



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en <i>Salmonella enterica</i>. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica</b>
Autor/es
<b>María de Toro Hernando</b>
Director/es
Carmen Torres Manrique y María Yolanda Sáenz Domínguez
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico



**Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en *Salmonella enterica*.**  
**Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica**, tesis doctoral de María de Toro Hernando, dirigida por Carmen Torres Manrique y María Yolanda Sáenz Domínguez (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor  
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2014  
publicaciones.unirioja.es  
E-mail: publicaciones@unirioja.es



**Universidad de La Rioja**  
Departamento de Agricultura y Alimentación  
Área de Bioquímica y Biología Molecular



**Centro de Investigación Biomédica de La Rioja**  
Área de Microbiología Molecular

**Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas  
en *Salmonella enterica*.  
Mecanismos moleculares y elementos  
de movilización génica.**

**Resistance to beta-lactams and fluoroquinolones  
in *Salmonella enterica*.  
Molecular mechanisms and elements of  
genetic mobilization.**

María de Toro Hernando  
Tesis Doctoral con Mención Internacional  
Logroño, 2013





**UNIVERSIDAD DE LA RIOJA**

Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Bioquímica y Biología Molecular



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA RIOJA**

Área de Microbiología Molecular

**Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en *Salmonella enterica*.**

**Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica.**

**Resistance to beta-lactams and fluoroquinolones in *Salmonella enterica*.**

**Molecular mechanisms and elements of genetic mobilization.**

**MARÍA DE TORO HERNANDO**

Tesis Doctoral con Mención Internacional

Logroño, 2013





**UNIVERSIDAD DE LA RIOJA**

Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Bioquímica y Biología Molecular



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA RIOJA**

Área de Microbiología Molecular

TESIS DOCTORAL

**Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en *Salmonella enterica*.  
Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica**

**Resistance to beta-lactams and fluoroquinolones in *Salmonella enterica*.  
Molecular mechanisms and elements of genetic mobilization.**

Memoria presentada por **MARÍA DE TORO HERNANDO** para optar al título de Doctora con la Mención de “Doctora Internacional” por la Universidad de La Rioja.

**Logroño, Febrero 2013**





Dra. **CARMEN TORRES MANRIQUE**, Catedrática del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja.

Dra. **YOLANDA SÁENZ DOMÍNGUEZ**, Investigadora del Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

Por la presente declaran que,

La memoria titulada **“Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en *Salmonella enterica*. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica”**, que presenta Dña. MARÍA DE TORO HERNANDO, Licenciada en Química, ha sido realizada en el Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja y en el Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, bajo su dirección, y reúne las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con la Mención de “Doctor Internacional”,

Lo que hacen constar en Logroño, a 14 de febrero de 2013.

Fdo.: Carmen Torres Manrique

Fdo.: Yolanda Sáenz Domínguez



“Wahrlich es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen, nicht das Besitzen sondern das Erwerben, nicht das “Da-sein”, sondern das Hinkommen, was des grössten Genuss”

“Sin duda no es el conocimiento, sino el aprendizaje, no es la posesión, sino la adquisición, no es “estar allí”, sino llegar hasta allí, lo que concede el mayor disfrute”

Carl Friedrich Gauß





# ***Índice***



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvii</b>

## **INTRODUCCIÓN**

<b>1.- GÉNERO SALMONELLA. ....</b>	<b>3</b>
1.1.- <i>Clasificación y características generales.</i> .....	3
1.2.- <i>Serotipado y fagotipado.</i> .....	4
1.3.- <i>Cuadro clínico.</i> .....	9
1.4.- <i>Epidemiología en la Unión Europea y en España.</i> .....	10
<b>2.-VIRULENCIA EN SALMONELLA. ....</b>	<b>13</b>
2.1.- <i>Estructuras de superficie. Fimbrias.</i> .....	14
2.2.- <i>Islas de patogenicidad</i> .....	16
2.3.- <i>Islotes de patogenicidad y genes sueltos.</i> .....	18
2.4.- <i>Plásmidos de virulencia.</i> .....	19
<b>3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.....</b>	<b>20</b>
3.1- <i>El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos.</i> .....	20
3.2.- <i>Bacterias Gram-negativas. Bases bioquímicas de la resistencia a los antibióticos.</i> .....	21
3.3.- <i>Mecanismos de resistencia a beta-lactámicos.</i> .....	23
Estructura química y clasificación de los antibióticos beta-lactámicos. ....	23
Mecanismo de acción de los beta-lactámicos. ....	24
Resistencia a beta-lactámicos.....	25
3.4.- <i>Mecanismos de resistencia a quinolonas.</i> .....	30
Estructura química y clasificación de las quinolonas.....	30
Mecanismo de acción de las quinolonas. ....	32
Resistencia a quinolonas. ....	34
3.5.- <i>Mecanismos de resistencia a otros antibióticos.</i> .....	41
Resistencia a aminoglucósidos. ....	41
Resistencia a fenicoles/cloranfenicoles.....	42
Resistencia a tetraciclina. ....	43
Resistencia a sulfamidas. ....	44
Resistencia a trimetoprim. ....	45

<b>4.- ELEMENTOS DE LA DISEMINACIÓN HORIZONTAL DE LA RESISTENCIA.....</b>	<b>45</b>
4.1.- Casetes génicos e integrones.....	46
4.2.- Elementos genéticos transponibles.....	50
4.3.- Plásmidos.....	51
4.4.- Elementos integrativos y conjugativos (ICEs).....	57
4.5.- Isla Genómica de resistencia de Salmonella de tipo 1 (SGI1).....	57
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
<b>OBJECTIVES .....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
<b>1.- AISLADOS DE Salmonella enterica ESTUDIADOS Y MUESTRAS ANALIZADAS.....</b>	<b>67</b>
1.1.- Aislados clínicos de Salmonella enterica.....	67
1.1.1.- Aislados no seleccionados de S. enterica. ....	67
1.1.2.- Aislados seleccionados por su fenotipo de resistencia: AMP <sup>R</sup> , AMC <sup>I/R</sup> .....	67
1.1.3.- Otros aislados incluidos.....	68
<b>2.- MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN.....</b>	<b>68</b>
2.1.- Medios de cultivo.....	68
2.2.- Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana.....	69
<b>3.- MUESTRAS FECALES DE PERSONAS SANAS.....</b>	<b>71</b>
3.1.- Procesamiento de las muestras para el aislamiento de Salmonella spp. ....	71
<b>4.- ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....</b>	<b>71</b>
4.1.- Difusión en agar.....	71
4.2.- Detección fenotípica de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs). ....	72
4.3.- Detección fenotípica de beta-lactamasas tipo AmpC plasmídicas (AmpC).....	73
4.4.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Método de dilución en agar. ....	73
4.5.- Estudio de la estabilidad de los fenotipos BLEE y AmpC. ....	74
<b>5.- EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA. ....</b>	<b>75</b>
5.1.- Extracción de DNA: método de hervido. ....	75
5.2.- Extracción de DNA por el método de resina (InstaGene <sup>TM</sup> Purification Matrix, Bio-Rad). .....	76
5.3.- Cuantificación de DNA. ....	76
<b>6.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). ....</b>	<b>76</b>
6.1.- Detección de genes de resistencia a distintos antibióticos. ....	77
6.2.- Estudio de los entornos genéticos de beta-lactamasas tipo BLEEs y AmpC.....	87

