qnrB</i>	QnrB-F	ACGATGCTGTGATTTGTC
	QnrB-R	ACGACATTCGCAACTGCAA
<i>qnrS</i>	QnrS-F	TAAATGGCCACTGTAGGC
	QnrS-R	GGCTGGCTTTTCTGTTATCC
<i>qacEΔ1</i>	Qac-F	TGAGCCCATACCTACAAAGC
	Qac-R	ATGGTTTCATCGGGTT
<i>orf513</i>	orf513-F	CTGAGGGTGTGAGCGAG
	orf513-R	GGGCAAGGATCTGGATTTC
<i>int1</i>	Int1-F	ACATGGGTGTAATCATCTGCT
	Int1-R	GGCATCAAGCAGCAAG
Int 1 VR ^a	5'-CS	AAGCAGACTTGACCTGA
	3'-CS	CCCTGTGGTTAGCAATC
<i>arr3</i>	arr-3-R	AAATCGCCCTGTCTTGTGT
	CyrA-F	GCATACCTACGGCGATACC
<i>gyrA</i>	CyrA-R	CCTTGGCTACATGAATTA
	ParC-F	CAGGTTATGCGGTGGAATAT
<i>parC</i>	ParC-F	
	ParC-R	

^a Class 1 integron variable region.

2.5. Conjugation assays

Conjugation experiments were carried out in Luria–Bertani broth with azide-resistant *Escherichia coli* J53 as the recipient strain. Transconjugants were selected on trypticase soy agar plates containing 150 mg/L sodium azide and 100 mg/L amoxicillin.

3. Results

3.1. β -Lactamase characterisation and antibiotic susceptibility

In total, 51 (29.8%) of 171 *K. pneumoniae* isolates recovered from clinical samples of different patients admitted to the chronic care hospital over the 3-year study period showed decreased susceptibility to AMC, 6 of which were resistant to ceftazolin and displayed a resistant phenotype consistent with the production of AmpC (four isolates) or ESBLs (two isolates), whilst the remaining 45 isolates, all intermediately resistant to AMC and recovered from urine (88.9%), blood (4.4%), wounds (4.4%) and ascitic fluid (2.2%), remained susceptible to first-generation cephalosporins and underwent further studies. PCR and nucleotide sequencing analysis revealed that 19 isolates produced the β -lactamase IRT-11 (TEM-40) and the other 26 were OXA-1-producers, whereas all harboured the *bla*_{SHV-1} gene. The percentage of AMC-non-susceptible isolates dropped from 46.6% in 2006 to 14.3% in 2008.

The 19 IRT-11-producing isolates were susceptible to TZP, extended-spectrum cephalosporins, carbapenems, gentamicin, tobramycin and amikacin, whilst resistance to other antibiotics assayed was variable, with fosfomicin (26.3%), ciprofloxacin (26.3%) and nalidixic acid (57.9%) showing the highest rates of resistance. All OXA-1-producing isolates were susceptible to ceftazidime, ceftazidime, cefepime (MIC between 1 mg/L and 4 mg/L in

61.5% of isolates), carbapenems and gentamicin and were resistant to tobramycin, kanamycin and ciprofloxacin. Resistance rates to sulfonamides, nitrofurantoin, chloramphenicol, nalidixic acid and TZP were 76.9%, 80.8%, 84.6%, 92.3% and 92.3%, respectively, and were <25% for the remaining antimicrobials studied.

3.2. Molecular epidemiology and detection of integrons, *qnr* genes and mutations in the QRDRs of *gyrA* and *parC* genes

The characteristics (ERIC-PCR pattern, resistance phenotype, presence and content of class 1 integrons, presence of *qnr*, amino acid changes in *GyrA* and *ParC*, and year of isolation) of the 19 IRT-11- and 26 OXA-1-producing isolates are shown in Table 2.

Three ERIC-PCR patterns were observed amongst the IRT-11-producing isolates, with E1 being the most prevalent (12; 63.2%), followed by E3 (5; 26.3%) and E2 (2; 10.5%). None of the IRT-11-producing isolates possessed *qnr* genes and only 1 presented a class 1 integron with a 2 kb/*dfiA12-orf-aadA2* variable region.

OXA-1-producing isolates could be classified into three different groups. The first group comprised 20 isolates that carried a typical class 1 integron with the following variable region [3.6 kb/*aac(6')-Ib-cr, bla_{OXA-1}, catB3, arr3*] as well as *qnrS2* and were ascribed to two closely related ERIC patterns (E3 and E3a) that differed from each other by only one band. The second group comprised three sulfonamide-susceptible isolates that shared the same ERIC-PCR pattern (E4) and harboured *qnrS2* and a class 1 integron whose variable region was identical to that described above, although they were negative for *qacEΔ1* and *sul1* (quaternary ammonium compounds and sulfonamide resistance genes associated with 3'-conserved region of class 1 integrons) as well as for *sul3*, a sulfonamide resistance gene encountered in the 3'-end of some atypical class 1 integrons [8]. Finally, the third group was made up of another three sulfonamide-susceptible isolates that contained the *aac(6')-Ib-cr-bla_{OXA-1}* array but were negative for *intl1*, *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* and were assigned to the E5 ERIC-PCR pattern. None of the OXA-1-producing isolates possessed *orf513*.

All nalidixic acid-resistant isolates analysed presented at least one point mutation in the *gyrA* or *parC* genes leading to amino acid substitutions.

3.3. Transfer of amoxicillin/clavulanic acid resistance and characteristics and antimicrobial resistance of transconjugants

Conjugation assays were carried out in selected IRT-11- and OXA-1-producing isolates displaying the different ERIC-PCR patterns identified in this work. Transfer by conjugation of genes involved in AMC resistance (*bla_{IRT-11}* or *bla_{OXA-1}*) was achieved in all the isolates studied. Moreover, *bla_{OXA-1}* was systematically co-transferred with *aac(6')-Ib-cr*, and transconjugants from integron-carrying OXA-1-producing isolates were positive for *qnrS2* and bore class 1 integrons that were identical to those presented by donor strains. The MIC and other characteristics of the donor strains and their transconjugants are shown in Table 3.

4. Discussion

The results of this work demonstrate that the high prevalence of decreased susceptibility to AMC amongst *K. pneumoniae* isolates recovered over a 3-year period from patients from a chronic care hospital was mediated by the production of IRT-11 or OXA-1, two penicillinases weakly inhibited by clavulanic acid, and was mainly due to the simultaneous spread of two different clones, one of which comprised isolates that produced IRT-11 (E1) and the other one comprising isolates that had acquired either the *bla_{OXA-1}* gene placed within a class 1 integron and linked to *qnrS2* or the *bla_{IRT-11}* gene (E3).

Table 2
Features of the 19 IRT-11- and 26 OXA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates.

β-Lactamase	ERIC-PCR pattern	Resistance phenotype ^a	Class 1 integron ^b	<i>qnr</i>	Amino acid changes ^c		Year of isolation (n)
					<i>GyrA</i>	<i>ParC</i>	
IRT-11 ^d	E1	Am, Amc (Nal, Fos)	No	No	Phe83	-	2006 (8); 2007 (3); 2008 (1)
	E2	Am, Amc (Fos, C)	No	No	-	-	2006 (2)
	E3	Am, Amc, Nal, Cip, Nf, C (K, Fos, Sxt, T, St/Sp, Sul)	2 kb/ <i>dfiA12-orf-aadA2</i> ^e	No	Ile83	-	2006 (2); 2007 (1); 2008 (2)
OXA-1 ^d	E3	Am, Amc, Nal, Cip, Tob, K, Nf, C, Sul (Crx, Fos, Sxt, T, St)	3.6 kb/ <i>aac(6')-Ib-cr, bla_{OXA-1}, catB3, arr3</i>	<i>qnrS2</i>	Ile83	Ile80	2006 (15); 2007 (1); 2008 (1)
	E3a	Am, Amc, Nal, Cip, Tob, K, Nf, C, Sul, St/Sp	3.6 kb/ <i>aac(6')-Ib-cr, bla_{OXA-1}, catB3, arr3</i>	<i>qnrS2</i>	Ile83	Ile80	2006 (1); 2007 (2)
	E4	Am, Amc, Cip, Tob, K (Nal, Nf, C)	3.6 kb/ <i>aac(6')-Ib-cr, bla_{OXA-1}, catB3, arr3</i> ^f	<i>qnrS2</i>	Phe83	-	2008 (3)
	E5	Am, Amc, Nal, Cip, Tob, K (Ak, Nf, C, Fos)	No	No	Phe83/Asn87	Ile80	2008 (3)

ERIC-PCR, enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction.
^a Resistance phenotypes: Am, amoxicillin; Amc, amoxicillin/clavulanic acid; Nal, nalidixic acid; Fos, fosfomicin; C, chloramphenicol; Cip, ciprofloxacin; Nf, nitrofurantoin; K, kanamycin; Sxt, sulfamethoxazole/trimethoprim; T, tetracycline; St, streptomycin; Sp, spectinomycin; Sul, sulfonamides; Tob, tobramycin; Crx, cefturoxime; Ak, amikacin. Additional antibiotic resistances found in some but not all of the isolates are indicated by parentheses.
^b Size and resistance genes inserted within the variable region of class 1 integrons identified by PCR amplification and nucleotide sequencing using 5'-CS plus 3'-CS or 3'-CS reverse primers plus *bla_{OXA-1}* forward primers:*dfiA12* (trimethoprim resistance), *aadA2* (streptomycin and spectinomycin resistance), *aac(6')-Ib-cr* (kanamycin, tobramycin and amikacin resistance and ciprofloxacin decreased susceptibility), *bla_{OXA-1}* (β-lactam resistance), *catB3* (chloramphenicol resistance), *arr3* (rifampicin resistance).
^c Amino acid substitutions in *GyrA* and *ParC* deduced from mutations detected by PCR amplification and nucleotide sequencing of the quinolone-resistance determining regions of *gyrA* and *parC* genes from nalidixic acid-resistant isolates.
^d All isolates additionally produced SHV-1.
^e A single isolate.
^f Isolates with atypical 3'-end class 1 integron [negative for *qacEΔ1*, *sul1* and *sul3* (quaternary ammonium compounds and sulfonamide resistance genes associated with class 1 integrons)].

Author's personal copy

M.O. Pérez-Moreno et al. / International Journal of Antimicrobial Agents 37 (2011) 462–466

465

Table 3
Characteristics and resistance profiles of donor strains and transconjugants.

Isolate (β -lactamase; ERIC-PCR pattern)	<i>Int1/qnrS2</i> ^a	MIC (mg/L)															
		Am	Amc	Tzp	Cfz	Cx	Crx	Ctx	Cfp	Tob	Ak	Nal	Cip	C	Nf	Fos	Sxt
EC J53 Az-R ^b	No/No	≤4	≤4/2	≤16/4	≤2	≤4	≤1	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	≤4	≤0.12	≤4	≤64	≤16	≤2/38
Kp9 (IRT-11; E2) ^c	No/No	>16	16/8	≤16/4	≤2	≤4	≤1	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	≤4	≤0.12	>8	≤64	>32	≤2/38
TC Kp9 ^d	No/No	>16	16/8	≤16/4	≤2	≤4	≤1	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	≤4	≤0.12	≤4	≤64	≤16	≤2/38
Kp12 (IRT-11; E3) ^c	No/No	>16	16/8	≤16/4	8	16	>16	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	>16	>4	>8	>64	>32	≤2/38
TC Kp12 ^d	No/No	>16	16/8	≤16/4	≤2	≤4	≤1	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	≤4	≤0.12	≤4	≤64	≤16	≤2/38
Kp13 (IRT-11; E1) ^c	No/No	>16	16/8	≤16/4	≤2	≤4	≤1	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	≤4	≤0.12	≤4	≤64	≤16	≤2/38
TC Kp13 ^d	No/No	>16	16/8	≤16/4	≤2	≤4	≤1	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	≤4	≤0.12	≤4	≤64	≤16	≤2/38
Kp15 (IRT-11; E3) ^c	+/No	>16	16/8	≤16/4	≤2	≤4	2	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	>16	>4	>8	>64	16	>4/76
TC Kp15 ^d	+/No	>16	16/8	≤16/4	≤2	≤4	≤1	≤0.12	≤0.5	≤2	≤4	≤4	≤0.12	≤4	≤64	≤16	>4/76
Kp18 (OXA-1; E3) ^c	+/+	>16	16/8	32/4	4	4	16	≤0.12	1	>8	8	>16	>4	>8	>64	>32	≤2/38
TC Kp18 ^d	+/+	>16	16/8	32/4	≤2	≤4	16	≤0.12	1	8	8	16	2	8	≤64	≤16	≤2/38
Kp19 (OXA-1; E3) ^c	+/+	>16	16/8	64/4	4	≤4	8	0.25	2	>8	8	>16	>4	>8	>64	32	>4/76
TC Kp19 ^d	+/+	>16	16/8	32/4	≤2	≤4	8	0.25	2	>8	8	16	1	8	≤64	≤16	≤2/38
Kp21 (OXA-1; E3a) ^c	+/+	>16	16/8	64/4	4	≤4	16	0.5	2	>8	≤4	>16	>4	>8	>64	≤16	≤2/38
TC Kp21 ^d	+/+	>16	16/8	32/4	≤2	≤4	4	0.25	1	8	≤4	16	2	8	≤64	≤16	≤2/38
Kp22 (OXA-1; E4) ^c	+/+	>16	16/8	64/4	≤2	≤4	8	0.25	2	>8	8	16	4	≤4	≤64	≤16	≤2/38
TC Kp22 ^d	+/+	>16	16/8	64/4	≤2	≤4	8	0.25	2	>8	16	16	2	8	≤64	≤16	≤2/38
Kp25 (OXA-1; E5) ^c	No/No	>16	16/8	32/4	4	≤4	8	≤0.12	2	>8	16	>16	>4	≤4	≤64	32	≤2/38
TC Kp25 ^d	No/No	>16	8/4	≤16/4	≤2	≤4	8	≤0.12	1	>8	8	≤4	≤0.12	≤4	≤64	32	≤2/38

ERIC-PCR, enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction; MIC, minimum inhibitory concentration; Am, amoxicillin; Amc, amoxicillin/clavulanic acid; Tzp, piperacillin/tazobactam; Cfz, ceftazidime; Cx, cefoxitin; Crx, cefuroxime; Ctx, cefotaxime; Cfp, cefepime; Tob, tobramycin; Ak, amikacin; Nal, nalidixic acid; Cip, ciprofloxacin; C, chloramphenicol; Nf, nitrofurantoin; Fos, fosfomicin; Sxt, sulfamethoxazole/trimethoprim.

^a Presence of *int1* (encoding integrase 1) or *qnrS2* (encoding QnrS2).

^b Recipient strain (azide-resistant *Escherichia coli* J53).

^c *Klebsiella pneumoniae* donor strains.

^d Transconjugants.

In this series, isolates harbouring the *bla*_{IRT-11} gene located in a conjugative plasmid accounted for 37.3% of AMC-resistant *K. pneumoniae* isolates and for up to 11.1% of total isolates. IRT-11-producing isolates were distributed in three different clones, a finding which indicates that, in addition to clonal dissemination, horizontal transfer or independent emergence of *bla*_{IRT-11} may have occurred. Although IRT β -lactamases have been described in sporadic clinical isolates of *K. pneumoniae* [2], these enzymes, unlike TEM-derived ESBLs, are still infrequent and occur chiefly in community-acquired *E. coli* isolates [9–11]. The high diversity of mutant enzymes and the lack of clonal relatedness observed in some studies suggest the independent emergence and selection of these TEM variants under antibiotic selective pressure, posed by increasing use of inhibitor-containing combinations in clinical practice, rather than an epidemic dissemination [10,11]. Although IRT enzymes are usually encoded by genes harboured by conjugative plasmids, they appear to be less prone to be transmitted or selected than ESBLs or TEM-1 β -lactamases, perhaps because their production constitutes a less efficient resistance mechanism, protecting bacteria specifically against the action of inhibitors but not against the effects of other β -lactams. In fact, to our knowledge there is only one previous description reporting an outbreak involving IRT β -lactamases. This outbreak was caused by the dissemination of clonally related *K. pneumoniae* isolates recovered in a geriatric facility in France that produced IRT-2 [12]. It is appropriate to point out that the isolates in the current study were also obtained from patients from a chronic care centre, a setting where bacteria are submitted to heavy antibiotic selection pressure and where strict adherence to infection control precautions may be difficult to achieve.

With regard to isolates bearing the *bla*_{OXA-1} gene, which represented 51% of AMC-non-susceptible isolates and 15.2% of total isolates, all of them also carried *aac*(6')-Ib-cr, a gene encoding a new variant of the acetyltransferase Acc(6')-Ib that exhibits the ability to acetylate not only tobramycin, kanamycin and amikacin but also quinolones with a piperazinyl amine such as ciprofloxacin. In most of these isolates the *aac*(6')-Ib-cr-*bla*_{OXA-1} cassette array was

located within the variable region of a class 1 integron together with *catB3* and *arr3*, which confer resistance to chloramphenicol and rifampicin, respectively, and was associated with a *qnrS2* gene, probably in the same plasmid, since this determinant was consistently co-transferred by conjugation with the former integron. The aforementioned variable region was identical to that described in various enterobacterial clinical isolates from a different geographical origin [4,13] and to that recently identified in the class 1 integron of an aquatic isolate of *Aeromonas allosaccharophila* [14]. However, when specified, the In37-like integron of clinical isolates was associated with *qnrA* or *qnrB* and with an *ISCR1* element, whilst the integron of *A. allosaccharophila* was not linked to *ISCR1* and was placed in a plasmid carrying *qnrS2*, similar to what occurred with the present *K. pneumoniae* isolates. Interestingly, three of the OXA-1-producing isolates obtained in 2008 carried a class 1 integron lacking both the *qacE Δ 1* and *sul1* genes typically present in the 3'-CS of class 1 integrons and that was also not associated with *sul3*. This circumstance also appears to be common amongst aquatic environmental bacteria, perhaps because natural bacterial isolates are less likely to have been exposed to synthetic antimicrobials such as sulfonamides and hence may not yet have found a need to integrate a *sul* resistance gene cassette into their integron [15]. Although genotyping analysis demonstrated that the current spread of OXA-1-producing *K. pneumoniae* isolates in the chronic care centre under discussion was the result of clonal dissemination, the fact that we have recently identified two *qnrS2*-positive *E. coli* isolates, likewise carrying *aac*(6')-Ib-cr, *bla*_{OXA-1}, *catB3* and *arr3* genes inserted in the variable region of a defective class 1 integron (unpublished data), in patients admitted to the former institution is of concern and evidences the role of integrons in the dissemination and co-selection of resistance in Gram-negative microorganisms.

Finally, we would like to highlight what in our opinion is the most striking finding of this work, namely the simultaneous emergence and scatter in a healthcare institution of *K. pneumoniae* isolates displaying two different resistance mechanisms, quite uncommon in this species, which confer specific resistance to BLIs. We speculate that the elevated consumption of AMC in the

Author's personal copy

466

M.O. Pérez-Moreno et al. / International Journal of Antimicrobial Agents 37 (2011) 462–466

centre, where it was the most frequently prescribed antibiotic (data not shown), could have favoured the emergence and selection of IRT-11- and OXA-1-producing isolates. Additionally, in the latter case, the widespread use of fluoroquinolones could have also contributed, as is suggested by the association of *bla_{OXA-1}* with the plasmid-mediated quinolone resistance determinants *aac(6)-Ib-cr* and *qnrS2* and the coexistence of chromosomal mutations in the QRDR. Moreover, deficiencies in infection control measures probably led to their propagation amongst patients, resulting in the consequent epidemic outbreak.

Acknowledgments

The authors thank M. Pilar Cid Ventura and Carmen López Escorihuela for excellent technical support in the conduct of this study as well as Donna Pringle for editorial assistance. They also thank J. Calvo Montes (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain) for kindly providing *E. coli* J53-AzR.

Funding: This work was partially supported by Fundació Doctor Ferran (2006 Research on Health Sciences Grant). The research of JR is supported by project CP05/0130 of the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Spain).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:589–603.
- [2] Lemozy J, Sirot D, Chanal C, Huc C, Labia R, Dabernat H, et al. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2580–2.
- [3] Dubois V, Poirol L, Demarthe F, Arpin C, Coulange L, Minarini LA, et al. Molecular and biochemical characterization of SHV-56, a novel inhibitor-resistant β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3792–4.
- [4] Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler Bistué AJ, Guerriero L, Vargas LJ, et al. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6)-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4466–70.
- [5] Machado E, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Sousa JC, Peixe L, et al. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the *aac(6)-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3220–1.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. Document M100-S19. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- [7] Deplano A, Vaneechoutte M, Verschraegen G, Struelens M. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1997;35:2580–7.
- [8] Pérez-Moreno MO, Centelles-Serrano MJ, Cortell-Ortolá M, Ruiz J, Llovet-Lomabarte MI, Jardí-Baiges AM, et al. Multidrug resistance related to class 1 integrons in human *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates and emergence of atypical *sul3*-associated integrons. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:381–3.
- [9] Pérez-Moreno MO, Pérez-Moreno M, Carulla M, Rubio C, Jardí AM, Zaragoza J. Mechanisms of reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in *Escherichia coli* strains from the health region of Tortosa (Catalonia, Spain). *Clin Microbiol Infect* 2004;10:234–41.
- [10] Miró E, Navarro F, Mirelis B, Sabaté M, Rivera A, Coll P, et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant β -lactamases at a university hospital in Barcelona, Spain, over a 3-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3991–4.
- [11] Martín O, Valverde A, Morosini MI, Rodríguez-Domínguez M, Rodríguez-Baños M, Coque TM, et al. Population analysis and epidemiological features of inhibitor-resistant-TEM- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from both community and hospital settings in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol* 2010;48:2368–72.
- [12] Girlich D, Karim A, Poirol L, Cavin MH, Verny C, Nordmann P. Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2 β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:467–73.
- [13] Chang GY, Fang YT, Tsai SM, Chamg LL, Yu WL. Characterization of class 1 integrons and gene cassettes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:214–6.
- [14] Picão RC, Poirol L, Demarta A, Ferreira Silva CS, Corvaglia AR, Petrini O, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:948–50.
- [15] Rosser SJ, Young HK. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:11–8.

ARTÍCULO 4

Diseminación intrahospitalaria de *Klebsiella pneumoniae* portadora de los genes *qnrB4* y *bla*_{DHA-1} en el seno de un integrón complejo de clase 1 de nueva estructura (Trabajo remitido para su publicación a *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*)

Entre los meses de agosto y octubre de 2008 se recuperaron en el laboratorio de microbiología del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta tres aislados de *Klebsiella pneumoniae* con un fenotipo de resistencia compatible con la producción de una β -lactamasa AmpC plasmídica (resistencia a amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, ticarcilina, piperacilina, cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima y sensibilidad a piperacilina/tazobactam y carbapenemes) y la presencia de determinantes de resistencia plasmídica a quinolonas (CMI para ácido nalidíxico 16 mg/L y para ciprofloxacino entre 2 y 4 mg/L). Los tres aislados eran resistentes a kanamicina, intermedios o resistentes a tobramicina y sensibles a gentamicina y amikacina y procedían de muestras clínicas de tres pacientes internadas en un centro sociosanitario. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la relación clonal entre los aislados e identificar los determinantes responsables de la resistencia a β -lactámicos y quinolonas y caracterizar su entorno genético.

El primer aislado (agosto de 2008) no pudo rescatarse a partir del *stock* crioconservado y, por lo tanto, sólo se pudieron estudiar los dos aislados restantes (C1911 and C2812) que se recuperaron durante la misma semana de octubre de 2008 de dos pacientes ingresadas en distintas unidades. Uno de estos aislados procedía de una muestra de orina de una paciente de 84 años no portadora de sonda vesical pero que había recibido tratamiento con amoxicilina/clavulánico, cefuroxima y fosfomicina los dos meses anteriores a la obtención de la muestra y el otro de una muestra de sangre de una paciente de 72 años que llevaba un tubo de gastrectomía percutánea endoscópica y que en los dos meses previos había recibido tratamiento con amoxicilina/clavulánico, ceftazidima, metronidazol, fosfomicina y levofloxacino. Esta última paciente había coincidido en la misma unidad que la paciente de la que se recuperó el aislado obtenido en el mes de agosto.

Los aislados C1911 y C2812 pertenecían al mismo grupo filogenético (KpII) y secuencia tipo (ST483) y presentaban un patrón estrechamente relacionado por electroforesis en campo pulsado e indistinguible por ERIC-PCR (este patrón no coincidía con el de ninguno de los aislados productores de OXA-1 sensibles a cefazolina incluidos en el artículo 3). Mediante PCR y secuenciación se pudo comprobar que los dos aislados eran positivos para *bla*_{DHA-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV-1}, *qnrB4*, *qnrS2*, *aac(6')-Ib-cr* e *intI1* y que, por lo tanto, eran portadores de un integrón

de clase 1 y la resistencia a β -lactámicos y quinolonas estaba mediada por la producción de DHA-1 (AmpC plasmídica), OXA-1 y SHV-1 y la presencia de tres determinantes de resistencia plasmídica a quinolonas (QnrB4, QnrS2 y Aac(6')-Ib-cr), respectivamente. Ninguno de los dos aislados presentó mutaciones en la región QRDR de *gyrA* o *parC* ni poseía *qepA*.

El entorno genético de *bla*_{DHA-1} y *qnrB4* se estudió mediante ensayos de PCR solapante y secuenciación y se comprobó que ambos genes estaban asociados a un integrón complejo de clase 1 de nueva estructura (No acceso Genbank **GU906294**), que era muy semejante a In37 descrito en una cepa de *Escherichia coli* de Shanghái por Wang (**GenBank AY259086**) (Wang et al 2003) y sobre todo a la variante de In37 identificada por Verdet y colaboradores en un aislado de *K. pneumoniae* de la región de Paris (RBDHA **GenBank AJ971343**) (Verdet et al 2006), pero con el que presentaba algunas diferencias. La región variable 1 del integrón era idéntica a la de In37 [*aac(6')-Ib-cr*; *bla*_{OXA-1}; *catB3*; *arr3*], pero el gen *sul1* y gran parte de *qac* Δ E de la primera copia de 3'CS se habían delecionado por la introducción de IS26, que también ocasionó la delección del elemento *orf513* asociado a *ISCR1* y de *sapC*, *sapB* y *sapA* (que en In37 de la cepa RBDHA están ubicados entre la primera copia de 3'CS y el determinante *qnr*). El resto de la estructura era idéntica a la de In37 de la cepa RBDHA con *qnrB4* y parte del operón *psp* (*pspF*, *pspA*, *pspB*, *pspC* y *pspD*) *downstream* de *bla*_{DHA-1} y *ampR* y una segunda copia completa de 3'CS *upstream* de *bla*_{DHA-1}.

No fue posible demostrar la transferencia del integrón por conjugación al no conseguirse transconjugantes en los ensayos en medio líquido que se llevaron a cabo empleando la cepa *E. coli* J53 resistente a azida como receptora y agar tripticasa soja suplementado con azida y cefotaxima o sulfamidas para la selección de los transconjugantes.

En resumen, en este trabajo presentamos la diseminación por transmisión cruzada entre dos pacientes de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente portadora de *bla*_{DHA-1} y de *qnrB4* en el seno de un integrón complejo de clase 1 de nueva estructura, muy semejante a In37. Es probable que en este minibrote estuviera también implicada la paciente de la que se recuperó el aislado que no se pudo estudiar, que sería el caso índice, ya que dicho aislado presentaba el mismo fenotipo de resistencia que los otros dos.

Elsevier Editorial System(tm) for Diagnostic Microbiology and Infectious Disease
Manuscript Draft

Manuscript Number: DMID-11-559

Title: Intrahospitalary dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaDHA-1 and qnrB4 genes within a novel complex class 1 integron

Article Type: Note

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, blaDHA-1, qnrB4, class 1 integron

Corresponding Author: Prof. Carmen Torres, PhD in Pharmacy

Corresponding Author's Institution: University of Rioja

First Author: Mar Olga Pérez-Moreno, Dr

Order of Authors: Mar Olga Pérez-Moreno, Dr; Vanesa Estepa, PhD student; Yolanda Sáenz, PhD; María Cortell-Ortolá, Dr; Isabel Fort-Gallifa, Dr; Joaquim Ruiz, PhD; Carmen Torres, PhD in Pharmacy

Abstract: Two epidemiologically closely related broad-spectrum cephalosporin-, amoxicillin/clavulanate- and ciprofloxacin-resistant but nalidixic acid-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates were recovered from two patients admitted to a chronic-care center. Both isolates harbored the blaDHA-1 and qnrB4 genes located together with aac(6')-Ib-cr and blaOXA-1 within an In37-like complex class 1 integron of novel structure.

Cover Letter

Carmen Torres
Área de Bioquímica y Biología Molecular,
Departamento de Agricultura y Alimentación,
Universidad de La Rioja,
Madre de Dios 51,
26006 Logroño, Spain.
Phone: +34 941 299750; Fax: +34 941 299721
e-mail:carmen.torres@unirioja.es

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease
Editor-in-Chief

Logroño, 21-September-2011

Dear Editor

I send you the manuscript entitled “**Intrahospitalary dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{DHA-1} and *qnrB4* genes within a novel complex class 1 integron**” by Pérez-Moreno et al., to be submitted for publication in Diagnostic Microbiology and Infectious Disease as a Short Note.

All authors of the manuscript and of the acknowledgments section agree with the submission of this original and unpublished paper, and are responsible for its content.

I hope that the results presented in this manuscript will be of interest for the Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Looking forward to hearing from you soon,
Yours sincerely,

Carmen Torres

*Manuscript

1 **Intrahospitalary dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{DHA-1} and *qnrB4***
2
3 **genes within a novel complex class 1 integron.**
4

5
6 Mar Olga Pérez-Moreno^{1,2†}, Vanesa Estepa^{3†}, Yolanda Sáenz⁴, María Cortell-Ortolá¹, Isabel
7
8 Fort-Gallifa¹, Joaquim Ruiz^{5,6}, Carmen Torres^{3,4*}
9

10
11
12 ¹ Servei d'Anàlisis Clíniques, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa, Spain.
13

14
15 ² Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain.
16

17
18 ³ Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.
19

20
21 ⁴ Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR),
22 Logroño, Spain.
23

24
25 ⁵ Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), Institut d'Investigacions
26 Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic, Barcelona, (Spain).
27

28
29 ⁶ CIBER, Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain.
30
31

32
33
34 † These authors contributed equally to this work.
35
36

37
38 **Running title:** Novel class 1 integron with *bla*_{DHA-1} and *qnrB4*
39

40
41 **Corresponding author:**

42 Carmen Torres

43 Área de Bioquímica y Biología Molecular,

44 Departamento de Agricultura y Alimentación,

45 Universidad de La Rioja,

46 Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain.

47 Phone: +34 941 299750; Fax: +34 941 299721

48 e-mail: carmen.torres@unirioja.es
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

Two epidemiologically closely related broad-spectrum cephalosporin-, amoxicillin/clavulanate- and ciprofloxacin-resistant but nalidixic acid-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates were recovered from two patients admitted to a chronic-care center. Both isolates harbored the *bla*_{DHA-1} and *qnrB4* genes located together with *aac(6')-Ib-cr* and *bla*_{OXA-1} within an In37-like complex class 1 integron of novel structure.

1 *Klebsiella pneumoniae* is a common cause of community and hospital-acquired infections, for
2
3 which the first-line therapeutic choices are β -lactams and fluoroquinolones. However,
4
5 different mechanisms of resistance to these antibiotics have been reported. The production of
6
7 either AmpC or extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) confers resistance to broad-
8
9 spectrum cephalosporins and penicillins (Bush K, 2010), while mutations in *gyrA* and *parC*
10
11 genes and acquisition of plasmid-mediated quinolone-resistance determinants (*qnr*, *aac(6')*-
12
13 *Ib-cr*, *qepA*...) are responsible for fluoroquinolone resistance (Strahilevitz et al., 2009).

14
15
16
17 These genes may be found associated with other resistance genes (e. g. aminoglycoside or
18
19 phenicol resistance) within classic or complex class 1 integrons. Integrons are genetic
20
21 elements capable of acquiring, organizing and expressing gene cassettes. They contain an
22
23 integrase gene *intI1*, an *attI1* recombination site and a common promoter Pc implicated in the
24
25 gene cassette expression. Integrons may be located within transposons or plasmids, and then,
26
27 be transferred among different bacteria (Cambray et al., 2010).

28
29
30
31
32 Two *K. pneumoniae* isolates resistant to different beta-lactams and to ciprofloxacin but
33
34 susceptible to nalidixic acid, were recovered at the microbiology laboratory of Hospital Verge
35
36 de la Cinta (Tortosa, Catalonia, Spain). The aim of this study was to elucidate the mechanisms
37
38 involved in these phenotypes of resistance.
39
40

41
42 The two *K. pneumoniae* isolates studied (C1911 and C2812) were obtained during the same
43
44 week in 2008 from an urine and a blood sample, respectively, of two patients admitted to
45
46 different wards in a chronic-care centre. The first patient was an 84 years old-woman and the
47
48 second one a 79 years-old woman. Both of them suffered from several comorbidities and, in
49
50 the two previous months, they had received amoxicillin/clavulanic acid (AMC) and
51
52 cefuroxime or ceftazidime, among other antimicrobials, to treat various infectious episodes.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 When clonal relationship among both *K. pneumoniae* isolates was analyzed by PFGE *Xba*I-
2 digested genomic DNA (Sáenz et al., 2004), by multi-locus sequence typing (MLST)
3
4 (Diancourt et al., 2005) and by determining their phylogenetic group (Brisse et al. 2004), the
5
6 results showed that both isolates were closely related by PFGE and were ascribed to the same
7
8
9
10
11 MLST pattern (ST483) and phylogenetic group (KpII).

12
13 The antimicrobial susceptibility to 18 antimicrobial agents was assessed by the Wider
14
15 microdilution system with 95W and 93W panels (Francisco Soria Melguizo, Madrid, Spain)
16
17 or by disk diffusion method according to CLSI (2010). ESBL production was determined by
18
19 double-disk synergic test (Jarlier et al., 1988). Molecular mechanism of resistance to beta-
20
21 lactams and quinolones and the presence of class 1 integrons were investigated by PCR and
22
23 sequencing using the primers and conditions previously described (Table 1).
24
25
26
27

28
29 Table 2 shows the resistance phenotypes of *K. pneumoniae* C1911 and C2812. Both strains
30
31 exhibited decreased susceptibility to AMC (MIC >8/4 mg/L) and were resistant to
32
33 ceftazidime, cefotaxime, cefoxitin, ciprofloxacin, tobramycin, and kanamycin. ESBL
34
35 production was negative, but the resistance pattern suggested the production of an AmpC
36
37 cefamycinase. After PCR multiplex and subsequent sequencing (Pérez-Pérez and Hanson,
38
39 2002), the *bla*_{DHA-1} gene was detected in both strains, that additionally harbored the *bla*_{OXA-1}
40
41 and *bla*_{SHV-1} β-lactamase encoding genes and the *aac*(6′)-*Ib-cr*, *qnrB4* and *qnrS2* genes.
42
43
44 Neither *qepA* nor mutations in *gyrA* α/and *parC* were found in both *Klebsiella* strains,
45
46 therefore the coexistence of *aac*(6′)-*Ib-cr*, *qnrB4* and *qnrS2* could entirely account for the
47
48 observed nalidixic acid-susceptible and ciprofloxacin-resistance phenotype. Qnr protects the
49
50 quinolone-target, and AAC(6′)-*Ib-cr* confers resistance to ciprofloxacin and norfloxacin, but
51
52 not to nalidixic acid (Rodríguez-Martínez et al., 2011).
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 DHA-1 is an inducible plasmid-mediated AmpC β -lactamase derived from chromosomally
2 encoded AmpC of *Morganella morganii*. However, DHA-1 is increasingly reported in the
3 context of complex class 1 integrons in other *Enterobacteriaceae* such as *Klebsiella* spp. or
4 *Salmonella enterica* (Verdet et al., 2006). Previous treatment with AMC or
5 oxyminocephalosporins (the therapy administered to the two concerned patients) is
6 recognized as an independent risk factor to become infected by AmpC-producing
7 *Enterobacteriaceae* (Yan et al., 2004). Moreover, a strong association between *qnrB4* and
8 *bla_{DHA-1}* has been previously communicated (Diestra et al., 2010; Seo et al., 2010; Verdet et
9 al., 2006), mainly linked in complex integrons to the *ISCR1* element, which plays an
10 important role in the transfer of both genes. Accordingly, the genetic environment of the
11 *bla_{DHA-1}* and *qnrB4* genes was studied by PCR mapping (Table 1) and sequencing in
12 *K. pneumoniae* C1911 and C2812. The *bla_{DHA-1}* and its regulator *ampR* were associated with
13 multiple resistance genes: *qnrB4*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}*, *catB3* and *arr3* inside a new
14 complex class 1 integron (Figure 1). This new structure of C1911 strain was included in
15 GenBank database with the accession number GU906294. Interestingly, this integron shared
16 backbones of the In37 (GenBank AY259086) and pRBDHA (GenBank AJ971343) complex
17 integrons (Verdet et al., 2006), such as the four gene cassettes (*aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}*, *catB3*
18 and *arr3*) located in the variable region downstream of the integrase gene *intI1*. However,
19 *sul1* gene, *ISCR1* element, *sapC*, *sapB* and *sapA* genes were completely deleted in the C1911
20 and C2812 integrons due to the insertion of the *IS26* downstream of *qnrB4* gene. The
21 insertion sequence *IS26* is commonly encountered in many plasmids, occasionally in high
22 copy number, in different bacteria. When this element is directly repeated, is able to mobilize
23 all the structure between the formed transposon. Nevertheless, some plasmids (such as
24 pTN60013, GenBank AJ971345) carrying *bla_{DHA-1}* gene surrounded upstream and
25

1 downstream by IS26 and *qacEΔ1-sul1-orf5*-IS26, respectively, but not by ISCR1 or a
2
3 complete conventional class 1 integron, have been identified. It has been speculated that these
4
5 plasmids could have evolved from typical class 1 complex integrons owing to the insertion of
6
7 IS26 (Verdet *et al.*, 2006). The C1911 structure also supports this hypothesis, showing an
8
9 intermediate scenario between a typical class 1 complex integron and the pTN60013
10
11 structure.
12
13

14
15
16 No transconjugants of these *bla*_{DHA-1}-positive strains were detected after conjugation
17
18 experiments using as recipient the azide-resistant *E. coli* J53 strain (Pérez-Moreno *et al.*,
19
20 2011).
21
22

23
24
25 In summary, the cross dissemination between two patients of a multiresistant *K. pneumoniae*
26
27 strain harboring *qnrB4* and *bla*_{DHA-1} inside a novel complex class 1 integron is reported in this
28
29 work. The association of plasmid-mediated quinolone-resistance and *ampC* genes within
30
31 complex integrons may promote their coselection and dissemination and cause therapeutic
32
33 failures, therefore warranting close monitoring and further studies.
34
35
36
37
38
39
40

41 ACKNOWLEDGMENTS

42
43

44 We are grateful to P. Margalef for kindly providing patients' medical information and J.
45
46 Calvo Montes (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain) for kindly providing *E. coli*
47
48 J53 strain.
49
50

51
52
53 Funding: This work was partially supported by Fundació Doctor Ferran (2006 Research on
54
55 Health Sciences Grant). V. Estepa has a fellowship from the University of La Rioja (FPI-UR-
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

09/16599009R). J. Ruiz research is supported by the Miguel Servet fellowship CP05/0130
(Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain).

1 **REFERENCES**

- 2
3
4
5 1. Brisse S, Van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J (2004) Development of a rapid
6
7 identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420
8
9 clinical isolates. Clin Microbiol Infect 10: 942-945.
10
11
12 2. Bush K (2010) Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant
13
14 *Enterobacteriaceae*. Curr Opin Microbiol 13:558-564.
15
16
17
18 3. Cambray G, Guerout AM, Mazel D (2010) Integrons. Annu Rev Genet 44:141-166.
19
20
21
22 4. Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) Performance standards for
23
24 antimicrobial susceptibility testing. Twentieth International Supplement. M100-S20.
25
26 CLSI. Wayne, PA.
27
28
29
30 5. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S (2005) Multilocus sequence
31
32 typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol 43: 4178-4182.
33
34
35
36 6. Diestra K, Miró E, Martí C, Navarro D, Cuquet J, Coll P, Navarro F (2011) Multiclonal
37
38 epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. Clin
39
40 Microb Infect 17: 1032-1036.
41
42
43
44 7. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Phillipon A (1988) Extended broad-spectrum beta-
45
46 lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in
47
48 *Enterobacteriaceae*; hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 10:
49
50 867–878.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 8. Park Y, Kang HK, Bae IK, Kim J, Kim JS, Uh Y, Jeong SH, Lee K (2009) Prevalence of
2 extended spectrum beta-lactamase and *qnr* genes in clinical isolates of *Escherichia coli*.
3 Korean J Lab Med. 29: 218-223.
4
5
6
7
8
- 9 9. Pérez-Moreno MO, Centelles-Serrano MJ, Cortell-Ortolá M, Fort-Gallifa I, Ruiz J,
10 Llovet-Lombarte MI, Picó-Plana E, Jardí-Baiges AM (2011) Molecular epidemiology
11 and resistance mechanisms involved in reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic
12 acid in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a chronic care centre. Int J Antimicrob
13 Agents 37: 462-466.
14
15
16
17
18
19
20
21
- 22 10. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase
23 genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 40: 2153-2162.
24
25
26
27
- 28 11. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A (2011)
29 Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother 17: 149-182.
30
31
32
33
- 34 12. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C (2004)
35 Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of
36 human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother 48: 3995-4001.
37
38
39
40
41
- 42 13. Seo MR, Park YS, Pai H (2010) Characteristics of plasmid-mediated quinolone
43 resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant isolates of *Klebsiella*
44 *pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. Chemother 56: 46-53.
45
46
47
48
49
- 50 14. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A (2009) Plasmid-mediated quinolone
51 resistance: a multifaceted threat. Clin Microb Rev 22: 664-689.
52
53
54
55
- 56 15. Verdet C, Benzerara Y, Gautier V, Adam O, Ould-Hocine Z, Arlet G (2006) Emergence
57 of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. In the Parisian region: genetic organization of the
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. Antimicrob Agents
2
3 Chemother 50: 607-617.
4
5
6
7 16. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y (2008) Plasmid-mediated *qepA* gene
8 among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 52:
9 1564-1566.
10
11
12
13
14
15 17. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL (2004) Epidemiological investigation of
16 bloodstream infections by extended spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in
17 a Taiwanese teaching hospital. J Clin Microbiol 42: 3329–3332.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure(s)

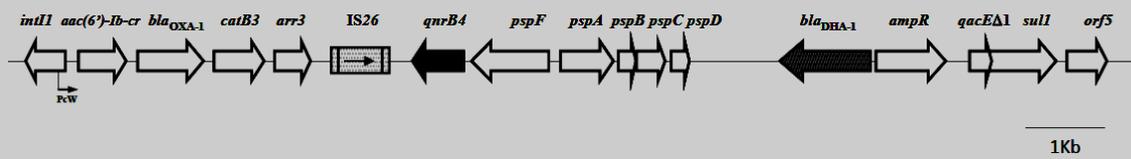


Figure 1.- Genetic environment of the *bla_{DHA-1}* and *qnrB4* genes in *K. pneumoniae* strain C1911. The nucleotide sequence has been included in GenBank with the accession number GU906294.

Table 1.- Primers and annealing temperatures used in the PCR reactions carried out in this study.