6.3. Detección de los entornos genéticos para los genes <i>sul2</i> y <i>sul3</i> .....	94
6.4.- Estudio del entorno genético del gen de resistencia a quinolonas <i>qnrS1</i> .....	95
6.5.- Estudio de integrones y promotores. ....	99
6.6.- CARACTERIZACIÓN DE LA ISLA GENÓMICA DE RESISTENCIA DE <i>Salmonella</i> DE TIPO 1 (SGI1).....	101
6.7.- ESTUDIO DE VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>Salmonella enterica</i> .....	103
<b>7- PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Detección e identificación de genes dihidrofolato reductasa (<i>dfr</i>) .....</b>	<b>108</b>
<b>8.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....</b>	<b>108</b>
<b>9.- ESTUDIO DE LA RELACIÓN CLONAL: TIPIFICACIÓN MOLECULAR .....</b>	<b>109</b>
9.1.- MultiLocus Sequence Typing (MLST).....	109
9.2.- Repetitive Extragenic Palindromic PCR (REP-PCR) .....	110
9.3.- Electroforesis en campos pulsados (PFGE).....	111
<b>10.- SECUENCIACIÓN.....</b>	<b>112</b>
10.1.-Purificación del producto de PCR.....	113
10.2.- Análisis de las secuencias.....	113
<b>11.- ANÁLISIS PLASMÍDICO.....</b>	<b>114</b>
11.1.- TIPADO DE PLÁSMIDOS POR “PCR-Based Replicon Typing” (PBRT). ....	114
11.2.- Experimentos de conjugación sobre filtro.....	117
11.3.- Transformación (electro-transformación).....	118
11.4.- Extracción del DNA plasmídico mediante lisis alcalina (método Kado-Liu modificado). .....	119
11.5.- Extracción del DNA plasmídico mediante lisis alcalina (método Birnboim-Doly). ....	120
11.6. Extracción del DNA plasmídico utilizando el kit "Qiagen".....	121
11.7.- Visualización de plásmidos. ....	123
Electroforesis en geles de agarosa horizontales.....	123
Electroforesis en geles de agarosa verticales. ....	123
Digestión con nucleasa S1 seguido de PFGE (S1-PFGE). ....	123
11.8.- Hibridación con sondas de DNA (Southern Blot).....	126
Método por quimioluminiscencia.....	126
Método colorimétrico. ....	128

## **RESULTADOS**

<b>1.- ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE <i>S. enterica</i> DE DOS HOSPITALES ESPAÑOLES. ....</b>	<b>133</b>
<b>2.- ANÁLISIS DE <i>S. enterica</i> EN MUESTRAS DE PERSONAS SANAS.....</b>	<b>138</b>
<b>3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE <i>S. enterica</i> RESISTENTES A AMPICILINA (AMP<sup>R</sup>) PROCEDENTES DE VARIOS HOSPITALES ESPAÑOLES. ....</b>	<b>139</b>

3.1.- Resistencia a antibióticos beta-lactámicos .....	140
Aislados con fenotipo AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup> .....	140
Aislados con fenotipo AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>I/R</sup> .....	141
3.2.- Mecanismos de resistencia a otros antibióticos. ....	144
3.3.- Prevalencia y caracterización de integrones de clase 1, 2 y 3.....	149
Caracterización de los promotores del casete génico bla <sub>OXA-1</sub> localizado en integrones de clase 1. ....	151
3.4.- Relación entre la resistencia a beta-lactámicos, otros antibióticos y la presencia de integrones. ....	153
<b>4.- CARACTERIZACIÓN DE CEPAS bla<sub>PSE-1</sub>-POSITIVAS. ....</b>	<b>159</b>
4.1.- Estudio de la diversidad clonal y tipado molecular de los aislados bla <sub>PSE-1</sub> -positivos.....	160
4.2.- Detección y caracterización de la Isla Genómica de Salmonella de tipo 1 (SGI1). ....	163
4.3.- Detección de factores de virulencia en cepas de <i>S. Typhimurium</i> bla <sub>PSE-1</sub> -positivas.....	164
<b>5.- CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>S. enterica</i> PORTADORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEEs) O DE BETA-LACTAMASAS DE TIPO AmpC (AmpC).....</b>	<b>166</b>
5.1.- Relación clonal y tipado molecular de las cepas portadoras de BLEE o AmpC. ....	169
5.2.- Fenotipo y genotipo de las cepas BLEE o AmpC-positivas.....	169
5.3.- Entornos genéticos de los genes codificantes de beta-lactamasas. ....	170
5.3.- Experimentos de conjugación y estabilidad de los fenotipos BLEE y AmpC. ....	171
5.4.- Caracterización de los plásmidos portadores de los genes codificantes de las enzimas BLEEs y AmpC. ....	176
<b>6.- CASO CLÍNICO: ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA IN VIVO DEL GEN aac(6')-Ib-cr Y MUTACIONES EN GyrA EN UNA CEPA CLÍNICA QnrS1-POSITIVA DE <i>S. enterica</i> SEROTIPO Typhimurium DT104B. ....</b>	<b>182</b>
6.1.- Estudio de la sensibilidad a antibióticos. ....	182
6.2.- Estudio de la relación clonal: tipificación molecular. ....	184
6.3.- Mecanismos de resistencia. ....	185
6.4.- Estudios de conjugación en placa. ....	187
6.5.- Estudio plasmídico. ....	189
6.6.- Secuenciación completa del plásmido portador del gen aac(6')-Ib-cr. ....	192
<b>RESUMEN GRÁFICO .....</b>	<b>199</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>202</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>227</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>229</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>232</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>262</b>

## **ABREVIATURAS**

AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
AMC <sup>S</sup>	Cepas/aislados sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico
AMC <sup>I/R</sup>	Cepas/aislados resistentes o con sensibilidad disminuida a amoxicilina-ácido clavulánico
AMK	Amikacina
AMP	Ampicilina
AMP <sup>R</sup>	Cepas/aislados ampicilina-resistentes
AmpC	Cefalosporinasa de tipo AmpC
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
BLEE	Beta-lactamasa de espectro extendido
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Grado centígrado
CAZ	Ceftazidima
CC	Clonal Complex (Complejo Clonal)
CF	Cefalotina
CHL	Cloranfenicol
CHP	Complejo Hospitalario de Pontevedra (Pontevedra)
CIP	Ciprofloxacina
CLB	Cell Lysis Buffer (Buffer de lisis bacteriana)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CR	Common Region
CS	Conserved Segment
CSB	Cell Suspension Buffer (Buffer de suspensión bacteriana)
CSPD	Sustrato quimioluminiscente
CTX	Cefotaxima
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (Centro europeo para la prevención y control de enfermedades)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica
EFSA	European Food Safety Authority (Agencia europea de seguridad alimentaria)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
g	Gramo
GC	Contenido Guanina+Citosina
GEN	Gentamicina
h	Hora/s
HCULB	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza)
HGM	Hospital Gregorio Marañón (Madrid)
HK	Hektoen
HRV	Hospital Royo Villanova (Zaragoza)
HSP	Hospital San Pedro (Logroño)
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo)
I	Sensibilidad intermedia

In	Integrón
Inc	Grupo de incompatibilidad
IS	Insertion Sequence (Secuencia de inserción)
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
KAN	Kanamicina
kb	Kilobases
l	Litro
LEV	Levofloxacina
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
M	Molar
McC	MacConkey
mg	Miligramo
ml	Mililitro
MH	Müller Hinton
min	Minuto
MLEE	MultiLocus Enzyme Electrophoresis
MLST	MultiLocus Sequence Typing
MLVA	MultiLocus Variable number of tandem repeats
mM	Milimolar
mm	Milímetro
m/v	Relación masa/volumen
NAG	N-acetilglucosamina
NAL	Ácido nalidíxico
NAM	N-acetilmurámico
nm	Nanometros
NOR	Norfloxacina
OFL	Ofloxacina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Open Reading Frame (marco de lectura abierto)
pb	Pares de bases
PBP	Penicillin Binding Protein (Proteína de unión a penicilina)
PBRT	PCR-Based Replicon Typing (Tipado de replicón basado en PCR)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis de campos pulsados)
PMQR	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos)
QRDR	Quinolone Resistance Determining Region (Region determinante de resistencia a quinolonas)
R	Resistente
REP-PCR	Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa de palíndromos extragénicos repetitivos)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de fragmentos de restricción)
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sup>t</sup>	Ácido ribonucleico de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensible
S1-PFGE	S1 nucleasa seguido de PFGE

SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundos
SGI1	<i>Salmonella</i> Genomic Island Type 1 (Isla Genómica de <i>Salmonella</i> tipo 1)
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island (Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> )
SS	<i>Shigella-Salmonella</i>
SSC	Saline Sodium Citrate buffer (Buffer sal de citrato de sodio)
ST	Sequence Type (Secuencia Tipo)
STR	Estreptomina
STT3	Sistema de Secreción de Tipo 3
SUL	Sulfamidas
SXT	Trimetoprim/sulfametoxazol
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
Tc	Transconjugante
TE	Tris-EDTA
TET	Tetraciclina
Tf	Transformante
TMQR	Transferable Mechanism of Quinolone Resistance (Mecanismo transferible de resistencia a quinolonas)
Tn	Transposón
tnp	Transposasa
TOB	Tobramicina
Tris	Tris (Hidroximetil) aminometano
TSI	Triple Sugar Iron Agar (Agar triple azúcar y hierro)
U	Unidades
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias
V/cm	Voltios por centímetro
VR	Vassiliadis Rappaport
v/v	Relación volumen/volumen



## **LISTA DE TABLAS**

- Tabla 1.- Fórmula antigénica de algunos serogrupos y serotipos más comunes de *S. enterica* subespecie *enterica*.
- Tabla 2.- Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos (Suárez & Gudiol, 2009).
- Tabla 3.- Esquemas de clasificación de beta-lactamasas (Drawz & Bonomo, 2010).
- Tabla 4.- Fenotipos de resistencia asociados a enzimas modificantes de aminoglucósidos (Martínez-Martínez & Ruiz de Alegría, 2009).
- Tabla 5.- Antibióticos testados por difusión en agar y puntos de corte en los halos de inhibición (CLSI, 2012).
- Tabla 6.- Antibióticos testados por CMI en este estudio y puntos de corte considerados (CLSI y EUCAST, 2013).
- Tabla 7.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de genes que codifican beta-lactamasas (resistencia a beta-lactámicos).
- Tabla 8.- Secuencia nucleotídica de los cebadores para la detección de variantes de beta-lactamasas de tipo AmpC (Pérez-Pérez & Hanson, 2002).
- Tabla 9.- Reactivos y cantidades añadidas al realizar la PCR Multiplex para la detección de beta-lactamasas de tipo AmpC (Pérez-Pérez & Hanson, 2002).
- Tabla 10.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia quinolonas.
- Tabla 11.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a tetraciclinas.
- Tabla 12.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a cloranfenicol.
- Tabla 13.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos.
- Tabla 14.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a sulfamidas.
- Tabla 15.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a trimetoprim.