Target	Primer	Sequence (5'→3')	T ^a annealing	Reference
<i>Resistance genes</i>				
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	60°C	Sáenz et al., 2004
	TEM-R	ACGCTCAGTGAACGAAAAC		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	CACTCAAGGATGTATTGTG	52°C	Sáenz et al., 2004
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG		
<i>bla</i> _{OXA-1}	OXA1-F	ACACAATACATATCAACTTCGC	61°C	Sáenz et al., 2004
	OXA1-R	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC		
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -F	AAATCTGCCCGT GTCGTTGGT	55°C	Pérez-Moreno et al., 2011
	<i>gyrA</i> -R	GCCATACCTACGGCGATACC		
<i>parC</i>	<i>parC</i> -F	CCTTGCGCTACATGAATTTA	50°C	Pérez-Moreno et al., 2011
	<i>parC</i> -R	CAGGTTATGCGGTGGAATAT		
<i>aac</i> (6')-Ib	<i>aac</i> (6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	55°C	Pérez-Moreno et al., 2011
	<i>aac</i> (6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	55°C	Pérez-Moreno et al., 2011
	<i>qnrA</i> -R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> -F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	53°C	Pérez-Moreno et al., 2011
	<i>qnrB</i> -R	ACGATGCCTGGTAGTTGTC		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	55°C	Pérez-Moreno et al., 2011
	<i>qnrS</i> -R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
<i>qepA</i>	<i>qepA</i> -F	GGACATCTACGGCTTCTTCG	60°C	Yamane et al., 2008
	<i>qepA</i> -R	CAACTGCTTGAGCCCGTAG		
<i>intI1</i>	<i>intI1</i> -F	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	62°C	Sáenz et al., 2004
	<i>intI1</i> -R	ACATGCGTGTAATCATCGTCG		
<i>qacEA1-sul1</i>	<i>qacEA1</i> -F	GGCTGGCTTTTCTTGTTATCG	63°C	Sáenz et al., 2004
	<i>sul1</i> -R	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG		
VR ^a	RV1-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	55°C	Sáenz et al., 2004
	RV1-R	AAGCAGACTTGACCTGA		
<i>genetic environment of the bla</i> _{DHA-1} <i> and qnrB4 genes</i>				
<i>qnrB4</i>	<i>qnrB4</i> -F	GATGACTCTGGCGTTAGTTGG	53°C	Park et al., 2009
	<i>qnrB4</i> -R	CCATGACAGCGATACCAAGA		
<i>sap</i> and <i>psp</i> operon	<i>sapB</i> -F	GCCAGCTAAAGACCATCTCG	55°C	Verdet et al., 2006
	<i>pspF</i> -R	CCAGCGATTACCCACTGAAT		
Inside <i>psp</i> operon	<i>pspF</i> -F	CAGATCCAGCGGTAGGGTTA	55°C	Verdet et al., 2006
	<i>pspA</i> -R	CAACATCAATGCCTGCTGAC		
Between <i>psp</i> operon and <i>M. morgani</i> region	Faz-F	AAGAAACAGTGTGCCGCCAT	55°C	Verdet et al., 2006
	Morg-R	GGTAACGCTGATCGGTAAAC		
Between <i>psp</i> operon and <i>M. morgani</i> region	<i>pspD</i> -F	CCGGCAATCAGGCTAAATAA	55°C	Verdet et al., 2006
	<i>ampC</i> -R	TCCGAAAAACAGGTGGCGA		
Second copy of 3'-CS ^b	<i>ampR</i> -F	CGTGAGCGGGTGAAAGTCG	55°C	Verdet et al., 2006
	<i>orf5</i> -R	AAGTGTGACGTTGGGTGAAT		
<i>M. morgani</i> region	DHA1-F	CTCATCTCCATAAAACAGC	55°C	Verdet et al., 2006
	DHA1-R	TTATCTCACACCTTTATTACT		
<i>M. morgani</i> region	DHA2-F	AGATACATTGCCATTTCCAG	55°C	Verdet et al., 2006
	DHA2-R	ACTTGCCGCCGTTACTCACA		
<i>M. morgani</i> region	DHA3-F	TGTGCCATCAGCGGTTTATT	55°C	Verdet et al., 2006
	DHA3-R	TGGAAGGTGAGTGAGTTTAA		

^a Class 1 variable region^b 3'-conserved segment (*qacEA1-sul1*)

Table(s)

Table 2.- Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and antimicrobial resistant phenotypes in *K. pneumoniae* strains C1911 and C2812.

Antimicrobial agents	MIC in mg/L (phenotype) ^a	
	C1911 isolate	C2812 isolate
Amoxicillin/clavulanic acid	16/8 (I)	32/16 (R)
Ceftazidime	>16 (R)	>16 (R)
Cefotaxime	>8 (R)	>8 (R)
Cefepime	≤0.5 (S)	≤0.5 (S)
Cefoxitine	>16 (R)	>16 (R)
Imipenem	≤0.12 (S)	≤0.12 (S)
Meropenem	≤0.12 (S)	≤0.12 (S)
Nalidixic acid	16 (S)	16 (S)
Ciprofloxacin	4 (R)	4 (R)
Gentamicin	≤2 (S)	≤2 (S)
Tobramycin	8 (I)	>8 (R)
Kanamycin ^b	(R)	(R)
Amikacin	≤4 (S)	≤4 (S)
Streptomycin ^b	(S)	(S)
Tetracycline	≤4 (S)	≤4 (S)
Sulphonamides ^b	(S)	(S)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≤2/38 (S)	≤2/38 (S)
Fosfomicin	>32 (R)	≤8 (S)

^a Phenotype determined by CLSI criteria (2010). R: resistant, S: susceptible, I: intermediate resistant.

^b Determined by disk diffusion method.

Discusión

RESISTENCIA ANTIBIÓTICA E INTEGRONES DE CLASE 1 EN AISLADOS CLÍNICOS DE ORIGEN HUMANO DE *SALMONELLA ENTERICA* DE LA REGIÓN SANITARIA TERRES DE L'EBRE

RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

Las resistencias antibióticas en serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica* han aumentado sustancialmente en las últimas décadas, llegando a constituir un serio problema de salud pública, pues está documentado que las infecciones por cepas resistentes se asocian con una peor respuesta clínica y una mayor morbimortalidad (Martin LJ et al 2004, Helms M et al 2002). En los países desarrollados estas resistencias parecen ser una consecuencia prácticamente inevitable del uso de antibióticos en animales destinados a la alimentación, tanto con fines terapéuticos como profilácticos e incluso como promotores del crecimiento, a pesar de los esfuerzos legislativos y las recomendaciones de las sociedades científicas para poner coto a su uso y racionalizarlo (Threlfall et al 2006, Torres et al 2010, Anónimo Food and Drug Administration 2010).

Las tasas de resistencia en *S. enterica* son muy variables y dependen de los serotipos, del origen de los aislamientos (diferentes tipos de animales o humanos) y de los clones circulantes, entre otras circunstancias. Así, por ejemplo, Threlfall et al (Threlfall et al 2006) comunicaron una disminución de la resistencia a los antibióticos en *Salmonella* en Inglaterra y Gales de casi el 25% entre 2000 y 2004 como consecuencia del declive en la incidencia de *S. Typhimurium* del fagotipo 104 y Domínguez-Rodríguez et al registran diferencias considerables en las tasas de resistencia a diferentes antibióticos en *Salmonella* y otros agentes zoonóticos en función de los animales de los que procedían los aislados, diferencias probablemente relacionadas con los serotipos más prevalentes y los antibióticos más usados en cada uno de ellos (Domínguez Rodríguez et al 2010).

Respecto a los serotipos aislados en nuestro laboratorio, el más frecuente en el periodo 2004-2009 fue Typhimurium (39,7%), seguido de Enteritidis (39,3%), Rissen (3,3%), Hadar (2,9%), la variante monofásica [4,(5),12:i:-] de *S. Typhimurium* (2,1%), Bredeney (1,3%) y Newport (1,1%). Éstos fueron también los serotipos más frecuentes entre los aislados de origen humano recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* español (LNRSE) entre 2004 y 2005 (Echeita MA et al 2007). Llama la atención el importantísimo descenso de *S. Enteritidis* registrado en nuestro laboratorio a lo largo del periodo de estudio, tanto en el número de aislamientos totales como en la frecuencia relativa, que pasó del 51,9% en 2000 al 20,7% en 2009, mientras que el comportamiento del serotipo Typhimurium fue el opuesto

pasándose de una frecuencia del 39,5% en 2000 al 59,8% en 2009 y habiéndose constituido en el más prevalente. La misma tendencia, tanto en números absolutos como relativos, se observa en los datos aportados por el LNRSE para el conjunto del estado español, detectándose un claro descenso de casos del serotipo Enteritidis a partir del 2003 y un aumento en el serotipo Typhimurium, si bien el serotipo Enteritidis seguía siendo el más frecuente en el año 2008 (39,2%) (Velasco et al 2009). El reemplazo del serotipo Enteritidis por el Typhimurium puede ser consecuencia de la aplicación de las medidas de vigilancia, prevención y control incluidas en el Programa de control de *Salmonella* en huevos y ovoproductos impulsadas en 2004 por los entonces denominados Ministerios de Sanidad y Consumo, y de Agricultura, Pesca y Alimentación. Estas medidas habrían resultado muy efectivas en el serotipo Enteritidis por su asociación al consumo de ovoproductos, pero mucho menos apreciables para el serotipo Typhimurium en el que la infección está preferentemente relacionada con la ingesta de carne de cerdo contaminada (Velasco et al 2009).

Como cabía esperar, los datos de resistencia que encontramos en nuestros aislados de los serotipos más prevalente (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Hadar*) son concordantes con los que se registraron en un estudio de vigilancia realizado en el LNRSE con aislados de origen humano procedentes de todo el estado Español recibidos entre 2000 y 2003 (Soler et al 2006) y también son muy semejantes a los obtenidos en un estudio de vigilancia llevado a cabo a nivel de la comunidad europea y Noruega, Suiza, Australia, Japón, Nueva Zelanda y Sudáfrica con aislados humanos del 2002, excepto en lo que se refiere a las tasas de resistencia a amoxicilina y ácido nalidíxico en los serotipos Enteritidis, Virchow y Hadar que fueron considerablemente más altas en España que las observadas para el conjunto de países participantes (Threlfall et al 2006).

S. Typhimurium fue el serotipo en el que se registró mayor frecuencia de multiresistencia (resistencia a tres o más familias de antibióticos), destacando los elevados porcentajes de resistencia a antibióticos ampliamente usados en ganado porcino, que constituye su principal reservorio (Burch 2005), como son tetraciclina (84,8%), amoxicilina (81,5%), estreptomina (79,4%) y sulfamidas (77,2%), pero también a cloranfenicol (60,9%), posiblemente debido a la amplia distribución en nuestro país de aislados portadores de elementos genéticos movilizables (integrones ubicados en la SGI1 o en plásmidos de virulencia resistencia) en los que coexisten los determinantes de resistencia a cloranfenicol y los determinantes que confieren resistencia a los antibióticos anteriormente citados (Herrera et al 2008, Pérez-Moreno et al 2005). Esta hipótesis vendría apoyada por los datos de resistencia exhibidos por los aislados del serotipo Rissen, cuyo reservorio también son los cerdos, que son elevados para

amoxicilina, estreptomicina, tetraciclina y sulfamidas pero mucho menos para cloranfenicol. Las tasas de resistencia de los aislados humanos de *S. Typhimurium* de nuestro ámbito geográfico coinciden con las que refleja para los aislados procedentes de España el informe elaborado por la *European Food Safety Authority* (EFSA) con aislados de diferentes países europeos obtenidos en el año 2009. Las tasas españolas son notablemente más elevadas para amoxicilina, estreptomicina, tetraciclina, sulfamidas y cloranfenicol que las obtenidas para la media de países participantes (Anónimo. EFSA 2011(b)). Es probable que esta diferencia, que no se observaba en el estudio del año 2002 al que hacíamos referencia con anterioridad (Threlfall et al 2002), sea atribuible a que la progresiva disminución de la incidencia de aislados pentarresistentes del fagotipo 104 y relacionados que se ha producido en toda Europa (Meakins S et al 2008) no ha ido paralela a la emergencia de los aislados pentarresistentes asociados al integron 2kb/*bla*_{OXA-1}-*aadA1* que sí ha tenido lugar en España.

Los aislados de la variante monofásica [4,5,12:i:-] de *S. Typhimurium* con resistencia a ampicilina, tetraciclina, estreptomicina y sulfamidas, se están extendiendo rápidamente por varios países europeos, donde parece que están sustituyendo a *S. Typhimurium* DT104 (Hopkins et al 2010). En nuestro laboratorio los empezamos a detectar a partir de 2008 (datos no publicados), pero no estaban presentes entre los aislados de *S. Typhimurium* de 2004-2006 que dieron lugar al artículo número 1, de los que sólo tres pertenecían a la variante monofásica y dos de los cuales presentaron un patrón más amplio de resistencia asociado a integrones atípicos. En cuanto a la resistencia en los otros dos serotipos más prevalentes, cabe destacar que la multirresistencia, afectando mayoritariamente a ampicilina, tetraciclina, estreptomicina y ácido nalidíxico, fue una característica del serotipo Hadar (81,3% de los aislados) como ya se ha observado en otros estudios (Soler et al 2006, Threlfall et al 2006), mientras que era rara en el serotipo Enteritidis (7,7%) en el que lo más destacable era la elevada tasa de resistencia a ácido nalidíxico y disminución de sensibilidad a ciprofloxacino (46,3% y 45,2%).

Resistencia a quinolonas

En *S. enterica* las resistencias a fluoroquinolonas y cefalosporinas de amplio espectro son las que tienen verdadera transcendencia clínica, puesto que éstos son los agentes de elección en aquellos casos en que la infección requiere tratamiento antibiótico por ser extraintestinal (Hohman 2001). La resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas es poco frecuente en *S. enterica*, especie en la que parece tener un alto coste biológico (Guiraud E et al 2006), pero la resistencia a ácido nalidíxico es mucho más común en algunos serotipos, principalmente los de reservorio aviar, como Enteritidis, Virchow y Hadar, y particularmente en nuestro país (Mølbak et al 2002, Marimon et al 2004, Soler P et al 2006, Anónimo EFSA 2009), donde se ha

relacionado con el amplio uso en el pasado de estos compuestos en las aves de corral (Soler et al 2006). La resistencia global a ácido nalidíxico, prácticamente en todos los casos asociada a disminución de sensibilidad a ciprofloxacino, que encontramos en los aislados de serotipos distintos al Typhimurium fue del 41,1%, con tasas del 45% para *S. Enteritidis*, del 93,7% para *S. Hadar* y del 80% para *S. Virchow*, lo que constituye un motivo de preocupación, ya que hay constancia de que se asocia con una menor efectividad del tratamiento con fluoroquinolonas (Helms et al 2002, Helms et al 2004). La resistencia a fluoroquinolonas en el serotipo Typhimurium es mucho menor (en nuestra serie sólo un 3,3% fueron resistentes a ácido nalidíxico), aunque después de la introducción de enrofloxacin en veterinaria se registraron en diferentes países algunos brotes ocasionados por *S. Typhimurium* DT104 con disminución de sensibilidad a ciprofloxacino (Threlfall 1997, Mølbak et al 1999, Walker et al 2000).

El principal mecanismo implicado en la resistencia a quinolonas son las mutaciones puntuales en la QRDR de *gyrA* (que suelen conducir a modificaciones en los residuos Ser83 y Asp87), pero se ha comprobado que la expulsión activa mediada por la sobreexpresión del sistema AcrAB-TolC tiene gran relevancia en *Salmonella* (en algunos serotipos como Typhimurium y Virchow incluso más que las mutaciones puntuales en *gyrA*) (Giraud et al 2006, Solnic-Isaac 2007). La resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas sólo se detectó en tres aislados de *S. Kentucky* de pacientes que habían viajado al Norte de África. La emergencia de aislados de este serotipo resistentes a ciprofloxacino en pacientes con historia reciente de viajes al Norte de África ha sido descrita en Francia y Bélgica y en todos los casos coexistían mutaciones dobles en *gyrA*, con mutaciones puntuales en *parC* y sobreexpresión de AcrAB-TolC (Weill et al 2006; Collard et al 2007). Recientemente hemos recuperado un cuarto aislado de *S. Kentucky* resistente a ciprofloxacino a partir de un hemocultivo de un paciente inmunodeprimido que no había viajado al extranjero, por lo que el origen podría estar en algún alimento importado contaminado (datos no publicados).

Uno de los últimos mecanismos descritos de resistencia a quinolonas es la resistencia plasmídica mediada por genes *qnr* (Martínez-Martínez et al 1998), que parece ser todavía relativamente rara en *Salmonella* y asociarse a menudo con resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (Cheung et al 2005, Cattoir et al 2007), aunque algunos autores las detectan en aislados de *Salmonella* sensibles a estos compuestos (Gay et al 2006, Herrera-León et al 2011). La presencia aislada de determinantes *qnr* generalmente confiere resistencia moderada a fluoroquinolonas y también a ácido nalidíxico -con CMI que pueden no superan 16 mg/L-, por lo que este mecanismo de resistencia podría pasar desapercibido si se siguen las recomendaciones del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) de considerar sensibles a fluoroquinolonas los aislados de *Salmonella* cuya CMI a ácido nalidíxico sea <32 mg/L (Gay K et

al 2006). En nuestro laboratorio sólo identificamos dos aislados de un total de 382 correspondientes a *S. enterica* de serotipo no Typhimurium (0,52%) con determinantes *qnr*, en concreto *qnrA1* en un aislado de *S. Grumpensis* productor de CTX-M-9 y *qnrB4* en otro aislado de *S. Newport* productor de DHA-1, ambos con una CMI de 16 mg/L para ácido nalidíxico y 1 mg/L para ciprofloxacino. En cualquier caso, no podemos descartar que su prevalencia esté infraestimada pues sólo investigamos la presencia de genes *qnr* en los aislados resistentes a cefalosporinas de tercera generación o en los que presentaban CMI a nalidíxico ≤ 16 mg/L y $>0,12$ mg/L a ciprofloxacino. Herrera-León et al, siguiendo la misma estrategia, detectaron determinantes *qnr* en sólo 122 de los aislados de *Salmonella* remitidos al LNRSE entre 2003 y 2008, de los que únicamente tres correspondían a aislados resistentes a cefalosporinas de tercera generación (*qnrB2* en *S. Bredeney* productora de SHV-12, *qnrS2* en *S. Typhimurium* productora de SHV-12 y *qnrB4* en *S. Newport* productora de DHA-1; este último aislado probablemente era el mismo al que nosotros hacemos referencia en el artículo 2 puesto que fue enviado para su serotipificación al LNRSE en 2004 y coinciden los patrones de resistencia). *qnrA1* fue detectado mayoritariamente en aislados del serotipo Thompson (n=25) relacionados clonalmente y *qnrS1* en aislados del serotipo Typhimurium DT104b (n= 91) también relacionadas clonalmente (Herrera-León et al 2011). No se conoce la trascendencia clínica real de la emergencia y diseminación de aislados de *Salmonella* con resistencia mediada por proteínas Qnr, pero teniendo en cuenta que por su localización en plásmidos pueden transferirse horizontalmente, que suelen asociarse a resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y, que si bien confieren resistencia moderada a quinolonas, bajo presión selectiva favorecerían la selección de mutantes con alto nivel de resistencia (Giraud et al 2006), sería interesante realizar estudios prospectivos y de vigilancia.

β -lactamasas identificadas y resistencia a cefalosporinas de tercera generación

La resistencia a β -lactámicos en las dos series de *Salmonellas* estudiadas, estuvo mediada prácticamente en todos los casos por la producción de β -lactamasas plasmídicas de amplio espectro de los grupos 2b (TEM-1), 2c (PSE-1) y 2d (OXA-1) sin actividad hidrolítica frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, excepto en el caso OXA-1 que puede dar lugar a ligeros incrementos en la CMI de cefepime (Bush y Jacoby 2010). En los aislados del serotipo Typhimurium el enzima predominante fue OXA-1, seguido de PSE-1 (ambos vinculados siempre a integrones de clase 1) y de TEM-1, mientras que TEM-1 fue la única β -lactamasa de amplio espectro identificada entre los aislados del resto de serotipos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores de nuestro entorno (Antunes et al 2006, Rodicio et al 2008, Herrero et al 2008), salvo en lo que se refiere a la prevalencia de OXA-1 en *S. Typhimurium* resistente a ampicilina que en nuestra colección alcanzó el 48% frente al 19% y 42%

registrados en dos estudios llevados a cabo en el LNRSE entre 2002 y 2004 y en los que, además, la prevalencia podría estar sobreestimada al incluirse sólo aislados multirresistentes (Rodicio et al 2008, Herrero et al 2008). Curiosamente en cuatro aislados (tres de *S. Rissen* y 1 de *S. Mikawasima*) con un fenotipo de resistencia compatible con la producción de una β -lactamasa de amplio espectro no pudimos dilucidar el mecanismo de resistencia a amoxicilina, pues la PCR fue negativa para *bla*_{OXA-1}, *bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}. La resistencia a amoxicilina/clavulánico fue del 16% en el serotipo Typhimurium, relacionada con la producción de OXA-1 y PSE-1, y de sólo el 1,9% en el resto de serotipos, concentrándose la mayoría de casos en el serotipo Hadar.

La resistencia a cefalosporinas de tercera generación, la otra opción terapéutica en casos de salmonelosis invasiva, afortunadamente fue muy baja en los aislados estudiados: tan sólo se obtuvieron cuatro aislados productores de β -lactamasas de espectro extendido (CTX-M-9 en un aislado de *S. Virchow* y otro de *S. Grumpensis*, CTX-M-15 en un aislado de *S. Kapemba* y SHV-12 en un aislado de *S. Enteritidis*) y un aislado de *S. Newport* productor de la cefamicinasa plasmídica DHA-1, mientras que no encontramos ningún aislado productor de estos tipos de enzimas entre los 92 de *S. Typhimurium* recuperados entre 2004 y 2006, aunque en uno de ellos se desarrolló resistencia in vivo en el curso del tratamiento con amoxicilina/clavulánico como consecuencia de la adquisición de la AmpC plasmídica CMY-2. Todos estos enzimas han sido descritos previamente en *S. enterica* (González-Sanz et al 2009, Rodríguez et al 2009), pero, hasta donde sabemos, ésta es la primera vez que se comunica la producción de β -lactamasas de espectro extendido en los serotipos Kapemba y Grumpensis. La resistencia a cefalosporinas de amplio espectro mediada por la adquisición de β -lactamasas de espectro extendido y cefamicinasas plasmídicas no está generalizada en Europa, donde de acuerdo al informe de EFSA en aislados del 2009 era del 0,7% y del 0,6% para los aislados procedentes de España (Anónimo. EFSA 2011), aunque sí que afecta a una gran variedad de serotipos, lo que se explicaría por la localización de los genes que las codifican en plásmidos conjugativos de gran tamaño (Hasman et al 2005, Politi et al 2005, González-Sanz et al 2009, Rodríguez et al 2009). En un trabajo llevado a cabo con 11.317 aislados de *S. enterica* recibidos en el LNRSE del Centro Nacional de Microbiología entre 2001 y 2005, 27 (0,26%) pertenecientes a 12 serotipos distintos resultaron resistentes a cefotaxima; se identificaron 8 tipos de β -lactamasas de espectro extendido, siendo CTX-M-9 la más frecuente seguida de SHV-12, y dos tipos de cefamicinasas plasmídicas (CMY-2 y DHA-1) (González-Sanz et al 2009). La preponderancia de las enzimas CTX-M-9 y SHV-12 en España también se confirmó en aislados de *S. enterica* de animales sanos destinados a la producción de carne en España (Riaño et al 2006). En España la producción de CTX-M-9 es particularmente elevada en aislados clonales multirresistentes de

S. Virchow del fagotipo 19, distribuidos por todo el territorio, y se ha demostrado que está asociada con la diseminación de plásmidos conjugativos del grupo de incompatibilidad IncH2 que albergan un integrón complejo en cuya región variable se ubican determinantes de resistencia a trimetoprim y estreptomicina. La emergencia de estos aislados resulta especialmente preocupante por la propensión del serotipo *Virchow* a producir infecciones sistémicas (Herrera-León S et al 2010). En el grupo de las AmpC plasmídicas, CMY-2 es la más frecuente, igual que sucede en el resto de enterobacterias, y su diseminación parece deberse fundamentalmente a su transferencia horizontal ya que se ha detectado en muchos serotipos distintos (Herrera-León et al 2010), aunque hace algunos años emergió en Estados Unidos un clon de *S. Newport* multirresistente productor de CMY-2, cuyo reservorio era el ganado vacuno enfermo, que se diseminó por todo el país (Zhao et al 2003). El enzima DHA-1 se ha descrito asociado a integrones complejos y determinantes *qnr* en aislados de diferentes miembros de las enterobacterias (Verdet et al 2006, Quiroga et al 2007), pero su presencia en *Salmonella* es anecdótica; Herrera-León et al refieren la producción de DHA-1 en un único aislado de *S. Newport* positivo para *qnrB4* pero no portador de integrones de clase 1, en lo que sería el primer caso de esta asociación en *Salmonella* y también el primer caso de producción de DHA-1 en el serotipo *Newport* en España (Herrera-León et al 2010, Herrera-León et al 2011), que creemos -como ya hemos comentado con anterioridad- que se corresponde con el aislado de las mismas características de nuestra serie. El hecho de que tanto las β -lactamasas de espectro extendido, como las de tipo AmpC identificadas en aislados de *S. enterica* de origen humano sean las mismas que se detectan en aislados de origen animal (Riaño et al 2006, Riaño et al 2009, Zhao et al 2003) sugieren que la fuente de transmisión es la cadena alimentaria. Habida cuenta que el uso de cefalosporinas de amplio espectro en veterinaria es mucho menor que en medicina humana, cabe pensar que sería el empleo de otros antibióticos como sulfamidas, estreptomicina o tetraciclina el que habría seleccionado indirectamente aislados con β -lactamasas de espectro extendido o AmpC plasmídicas, que acostumbran a presentar coresistencia a dichos antimicrobianos (Torres et al 2010).

La adquisición de estas enzimas por *S. enterica* también puede producirse, aunque mucho más raramente, en el mismo paciente por transmisión horizontal de los plásmidos que los vehiculan a partir de otras especies presentes en el intestino como consecuencia de la selección ejercida por el tratamiento antibiótico. Un ejemplo de esta posibilidad lo constituye el caso que presentamos como *addendum* al artículo 1: se trataba de una lactante con gastroenteritis febril a la que se cursó un coprocultivo a su ingreso en urgencias del que se recuperó un aislado multirresistente de *S. Typhimurium* fagotipo U311 con el fenotipo y

genotipo de resistencia característico de la presencia de SGI1 y en la que, tras recibir tratamiento con amoxicilina/clavulánico, se recuperó otro aislado de *S. Typhimurium* U311 con idéntico patrón por electroforesis en campo pulsado y secuencia tipo que el original pero con resistencia adicional a cefamicinas, amoxicilina/clavulánico y cefalosporinas de espectro extendido, que se demostró que estaba mediado por *bla*_{CMY-2} en el entorno genético *ISEcp1* - *bla*_{CMY-2} - *blc* y que se podía transferir por conjugación. Este entorno genético, con ligeras variaciones, es común a todos los aislados de enterobacterias portadores de *bla*_{CMY-2} plasmídica; los genes *bla*_{CMY-2} y *blc* son originarios del cromosoma de *Citrobacter freundii* y el elemento transposón-like *ISEcp1* se cree que está implicado tanto en la movilización de *bla*_{CMY-2} desde el cromosoma de *C. freundii* a diferentes plásmidos como en la expresión de *ampC* en ausencia del *ampR* cromosómico (Verdet et al 2009). Aunque no podemos descartar la posibilidad de que los dos aislados (el aislado original negativo para *bla*_{CMY-2} y el recuperado tras el tratamiento que sí que albergaba *bla*_{CMY-2}) estuvieran presentes desde un primer momento en el tracto gastrointestinal de la paciente y el segundo fuese seleccionado por el tratamiento, pensamos que es igualmente plausible que se trate de un caso de adquisición *in vivo* de la cefamicinas plasmídica a partir otro enterobacteria de la flora intestinal de la paciente. La adquisición *in vivo* de β -lactamasas CTX-M en el curso del tratamiento, presumiblemente a partir de flora intestinal comensal, se ha documentado en aislados de origen humano de *S. Anatum* (Su et al 2000) y *S. Kentucky* (Collard et al 2007) en los que fue responsable del fracaso terapéutico y la transmisión horizontal de CMY-2 desde *E. coli* a *S. Newport* se consiguió fácilmente en un modelo animal con pavos (Peppe et al 2005). Por otro lado, el uso de inhibidores de β -lactamasas se ha identificado como un factor de riesgo independiente para la infección por *E. coli* productor de CMY-2 (Yan et al 2000, Yan et al 2004).

RESISTENCIA ASOCIADA A INTEGRONES DE CLASE 1

El interés por el papel de los integrones, elementos genéticos movilizables de gran versatilidad que se conocieron a principios de la década de los 80, en la emergencia y diseminación de resistencias en *S. enterica* cobró verdadera vigencia cuando algunos trabajos demostraron que todas las cepas del clon epidémico de *S. Typhimurium* DT104 de distribución mundial poseían dos integrones de clase 1 (1 Kb/*aadA2* y 1,2 Kb/*bla*_{PSE-1}) que explicaban parcialmente el característico fenotipo de pentarresistencia (ampicilina, estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol y sulfamidas) (Ridley y Therlfall 1998, Sandvang et al 1998, Briggs y Fratamico 1999). Posteriormente se supo que estos dos integrones estaban ubicados en una isla genómica cromosómica de 43 Kb (SGI1 por *Salmonella Genomic Island 1*), que por su

contenido en guanina o citosina probablemente se había adquirido horizontalmente a partir de organismos acuáticos como *Vibrio* o *Pseudomonas aeruginosa*, y en concreto en un segmento de 13 kb denominado región de multirresistencia, en el que también se encontraban los genes *tetG* y *floR* que conferían resistencia a tetraciclina y cloranfenicol (Mulvay et al 2006). Son numerosos los trabajos que ilustran la diseminación de las cepas de *S. Typhimurium* del fagotipo 104 y relacionados con el fenotipo y genotipo de resistencia que hemos citado, que durante muchos años han sido las predominantes en Europa y en América (Casin et al 1999, Guerra et al 2000, Carattoli et al 2002, Lindstedt et al 2003 (b), Nógrady et al 2005, Antunes 2006 (a), Majtánová et al 2007, Vo ATT 2006, Glynn et al 1998, Cabrera et al 2006), lo que podría estar relacionado con la localización cromosómica de la estructura genética responsable de la resistencia que le permitiría fijarse de forma estable incluso en ausencia de presión selectiva.

En nuestra región sanitaria los resultados obtenidos en un estudio llevado a cabo con aislados de *S. enterica* de 2000-2001 productores de β -lactamasas avalaban esta situación, aunque ya entonces se pudo constatar por primera vez en España la inusual frecuencia de aislados del serotipo Typhimurium (mayoritariamente no tipables, de fagotipo no reconocido o fagotipo 104b) con el mismo patrón de resistencia pero en los que se detectaba un integrón de 2 Kb con el *array* de casetes *bla*_{OXA-1}-*aadA1* (Pérez-Moreno et al 2005). En el estudio posterior, recogido en el artículo 1, que comprendía aislados de 2004 a 2006 se comprobó que el 73% de los aislados del serotipo Typhimurium eran multirresistentes y que el 79% de éstos eran portadores de integrones de clase 1. Se observó, asimismo, la disminución en la frecuencia de aislados con las características propias de la presencia de SGI1 (*floR*, *tetG* e integrones *aadA2* y *bla*_{PSE-1}), que habían pasado del 24% al 16,3%, y el incremento en la de los aislados con el integrón *bla*_{OXA-1}-*aadA1*, que se habían erigido en los más prevalentes, y se comunicó por primera vez que, a diferencia de lo que sucede con los aislados portadores de la SGI1, eran uniformemente resistentes a nitrofurantoina. La presencia de aislados de *S. Typhimurium* con este tipo de integrón se había descrito con anterioridad de forma esporádica por algunos autores (Tosini et al 1998, Guerra et al 2000, Carattoli et al 2002, Lindstedt et al 2003 (b), Weill et al 2006), pero aparentemente sólo se convirtieron en epidémicos en Portugal (Antunes et al 2004) y sobre todo en España (Herrero et al 2006, Rodríguez et al 2008, Herrero et al 2008), aunque recientemente se ha comunicado por primera vez su detección en el Reino Unido (Herrera et al 2009). Sin embargo, los datos de nuestra serie indican que la prevalencia en nuestro área geográfica, en donde suponían un 39% del total de aislados de *S. Typhimurium*, es superior a la que se observa para el conjunto de España (Rodríguez et al 2008, Herrero et al 2008). Cabe plantearse la posibilidad de que la emergencia y selección de este tipo de

aislados, generalmente asociados con el consumo de carne de cerdo, estén relacionadas con su resistencia a la nitrofurantoina y el uso fraudulento de este compuesto en animales destinados al consumo que ha podido verificarse en Portugal (Antunes et al 2006_b (b) y del que también hay indicios en España hasta el 2006 (Anónimo, Memoria AESAN 2006).

Llama la atención la poca diversidad de integrones en *S. Typhimurium*, a pesar de la elevada frecuencia de estas plataformas genéticas entre los aislados multirresistentes de dicho serotipo. De hecho, en nuestra serie, aparte de los tres integrones anteriormente descritos que eran abrumadoramente mayoritarios, sólo encontramos otros dos tipos de integrones: el integrón de región variable *dfrA1-aadA1*, que se identificó en un único aislado junto al integrón *bla_{OXA-1}-aadA1*, y un integrón atípico asociado a *sul3* de estructura 5'CS-*dfrA12-orfF-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-IS440-sul3*, identificado en cinco aislados de diferentes fagotipos, incluido uno de la variante monofásica, que no había sido descrito previamente en España en *S. enterica* y al que nos referiremos más adelante. Esta homogeneidad coincide con lo referido por otros autores de nuestro entorno (Carattoli et al 2002, Antunes et al 2006, Rodríguez et al 2008), si bien es llamativo la ausencia del integrón con el *array* de casetes *dfrA12-orfF-aadA2* que sí que se describe en estos trabajos y que en España parece estar muy extendido en la variante monofásica de *S. Typhimurium* (Guerra et al 2001, Rodríguez et al 2008). Es interesante mencionar que en algunas zonas geográficas, como en China y sudeste asiático, este último integrón es el más prevalente en *S. Typhimurium* (Khengtong y Chuanchuen 2008, Jin y Ling 2009). Respecto a la identificación de dos aislados de *S. Typhimurium* del fagotipo emergente U311 con resistencia a amoxicilina, tetraciclina, cloranfenicol y sulfamidas y que eran positivos para *floR* y *tetG* y poseían el integrón 1,2 kb/ *bla_{PSE-1}* pero no el integrón 1kb/*aadA2*, posiblemente se trataba de aislados con la variante B de SGI1 descrita en *S. Typhimurium* DT104 y que, igual que SGI1-C, sería consecuencia de una delección en la estructura original (Vo et al 2006) que podría proporcionar una mejor adaptación a determinadas condiciones ambientales (Gebreyes y Altier 2002).

Los estudios de epidemiología molecular llevados a cabo con los aislados de *S. Typhimurium* de 2004-2006 y con aislados de una colección de 2000-2001 que albergaban integrones típicos asociados a *sul1* pusieron de manifiesto que la mayor parte de ellos (79,1%) presentaban un perfil genético indistinguible entre sí al combinar los patrones de ERIC y REP-PCR, independientemente del patrón de integrones (*bla_{PSE-1}± aadA2* o *bla_{OXA-1}-aadA1*), del fagotipo o del año de aislamiento, lo que sugería que la amplia diseminación de aislados multirresistentes portadores de integrones en nuestra zona geográfica era fundamentalmente debida a la diseminación de un clon, probablemente muy bien adaptado ecológicamente,

aunque la transferencia horizontal también parecía haber contribuido, pero en menor medida, pues se encontraron cinco genotipos adicionales minoritarios en aislados no tipificables o de patrón de lisis no reconocido que eran específicos de un determinado perfil de integrones y se circunscribían a periodos limitados en el tiempo. Aunque estos resultados deben ser interpretados con precaución, ya que la electroforesis en campo pulsado se considera la técnica de referencia para el tipado molecular de *S. Typhimurium*, algunos autores han demostrado que las técnicas de ERIC-PCR y REP-PCR representan una alternativa válida para el genotipado de este serotipo (Woo y Lee 2006). El origen esencialmente clonal de los aislados de *S. Typhimurium* portadores de SGI1 del fagotipo 104 y relacionados, independientemente de su origen geográfico, ha sido puesto en evidencia por diferentes investigadores (Mulvay 2006, Krauland et al 2009), al igual que el de los aislados con el integrón *bla_{OXA-1}-aadA1* (Antunes et al 2004, Herrero et al 2008, Herrero et al 2009), si bien es cierto que, a diferencia de lo observado en nuestro estudio y en uno realizado en Amiens (Biendo et al 2005), en otros trabajos se ha comprobado que la mayoría de aislados portadores de uno u otro de estos dos perfiles de integrones son adscritos a dos genotipos bien diferenciados entre sí (Antunes et al 2004, Weill et al 2006). Por otro lado, la diseminación horizontal de las estructuras genéticas responsables de la multiresistencia antibiótica de ambos tipos de aislados ha sido ya documentada por otros autores (Markogiannakis et al 2000, Herrera et al 2006). Una constante del integrón *bla_{OXA-1}-aadA1* es su localización en plásmidos híbridos de virulencia-resistencia (Herrera et al 2006), lo que podría contribuir a facilitar su diseminación por transmisión horizontal. En el caso de la SGI1, que se ha detectado en diversos fagotipos de *S. Typhimurium* y en muchos otros serotipos de *S. enterica*, se ha visto que no sólo puede ser transferida por transducción, sino que también puede presentarse transitoriamente en una forma extracromosómica circular susceptible de ser transferida con el concurso de plásmidos *helper* (Vo et al 2010), lo que constituye un motivo de preocupación al haber indicios de que la presencia de SGI1 se asocia con una mayor virulencia (Rasmussen et al 2005). La circunstancia de que aislados de diferentes fagotipos (104, 104b, 120, 194, 204c, U302 y U311) compartieran un mismo patrón genotípico sería consecuencia, como han propuesto algunos autores, de la adquisición de plásmidos que transportan elementos genéticos capaces de alterar la susceptibilidad a los fagos empleados en la tipificación y dar lugar a la transformación de un fagotipo en otro distinto (Lawson et al 2002), y se trataría, por lo tanto, de aislados pertenecientes a un mismo clon.

En cuanto a la contribución de los integrones de clase 1 a la resistencia a antibióticos en aislados de origen humano de *S. enterica* de serotipos diferentes al *Typhimurium* en nuestro

ámbito geográfico, los resultados del trabajo de investigación que dio lugar al artículo número 2 demuestran que ésta no es en absoluto despreciable, que es variable dependiendo del serotipo, aunque en general es menos acusada que en *S. Typhimurium*, y que es arriesgado extraer conclusiones respecto a su prevalencia en algunas serovariedades, puesto que por su rareza los aislados que se pudieron estudiar fueron escasos. De cualquier modo, encontramos una asociación claramente significativa entre la presencia de integrones y multirresistencia (un 54% de los aislados multirresistentes eran portadores de integrones frente al 0,3% -un solo aislado- de los no multirresistentes) y también entre la presencia de integrones y la resistencia a muchos antibióticos, tanto aquellos en que la resistencia estaba mediada por genes insertados en los integrones (estreptomicina [*aadA1*, *aadA2*, *aadA5* y *aadA13*], gentamicina/tobramicina [*aadB*], trimetoprim [*dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA16* and *dfrA17*], cloranfenicol [*cmIA1*]) sulfamidas [*sul1*. *Sul3*]) como para tetraciclina o β -lactámicos, incluidas cefalosporinas de amplio espectro. Este extremo que, como demostraban los experimentos de conjugación realizados, puede explicarse por la eventual asociación en una estructura genética común entre casetes génicos incluidos en integrones y otros determinantes de resistencia, pone de relieve que la presión ejercida por el uso extensivo de antibióticos en ganadería puede acabar seleccionado aislados resistentes a antibióticos que son de elección en el tratamiento de la salmonelosis humana, como ya se ha alertado en algunos informes científicos (Anónimo, EFSA 2009). En este sentido, resultan especialmente interesantes y preocupantes los dos casos de multirresistencia mediada por integrones complejos en el seno de los cuales se asociaban los genes codificadores de CTX-M-9 y los que confieren resistencia a trimetoprim o aminoglicósidos. Uno de ellos correspondía a un aislado de *S. Virchow*, serotipo en el que en España la presencia del integrón complejo In60 es relativamente frecuente (Herrera-León et al 2010), pero el otro correspondía a un aislado de *S. Grumpensis*, en el que hasta el momento no se había descrito la producción de β -lactamasas de espectro extendidos, y en el que además del integrón complejo que incluía *aadB-aadA2* en la región variable 1 se detectó *qnrA1* que se constransfería junto al integrón. En el extremo opuesto encontramos al serotipo Hadar, uno de los más prevalentes, en el cual a pesar de ser típica la resistencia a amoxicilina, estreptomicina y tetraciclina, no detectamos integrones. En efecto, la presencia de integrones en este serotipo parece ser anecdótica, pues tampoco los detectan otros autores (Rodríguez et al 2008) y, tras una exhaustiva revisión, sólo hemos encontrado su descripción en dos aislados de Hungría (Nógrady et al 2005).

A la vista de nuestros resultados, en nuestro ámbito geográfico, los integrones de clase 1 están ampliamente distribuidos en serotipos de *S. enterica* distintos al *Typhimurium* y su diversidad es considerable, puesto que identificamos 11 integrones diferentes en 15 serotipos distintos,

incluidos los serotipos Kapemba, Mikawasima y [9,12:lv:i:-], en los que hasta donde sabemos no se habían descrito previamente.

Coincidiendo con lo publicado previamente (Nógrady et al 2005, Antunes et al 2006 (a), Rodríguez 2008, Vo et al 2010, Khemtong y Chuanchuen 2008) los integrones con los *arrays* de casetes *dfrA1-aadA1*, *dfrA17-aadA5*, principalmente asociados con plásmidos IncK, IncN e IncI1, y *dfrA12-orf-aadA2* fueron no sólo los más frecuentes sino también los compartidos por más serotipos, lo que vendría a apoyar el papel de los integrones en la transmisión horizontal de resistencias. Sin embargo, en el 50% de los aislados los integrones no se pudieron transferir por conjugación (en concreto no se obtuvieron transconjugantes a partir de ninguno de los aislados con los integrones de estructura *dfrA12-orf-aadA2*, ni en cuatro de los cinco con el integrón *dfrA17-aadA5* o en cuatro de los once con el integrón *dfrA1-aadA1*). Estos hallazgos son concordantes con los de otras series (Antunes et al 2006 (a), Vo et al 2010) y sugieren que la diseminación clonal también ha contribuido a la propagación de aislados portadores de integrones, máxime en aquellos casos en que la recuperación de múltiples aislados de una misma serovariedad que albergaban un mismo tipo de integrón se produjo en un breve lapso de tiempo, aunque no tuviésemos constancia de que los aislados formaran parte de un brote.