- Tabla 16.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR para caracterizar el entorno genético de BLEEs de tipo CTX-M.
- Tabla 17.- Cebadores empleados en la caracterización del entorno genético del gen *sul2*.
- Tabla 18.- Cebadores empleados en la caracterización del entorno genético del gen *sul3*.
- Tabla 19.- Cebadores empleados para caracterizar el entorno genético del gen de resistencia a quinolonas *qnrS1* (Figura 23).
- Tabla 20.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR para el estudio de integrones.
- Tabla 21.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR para el estudio de SGI1.
- Tabla 22.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR para el estudio de genes de virulencia localizados en islas de patogeneidad (SPIs) en *S. enterica*.
- Tabla 23.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR para el estudio de genes de virulencia localizados en cromosoma y plásmidos de virulencia en *S. enterica*.
- Tabla 24.- Tamaños de los fragmentos obtenidos tras la RFLP de los amplicones de los genes *dfp* obtenidos mediante PCR (Navia *et al.*, 2003).
- Tabla 25.- Cebadores de PCR y condiciones de amplificación de los siete genes “housekeeping” para el tipado por MLST (<http://mlst.ucc.ie/>).
- Tabla 26.- Cebadores utilizados en la reacción de secuenciación de los siete genes “housekeeping” (<http://mlst.ucc.ie/>).
- Tabla 27.- Cebadores de PCR utilizados en el estudio de la relación clonal y condiciones de amplificación.
- Tabla 28.-Cebadores utilizados en PBRT para el estudio de plásmidos y condiciones de amplificación (Carattoli *et al.*, 2005; García-Fernández *et al.*, 2009; Villa *et al.*, 2010).
- Tabla 29.- Cebadores utilizados para tipar por pMLST el plásmido del grupo de incompatibilidad Inc11 (García-Fernández *et al.*, 2008).
- Tabla 30.- Serotipos encontrados entre las cepas estudiadas de los hospitales HSP y HCULB.
- Tabla 31.- Porcentaje de resistencia a antibióticos en las cepas analizadas procedentes de los hospitales HSP y HCULB.

- Tabla 32.- Fenotipos de resistencia a 8 antibióticos (ampicilina, gentamicina, estreptomina, ácido nalidíxico, tetraciclina, cloranfenicol, sulfamidas y trimetoprim) en los 280 aislados analizados.
- Tabla 33.- Genes codificantes de las beta-lactamasas encontrados entre los 203 aislados AMP<sup>R</sup> con/sin sensibilidad disminuida a AMC.
- Tabla 34.- Genes *tet* encontrados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a tetraciclina.
- Tabla 35.- Genes implicados en la resistencia a cloranfenicol encontrados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a cloranfenicol.
- Tabla 36.- Genes de resistencia detectados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a aminoglucósidos.
- Tabla 37.- Genes *dfr* encontrados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a trimetoprim.
- Tabla 38.- Genes *sul* detectados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a sulfamidas.
- Tabla 39.- Fenotipos y mecanismos de resistencia detectados en 203 aislados AMP<sup>R</sup>.
- Tabla 40.- Fenotipos y mecanismos de resistencia detectados en los 65 aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos.
- Tabla 41.- Factores de virulencia detectados en las 65 cepas de *S. Typhimurium bla*<sub>PSE-1</sub>-positivas analizadas.
- Tabla 42.- Cepas de *S. enterica* con fenotipo BLEE o AmpC incluidas en este estudio.
- Tabla 43.- Serotipo, fenotipo y genotipo de resistencia para las cepas de *S. enterica* estudiadas.
- Tabla 44.- Fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos; así como entornos genéticos de los genes codificantes de las beta-lactamasas de estudio e integrones en las cepas dadoras de *S. enterica*, transconjugantes y cepas derivadas del experimento de estabilidad genética (LP).
- Tabla 45.- Localización de los genes *bla* y caracterización de los plásmidos portadores de éstos en las cepas de *S. enterica* y derivadas.
- Tabla 46.- Valores de CMI y halos de inhibición frente a distintos antibióticos observados en los aislados de *S. Typhimurium* Se6 y Se20.
- Tabla 47.- Mecanismos de resistencia encontrados para las cepas Se6 y Se20.
- Tabla 48.- Valores de CMI y fenotipos de resistencia a distintos antibióticos obtenidos para las cepas receptora (CSH26), dadoras (Se6 y Se20) y transconjugantes (TCSe20B y TCSe20L).

Tabla 49.-Genes encontrados por PCR y secuenciación en las cepas Se6, Se20 y en los transconjugantes obtenidos a partir de la cepa Se20.

Tabla 50.- Tipo, número y tamaño de los plásmidos detectados en las cepas Se6, Se20 y los transconjugantes.

Tabla 51.- Valores de CMI (mg/L) para aminoglucósidos, quinolonas y fluoroquinolonas en las cepas de *S. Typhimurium* Se20, la cepa transformante TF-Se20 y la cepa receptora *E.coli* ElectroMax DH10B.

Tabla 52.- Comparación de las proteínas de movilización del plásmido pMdT1 con aquellas presentes en plásmidos de tipo ColE1 representativos.

Tabla 53.- Detalle de las regiones y genes detectados en la secuencia del plásmido pMdT1.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.- Panorama general de la clasificación actual de *Salmonella enterica* (adaptación de Achtman *et al.*, 2012).

Figura 2.- Diagrama eBurst obtenido con los datos de MLST de *S. enterica* subesp. *enterica*. Cada círculo corresponde a uno de los 1095 STs, cuyo tamaño es proporcional al número de aislados y cada color se asocia con el serotipo de las cepas agrupadas en él (Achtman *et al.*, 2012).

Figura 3.- Distribución de los diez serotipos más comunes encontrados en *Salmonella* en humanos. Datos del año 2010 (tomados de ECDC 2012b).

Figura 4.- Mecanismo de invasión de *Salmonella* (adaptación de la imagen proporcionada en <http://eng.sheba.co.il>).

Figura 5.- Factores de virulencia representativos de *S. enterica* (adaptado de Madigan *et al.*, 1998).

Figura 6.- Características generales de una isla de patogenicidad (Schmidt & Hensel, 2004).

Figura 7.- Puntos diana de los antibióticos (1-6) y mecanismos de resistencia (a-e). Puntos diana de acción: (1) síntesis de la pared celular; (2) membrana citoplasmática; (3) metabolismo esencial de la bacteria; (4) replicación del DNA; (5) transcripción; (6) traducción. Mecanismos de resistencia: (a) enzimas inactivadoras/modificantes de antibiótico; (b) superproducción de la diana; (c) modificación de la diana celular; (d) expulsión activa del antibiótico; (e) alteración de la permeabilidad (porinas).