Por otro lado, es interesante hacer algunas puntualizaciones respecto a la estructura de los integrones identificados en nuestra serie: (a) los integrones *bla_{OXA-1}-aadA1* y la combinación de integrones *aadA2+bla_{PSE-1}*, que eran los más prevalentes y casi los exclusivos en *S. Typhimurium*, no se detectaron en ningún aislado de otra serovariedad, aunque sí el integrón *aadA2*, localizado en un aislado de *S. Derby* y que podría corresponder a la variante C de SGI1 que ya se ha notificado en este serotipo (Vo et al 2006, Vo et al 2010); (b) dos de los once integrones identificados en este trabajo no se habían descrito previamente en *S. enterica*; se trata de los integrones *aadA13-sat* -hasta el momento sólo descrito en un aislado ambiental de *E. coli* (Moura et al 2007)- que encontramos en un aislado de *S. Grumpensis* y del integrón atípico *estX-psp* asociado a *sul3* cuya primera descripción ha tenido lugar muy recientemente en dos aislados humanos de *E. coli* productores de CTX-M-14 (Curiao et al 2011) y que nosotros detectamos en dos aislados de *S. Rissen*, aunque asociados a plásmidos de los grupos IncN o IncF y no a IncI1; (c) los integrones atípicos asociados a *qacH-IS440-sul3* supusieron un 14,1% del total de integrones de nuestra serie y además de identificarse en *S. Typhimurium* (como ya indicamos en el apartado de la discusión dedicado a este serotipo), aparecieron en *S. Rissen* (*5'CS-estX-psp-qacH-IS440-sul3*) y en *S. Enteritidis* (*5'CS-dfrA12-orf-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-IS440-sul3*), serotipo en el que nunca se habían comunicado. Estos integrones, descritos por primera vez en Portugal en aislados de *S. Typhimurium*, *S. Rissen*, *S. Haifa* y IIIb:65:lv:enxz15 de diferentes orígenes incluido el humano (Antunes et al 2007), parecen ser

emergentes pues se han descrito posteriormente en aislados de *E. coli* de origen humano y animal (Sáenz et al 2010, Curiao et al 2011) y en aislados de *S. Stanley* y *S. Kedougou* (Chuanchien et al 2008) siempre ubicados en plásmidos conjugativos de gran tamaño; hasta el momento se han caracterizado varias estructuras diferentes, pero los casetes génicos insertados en su región variable siempre son *estX*, *psp* y los casetes de resistencia *dfrA12*, *aadA2*, *aadA1* y *cmIA1* y es muy posible que su prevalencia real sea más elevada de lo que se sospecha ya que su presencia puede pasar desapercibida cuando para el cribado de integrones de clase 1 se usan los iniciadores descritos por Levesque complementarios a secuencias de las regiones 5'CS y 3'CS.

Todos estos hallazgos no hacen sino confirmar la relevancia de los integrones de clase 1, plataformas genéticas que por su gran versatilidad y capacidad para capturar y transferir material genético endógeno contribuyen a promover la diversidad genética de las bacterias, en la emergencia, diseminación y coselección de resistencias en un agente de zoonosis de tanta transcendencia e como *S. enterica*. La resistencia a los antibióticos en *Salmonella* y otras bacterias zoonóticas constituye un importante problema de salud pública, una de cuyas principales causas es el uso de antibióticos en ganadería y otras áreas afines, por lo que para controlarlo es imprescindible adoptar medidas encaminadas a racionalizar su uso en estos ámbitos, así como concentrar esfuerzos en implantar estrategias dirigidas a minimizar la transmisión de todos los patógenos causantes de infecciones alimentarias, con especial atención a las prácticas higiénicas adecuadas en todas las fases del proceso (cría de animales en las granjas, matadero, distribución y preparación de los alimentos) que se han mostrado muy eficaces en *S. Enteritidis*.

RESISTENCIA A AMOXICILINA/CLAVULÁNICO EN AISLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* DE UN CENTRO SOCIOSANITARIO: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR, MECANISMOS IMPLICADOS E INTEGRONES DE CLASE 1

Klebsiella pneumoniae es una enterobacteria que forma parte de la flora intestinal endógena y que se comporta como un patógeno oportunista, implicado frecuentemente en brotes de infección nosocomial por su capacidad para sobrevivir en la piel y mucosas de los pacientes y en el medio ambiente y superficies inanimadas. *K. pneumoniae* puede ocasionar una gran variedad de cuadros infecciosos en pacientes debilitados, siendo las más habituales la infección del tracto urinario y la infección respiratoria (Podschum y Ullmann 1998), cuyo tratamiento a menudo entraña dificultades por la facilidad de este microorganismo para adquirir resistencia a antibióticos y en especial a las cefalosporinas de amplio espectro e incluso a carbapenemes, mediadas por β -lactamasas de espectro extendido o carbapenemasas de codificación plasmídica, que suelen asociarse con resistencia a otras familias de antibióticos (Abbott et al 2007). Sin embargo, *K. pneumoniae*, que es intrínsecamente resistente a amino y carboxipenicilinas por producir de forma natural una β -lactamasa cromosómica de tipo SHV-1 de la clase A, acostumbra a ser sensible a las combinaciones de β -lactámicos e inhibidores suicidas de β -lactamasas como amoxicilina clavulánico y piperacilina/tazobactam (Livermore 1995). El principal mecanismo responsable de la resistencia de *K. pneumoniae* a amoxicilina clavulánico es la hiperproducción de SHV-1 (Espinasse et al 1997), pero otros posibles mecanismos involucrados son la adquisición de β -lactamasas AmpC plasmídicas, la hiperproducción de TEM-1 o TEM-2 por la presencia de varias copias del gen o de promotores de gran eficiencia, la hiperproducción de β -lactamasas de espectro extendido derivadas de TEM o SHV, la disminución de permeabilidad por deficiencia de porinas y, con mucha menor frecuencia, la producción de penicilinasas resistentes a inhibidores derivadas de TEM (IRT) o más raramente de SHV y de enzimas tipo OXA también pobremente inhibidos por clavulánico (Cantón et al 2008). Por este motivo, nos llamó la atención la elevada tasa de sensibilidad disminuida a amoxicilina/clavulánico entre los aislados de *K. pneumoniae* (la gran mayoría sensibles a cefazolina y cefamicinas) recuperados desde 2003 de pacientes de un centro sociosanitario que se detectó en un estudio retrospectivo de vigilancia de resistencias antibióticas (ver datos sobre características del centro y evolución de resistencias en *K. pneumoniae* en anexos 1 y 2) y que nos indujo a investigar los mecanismos de resistencia implicados y a explorar las vías de diseminación.

En total se estudiaron 171 aislados, recuperados prospectivamente de diversas muestras clínicas - principalmente de orina- entre enero de 2006 y diciembre de 2008, procedentes de

otros tantos pacientes ingresados en el centro sociosanitario, de los que 51 (29,8%) fueron resistentes o intermedios a amoxicilina/clavulánico. Seis de estos aislados eran resistentes a cefazolina, cuatro de ellos con un fenotipo sugestivo de la producción una AmpC plasmídica y dos de la producción de una β -lactamasas de espectro extendido, mientras que los 45 restantes (todos intermedios a amoxicilina/clavulánico) eran sensibles a cefazolina y cefamicinas.

AISLADOS SENSIBLES A CEFALOSPORINAS DE PRIMERA GENERACIÓN Y CEFAMICINAS

Mediante amplificación y secuenciación se pudo comprobar que los 45 aislados de *K. pneumoniae* sensibles a cefazolina y cefamicinas, que son los que dieron lugar al artículo 3, producían, además de SHV-1, una penicilinasas resistente a inhibidores, que en 19 aislados correspondió a IRT-11 o TEM-40 y en 26 a OXA-1 (OXA-30).

Los **aislados productores de IRT-11**, que supusieron un 11,1% de los aislados obtenidos durante el periodo de estudio y un 37,3% de los no sensibles a amoxicilina/clavulánico, eran uniformemente sensibles a piperacilina/tazobactam, cefalosporinas, carbapenemes gentamicina, tobramicina y amikacina y mostraban sensibilidad variable a fosfomicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, nitrofurantoina, cotrimoxazol, cloranfenicol, estreptomina, kanamicina y sulfamidas. Los 19 aislados se agrupaban en tres clones diferentes (E1, E2 y E3) atendiendo a los patrones obtenidos mediante ERIC-PCR, de los cuáles el patrón E1 era el mayoritario (63%), mientras que los aislados asignados al patrón E3 (que fue, a su vez, el mayoritario entre los aislados productores de OXA-1) se diferenciaban del resto por su resistencia a ciprofloxacino, nitrofurantoina y cloranfenicol.

Estos resultados demuestran que la propagación de aislados productores de IRT-11 se debía tanto a una diseminación clonal como a la emergencia independiente o a la transferencia horizontal del determinante que lo codifica y, efectivamente, el gen *bla*_{IRT-11} pudo ser transferido por conjugación en todos los aislados. Aunque no existen estudios que hayan investigado la prevalencia de los enzimas IRT o de los enzimas resistentes a inhibidores derivados de SHV en *K. pneumoniae*, sí que se han comunicado algunos casos en aislados esporádicos (Lemozy et al 1995, Bermudes et al 1997, Dubois et al 2004, Dubois et al 2008). Sin embargo, parece que estos enzimas, al contrario de lo que sucede con las β -lactamasas de espectro extendido de tipo TEM o SHV, son todavía poco frecuentes y se detectan mayoritariamente en aislados de *E. coli* de origen comunitario (Miró et al 2002, Pérez-Moreno et al 2004, Martín et al 2010). La gran diversidad de enzimas diferentes y la ausencia de relación clonal que suele observarse (Miró et al 2002, Martín et al 2010) sugieren que la

emergencia independiente y la selección de estos enzimas, fruto de la presión ejercida por el uso de asociaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas, es una vía de adquisición más probables que la diseminación epidémica. Los enzimas IRT suelen estar codificados por genes acarreados por plásmidos conjugativos, aunque en ocasiones pueden ser de localización cromosómica (Martín et al 2010), igual que ocurre con las β -lactamasas de espectro extendido derivadas de TEM y, sin embargo, parecen tener mucha menor tendencia que estas últimas a ser transmitidos o a seleccionarse, tal vez porque su producción constituye un mecanismo de resistencia menos eficaz al proteger a la bacteria específicamente de la acción de los inhibidores y no de otros β -lactámicos (Cantón et al 2008). Nos parece interesante señalar, no obstante, que en el centro sociosanitario que nos ocupa, parece haber tenido lugar la transferencia horizontal de *bla*_{IRT-11} entre *K. pneumoniae* y *E. coli*, puesto que en un trabajo realizado por nuestro grupo con aislados de *E. coli* intermedios o resistentes a amoxicilina/clavulánico, obtenidos entre 2007 y 2010 de pacientes de ese centro, se comprobó que un 15%, la mayoría no relacionados clonalmente, producían IRT-11 y que éste era después de la producción de OXA-1 el mecanismo de resistencia a amoxicilina/clavulánico más frecuente (Pérez-Moreno et al 2011).

Respecto al impacto de la presión selectiva ejercida por el amplio uso de amoxicilina/clavulánico, tanto en el medio hospitalario como en el comunitario, en la selección de aislados productores de β -lactamasas IRT, dos trabajos realizados en Francia demuestran que el tratamiento previo con esta combinación es un factor de riesgo para contraer una infección producida por *E. coli* productor de IRT (Leflon-Guibout et al 2002 (a), (b). Aunque nosotros no disponemos de información sobre el tratamiento antibiótico recibido por los pacientes a partir de los cuales se recuperaron los aislados productores de IRT-11, la amoxicilina/clavulánico era el antibiótico más prescrito en el centro sociosanitario en el que estaban institucionalizados (ver datos sobre consumo de antibióticos en el centro en el anexo 3). De todos modos, hay un dato que resulta sorprendente y que sugiere que hay factores de otra índole que pueden influir en las diferencias consignadas en la prevalencia geográfica de estas β -lactamasas, y éste es el que, a pesar de que el consumo de amoxicilina/clavulánico es comparable, los aislados con enzimas IRT son mucho más frecuentes en Europa que en Estados Unidos (Kaye et al 2004, Drawz y Bonomo 2010), donde hasta el año 2004 no se identificaron y fue precisamente en tres aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC-2 e IRT-2 relacionados clonalmente (Bradford et al 2004). Uno de estos factores, aunque no el único, podrían ser problemas metodológicos, ya que la aparición de este mecanismo de resistencia puede pasar desapercibido por el laboratorio si en el antibiograma no se incluye cefazolina (el fenotipo característico es el de un aislado con resistencia o sensibilidad disminuida a

amoxicilina/clavulánico y sensibilidad a cefalosporinas) o si coexisten otros mecanismos de resistencia que afecten a las cefalosporinas y, además, el fenotipo puede ser indistinguible del conferido por la producción de un enzima tipo OXA si no se incluyen cefepime y cefuroxima a concentraciones suficientemente bajas; por otro lado, el uso de amoxicilina/clavulánico en una relación 2:1, que es lo habitual en los paneles comerciales de microdilución, en lugar de a una concentración fija de 2mg/L puede disminuir la sensibilidad en la detección de los enzimas IRT, lo que junto a la aplicación de diferentes puntos de corte para categorizar a los aislados puede dificultar la comparación de la prevalencia obtenida en distintos estudios (Cantón et al 2008, Drawz y Bonomo 2010).

De la aparente poca propensión de los aislados productores de enzimas IRT a producir brotes epidémicos nosocomiales da fe el hecho de que por el momento, hasta donde nosotros sabemos, sólo se ha comunicado otro brote hospitalario en el que estuviera implicado una β -lactamasa IRT. El brote se produjo por la diseminación de aislados de *K. pneumoniae* productores de IRT-2 procedentes de la unidad de geriatría de un hospital francés (Girlich et al 2000). Conviene recordar que los aislados de nuestro trabajo también se obtuvieron de pacientes de un centro sociosanitario, un tipo de instituciones sanitarias en las que, por las características de los pacientes, el uso empírico de antibióticos de amplio espectro (y en concreto de amoxicilina/clavulánico), a veces inapropiado, es muy común y en el que la adherencia estricta a las precauciones estándar para el control de la infección puede resultar complicada (Bonomo 2000, Vaqueiro et al 2002, Gudiol 2010, Nicolle 2000 (a)).

Únicamente uno de los aislados productores de IRT-11, que era resistente a cotrimoxazol y estreptomina, albergaba un integrón de clase 1 con el *array dfrA12-orF-aadA2*, y ninguno poseía determinantes *qnr*, confirmándose que estos determinantes de resistencia plasmídica a quinolonas son raros en aislados que no produzcan β -lactamasas de espectro extendido o posean integrones (Strahilevitz et al 2009), en los que, por otro lado, nunca se han encontrado genes que codifiquen β -lactamasas TEM (Partridge et al 2009). Los tres aislados resistentes a ciprofloxacino presentaban una mutación en *gyrA* (Ser83Ile) y otra en *parC* (Asp80Ile) asociadas con resistencia a fluorquinolonas en *K. pneumoniae* (Oteo et al 2009).

Los **aislados productores de OXA-1** y sensibles a cefazolina y cefamicinas, que supusieron un 15,2% del total de aislados y un 51% de los no sensibles a amoxicilina/clavulánico, a diferencia de los aislados productores de IRT-11, eran todos multirresistentes: la resistencia a tobramicina, kanamicina y ciprofloxacino y la sensibilidad a ceftazidima, cefotaxima, carbapenemes y gentamicina eran constantes y mostraban sensibilidad variable al resto de antibióticos ensayados, destacando los porcentajes de resistencia a sulfamidas (76,9%),

nitrofurantoina (80,8%), cloranfenicol (84,6%), ácido nalidíxico (92,3%) y piperacilina/tazobactam (92,3%) y la disminución de sensibilidad a cefepime, con CMI entre 1 y hasta 4 mg/L, en un 61,5% de los aislados. OXA-1 es una β -lactamasa que pertenece al grupo 2d en la clasificación funcional de Bush y al grupo D en la clasificación de Ambler, cuya inhibición por clavulánico y tazobactam es menos efectiva que en las β -lactamasas de los grupos 2b y 2be y que presentan una cierta acción hidrolítica sobre cefepime y cefuroxima pero no sobre el resto de cefalosporinas, lo que la distingue de las β -lactamasas IRT (Bush et al 2005). En un trabajo reciente se presentaban varios aislados de *E. coli* con disminución de sensibilidad a cefepime o incluso resistencia franca (CMI 8 mg/L), en los que la única β -lactamasas detectable era OXA-1 y en los que además no se objetivó déficit de porinas ni sobreexpresión de bombas de eflujo (Koh et al 2008). La producción de OXA-1 parece ser un mecanismo emergente de resistencia a ácido clavulánico en *E. coli* en España según un trabajo realizado con aislados de siete hospitales pertenecientes a la Red REIPI en la que la producción de este enzima resultó ser el mecanismo más prevalente (Ortega et al 2011). Los enzimas OXA se ha descrito asociado a β -lactamasas CTX-M, en particular a CTX-M-2 en Sudamérica (Arduino et al 2002) y especialmente a CTX-M-15 en un clon epidémico de *E. coli* del serogrupo O25 y grupo filogenético B2 de distribución intercontinental en el que los genes que codifican estos dos enzimas y TEM-1 están localizados en un mismo plásmido (Boyd et al 2004, Oteo et al 2006, Nicolas-Chanoine et al 2008). La asociación de OXA-1 con CTX-M-15 se ha descrito también en aislados de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-15 pertenecientes a distintos grupos clonales, que probablemente lo han adquirido a partir del clon pandémico de *E. coli* O25 puesto que eran portadores de plásmidos homólogos al descrito en dicho clon (Machado et al 2006, Oteo et al 2009).

Ninguno de los aislados a los que estamos haciendo referencia producía una β -lactamasa de espectro extendido ni TEM-1; sin embargo, todos ellos eran resistentes a ciprofloxacino, tobramicina y kanamicina y sensibles a gentamicina y comprobamos que este fenotipo de resistencia era conferido por el gen *aac(6')-Ib-cr*. Este gen, que también se encuentra sistemáticamente en los aislados productores de CTX-M-15, codifica una variante de la acetilasa AAC (6')-1b, descrita en 2006, capaz de acetilar no sólo tobramicina, kanamicina y amikacina sino también quinolonas con un anillo piperacilínico como ciprofloxacino.

El rastreo de la presencia de integrones y determinantes *qnr* puso de manifiesto que 23 de los 26 aislados eran positivos para *qnrS2* y poseían un integrón de clase 1 con el array de casetes génicos [*aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}*, *catB3*, *arr-3*]; en 20 aislados, recuperados en su mayoría en 2006 y que se adscribieron a dos patrones genotípicos estrechamente relacionados al diferir sólo en una banda (E3, que también se detectó en aislados productores de IRT-11, y E3a), el

integrón poseía un extremo 3'CS característico con *qacΔE* y *sul1*, mientras que en tres aislados sensibles a sulfamidas, que se recuperaron en el año 2008 y que compartían un mismo patrón genotípico (E4), el integrón era defectivo y no poseía ninguno de estos dos genes ni tampoco *sul3*. Por último, en tres aislados también sensibles a sulfamidas y recuperados en el 2008, cuyo patrón genotípico (E5) era diferente al de los anteriores aislados, se detectó la presencia del array *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}*, pero no la de integrones ni determinantes *qnr*. Los genes *bla_{OXA-1}* y *aac(6')-Ib-cr* se cotransfirieron por conjugación en todos los aislados y los transconjugantes obtenidos a partir de los aislados portadores de integrones también fueron positivos para *qnrS2* y transportaban integrones idénticos a los de las cepas donantes, lo que indicaba que, con toda probabilidad, ambos estaban vehiculados por un mismo plásmido. El integrón de región variable [*aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}*, *catB3*, *arr-3*] había sido identificada previamente en varios aislados clínicos de origen humano de distintas especies de enterobacterias y diferente procedencia geográfica, pero dentro de integrones complejos asociados a *ISCR1* y determinantes *qnrA* o *qnrB* y, a menudo, a cefamicinasas plasmídicas (Wang et al 2003, Verdet et al 2006, Quiroga et al 2007), mientras que en nuestra serie ninguno de los aislados fue positivo para *orf513* (elemento relacionado con *ISCR1*). Este mismo integrón también se detectó en un aislado clínico de *K. pneumoniae* en Taiwán (Chang et al 2009) y en otro de *E. coli* en Singapur (Koh et al 2008) pero en ninguno de los dos casos se investigó la presencia de *qnr* ni se especificaba el fenotipo de resistencia a β-lactámicos. Por el contrario, recientemente se ha descrito en un aislado ambiental de *Aeromonas allosaccharophila* de un lago suizo, que también contenía *qnrS2*, un integrón de idéntica composición a la de los de nuestros aislados de *K. pneumoniae* que estaba localizado en un plásmido de tipo IncU. Curiosamente, Cattoir y colaboradores también descubren el determinante *qnrS2* ubicado en un plásmido IncU en otros dos aislados acuáticos de *Aeromonas* (*A. punctata* y *A. media*) recuperados en el río Sena (Cattoir et al 2008) y hay constancia de un aislado clínico de *A. veronii* de un hospital de Valencia positivo para este gen (Sánchez-Céspedes et al 2008). Los determinantes *qnrA* y *qnrS* tienen su origen en bacterias acuáticas, *Shewanella algae* y *Vibrio splendidus* (Strahilevitz et al 2009), por lo que es plausible que *Aeromonas* los haya adquirido a partir de estos microorganismos y que desempeñe un papel significativo como vehículo de transmisión horizontal de éstos y otros determinantes de resistencia, teniendo en cuenta la frecuencia con la que albergan integrones de clase 1, a especies de enterobacterias de mayor relevancia clínica. Por otra parte, las quinolonas son antibacterianos muy usados en acuicultura y, a diferencia de los β-lactámicos, son muy estables en el agua lo que facilita que ejerzan una presión selectiva que favorezca la selección de especies resistentes a quinolonas o incluso que induzcan la movilidad de *qnrS2*, todo lo cual

subraya la importancia del medio acuático en la transferencia de elementos genéticos de resistencia (Cattoir et al 2008, Baquero et al 2008).

Los determinantes *qnr* tienen distribución mundial, con una considerable prevalencia en Asia (Nordmann y Poirel 2005), y en *K. pneumoniae* y en otras enterobacterias parecen estar asociados con la producción de β -lactamasas de espectro extendido (Nordmann y Poirel 2005, Wang et al 2008); de hecho, muchos estudios sobre su prevalencia se centran en los aislados productoras de estas enzimas (Poirel et al 2006, Lavilla et al 2008), aunque hay otros que no confirman esta asociación y que más bien concluyen que se trata de una asociación espuria fruto de la relación entre la resistencia a fluorquinolonas por cualquier mecanismo y las β -lactamasas de espectro extendido (Strahilevitz et al 2007). La prevalencia de los distintos genes *qnr* varía entre diferentes trabajos (Poirel et al 2006, Lavilla et al 2008, Wang et al 2008). *qnrS*, en oposición a muchas de las variantes de *qnrA* y *qnrB*, no está vinculado a ISCR ni a integrones complejos y es frecuente en aislados de *Salmonella* que no producen AmpC plasmídicas ni β -lactamasas de espectro extendido (Strahilevitz et al 2009).