Figura 8.- Estructura del peptidoglicano y sitio de acción del antibiótico beta-lactámico.

Figura 9.- Lugar de ataque de las beta-lactamasas sobre las moléculas de penicilina y cefalosporina.

Figura 10.- Estructura de algunas quinolonas y fluoroquinolonas representativas (Cattoir & Nordmann, 2009).

Figura 11.- Ilustración esquemática del ciclo de superenrollamiento de la DNA-girasa, donde se muestra el punto de acción de las quinolonas (Hawkey, 2003).

Figura 12.- (a) Esquema de la molécula de quinolona genérica con las posiciones de anclaje para el bloqueo de las topoisomerasas de tipo II, y (b) esquema del complejo topoisomerasa-DNA-quinolona (derecha).

Figura 13.- Efecto de las mutaciones en las proteínas GyrA y ParC sobre la CMI de ciprofloxacina en cepas de *E. coli* (Sáenz *et al.*, 2003).

Figura 14.- Estructura de la ciprofloxacina y posición de actuación de la enzima acetiltransferasa mutada. A la derecha, estructura de levofloxacina, donde la enzima no puede actuar.

Figura 15.- Metabolismo del ácido tetrahidrofólico.

Figura 16.- Modelo de incorporación y escisión de casetes génicos de la estructura del integrón (Cambray *et al.*, 2011; Stalder *et al.*, 2012).

Figura 17.- Estructura básica de los elementos transponibles.

Figura 18.- Organización modular de un plásmido conjugativo (R388) y uno movilizable (RSF1010) (tomada de Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

Figura 19.- Representación linear de la SGI1 y regiones flanqueantes. Los genes de resistencia están coloreados en fucsia (tomado de Boyd *et al.*, 2001).

Figura 20.- Modelo de integración y escisión sitio-específico de SGI1 (adaptada de Doublet *et al.*, 2005).

Figura 21.- Test de doble disco para la detección de fenotipo BLEE observado en la cepa C1221, portadora del gen *bla*<sub>SHV-12</sub> en el experimento de estabilidad de fenotipo.

Figura 22.- Posibles entornos genéticos de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>CMY</sub> y posición de los cebadores utilizados para su estudio.

Figura 23.- Localización de los cebadores utilizados para amplificar el entorno del gen de resistencia a quinolonas *qnrS1*.

Figura 24.- Estructura clásica de SGI1-A (GenBank número AF261825). En azul se encuentra la región de resistencia.

Figura 25.- Esquema de la región de resistencia de SGI1 mapeada por PCR (adaptado de Targant *et al.*, 2010).

Figura 26.- Porcentajes de resistencia a antibióticos encontrados en las cepas analizadas de los hospitales HSP y HCULB.

Figura 27.- Serotipos encontrados en los aislados resistentes a ampicilina.

Figura 28.- Medios de cultivo y prueba de identificación bioquímica entre las muestras fecales procedentes de voluntarios sanos.

Figura 29.- Porcentajes de resistencia encontrados en los 203 aislados ampicilina-resistentes.

Figura 30.- Porcentaje de aislados portadores de genes codificantes de beta-lactamasas encontradas entre los 203 aislados de *S. enterica* resistentes a ampicilina y sensibles o con sensibilidad disminuida a AMC (AMC<sup>I/R</sup>).

Figura 31.- Representación de las distintas variantes de *bla*<sub>TEM-1</sub> encontradas en esta tesis.

Figura 32.- Beta-lactamasas encontradas en los 203 aislados AMP<sup>R</sup> en función de sus serotipos.

Figura 33.- Estructuras genéticas asociadas al gen *sul2* detectadas en 61 de los aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> *sul2*-positivos.

Figura 34.- Estructuras genéticas asociadas al gen *sul3* detectadas en los 6 aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> *sul3*-positivos.

Figura 35.- Estructura genética de los integrones de clase 1 detectados en 119 aislados de *S. enterica* y del integrón vacío detectados en un aislado de *S. enterica* serotipo Typhimurium.

Figura 36.- E-test realizado sobre cepas de *S. enterica* que albergaban el gen *bla*<sub>OXA-1</sub>.

Figura 37.- Estructura del promotor encontrado en el integrón de clase 1 asociado a la presencia del gen *bla*<sub>OXA-1</sub>.

Figura 38.- Estructura del promotor encontrado en el integrón de clase 1 asociado a la presencia de los genes *aac(6')*-Ib-cr y *bla*<sub>OXA-1</sub>.

Figura 39.- Patrones de PFGE representativos encontrados en las cepas *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivas. M: marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs). (A): patrones PFGE-*Xba*I. (B): patrones PFGE-*Spe*I.

Figura 40.- Combinación de patrones de PFGE y número de cepas encontrados entre las cepas *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivas.

Figura 41.- Región de la SGI1 donde se observó una delección. En la parte superior se encuentra la región estándar de SGI1 (GenBank no. AF261825) y en la parte inferior la región correspondiente a *S. Typhimurium* W313 con la delección en la región *orf5-orf6-IS6100*.

Figura 42.- Patrones de PFGE encontrados en los aislados de *S. enterica* con fenotipo ESBL/AmpC. (a): patrones PFGE-*Xba*I. (b): patrones PFGE-*Spe*I. En ambas figuras, carril 1: marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs); carriles 2 y 14: digestión *Xba*I de la cepa de *S. enterica* serotipo Braenderup H9812, utilizada como control de tamaño estándar. Carril 3: cepa W19; carril 4: C683; carril 5: C516; carril

6: C650; carril 7: C1220; carril 8: C1189; carril 9: C1221; carril 10: W192; carril 11: C493; carril 12: C1218 y carril 13: C1219.

Figura 43.- Entornos genéticos de los genes *bla* detectados entre las cepas de *S. enterica* con fenotipo BLEE o AmpC estudiadas y casetes génicos incluidos en integrones de clase 1 entre ellas.

Figura 44.- Antibiogramas mostrados por las cepas inicial y final en aquellas cepas que perdieron el fenotipo BLEE o AmpC.

Figura 45.- Entornos genéticos de los genes *bla* detectados entre las cepas de *S. enterica* con fenotipo BLEE o AmpC estudiadas y casetes génicos incluidos en integrones de clase 1 entre nuestras cepas.