Como ya hemos comentado, la presencia aislada de determinantes *qnr* sólo confiere una disminución de sensibilidad a fluoroquinolonas, con CMI que en la mayoría de aislados no superan los puntos de corte de sensibilidad según los criterios del CLSI, y, así, en todos los aislados positivos para *qnrS2* con CMI a ciprofloxacino >4 mg/L se evidenció simultáneamente como mínimo una mutación en *gyrA* (Ser83Ile) y otra en *parC* (Asp80Ile); sin embargo, las CMI de ciprofloxacino en los tres aislados positivos para *qnrS2* en que no se detectaron mutaciones en la QRDR y en sus correspondientes transconjugantes fueron relativamente elevadas (entre 2 y 4 mg/L), probablemente por la coexistencia de *aac(6′)-Ib-cr*.

Respecto a los tres aislados que poseían un integrón defectivo en la región 3′CS, se trata de un fenómeno también común en bacterias ambientales acuáticas, en las que es menos probable la exposición a antibióticos sintéticos como las sulfamidas y a biocidas, y que, en consecuencia, no han necesitado incorporar genes *sul* o *qac* a los integrones (Rosser et al 1999).

Aunque el análisis genotípico revelaba que la diseminación de *K. pneumoniae* productora de OXA-1 en el centro que nos ocupa era de tipo clonal, la posterior identificación en pacientes de esa institución de tres aislados de *E. coli*, genéticamente indistinguibles, positivos para *qnrS2* y con un integrón defectivo de las mismas características que el de los aislados de *K. pneumoniae* (Pérez-Moreno et al 2010), es preocupante e ilustrativo de la eficacia de los integrones como vectores genéticos de transferencia horizontal de resistencias entre bacterias Gramnegativas de transcendencia clínica.

En síntesis, los resultados del trabajo demuestran que la elevada prevalencia de sensibilidad reducida a amoxicilina/clavulánico entre aislados de *K. pneumoniae* de pacientes de un centro sanitario durante el periodo de estudio era fundamentalmente debida a la diseminación de dos clones, uno compuesto por aislados productores de IRT-11 (E1) y otro que comprendía aislados que o bien había adquirido el gen *bla*_{OXA-1} insertado en un integrón de clase 1 asociado a *qnrS2* o el gen *bla*_{IRT-11} (E3). A nuestro juicio, lo más sorprendente de los resultados es la emergencia y propagación simultánea en una misma institución de dos mecanismos de resistencia diferentes, poco habituales en *K. pneumoniae* al menos de forma aislada, que confieren resistencia específica a combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas. Es presumible que el elevado consumo de amoxicilina/clavulánico en el centro favoreciera la selección de aislados productores de IRT-11 y OXA-1 y que, en el último caso, también contribuyese el amplio uso de fluoroquinolonas, la segunda familia de antibióticos más prescrita (ver datos sobre consumo de antibióticos en el centro en el anexo 3), al coexistir en estos aislados dos mecanismos de resistencia plasmídica a quinolonas y mutaciones en *gyrA* y *parC*. En última instancia, deficiencias en las medidas estándar de control de la infección habrían conducido a su diseminación entre pacientes y al brote epidémico, que aún siendo menos alarmante que un brote por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido, por ejemplo, dificultaba el tratamiento empírico adecuado de algunas de las infecciones más comunes en pacientes de edad avanzada como las infecciones del tracto urinario o respiratorio (Bonomo 2000, Nicolle 2000 (b), Vaqueiro et al 2002). Todo ello pone de manifiesto la conveniencia de observar las medidas encaminadas a minimizar la infección nosocomial y promover políticas de antibióticos más racionales (Doshi et al 2009), lo que según algunos autores conllevaría una mayor diversificación en los antibióticos usados en un mismo hospital y una restricción en el uso de los más proclives a promover la selección de resistencias como fluoroquinolonas (Livermore 2005).

AISLADOS PRODUCTORES DE AmpC PLASMÍDICA

Como ya hemos comentado, seis de los aislados de *K. pneumoniae* resistentes a amoxicilina/clavulánico recuperados entre 2006 y 2008 de pacientes del centro sociosanitario eran también resistentes a cefazolina: dos de ellos producían una β -lactamasas de espectro extendido, que se comprobó que era CTX-M-15, y portaban el *array aac (6')-1b-cr – bla*_{OXA-1} pero no integrones de clase 1 (datos no mostrados), mientras que los otros cuatro presentaban un fenotipo compatible con la producción de una β -lactamasa AmpC plasmídica. Uno de estos aislados sólo era resistente a antibióticos β -lactámicos y los otros tres, recuperados de otras

tantas pacientes entre agosto y octubre de 2008, nos resultaron interesantes porque presentaban adicionalmente resistencia a tobramicina y ciprofloxacino, pero no a ácido nalidíxico, lo que sugería la implicación de uno o más mecanismos de resistencia plasmídica a quinolonas, por lo que decidimos estudiarlos en mayor profundidad.

El aislado recuperado en agosto de 2008, que podría ser el caso índice, procedía de una muestra de orina de una paciente, que había coincidido en la misma unidad con otra de las dos pacientes implicadas, y que se obtuvo al día siguiente de su traslado desde un hospital de tercer nivel. Desgraciadamente este aislado no se pudo estudiar a nivel molecular al no poderse rescatar del stock crioconservado.

Se demostró que los otros dos aislados (C1911 and C2812), que se recuperaron durante la misma semana de octubre de 2008 a partir de una orina y un hemocultivo, eran positivos para *bla*_{DHA-1}, *bla*_{SHV-1}, *qnrS2* y *qnrB4* y que albergaban un integrón de clase 1 con la misma región variable [*aac (6')-1b-cr*; *bla*_{OXA-1}, *catB3*; *arr3*] que el integrón detectado en los aislados productores de OXA-1 sensibles a cefazolina y cefoxitina. Ambos aislados compartían un mismo patrón por electroforesis en campo pulsado y ERIC-PCR (patrón que era diferente al de los aislados sensibles a cefazolina portadores de OXA-1) y fueron adscritos a un mismo grupo filogenético y secuencia tipo.

DHA-1 es una β -lactamasa AmpC plasmídica inducible no inhibida por ácido clavulánico, originaria de *Morganella morganii*, que confiere resistencia a amino, carboxi y ureidopenicilinas, cefamicinas y oximinocefalosporinas a excepción de cefepime. Los enzimas DHA, de los que se conocen dos variantes (DHA-1 y DHA-2), son menos prevalente que CMY-2, pero ya se han detectado en los cinco continentes. La primera descripción de DHA-1 se hizo en un aislado de *S. enterica* de Arabia Saudí (Jacoby 2009). Por otro lado, esta β -lactamasa tiene una fuerte asociación con *ISCR1*, elemento que prácticamente siempre se encuentra en integrones complejos de clase 1 adyacente a la primera copia de 3'CS (Toleman et al 2006 (a)). La primera notificación de la ubicación de *bla*_{DHA-1} en un integrón complejo data del año 2000 y corresponde a pSAL-1, un plásmido obtenido de un aislado de *S. Enteritidis* (Verdet et al 2000). Asimismo, el alelo *qnrB4* de distribución mundial está estrechamente relacionado con *bla*_{DHA-1}, (Seo et al 2010, Diestra et al 2011) y, también en el contexto de integrones complejos, con ocho genes o pseudogenes no implicados en la resistencia a antibióticos: *sapA*, *sapB*, *sapC* (componentes del operón *sap* codificante de un sistema de transporte de proteínas presente en muchas enterobacterias), *pspA*, *pspB*, *pspC*, *pspD* (componentes del operón *psp* codificante de un sistema de proteínas de respuesta al estrés identificado en *E. coli*, *S. Typhimurium* y *Yersinia*) y *pspF* (activador del operón *psp*) (Strahilevitz et al 2009).

Ensayos de PCR solapante y secuenciación evidenciaron que, efectivamente, *bla*_{DHA-1} y *qnrB4* estaban ligados al citado integrón formando un integrón complejo de estructura inédita (No acceso Genbank **GU906294**) que por la secuencia de su región variable 1 podría adscribirse a In37 (Quiroga et al 2007), pero que no estaba asociado a *ISCR1* como es característico de los integrones complejos (Toleman et al 2006 (a)). En la figura 24 se esquematiza la estructura de este integrón y de otros integrones complejos asociados a determinantes *qnr* que poseen In37 en su primera región variable y con los que lo comparamos, en concreto un aislado de *E. coli* de Shanghái portador de *qnrA1* (GenBank **AY259086**) (Wang et al 2003), otro de *K. pneumoniae* procedente de Argentina portador de *qnrB10* (Quiroga et al 2007) y, por último, un aislado de *K. pneumoniae* de la región parisiense (RBDHA GenBank **AJ971343**) portador de *qnrB4* que era al que más asemejaba (Verdet et al 2006).

La principal diferencia entre nuestro integrón y el integrón de la cepa RBDHA era que la inserción de IS26 había delecionado *sul1* y gran parte de *qac*ΔE de la primera copia de 3'CS, así como *ISCR1* y los genes *sapA*, *sapB* y *sapC*, situados *downstream* de *qnrB4*. El resto de la estructura estaba conservada con *qnrB4* y *pspF*, *pspA*, *pspB* y *pspA* *downstream* de *bla*_{DHA-1} y *ampR* y una segunda copia de 3'CS *upstream* de *bla*_{DHA-1}.

Las dos principales características de los integrones de clase 1 complejos son (a) aproximadamente la mitad de su estructura corresponde a la de un integrón de clase 1 convencional con los correspondientes extremos 5'CS y 3'CS y entre ambos una región variable con casetes génicos que habitualmente son casetes de resistencia, seguida de una copia de *ISCR1* y una segunda región variable en la que se ubican diferentes genes de resistencia que no están en forma de casetes, entre los que figuran *bla*_{DHA-1}, diversas variantes de *bla*_{CMY}, *bla*_{CTX}, *qnrA*, *qnrB*, *catA* o *dfrA*; (b) inmediatamente después de esta región variable viene una segunda copia de 3'CS (Bennett 2008). El descubrimiento de estas nuevas estructuras indica que los integrones no sólo han evolucionado, como se esperaba, a través de la adquisición y escisión de casetes de resistencia, sino que están reclutando genes de resistencia que no se presentan en forma de casetes y experimentando duplicaciones de fragmentos de los integrones, como consecuencia de la actividad de *ISCR1*. Se supone que *ISCR1* (antes denominado orf513) se asoció con la región 3'CS de los integrones y los genes de resistencia por una serie de eventos de transposición y recombinación homóloga. Se ha propuesto que los elementos *ISCR* movilizan a los genes de resistencia transponiéndose próximos a ellos y que después los comoviliza por una segunda transposición, lo que significaría que estos elementos son unas herramientas genéticas extremadamente potentes que pueden movilizar cualquier gen de cualquier localización sin necesidad de su duplicación como les ocurre a la mayoría de IS (Toleman et al 2006 (a), (b)). Las numerosas variantes de In37 con distintas

regiones variables 2 descritas en aislados nosocomiales de diferentes enterobacterias y procedencias geográficas (Wang et al 2003, Verdet et al 2006, Quiroga et al 2007) o la heterogeneidad de las regiones variables del extremo 5' de los integrones complejos asociados a *bla*_{DHA-1} (Verdet et al 2000, Verdet et al 2006) apoyarían esta hipótesis y nos situaría ante un escenario en el que es previsible una enorme diversidad en el arsenal de determinantes de resistencia que pueden ser albergados por los integrones. La reciente identificación de In37 en la región variable 2 de un integrón complejo no asociado a determinantes *qnr* en un aislado de *K. pneumoniae* medioambiental de un hospital portugués corrobora esta teoría (Santos et al 2011).

Aunque ya hemos comentado que una de las particularidades de los integrones complejos es el elemento *ISCR1*, hay algunos ejemplos de plásmidos que vehiculan *bla*_{DHA-1} en los que se encuentra una copia de *qacΔE* y *sul1* a continuación de *bla*_{DHA-1} y *ampR* pero en los que está ausente no sólo *ISCR1* sino toda (pT948) o gran parte (pTN60013) de la secuencia que abarca desde *IntI1* hasta *bla*_{DHA-1} y en los que *downstream* de *bla*_{DHA-1} aparece *IS26* (Wei et al 2005, Verdet et al 2006). Se ha especulado que estos plásmidos se habrían originado a partir de integrones complejos de clase 1 con la estructura clásica por la inserción de *IS26* (Verdet et al 2006), que es lo que aparentemente habría sucedido en el caso del integrón complejo objeto del presente estudio, aunque aquí la delección no haya afectado al determinante *qnr* ni a la primera región variable. La estructura de este integrón representaría un estado intermedio entre pRBDHA y pTN60013.

La asociación, en el seno de integrones complejos, de *ISCR1* con varias β -lactamasas de espectro extendido (Arduino et al 2002, Sabaté y Prats 2002, Chowdhury et al 2011), AmpC plasmídicas, *qnrA* y *qnrB* (Toleman et al 2006 (a),(b)) supone una seria amenaza porque facilita la selección y propagación de estos determinantes de resistencia y, además, dificulta el tratamiento de las infecciones producidas por enterobacterias, en las que las cefalosporinas de amplio espectro y las fluoroquinolonas son agentes terapéuticos de elección.

En este trabajo hemos presentado un caso de diseminación intrahospitalaria de una cepa de *K. pneumoniae* con multirresistencia (resistencia a todos los β -lactámicos excepto carbapenemes, a tobramicina y a ciprofloxacino) asociada a un integrón complejo de nueva estructura en el que el caso índice, aunque no se pudo comprobar, posiblemente fue una paciente trasladada desde un hospital de tercer nivel. Las otras dos pacientes habían recibido tratamiento con amoxicilina/clavulánico y cefuroxima o ceftazidima, antibióticos cuyo uso se ha reconocido como un factor de riesgo independiente para sufrir una infección por enterobacterias productoras de AmpC plasmídicas (Yan et al 2000, Yan et al 2004). Este caso ilustraría las intrincadas rutas que propician la transmisión de genes de resistencia entre bacterias y de

bacterias resistentes entre individuos y la repercusión que en ello tienen los cambios sociales y médicos, entre los que están una mayor supervivencia e instrumentalización de los pacientes, el empleo generalizado de antibióticos de amplio espectro y una mayor frecuencia de traslados entre instituciones sanitarias.

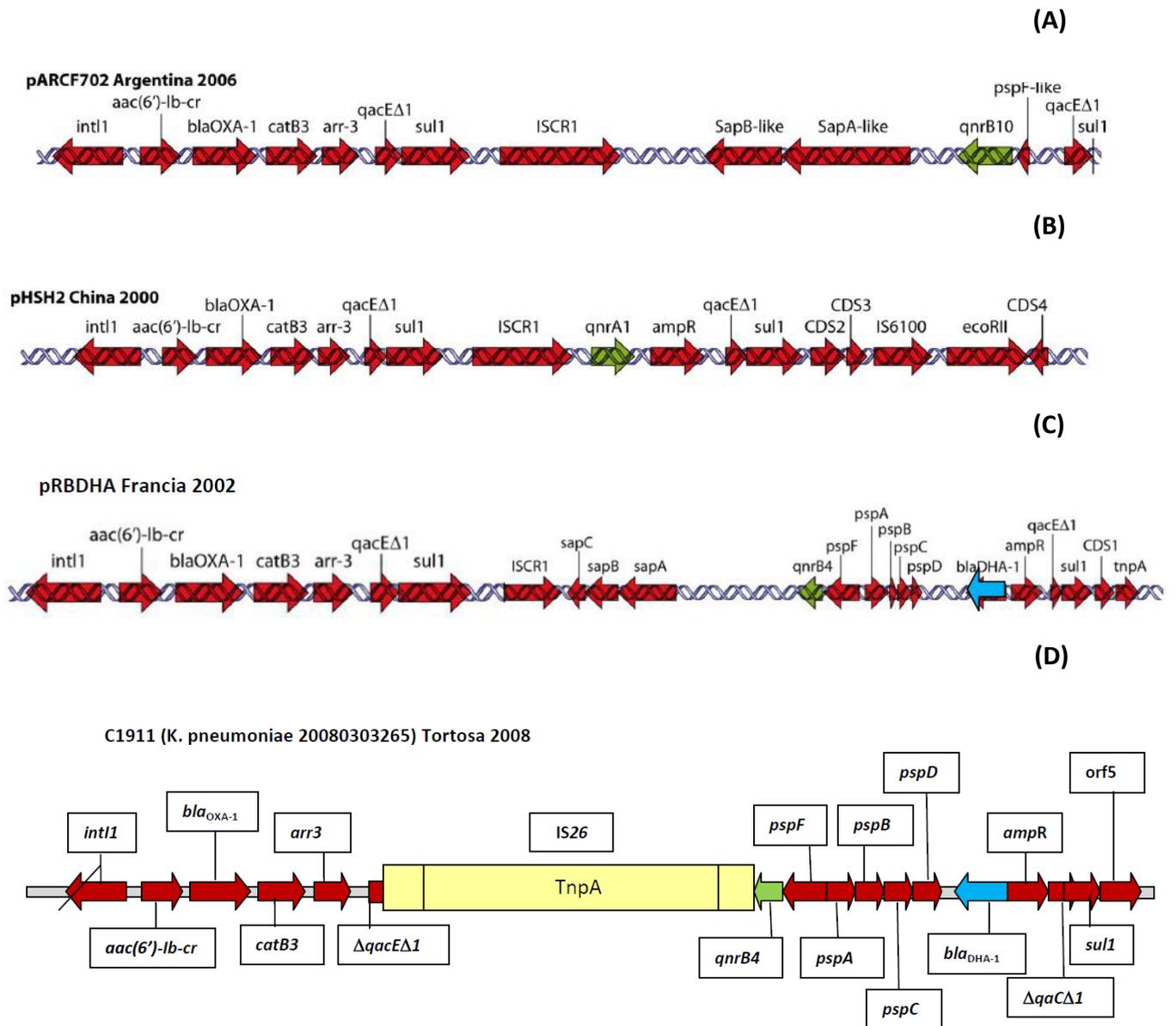


Figura 24: representación esquemática de diversas variantes del integrón complejo In37 asociadas a determinantes *qnr*. (A) *K. pneumoniae* (Quiroga et al 2007); (B) *E. coli* (Wang et al 2003); (C) *K. pneumoniae* (Verdet et al 2006); (D) *K. pneumoniae* presente trabajo (parcialmente adaptado de Strahilevitz et al 2009).

Conclusiones

1. En nuestro ámbito geográfico (región sanitaria Terres de l'Ebre) *Salmonella* Typhimurium se ha convertido en el serotipo de *S. enterica* más prevalente y ha desplazado de esta posición al serotipo Enteritidis.
2. La multirresistencia antibiótica es muy frecuente en el serotipo Typhimurium y en algunos otros serotipos menos habituales pero que figuran entre los más prevalentes en nuestro país, como *S. Hadar*, *S. Rissen* y *S. Bredeney*, aunque no en *S. Enteritidis*.
3. Los porcentajes de resistencia a los diferentes antibióticos en *S. enterica* son variables dependiendo del serotipo. Los antibióticos que presentaron las tasas más altas de resistencia fueron antibióticos de uso muy extendido en ganadería o avicultura: tetraciclina, estreptomycin, amoxicilina, cloranfenicol y sulfamidas en *S. Typhimurium* y ácido nalidíxico, amoxicilina, tetraciclina, estreptomycin, sulfamidas y cotrimoxazol en el resto de serotipos.
4. Las β -lactamasas detectadas con más frecuencia en el serotipo Typhimurium fueron OXA-1 y PSE-1, siempre vehiculadas por integrones de clase 1. Estas enzimas no se identificaron en ningún aislado del resto de serotipos, en los cuales TEM-1 fue la única β -lactamasa de amplio espectro identificada.
5. La resistencia a cefalosporinas de amplio espectro fue excepcional y sólo se constató en cinco aislados, cuatro productores de β -lactamasas de espectro extendido (entre ellos dos aislados de los serotipos Grumpensis y Kapemba en los que la producción de este tipo de enzimas no estaba descrita) y un aislado de *S. Newport* productor de DHA-1.
6. La resistencia a ácido nalidíxico, prácticamente siempre acompañada de sensibilidad disminuida a ciprofloxacino, fue muy elevada en los serotipos de origen aviar (*S. Enteritidis*, *S. Virchow* y *S. Hadar*), probablemente relacionada con el amplio uso de este compuesto en las granjas avícolas, pero anecdótica en *S. Typhimurium*. La resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas sólo se observó en los tres aislados de *S. Kentucky*, todos ellos recuperados de pacientes con historia reciente de viaje al Norte de África.