Figura 46.- Geles de agarosa para la visualización de plásmidos tras la extracción de Birnboim-Doly (izquierda) y de Kado-Liu (derecha).

Figura 47.- Gel de agarosa S1-PFGE de las cepas de *S. enterica* portadoras de genes BLEEs o AmpC.

Figura 48.- Gel de agarosa I-Ceu-I-PFGE de las cepas C1220 y LP-C1220-100, con las anotaciones de hibridación de las sondas *IncA/C*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>* y 16S rDNA estudiadas.

Figura 49.-Comparativa entre el fenotipo de resistencia a distintos antibióticos en ambos aislados. Se6: aislado previo al tratamiento antibiótico. Se20: aislado posterior al tratamiento con ciprofloxacina.

Figura 50.- Perfiles obtenidos tras PFGE con las enzimas *XbaI* y *SpeI*.

Figura 51.- Estructura del entorno genético del gen *qnrS1* detectado en las cepas de *S. Typhimurium* Se6 y Se20.

Figura 53.- Integrón de clase 1 defectivo en la región 3'-conservada encontrado en la cepa Se20.

Figura 52.- Entorno genético descrito para el gen de resistencia a sulfamidas *sul2* en las cepas Se6 y Se20.

Figura 54.- Patrón de digestión S1-PFGE de las cepas estudiadas y de la cepa receptora CSH26. Marcador: Lambda Ladder PFG Marker.

Figura 55.- Representación gráfica de la localización donde hibridan las sondas específicas para cada gen.

Figura 56.- Representación circular del plásmido pMdT1 detectado en la cepa Se20.

Figura 57.- Representación lineal del plásmido pMdT1, en la que se detalla la región del gen de resistencia *aac(6')-Ib-cr4*.



## **RESUMEN**

*Salmonella enterica* es un importante patógeno zoonótico frecuentemente implicado en toxiinfecciones alimentarias y la emergencia de aislados clínicos resistentes a los antibióticos supone graves limitaciones para su tratamiento. Por ello, el primer objetivo de esta tesis fue estudiar el fenotipo de resistencia a antibióticos y su relación con el serotipo en los 280 aislados de *S. enterica* recogidos en el Hosp. San Pedro de Logroño (2007-2009) y Hosp. Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (2009-2010). Los serotipos mayoritarios fueron Typhimurium (52%) y Enteritidis (33%), estando *S. Typhimurium* altamente asociado con fenotipos de multiresistencia y específicamente con la resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas y tetraciclina (ACSSuT, 29,5%). Se detectaron bajos porcentajes de resistencia a ciprofloxacina o cefalosporinas de tercera generación.

El segundo objetivo fue caracterizar los mecanismos de resistencia a beta-lactámicos (y a otros antibióticos) en los 203 aislados de *S. enterica* resistentes a ampicilina (AMP<sup>R</sup>) obtenidos en hospitales de cinco comunidades autónomas (incluidos los dos anteriormente indicados). Se detectó sensibilidad a amoxicilina-ácido clavulánico (AMC<sup>S</sup>) en 79 de estos aislados y sensibilidad intermedia o resistencia (AMC<sup>I/R</sup>) en 124 aislados. El gen *bla*<sub>TEM-1</sub> se identificó fundamentalmente en los aislados con fenotipo AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>S</sup> y los genes *bla*<sub>OXA-1</sub> o *bla*<sub>PSE-1</sub> en los aislados AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>I/R</sup>. En el 59% de los aislados AMP<sup>R</sup> se detectaron integrones de clase 1 con 12 estructuras distintas, siendo mayoritarias las estructuras *aadA2/bla*<sub>PSE-1</sub> (55%) y *bla*<sub>OXA-1</sub>-*aadA1* (32%). Siete integrones de clase 1, cuatro de ellos carentes de la región 3'-conservada, albergaban genes *dfr* de resistencia a trimetoprim. El integrón *estX+psp+aadA2+cmlA1+aadA1+qacH+IS440+sul3+orf1+mef(B)ΔIS26* se detectó en un aislado *S. Typhimurium* y el integrón In37 de estructura *aac(6')-Ib-cr+bla*<sub>OXA-1</sub>+*catB3+arr3* con el promotor PcW<sub>TGN-10</sub> inusual en un aislado de *S. Thompson*. Se observó el fenotipo de pentaresistencia ACSSuT, asociado a los genotipos mayoritarios *bla*<sub>PSE-1</sub>-*floR-aadA2-sul1-tet(G)* o *bla*<sub>OXA-1</sub>-*catA-aadA1/strA-strB-sul-tet(B)*.

El tercer objetivo se centró en caracterizar los 65 aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos, todos ellos *S. Typhimurium*, obtenidos en el objetivo anterior. La Isla Genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1), portadora de los genes *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*, se detectó en todos los aislados, identificándose una nueva variante de SGI1 (GenBank JF775513). Todas las cepas *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivas presentaron pulsotipos indistinguibles o altamente relacionados (PFGE, enzimas *XbaI*, *SpeI*) y fueron adscritas a la secuencia tipo ST19 (Complejo Clonal CC1). La detección de genes de virulencia agrupó a las cepas en tres virulotipos; detectándose el

mayoritario en el 89% de las mismas e incluyendo genes localizados en islas de patogenicidad, en el plásmido de virulencia o relacionados con profagos.

El cuarto objetivo fue estudiar los 11 aislados que presentaban un fenotipo de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) o AmpC y que se asociaron a los genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (serotipo Virchow, 2 aislados), *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (Virchow, 2), *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> (Enteritidis, 1), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Gnesta, 1, y *S. enterica* grupo C, 1), *bla*<sub>SHV-2</sub> (Livingstone, 1), *bla*<sub>SHV-12</sub> (Enteritidis, 1) y *bla*<sub>CMY-2</sub> (Bredeney, 2). Plásmidos de tipo Inc11 o Inca/C portaban los genes *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> o *bla*<sub>CMY-2</sub>; mientras que el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, incluido en un integrón complejo In60, y el gen *bla*<sub>CTX-M-10</sub>, presente en un entorno relacionado con fagos, se encontraron en plásmidos no tipables. La transferencia por conjugación de los genes BLEE/AmpC resultó positiva en 8 de las 11 cepas estudiadas, cotransfiriendo otros genes de resistencia adicionales en la mayoría de los casos. Se realizaron experimentos de estabilidad del fenotipo BLEE/AmpC tras 100 pases consecutivos en ausencia de presión selectiva antibiótica. Cinco de las cepas analizadas, portadoras de los genes de resistencia *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub>, perdieron la copia plasmídica del gen. En dos de estos casos se evidenció la pérdida completa del plásmido Inc11 portador del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> o *bla*<sub>SHV-12</sub>. Otros genes de resistencia, tales como *tet(A)*, *tet(B)*, y los integrones portadores de los genes *dfrA12* y *dfrA16*, se perdieron en dos cepas adicionales.

El quinto objetivo fue la caracterización en profundidad del único aislado (*S. Typhimurium* Se20) resistente a ciprofloxacina obtenido en esta tesis. Correspondió a un caso clínico de selección *in vivo* de resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos, asociado a la adquisición gen *aac(6')-Ib-cr4*, tras 7 días de tratamiento con ciprofloxacina. Tras comprobar mediante PFGE y MLST que las cepas pre- y post-tratamiento pertenecían al mismo clon, se realizó la caracterización de los mecanismos moleculares de resistencia implicados. Se determinó la localización genética de los determinantes de la resistencia, detectando los plásmidos portadores, y se comprobó mediante experimentos *in vitro* la transferencia por conjugación de los mismos. Este trabajo supone la primera evidencia de selección *in vivo* de resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos en *S. Typhimurium* portadora del gen *qnrS1* y *aac(6')-Ib-cr4* y con mutaciones en la proteína GyrA. Por último, se caracterizó el plásmido de pequeño tamaño portador del gen *aac(6')-Ib-cr4*, que se denominó pMdT1 (GenBank JX457478).

## **ABSTRACT**

*Salmonella enterica* is an important zoonotic pathogen frequently implicated in human foodborne infections. The emergency of clinical isolates resistant to antibiotics involves serious limits for their treatments. The first objective of this thesis was to study the resistance phenotype and its relation with the serotype in 280 *S. enterica* isolates obtained from Hosp. San Pedro in Logroño (2007-2009) and Hosp. Clínico Universitario Lozano Blesa in Zaragoza (2009-2010). The main serotypes were Typhimurium (52%) and Enteritidis (33%), being *S. Typhimurium* highly associated with multi-resistance phenotypes, and in particular with resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulphonamides and tetracycline (ACSSuT, 29.5%). Low resistance percentages of resistance to ciprofloxacin or third generation cephalosporins were observed.

The second objective was to characterize the mechanisms of resistance to beta-lactams (and to other antibiotics) in 203 ampicillin-resistant (AMP<sup>R</sup>) *S. enterica* isolates obtained from hospitals of five regional communities (including both previously mentioned). Susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid (AMC<sup>S</sup>) was detected in 79 of these isolates, and reduced susceptibility or resistance (AMC<sup>I/R</sup>) in 124 additional isolates. The *bla*<sub>TEM-1</sub> gene was basically identified among AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>S</sup> isolates and the *bla*<sub>OXA-1</sub> or *bla*<sub>PSE-1</sub> genes among AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>I/R</sup> ones. Class 1 integrons were detected in the 59% of AMP<sup>R</sup> isolates, showing 12 different structures, and the *aadA2/bla*<sub>PSE-1</sub> (55%) and *bla*<sub>OXA-1</sub>-*aadA1* (32%) being the main ones. Seven class 1 integrons, four of them lacking the 3'-conserved region, harbored the trimethoprim resistance *dfp* genes. The *estX+psp+aadA2+cmlA1+aadA1+qacH+IS440+sul3+orf1+mef(B)ΔIS26* integron was detected in a *S. Typhimurium* isolate, and the In37 integron carrying the *aac(6')-Ib-cr+bla*<sub>OXA-1</sub>-*catB3+arr3* structure and the unusual PcW<sub>TGN-10</sub> promoter was also detected in a *S. Thompson* isolate. The ACSSuT penta-resistance phenotype was associated with the major genotypes *bla*<sub>PSE-1</sub>-*floR-aadA2-sul1-tet(G)* or *bla*<sub>OXA-1</sub>-*catA-aadA1/strA-strB-sul1-tet(B)*.

The third objective was focused on the characterization of 65 *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive isolates, all of them *S. Typhimurium*, obtained in the previous part. The *Salmonella* Genomic Island type 1 (SGI1), carrying *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul1* and *tet(G)* genes, was identified in all the strains, and a new variant was detected (GenBank JF775513). All the *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive strains displayed indistinguishable or closely related pulsotypes (PFGE, *Xba*I, *Spe*I enzymes), and were assigned to the sequence type ST19 (Clonal Complex CC1). The detection of virulence genes grouped the strains in three virulotypes. An 89% of them showed the same profile and included the

genes located in pathogenicity islands (SPI 1-5), prophage related genes and the virulence plasmid.

The fourth objective was to study 11 isolates that showed an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) or AmpC phenotype. The associated genes were the following ones: *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (serotype Virchow, 2 isolates), *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (Virchow, 2), *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> (Enteritidis, 1), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Gnesta, 1, and *S. enterica* group C, 1), *bla*<sub>SHV-2</sub> (Livingstone, 1), *bla*<sub>SHV-12</sub> (Enteritidis, 1) and *bla*<sub>CMY-2</sub> (Bredeney, 2). The IncI1 or Inca/C plasmids carried the *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> genes. Whereas the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene, included in the In60 complex integron, and the *bla*<sub>CTX-M-10</sub> gene, located in a phage related environment, were found in non-typeable plasmids. The conjugative transfer of ESBL/AmpC genes was successful in 8 of the 11 strains, co-transferring in most of the cases other additional resistance genes. The stability of the ESBL/AmpC phenotype was evaluated after 100 daily passages in the absence of antibiotic selection pressure. Five of the analyzed strains, carrying the *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes, lost the plasmidic copy of the beta-lactamase gene. In two of these, the complete loss of the IncI1 plasmid harboring the *bla*<sub>CMY-2</sub> or *bla*<sub>SHV-12</sub> genes was observed. Other resistance genes, such as *tet(A)*, *tet(B)*, and the *dfrA12*- and *dfrA16*-positive integrons, were lost in two additional strains.