7. La resistencia a fluoroquinolonas mediada por proteínas Qnr aparentemente está poco extendida en *Salmonella* y suele asociarse con resistencia a cefalosporinas de espectro extendido; en nuestra serie sólo detectamos estos determinantes en dos aislados sensibles a ácido nalidíxico y con sensibilidad reducida a ciprofloxacino (QnrA1 en *S. Virchow* productor de CTX-M-9 y QnrB4 en *S. Newport* productor de DHA-1).
8. El uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano es probablemente el factor más determinante en la emergencia y selección de aislados de *S. enterica* resistentes a los antimicrobianos, pero la adquisición de resistencia *in vivo* en el curso del tratamiento, por transferencia horizontal de vectores de resistencia a partir de la flora comensal intestinal, también es un fenómeno documentado y que nosotros pudimos observar en un aislado de *S. Typhimurium* que desarrolló resistencia a cefalosporinas y amoxicilina/clavulánico por adquisición de *bla*_{CMY-2} tras la administración al paciente de amoxicilina/clavulánico.
9. La presencia de integrones de clase 1 se asoció significativamente con la multirresistencia antibiótica y con la resistencia a antibióticos codificados por casetes génicos insertados en su región variable, generalmente antibióticos “antiguos” usados en veterinaria, pero también a otros como amoxicilina, cefotaxima, ceftazidima y tetraciclina que se cotransferían sistemáticamente por conjugación junto a los integrones.
10. Los integrones de clase 1 están muy extendidos entre aislados multirresistentes de *S. enterica* de nuestra región sanitaria, en particular en *S. Typhimurium*. Se detectaron trece tipos diferentes de integrones en diecisiete serotipos distintos de *Salmonella*.
11. La presencia de integrones fue muy frecuente en *S. Typhimurium*, serotipo en el que, sin embargo, el espectro de estos elementos genéticos fue muy limitado, restringiéndose casi exclusivamente a los integrones *bla*_{OXA-1}-*aadA1* y *aadA2* y *bla*_{PSE-1}, estos últimos prácticamente siempre asociados. Ninguno de estos perfiles de integrones se identificó en otros serotipos de *S. enterica*.
12. Los aislados portadores del integrón de región variable *bla*_{OXA-1}-*aadA1*, endémicos en España y Portugal, fueron los más prevalentes en *S. Typhimurium* de nuestro ámbito

geográfico, presentando una frecuencia superior a la registrada en el resto del estado español y habiendo desbancado a los que presentan el genotipo de resistencia característico de SGI1 (*floR*, *tetG* y perfil de integrones *aadA2* + *bla_{PSE-1}*), de los que fenotípicamente sólo se diferenciaban por ser resistentes a nitrofurantoina.

13. La mayor parte de aislados de *S. Typhimurium* que albergaban cualquiera de estos dos perfiles de integrones compartían un mismo patrón genotípico, independientemente del fagotipo, perfil de integrones o año de aislamiento, lo que sugería que la multiresistencia vinculada a integrones en este serovar era fundamentalmente debida a la diseminación de un único clon muy bien adaptado ecológicamente.
14. Los integrones con los *arrays* de casetes *dfrA1-aadA1* y *dfrA17-aadA5*, principalmente asociados a plásmidos *IncK*, *IncN* e *IncI1*, y *dfrA12-orf-aadA2* fueron los más frecuentes en *S. enterica* de serovariedades distintas a *Typhimurium* y también los que estaban presentes en un mayor número de serotipos diferentes.
15. Resulta especialmente preocupante la asociación de genes que codifican resistencia a los antibióticos de elección en el tratamiento de la salmonelosis invasiva (cefalosporinas de amplio espectro [*bla_{CTX-M-9}*] y fluoroquinolonas [*qnrA1*]) con determinantes de resistencia a otros antibióticos usados en animales (aminoglicósidos [*aadB*,*aadA2*] y trimetoprim [*dfrA12*]) en el seno de integrones complejos que observamos no sólo en un aislado de *S. Virchow*, en el que este hecho es habitual, sino también en otro de *S. Grumpensis*.
16. Los integrones de clase 1 atípicos asociados a *qacH-IS440-sul3* son un tipo de integrones emergentes. En nuestra serie los detectamos en varios aislados de los serotipos *Typhimurium*, [4,5,12:i:-], *Rissen* y *Enteritidis* (serotipo en el que hasta el momento no se habían notificado), y en todos los casos se transfirieron por conjugación.
17. La descripción por primera vez de integrones en los serotipos *Kapemba*, *Mikawasima* y *9,12:lv:i:-* y de dos integrones de estructura inusual (*aadA13-sat* y *estX-psp*) en *S. enterica* pone de manifiesto que los integrones no sólo son plataformas genéticas muy

eficientes en la adquisición y transmisión de determinantes de resistencia, sino que además contribuyen a promover la diversidad genética de las bacterias.

18. La emergencia y diseminación simultánea de aislados productores de dos penicilinas resistentes a inhibidores, IRT-11 y OXA-1, fueron las responsables de la elevada prevalencia de aislados de *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a amoxicilina/clavulánico y sensibles a cefazolina en un centro sociosanitario de la región sanitaria.
19. La propagación de los aislados productores de IRT-11 fue consecuencia de la diseminación de tres clones diferentes, lo que sugiere que, además de transmisión cruzada entre pacientes, también tuvo lugar la transferencia horizontal de bla_{IRT-11} , que en todos los casos se pudo transferir por conjugación.
20. El gen bla_{OXA-1} se encontró invariablemente formando un *array* con $aac(6')-Ib-cr$ que en la inmensa mayoría de los aislados estaba localizado junto con los casetes génicos *catB3* y *arr3* en la región variable de un integrón de clase 1 transferible por conjugación y asociado a *qnrS2*, pero no a *ISCR1* (elemento típico de los integrones complejos); en tres de los aislados el integrón carecía de *qacΔE* y de *sul 1* o *sul3*. Un integrón de idénticas características, también asociado a *qnrS2*, se describió recientemente en un aislado acuático de *Aeromonas allosaccharophila*.
21. Los aislados productores de OXA-1 se agrupaban en tres clones diferentes según poseyesen integrones de clase 1 convencionales, defectivos o no presentaran integrones. El patrón ERIC-PCR de los aislados que alojaban integrones de clase 1 con la región 3'CS conservada coincidía con el de uno de los clones productores de IRT-11.
22. El elevado consumo de amoxicilina/clavulánico en el centro habría facilitado la emergencia de aislados de *K. pneumoniae* productores de IRT-11 y OXA-1 (poco frecuentes de forma aislada en esta especie) que posteriormente se diseminaron por presumibles deficiencias en las medidas de control de la infección. Es probable que el amplio uso de fluoroquinolonas contribuyese asimismo a la selección de los aislados productores de OXA-1 en los que coexistían dos mecanismos de resistencia plasmídica a quinolonas y mutaciones en *gyrA* y *parC*.

23. El integrón de región variable [*aac(6′)-Ib-cr*; *bla_{OXA-1}*; *catB3*; *arr3*] también se detectó en dos aislados de *K. pneumoniae* con fenotipo sugestivo de producción de una AmpC plasmídica y de la presencia de determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas, recuperados en el curso de la misma semana de dos pacientes del centro sociosanitario que habían recibido tratamiento con amoxicilina/clavulánico y cefuroxima o ceftazidima.
24. En ambos aislados, que eran indistinguibles genéticamente y positivos para *qnrS2*, el mencionado integrón estaba vinculado a *bla_{DHA-1}* y *qnrB4* en un integrón complejo de nueva estructura. El integrón era muy semejante a In37 y al descrito en un aislado de *K. pneumoniae* en Francia, del que se diferenciaba por haber sufrido la deleción, como consecuencia de la inserción de IS26, de gran parte de la primera copia de 3′CS, del elemento ISCR1 y del operón *sap* situado *downstream* de *qnrB4*.
25. Los integrones desempeñan un papel decisivo en la emergencia, diseminación y coselección de resistencias por su gran versatilidad, bajo coste biológico, capacidad de movilización y de dar respuesta a la presión selectiva del uso de antibióticos en diferentes ecosistemas, como demuestran nuestros hallazgos en aislados humanos de una bacteria zoonótica como *Salmonella* y de *K. pneumoniae* de adquisición nosocomial.
26. Los integrones complejos representan un paso más en la evolución y diversificación de los vectores de transmisión horizontal de resistencia al conseguir ensamblar en una misma estructura, gracias a sucesivos eventos de recombinación y transposición con el concurso de ISCR1, a genes que confieren resistencia a antibióticos modernos, como las cefalosporinas de amplio espectro o quinolonas, con los casetes de resistencia vehiculados por los integrones clásicos.

Referencias bibliográficas

- Abbott LS.** *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other Enterobacteriaceae. En Murray Manual of Clinical Microbiology (Cap 43). 9th edition ASM Press. Washington DC 2007.
- Albrich WC, Monnet DL, Harbarth S.** Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Emerg Infect Dis 2004; 10: 514-517.
- Alekshun MN, Levy SB.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 2007; 128:1037-1050.
- Andersson D.** The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Cur Opini Microbiol 2006; 9:461–465.
- Anónimo.** Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment. Geneva 2003. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/amr.pdf>
- Anónimo.** Memoria de la Agencia Española de Sanidad Alimentaria y nutrición 2006 (http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/publicaciones_estudios/subdetalle/memoria_anual_2006.shtmlhttps: 2006 annual memory of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition).
- Anónimo.** Food- and waterborne diseases and zoonoses Surveillance Network Quarterly Salmonella Report Q1 2008, January–March 2008
- Anónimo.** Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. EFSA Journal 2009; 7: 1372.
- Anónimo.** European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2010.
- Anónimo.** Food and Drug Administration. Center for Veterinary Medicine. The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. Draft Guidance #209. June 2010. (Disponible online: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/%20GuidanceforIndustry/UCM216936.pdf>.)

- Anónimo.** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. EFSA Journal 2011; 9:2090. [378pp.] Disponible online www.efsa.europa.eu/efsajournal. (a)
- Anónimo.** The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal 2011; 9:2154. [321pp] (Disponible online: www.efsa.europa.eu/efsajournal)(b)
- Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L.** Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella* Typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. J Antimicrob Chemother 2004; 54:429-434.
- Antunes P, Machado J, Peixe L.** Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. J Antimicrob Chemother 2006; 58:297-304.(a)
- Antunes P, Machado J, Peixe L.** Illegal use of nitrofurans in food animals: contribution to human salmonellosis? Clin Microbiol Infect 2006; 12:1047-1049.(b)
- Antunes P, Machado J, Peixe L.** Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:1545–1548.
- Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D.** *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:2303-23066
- Baggesen DL, Wegener HC, Madsen M.** Correlation of conversion of *Salmonella enterica* serovar enteritidis 1, 4 or 6 phage type with loss of lipopolysaccharide. J Clin Microbiol 1997; 35:330-333.
- Baquero F, Martínez JL, Cantón R.** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr Opin Biotechnol 2008; 19:260-265.
- Bennett PM.** Plamid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br Pharmacol 2008; 153:5347-5357.

- Bermudes H, Jude F Arpin C, Quentin C.** Characterization of an inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamase in a novel strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother* 1997; 41:222.
- Biendo M, Laurans G, Thomas D, Canarelli B, Hamdad-Daoudi F, Rousseau F, Castelain S, Eb F.** Molecular characterisation and mechanisms of multidrug-resistant human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Amiens (France). *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26:219-229.
- Bischoff KM, White DG, Hume ME, Poole TL, Nisbet DJ.** The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243:285-291.
- Boerlin P, Reid-Smith RJ.** Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal Health Research Reviews* 2008; 9:115-126.
- Bonomo RA.** Multiple antibiotic-resistant bacteria in long-term-care facilities: an emerging problem in the practice of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1414-1422.
- Boucher Y, Labbate M, Koenig J, Stokes HW.** Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol* 2007; 15:301-309.
- Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR.** Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3758-3764
- Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J.** Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004; 39:55-60
- Briggs CE, Fratamico PM.** Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 846-849.

- Briñas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Sáenz Y, García M, Dominguez L, Torres C.** Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2056-2058.
- Burch D.** Drug resistance? Not guilty!. *Pig international* 2005; 35:19-21.
- Bush K, Jacoby CA.** Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:969–976.
- Cabrera R, Ruiz J, Ramírez M, Bravo L, Fernández A, Aladueña A, Echeíta A, Gascón J, Alonso PL, Vila J.** Dissemination of *Salmonella enterica* serotype agona and multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium in Cuba. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74:1049-1053.
- Cantón Moreno R, Coque González MT, Baquero Mochales F.** Evolución y perspectivas futuras de resistencia a los antimicrobianos. En *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Capítulo 12)* (Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, editores). 1ª edición Editorial Médica Panamericana, Madrid 2005.
- Cantón R, Coque TM.** The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:466–475.
- Cantón R, Morosini MI, Martín O, de la Maza S, Gomez G. de la Pedrosa E.** IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl. 1):53–62.
- Cantón R.** Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15 (suppl I):20-29.
- Cantón R, Morosini MI.** Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35:977-991.
- Carattoli A.** Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 2001; 32:243-259.
- Carattoli A.** Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Issues Mol Biol.* 2003; 5:113-122.

- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ.** Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63:219-228.
- Carattoli A.** Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl 1):117–123.
- Casin I, Breuil J, Brisabois A, Moury F, Grimont F, Collatz E.** Multidrug-resistant human and animal *Salmonella* typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded β -lactamase PSE-1. *J Infect Dis* 1999; 179:1173-1182.
- Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P .** Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas spp.* *Emerg Infect Dis* 2008; 14:231-237.
- Cloekaert A, Schwarz S.** Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Vet Res* 2001; 32:301-310.
- Collard JM, Place S, Denis O, Rodríguez-Villalobos H, Vrints M, Weill FX, Baucheron S, Cloekaert A, Struelens M, Bertrand S.** Travel-acquired salmonellosis due to *Salmonella* Kentucky resistant to ciprofloxacin, ceftriaxone and co-trimoxazole and associated with treatment failure. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:190-192.
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* 2011; 11:381-93.
- Courvalin P.** Antimicrobial Drug Resistance: “Prediction is very difficult, especially about the future”. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1503-1509.
- Csewell MW, Philipps I.** Aspects of plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am J Med* 1981; 70:459-462.
- Cuevas O, Oteo J, Lázaro E, Aracil B, de Abajo F, García-Cobos S, Ortega A, Campos J and the Spanish EARS-Net Study Group.** Significant ecological impact on the progression of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* with increased community use of moxifloxacin, levofloxacin and amoxicillin/clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:664–669.

- Curiao T, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Baquero F, Coque MT.** Association of composite IS26-*sul3* elements with highly transmissible IncI1 plasmids in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* clones from humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:2451-2457.
- Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R.** Inhibitor-resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:447–458.
- Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RW, Kam KM.** Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *Antimicrob Chemother* 2005; 56:586-589.
- Chowdhury PR, Ingold A, Vanegas N, Martínez E, Merlino J, Merkier AK, Castro M, González Rocha G, Borthagaray G, Centrón D, Toledo HB, Márquez CM, Stokes HW.** Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3140-3149.
- Chuanchuen R, Koowatananukul C, Khemtong S.** Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008; 39:419–424.
- D'Acosta VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD.** Sampling the antibiotic resistome. *Science* 2006, 311:374-377.
- Díaz MA, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH).** Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27:503-510.
- Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, Moyá B, Curiao T, Pérez-Vázquez M, Cantón R, Oliver A, Navarro F; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa.** Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:404-410.

- Diestra K, Miró E, Martí C, Navarro D, Cuquet J, Coll P, Navarro F.** Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. Clin Microb Infect 2011; 17:1032-1036.
- Domínguez Rodríguez L, Moreno Romo MA, Porrero Calonge MC.** Uso prudente de antimicrobianos y propuestas de mejora en veterinaria. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28 (Supl 4):40-44.
- Donnenberg MS.** Enterobacteriaceae. En Principles and practices of Infectious diseases (Capítulo 215) (Editores Mandell, Bennett, Dolin).7a edición Elsevier. Philadelphia 2010.
- Doran G, Morris D, O'Hare C, DeLappe N, Bradshaw B , Corbett-Feeney G, Cornican M.** Cost-effective application of pulsed-field gel electrophoresis to typing of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Appl Environ Microbiol 2005; 71:8236–8240.
- Doshi RK, Patel G, Mackay R, Wallach F.** Healthcare-associated Infections: epidemiology, prevention, and therapy. Mt Sinai J Med 2009; 76:84-94.
- Drawz SM, Bonomo RA.** Three decades of β -lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev 2010; 23:160-201.
- Dubois V, Poirel L, Arpin C, Coulange L, Bebear C, Nordmann P, Quentin C.** SHV-49, a novel inhibitor-resistant β -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:4466–4469.
- Dubois V, Poirel L, Demarthe F, Arpin C, Coulange L, Minarini LA, Bezia MC Bordmann P, Quentin C.** Molecular and biochemical characterization of SHV-56, a novel Inhibitor-resistant β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:3792-3794.
- Echeita MA, Aladueña AM, de la Fuente M, González-Sanz R, Díez R, Arroyo M, Cerdán F, Gutierrez R, Herrera S.** Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2004 y 2005 (I). Boletín epidemiológico semanal 2007; 15: 145-156.

- Espinasse F, Gheorghiu R, Poiata A, Labia R, Nicolas-Chanoine MH.** Reduced susceptibility to co-amoxiclav in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in Romania between 1985 and 1993. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39:103-106.
- Figueroa Ochoa IA, Verdugo Rodríguez A.** Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Rev Latinoam Microbiol* 2005; 47:25-42.
- Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J; European SENTRY Participants.** Multi-resistance to antimicrobial agents for the ten most frequently isolated bacterial pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18:147-160.
- Fluit AC, Schmitz FJ.** Resistance integrons and superintegrons. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:272-288.
- García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A.** Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 274–81.
- Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Hooper DC.** Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis* 2006; 43:297-304.
- Gazouli M, Kaufmann ME, Tzelepi E, Dimopoulou H, Paniara O, Tzouvelekis LS .** Study of an outbreak of cefoxitin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *J Clin Microbiol* 1997; 35:508-510.
- Gebreyes WA, Altier C.** Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* Subs. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2813-2822.
- Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A.** Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect* 2006; 8:1937–1944.
- Girlich D, Karim A, Poirel L, Cavin MH, Verny C, Nordmann P.** Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2 β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:467–473.

- Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ.** Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* 1998; 338:1333-1338.
- Goldman MP, Nair R.** Antibacterial treatment strategies in hospitalized patients: what role for pharmacoeconomics? *Cleve Clin J Med* 2007; 74 (Suppl 4):S38-S47.
- González-Sanz R, Herrera-León S, de la Fuente M, Arroyo M, Echeita MA.** Emergence of extended-spectrum β -lactamases and AmpC-type β -lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1181–1186.
- Grave K, Torren-Edo J, Mackay D.** Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:2037-2040.
- Gottesman BS, Carmeli Y, Shitrit P, Chowers M.** Impact of quinolone restriction on resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from urine by culture in a community setting. *Clin Infect Dis* 2009; 49:869-8675
- Gudiol F.** Uso prudente de antibióticos y propuestas de mejora en los centros sociosanitarios. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28 (Supl 4):32-35.
- Guerra B, Soto S, Cal S, Mendoza, MC.** Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2166-2169.
- Guerra B, Soto SM, Argüelles JM, Mendoza MC.** Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1305-1308.
- Hall LM, Henderson-Begg SK.** Hypermutable bacteria isolated from humans- a crytical analysis. *Microbiology* 2006; 152:2505-2514.
- Harbarth S, Nobre V, Pittet D.** Does antibiotic selection impact patient outcome? *Clin Infect Dis* 2007; 44:87–93.

- Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM.** β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 115-121.
- Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Mølbak K.** Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* typhimurium. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 490-495.
- Helms M, Simonsen J, Molbak K.** Quinolone resistance is associated with increased risk of invasive illness or death during infection with *Salmonella* serotype Typhimurium. *Infect Dis* 2004; 190:1652-1654.
- Herrera-León S, González-Sanz R, Rodríguez I Rodicio MR, Echeita MA.** Spread of a multiresistant CTX-M-9-producing *Salmonella enterica* serotype Virchow phage type 19 in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:901–90.
- Herrero A, Rodicio MR, González-Hevia MA, Mendoza MC.** Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:39–45.
- Herrero A, Rodicio MR, Echeitia MA, Mendoza MC.** *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): A new multidrug-resistant group endemic in Spain. *Int J Med Microbiol* 2008; 298:253-261.
- Herrero A, Mendoza MC, Threlfall EJ, Rodicio MR.** Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:1087-1093.
- Hohmann EL.** Nontyphoidal Salmonellosis, *Clin Infect Dis* 2001; 32:263–269.
- Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, Jakubczak A, Threlfall EJ, Mevius DJ.** Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill* 2010; 15(22):pii=19580.
- Jacoby GA.** AmpC β -lactamases. *Clin Microb Rev* 2009; 22:161-182.

- Jayaraman R.** Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Current science* 2009; 96:1475-1484.
- Jin Y, Ling JM.** Prevalence of integrons in antibiotic-resistant *Salmonella* spp. in Hong Kong. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62:432- 439,
- Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW.** Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33:376-393.
- Kaye KS, Gold HS, Schwaber MJ, Venkataraman L, Qi Y, De Girolami PC, Samore MH, Anderson G, Rasheed JK, Tenover FC.** Variety of β -lactamases produced by amoxicillin–clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the Northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1520–1525.
- Keynan Y, Rubinstein E.** The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *Int J Antimicrobial Agents* 2007; 30:385-389.
- Khemtong S, Chuanchuen R.** Class 1 integrons and *Salmonella* genomic island 1 among *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *Microb Drug Resist* 2008; 14:65-70.
- Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC.** *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3582-3584.
- Koh YH, Wang G, Koh TY.** High-level cefepime resistance in *Escherichia coli* from Singapore producing OXA-1 β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:380-389.
- Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH.** Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:388-396.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R et al.** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:597–602.

- Lascols C, Hackel M, Marshall SH, Hujer AM, Bouchillon S, Badal R, Hoban D, Bonomo RA** Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo- β -lactamase in India: data from the SMART study (2009). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1992-1997.
- Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM, Carattoli A, Prats G.** Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:291-295.
- Lawson AJ, Dassama MU, Ward LR, Threlfall EJ.** Multiply resistant (MR) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 12 and DT 120: a case of MR DT 104 in disguise? *Emerg Infect Dis* 2002; 8:434-436.
- Leflon-Guibout V, Ternat G, Heym B, Nicolas-Chanoine MH.** Exposure to co-amoxiclav as a risk factor for co-amoxiclav-resistant *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:367-371. (a)
- Leflon-Guibout V, Bonacorsi S, Clermont O, Ternat G, Heym B, Nicolas-Chanoine MH.** Pyelonephritis caused by multiple clones of *Escherichia coli*, susceptible and resistant to co-amoxiclav, after a 45 day course of co-amoxiclav. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:373-377. (b)
- Lemozy J, Sirot D, Chanal C, Huc C, Labia R, Sirot J.** First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 33:2580-2582.
- Levy SB.** Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49 25-30.
- Levy S, Marshall B.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and response. *Nat Med* 2004; 10 (12 Suppl): S122-S127.
- Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, Kapperud G.** DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1469-79. (a)
- Linstedt BA, Heir E, Nygard I, Kapperud G.** Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J Clin Microbiol* 2003; 52:141-149. (b)

- Lipsitch M, Samore MH.** Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:347-354.
- Livermore DM.** β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557–584.
- Livermore DM.** Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clin Infect Dis* 2003; 36 (Suppl 1):S11-S22.
- Livermore DM.** Minimising antibiotic resistance. *Clinical Microbiol infect* 2004; 10 (Suppl 4):1–9.
- Machado E, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Peixe L.** Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the *aac(6′)-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3220-3221.
- Mantilla JR, García I, Espinal PA, Valenzuela EM.** Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Col Cienc Quím Farm* 2004; 33:48-58.
- Marimón JL, Gomáriz M, Zigorraga C, Cilla G, Pérez-Trallero E.** Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 46:3789-3793.
- Markogiannakis A, Tassios PT, Lambiri M, Ward LR, Kourea-Kremastinou J, Legakis NJ, Vatopoulos AC.** Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. The Greek Nontyphoidal *Salmonella* Study Group. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1269-1271.
- Martin LJ, Fyfe M, Doré K, Buxton JA, Pollari F, Henry B, Middleton D, Ahmed R, Jamieson F, Ciebin B, McEwen SA, Wilson JB; Multi-Provincial *Salmonella* Typhimurium Case-Control Study Steering Committee.** Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium infections. *J Infect Dis* 2004; 189:377-384.

- Martín O, Valverde A, Morosini MI, Rodríguez-Domínguez M, Rodríguez-Baños M, Coque TM, Cantón R, del Campo R.** Population analysis and epidemiological features of inhibitor-resistant-TEM (IRT) β -lactamases producing *Escherichia coli* from both community and hospital settings in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:2368-2372.
- Martínez JL, Baquero F.** Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15: 647–679.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351:797-799.
- Martínez-Martínez L, Calvo J.** Desarrollo de la resistencia a antibióticos: causas, consecuencias y su importancia en la salud pública. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28 (Supl4):4-9.
- Majtánová L, Majtán T, Majján V.** Molecular characterization of class 1 integrons in clinical strains of *Salmonella* Typhimurium isolated in Slovakia. *Pol J Microbiol* 2007; 56:19-23.
- Mazel D.** Integrons: Agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:608- 618.
- Meakins S, Fisher IST, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschäpe H, Cormican M, Luzzi I, Schneider F, Wannett W, Coia J, Echeita A, Threlfall EJ.** Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000–2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microb Drug Resist* 2008; 14:31-35.
- Mendoza MC, Herrero A, Rodidico MR.** Ingeniería evolutiva en *Salmonella*: emergencia de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia a antimicrobianos en serotipos no tifoideos. *Enferm Infecc Microbiol Cli* 2009; 27:37-43.
- Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola MT, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, Prats G, Navarro F.** Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58:211-215.

- Mimica Matanovic S, Bergman U, Vukovic D, Wettermark B, Vlahovic-Palcevski V.** Impact of restricted amoxicillin/clavulanic acid use on *Escherichia coli* resistance--antibiotic DU90% profiles with bacterial resistance rates: a visual presentation. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36:369-373
- Molbak K, Baggesen D, Aarestrup F, Ebbesen JM, Engberg J, Frydendahl K, Gerner-Smidt P, Petersen AM, Wegener HC.** An outbreak of multidrugresistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* DT104. *N Engl J Med* 1999; 341:1420–1425.
- Moura A, Henriques I, Ribeiro R, Correia A.** Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1243–1250.
- Mulvay RM, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckert A.** The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes infect* 2006; 8:1915-1922.
- Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine N.** *Escherichia, Shigella* and *Salmonella* (Capítulo 43). En Murray Manual of Clinical Microbiology. 9th edition ASM Press. Washington DC 2007.
- Navarro Risueño F, Cuenca Estrella M, Pumarola Suñé T.** Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos En Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Capítulo 11). (Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, editores). 1ª edición Editorial Médica Panamericana, Madrid 2005.
- Navarro F, Miró E, Mirelis B.** Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:638–645.
- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B.** Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29: 524-534.
- Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR.** Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:273-281.
- Nicolle LE.** Infection control in long-term care facilities. *Clin Infect Dis* 2000; 31:752-756 (a)

- Nicolle LE.** Urinary tract infection in long-term-care facility residents. *Clin Infect Dis.* 2000; 31:757-761 (b)
- Nógrády N, Gadó I, Tóth A, Pászti J.** Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26:126-132.
- Nordmann P, Poirel L.** Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:463–469.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:228-236.
- O’Brian TF.** Emergence, spread and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (Suppl 3):S78-S84.
- Ortega A, Bautista V, Aranzamendi M, Bou G, E. Cercenado E, Conejo C, González-López JJ, Merino M, Mirelis B, Navarro F, Oliver A, Pascual A, Prats G, Weber I, Campos J, Oteo J.** Estudio multicentrico de la resistencia a amoxicilina/acido clavulanico en *Escherichia coli*: mecanismos moleculares y epidemiologia molecular. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(Espec Cong 1):318.
- Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, García C, Miguelañez S, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Aracil B, Bautista V, Campos J.** Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2359-2366.
- Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Arroyo M, García-Caballero J, Marín-Casanova P, González-Sanz R, Fuentes-Gómez V, Oña-Compán S, García-Cobos S, Campos J.** Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:524-528.

- Pallecchi L, Alessandro B, Paradisi F, Rossolini GM.** Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use : mechanisms and implications. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6:725-732.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR.** Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33:757–784.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, Wagener MM, McCormack JG, Yu VL.** International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* 2004; 140:26-32.
- Pegues DA, Miller SI.** *Salmonella* species including *Salmonella* Typhi. En Principles and practices of Infectious diseases (Capítulo 223) (Editores Mandell, Bennett, Dolin).7ª edición Elsevier. Philadelphia 2010.
- Peleg AY, Hooper DC.** Hospital-acquired Infections due to Gram-Negative bacteria. *N Engl J Med* 2010; 362:1804-1813.
- Pérez-Moreno MO, Pérez-Moreno M, Carulla M, Rubio C, Jardí AM, Zaragoza J.** Mechanisms of reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanate in *Escherichia coli* strains from the Health Region of Tortosa (Catalonia, Spain). *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:234-241.
- Pérez-Moreno MO, Carulla-Pont M, Pérez-Moreno M, Jardí-Baiges AM, Llovet-Lombarte MI, Tejedor-Ganduxé X, Zaragoza-López JJ.** Integrones de clase 1 en aislamientos de *Salmonella enterica* productores de diferentes tipos de β -lactamasas recogidos en la región sanitaria de Tortosa. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23:259-265.
- Pérez-Moreno MO, Fort Gallifa I, Picó Plana E, Ruiz Blázquez J, Grande Armas J, Llovet Lombarte MI, Cid Ventura MP, Jardí Baiges AM.** Epidemiología y prevalencia de penicilinasas resistentes a inhibidores en aislados de *Escherichia coli* de un centro sociosanitario con sensibilidad disminuida a amoxicilina-acido clavulanico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(Espec Cong 1):220.
- Pérez-Pérez FJ, Hansoni ND.** Detection of plasmid-mediated AmpC β -Lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2153–2162.

- Peterson LR.** Squeezing the antibiotic balloon: the impact of antimicrobial classes on emerging resistance. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (Suppl 5):4–16.
- Picão RC, Poirel L, Demarta A, Ferreira Silva CS, Corvaglia AR, Petrini O, Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:948–950.
- Piddock LJV.** Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; 9:382-402.
- Podschum R., Ullmann U.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microb Rev* 1998; 11:589-603.
- Poirel L, Leviandier C, Nordmann P.** Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3992-3997.
- Poirel L, Cattoir V, Nordmann P.** Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:295–297.
- Politi L, Tassios PT, Lambiri M, Kansouzidou A, Pasiotou M, Vatopoulos AC, Mellou K, Legakis NJ, Tzouvelekis LS.** Repeated occurrence of diverse extended-spectrum β -lactamases in minor serotypes of food-borne *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Clin Microbiol* 2005; 43:3453-3456.
- Poppe C, Martin LC, Gyles CL, Reid-Smith R, Boerlin P, McEwen SA, Prescott JF, Forward KR.** Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:1184-1192.
- Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler Bistué AJ, Guerriero L, Vargas LJ, Zorreguieta A, Tokumoto M, Quiroga C, Tolmasky ME, Galas M, Centrón D.** Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6′)-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:4466–4470.

- Rasmusen MA, Carlson SA, Franklin SK, McCuddin ZP, Wu MT, Sharma VK.** Exposure to rumen protozoa leads to enhancement of pathogenicity and of invasion by multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* bearing SGI1. *Infect Immun* 2005; 73:4668-4675.
- Riaño I, García-Campello M, Sáenz Y, Alvarez P, Vinué L, Lantero M, Moreno MA, Zarazaga M, Torres C.** Occurrence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:292-295.
- Rice LB, Bonomo RA.** Mechanisms of resistance to Antibacterial Agents (Cap 71). En Murray Manual of Clinical Microbiology. 9th edition ASM Press. Washington DC 2007.
- Ridley AM, Punia P, Ward LR, Rowe B, Threlfall E.J.** 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* 1996; 8:613-638.
- Ridley A, Threlfall EJ.** Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104. *Microb Drug Resist.* 1998; 4:113-118.
- Rodríguez I, Rodicio MR, Herrera-León S, Echeita A, Mendoza MC.** Class 1 integrons in multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002 and 2004. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32:158–164.
- Rodríguez I, Barownick W, Helmuth R, Mendoza MC, Rodicio MR, Schroeter A, Guerra B.** Extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003–07. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:301-309.
- Rosser SJ, Young HK.** Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:11-18.
- Ruiz J.** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1109–1117.

- Sabaté M, Prats G.** Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microb Clin* 2002; 20:301-305. (a)
- Sabaté M, Navarro F, Miró E, Campoy S, Mirelis B, Barbé J, Prats G.** Novel Complex *sul1*-type Integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2656-2661.(b)
- Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M; Vila J, Torres C.** Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3996-4001.
- Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, Martínez S, Rojo-Bezares B, Zarazaga M, Torres C.** Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol* 2010; 144:493-497.
- Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB.** Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 160:37-41.
- Sánchez-Céspedes J, Blasco MD, Marti S, Alba V, Alcalde E, Esteve C, Vila J.** Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2990-2991.
- Santos C, Caetano T, Ferreira S, Ramalheira E, Mendo S.** A novel complex class 1 integron found in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Portugal. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1036-1039.
- Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y.** Clinical economic impact of bacteremia with extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1257-1262.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A.** Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:519-542.
- Seo MR, Park YS, Pai H.** Characteristics of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. *Chemother* 2010; 56:46-53.

- Slama TG.** Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care* 2008; 12 (Suppl 4):S4.
- Soler P, González-Sanz R, Bleda MJ Hernández G, Echeíta A, Usera MA.** Resistance in non-typhoidal *Salmonella* from human sources, Spain, 2001–2003. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:310–314.
- Stapleton PD, Shannon KP, French GL.** Construction and characterization of mutants of the TEM-1 β -lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1881-1887.
- Strahilevitz J, Engelstein D, Adler A, Temper V, Moses AE, Block C, Robicsek A.** Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3001-3003.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:664-689.
- Su LH, Chiu CH, Chu C, Wang MH, Chia JH, Wu TL.** In vivo acquisition of ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serotype anatum. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:563-567.
- Swaminathan, B., T. J. Barrett, S. B. Hunter, Tauxe RV.** PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:382–389.
- Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B.** Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104 in England and Wales. *Eurosurvey* 1997; 2:81-84.
- Threlfall EJ.** Epidemic *Salmonella typhimurium* DT104- a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:7-10.
- Threlfall EJ.** Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26:141-148.

- Threlfall EJ, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschäpe H, Cormican M, Luzzi I, Schnieder F, Wannet W, Machado J, Edwards G.** Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill* 2003; 8(2):pii=400.
- Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR.** Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:1-6. (a)
- Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR.** ISCR elements. Novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70:296-316. (b)
- Torres C, Moreno MA, Zaragaza M.** Prudent use of antimicrobial agents: not just in human. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:669-671.
- Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A et al.** Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:3053-3058.
- Ungemach FR, Müller-Bahrndt D, Abraham G.** Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 2006; 296 (Suppl 41):33-38.
- Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM.** Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:256-280.
- Van den Bogaard AE, Stobberingh EE.** Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14:327-335.
- Vaqueiro M, Morón A, Sampere M, Niño J, Segura F.** Evolution of the use of antibiotics in a hospital long-term care center in Catalonia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20:384-387.

- Velasco L, Sobrino L, García M, Soler P, Martínez E.** Infecciones por *Salmonella* no tifoidea de origen humano en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 2000-2008. Boletín epidemiológico 2007; 17:193-196.
- Verdet C, Arlet G, Barnaud G, Lagrange PH, Philippon A .** 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 2000; 44:222-225.
- Verdet C, Benzerara Y, Gautier V, Adam O, Ould-Hocine Z, Arlett G.** Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:607-617.
- Verdet C, Gautier V, Chachaty E, Ronco E, Hidri N, Decré D, Arlet G.** Genetic context of plasmid-carried *bla*_{CMY-2}-like genes in Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53:4002-4006.
- Vila J, Rodríguez-Baño J, Gargallo-Viola D.** Prudent use of antibacterial agents: are we entering in an era of infections with no effective antibacterial agents? What can we do? Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28:577–579.
- Vo AT, Van Dujikeren E, Fluit AC, Wannet WJB, Verbruggen AJ, Maas HME, Gaastra W.** Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non Typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. Int J Antimicrob Agents 2006; 28:172-179.
- Vo AT, van Duijkeren E, Gaastra W, Fluit AC.** Antimicrobial resistance, class 1 integrons, and genomic island 1 in *Salmonella* isolates from Vietnam. PLoS One 2010 26;5: e9440
- Walker RA, Lawson AJ, Lindsay EA, Ward LR, Wright PA, Bolton FJ, Wareing DR, Corkish JD, Davies RH, Threlfall EJ.** Decreased susceptibility to ciprofloxacin in outbreak-associated multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104. Vet Rec 2000; 147:395-396.

- Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC.** Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2242–2248.
- Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Ding H, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Xu X, Wang L, Shen X,** Presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infect Dis* 2008 May 22; 8:68.
- Wei ZQ, Chen YG, Yu YS, Lu WX, Li LJ.** Nosocomial spread of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* containing a plasmid encoding multiple β -lactamases. *J Med Microbiol* 2005; 54:885-888.
- Weill FX, Bertrand S, Guesnier F, Baucheron S, Cloeckart A, Grimont PA.** Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky in travelers. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1611-1612.
(a)
- Weill FX, Guesnier F, Guibert V, Timinouni MD, Polomack L, Grimont PAD.** Multidrug resistance in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *J Clin Microbiol* 2006; 44:700-708. (b)
- Woo YK, Lee SH.** Genetic Diversity of Multi-resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolates from animals and humans. *J Microbiol* 2006; 44:106-112.
- Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Jin YT, Wu JJ.** Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4320-4325.
- Yan JJ, Ko WC, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL.** Epidemiological investigation of bloodstream infections by extended spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in a Taiwanese teaching hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3329–3332.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC:** Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45:1151-1161.
- Zhang Q, Sahin O, McDermott PF, Payot S.** Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes Infect* 2006; 8:1972-1978.

Zhao S, Qaiyumi S, Friedman S, Singh R, Foley SI, White DG, McDermott PF, Donkar T, Bolin C, Munro S, Baron EJ, Walker RD. Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5366-5371.

Anexos

ANEXO 1:

CARACTERÍSTICAS DEL CENTRO SOCIOSANITARIO DEL QUE PROCEDÍAN LOS PACIENTES DE LOS CUALES SE RECUPERARON LOS AISLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* OBJETO DE ESTUDIO

El Hospital de la Santa Creu de Tortosa es un centro sanitario con más de 900 años de trayectoria. Su historia se remonta al siglo XII y está estrechamente relacionada con la de la ciudad de Tortosa.

En la actualidad el Hospital de la Santa Creu de Tortosa es uno de los centros sociosanitarios más grandes de Cataluña, con 355 camas. Consta de 60 camas de convalecencia y rehabilitación, 10 de cuidados paliativos, 165 de larga estancia, 15 de psicogeriatría y 105 camas residenciales

Además de estas unidades de hospitalización, existen tres equipos PADES (Programa d'atenció domiciliària-equips de suport) para atender las demandas domiciliarias de pacientes geriátricos y paliativos oncológicos de las comarcas del Baix-Ebre, Montsià y Terra Alta y una UFISS (Unitat funcional interdisciplinària sociosanitària) que realiza las interconsultas en el Hospital de agudos de Tortosa Verge de la Cinta. El área ambulatoria dispone de consultas externas de valoración geriátrica integral, un hospital de día geriátrico, un hospital de día de enfermedades neurodegenerativas y un centro de día, cada uno de ellos con una capacidad de 20 plazas por día.

El área de influencia del hospital es la región sanitaria de les Terres de l'Ebre que abarca las comarcas del Baix Ebre, Montsià y Terra Alta, con una población de 155.670 habitantes en 2006. El Hospital de la Santa Creu es el centro sociosanitario de referencia para la misma, aunque también se puede acceder desde cualquier otra área sanitaria de Cataluña.

El Hospital de la Santa Creu de Tortosa está acreditado como Unidad Docente para el postgrado de Médicos Internos Residentes en la Especialidad de Geriatría desde el año 1999.

ANEXO 2:**PORCENTAJE DE AISLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* NO SENSIBLES (INTERMEDIOS Y RESISTENTES) A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS EN EL CENTRO SOCIOSANITARIO EN EL PERIODO 2001-2008 ^a**

Antibiótico	% aislados no sensibles							
	2001 (n=33)	2002 (n=35)	2003 (n=28)	2004 (n=43)	2005 (n=53)	2006 (n=58)	2007 (n=36)	2008 (n=77)
Amoxicilina/clavulánico	12,1	25,7	29,6	60,5	41,6	50	19,4	14,6
Piperacilina/tazobactam	-	24,6	14,8	58,1	30,2	23,9	8,3	9,8
Cefazolina	15,2	20	3,6	11,6	2,3	3,4	8,3	9,1
Cefuroxima	6	14,3	10,8	64	31,7	34,5	14,6	19,4
Cefoxitina	0	9,4	7,4	11,7	5,9	10,4	8,1	8,5
Cefotaxima ^b	3	2,9	0	4,6	0	5,2	0	5,2
Ceftazidima ^b	3	2,9	0	4,6	0	5,2	0	5,2
Cefepime ^b	3	2,9	3,7	34,9	22,6	19,4	5,4	10,4
Imipenem	0	0	0	0	0	0	0	0
BLEE (+) ^c	3	0	0	2,3	0	1,7	0	1,3
AmpC (+) ^d	3	2,9	0	2,3	0	1,7	0	3,9
Amikacina	0	0	0	2,3	0	1,4	0	0
Gentamicina	0	8,6	7,4	4,7	0	1,5	0	10,4
Tobramicina	0	8,6	11,1	55,8	30,2	28,8	8,1	19,5
Ácido nalidíxico	63	37,1	48,1	76,7	58,5	68,6	35,1	39
Ciprofloxacino ^e	51,9	34,3	40,8	74,4	56,6	70,1	35,1	42,7
Cotrimoxazol	51,9	22,9	14,8	53,5	28,3	13,4	10,8	3,7
Fosfomicina	15,2	2,9	22,2	16,3	13,2	32,8	37	6,8
Nitrofurantoina	6,1	11,4	3,7	62,8	50,9	58,2	24,,3	26,8

^a Un solo aislado del mismo fenotipo por paciente

^b Se incluyen todos los aislados con CMI > 1 mg/L

^c Aislados productores de β -lactamasas de espectro extendido

^d Aislados con fenotipo característico de producción de AmpC plasmídica

^e Se incluyen todos los aislados con CMI >0,06 mg/L

ANEXO 3:**EVOLUCIÓN DEL CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS CON ACTIVIDAD FRENTE A GRAMNEGATIVOS EN DOSIS DEFINIDAS DIARIAS (DDD) EN EL CENTRO SOCIOSANITARIO DURANTE EL PERIODO 2002-2008**

Antibiótico	DDD absolutas (DDD/100 camas-día)						
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Amoxicilina-Ampicilina	1655 (1,31)	1801 (1,45)	1812 (1,43)	1982 (1,56)	1697 (1,33)	1826 (1,45)	1660 (1,33)
Amoxicilina/Clavulánico	6410 (5,06)	5729 (4,63)	6436 (5,08)	5167 (4,07)	5059 (3,97)	5374 (4,26)	5276 (4,22)
Piperacilina/Tazobactam	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (0,01)	37 (0,03)	21 (0,02)
Cefazolina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	78 (0,06)	429 (0,34)	521 (0,42)
Cefuroxima	390 (0,31)	875 (0,71)	1032 (0,81)	884 (0,70)	681 (0,53)	666 (0,53)	766 (0,61)
Cefotaxima-ceftriaxona- ceftazidima-cefixima	217 (0,17)	286 (0,23)	309 (0,24)	455 (0,36)	628 (0,49)	692 (0,55)	907 (0,72)
Imipenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	65 (0,05)	152 (0,12)	145 (0,12)
Gentamicina	446 (0,35)	402 (0,32)	286 (0,23)	343 (0,27)	326 (0,26)	549 (0,43)	552 (0,44)
Amikacina	186 (0,15)	209 (0,17)	205 (0,16)	53 (0,04)	206 (0,16)	152 (0,12)	229 (0,18)
Tobramicina	5 (0,004)	15 (0,012)	15 (0,01)	0 (0)	0 (0)	30 (0,02)	24 (0,02)
Ciprofloxacino	1278 (1,01)	988 (0,80)	1137 (0,70)	1460 (1,15)	1137 (0,89)	1493 (1,18)	1347 (1,08)
Levofloxacino	406 (0,32)	1059 (0,86)	1355 (0,90)	1772 (1,40)	2128 (1,67)	2077 (1,65)	2890 (2,31)
Cotrimoxazol	455 (0,36)	217 (0,18)	358 (0,28)	107 (0,08)	0 (0)	48 (0,04)	0 (0)
Fosfomicina	162 (0,13)	191 (0,15)	228 (0,18)	393 (0,31)	506 (0,40)	518 (0,41)	579 (0,46)