The fifth objective was to characterize in detail the single ciprofloxacin resistant isolate (*S. Typhimurium* Se20) found in this thesis. It belonged to an *in vivo* selection of fluoroquinolones and aminoglycosides resistance case report, associated with the *aac(6′)-Ib-cr4* gene acquisition, after a ciprofloxacin treatment during 7 days. After checking by PFGE and MLST that both pre- and post-treatment strains belonged to the same clone, the characterization of the molecular resistance mechanisms involved was performed. The genetic location of the resistance determinants, the plasmids and the *in vitro* conjugative transference were assessed. This work is the first description of *in vivo* selection of resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides in a *qnrS1*-positive *S. Typhimurium* strain mediated by the acquisition of the *aac(6′)-Ib-cr4* gene and a substitution in the GyrA protein. Finally, the small *aac(6′)-Ib-cr4*-carrying plasmid, named as pMdT1 (GenBank JX457478) was fully characterized.

# ***Introducción***

*“Amor, trabajo y conocimiento son las fuentes de nuestra existencia.*

*Ellos deberían también gobernarlo”*

*Wilhelm Reich*



# **INTRODUCCIÓN**

## **1.- GÉNERO SALMONELLA.**

### **1.1.- Clasificación y características generales.**

El género *Salmonella* está incluido en la Familia Enterobacteriaceae, Orden *Enterobacteriales*, Clase  $\gamma$ -Proteobacteria (Garrity *et al.*, 2004). Los miembros de esta familia se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos con un contenido en guanina-citosina (GC) de 50-53% y móviles por flagelación peritrica, a excepción de los serotipos Gallinarum y Pollurum, además de alguna variante inmóvil de otros serotipos como Arizonae. Este tipo de microorganismos producen ácido y gas a partir de glucosa, catalasa positivos y oxidasa negativos, y reducen los nitratos a nitritos (Corral & Perea, 1992). La mayoría de los miembros de esta familia se encuentran en el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales, bien como patógenos o como comensales.

*Salmonella* es capaz de crecer en un rango de temperatura que varía desde los 5°C a los 45-47°C, siendo su temperatura óptima 35-37°C. El pH óptimo de crecimiento es de 6,5-7,5; soportando un rango entre 4,5-9. Se desarrollan bien a una actividad de agua ( $a_w$ ) de 0,945 a 0,999, aunque a valores muy bajos que se encuentran en productos deshidratados, sobreviven largos periodos de tiempo (Gledel, 1995; Mossel *et al.*, 2002).

Cabe destacar la alta tolerancia de *Salmonella* frente a sales biliares y la presencia de colorantes (azul de metileno, eosina, fucsina ácida, cristal de violeta o verde brillante), lo que ha sido utilizado para el diseño de medios selectivos de cultivo como agar Hektoen, agar verde brillante o el agar eosina-azul de metileno (Gledel, 1995; Mossel *et al.*, 2002).

El sistema de clasificación de *Salmonella* ha variado mucho en el tiempo y actualmente se considera que existen dos especies dentro del género *Salmonella*: *S. enterica* y *S. bongori* (Tindall *et al.*, 2005). La primera especie agrupa las subespecies *enterica* (subespecie I), *arizonae* (subespecie IIIa), *diarizonae* (subespecie IIIb), *houtenae* (subespecie IV), *salamae* (subespecie II) e *indica* (subespecie VI) (Figura 1). La subespecie *enterica* es la más frecuente y se aísla en humanos y en animales de sangre caliente. El resto de subespecies de *S. enterica* así como *S. bongori*, se encuentran habitualmente en animales de sangre fría y en el ambiente. Esta segunda especie (*S. bongori*) es la más antigua e incluye una única subespecie denominada subespecie V o *bongori*. En 2004, Shelobolina y colaboradores propusieron una

nueva especie denominada *S. subterranea*. Su distancia filogenética con *Citrobacter spp.* no es significativa en cuanto a la secuencia del 16S RNA, por lo que muchos autores todavía no la reconocen como una nueva especie. La página web <http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html> ofrece indicaciones sobre la nomenclatura del género *Salmonella*.

## 1.2.- Serotipado y fagotipado.

Actualmente existen técnicas de biología molecular mediante sondas de DNA capaces de identificar los serotipos más frecuentes de *Salmonella* que se pueden encontrar en aislados clínicos y de animales; sin embargo, la serotipificación con anticuerpos frente a los distintos antígenos es la técnica que se sigue utilizando habitualmente, aunque generalmente está restringida a centros de referencia. Al igual que en otras enterobacterias, este esquema de serotipado se basa en el sistema de Kauffmann-White y utiliza tres tipos de antígenos de superficie: somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Los antígenos somáticos permiten establecer serogrupos y los flagelares dividen éstos en serotipos, de manera que hasta la fecha la Organización Mundial de la Salud (OMS) contabiliza más de 30 serogrupos y más de 2500 serotipos de *Salmonella*. Aproximadamente 1500 de estos serotipos en la subespecie *S. enterica enterica* y 1000 serotipos en otras subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* (Achtman *et al.*, 2012; Grimont & Weill, 2007).

Los antígenos somáticos o antígenos O son moléculas grandes, complejas, termoestables y alcohol-resistentes. Forman parte del lipopolisacárido (LPS) localizado en la membrana celular externa. Los antígenos O pueden subdividirse a su vez en antígenos O mayores o factores principales y antígenos O menores o factores secundarios. Los factores principales son los que definen el grupo antigénico o serogrupo, de manera que todos los serotipos pertenecientes al mismo grupo se caracterizan por presentar el mismo antígeno O (todos los serotipos del grupo D poseen el antígeno 9, por ejemplo) (Tabla 1). Los factores secundarios están ligados al factor principal y no tienen carácter discriminatorio.

Los antígenos flagelares o antígenos H son de naturaleza proteica y termolábiles, constituidos por la flagelina, la proteína estructural de los flagelos. Mientras que los grupos carboxilo y amino terminales de la flagelina se encuentran altamente conservados, la región central tiene una gran variabilidad y se usa para definir los antígenos flagelares dentro del esquema de serotipado. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* presentan dos tipos de antígenos H, y por tanto son denominados bifásicos; mientras que aquellos, como Typhi,

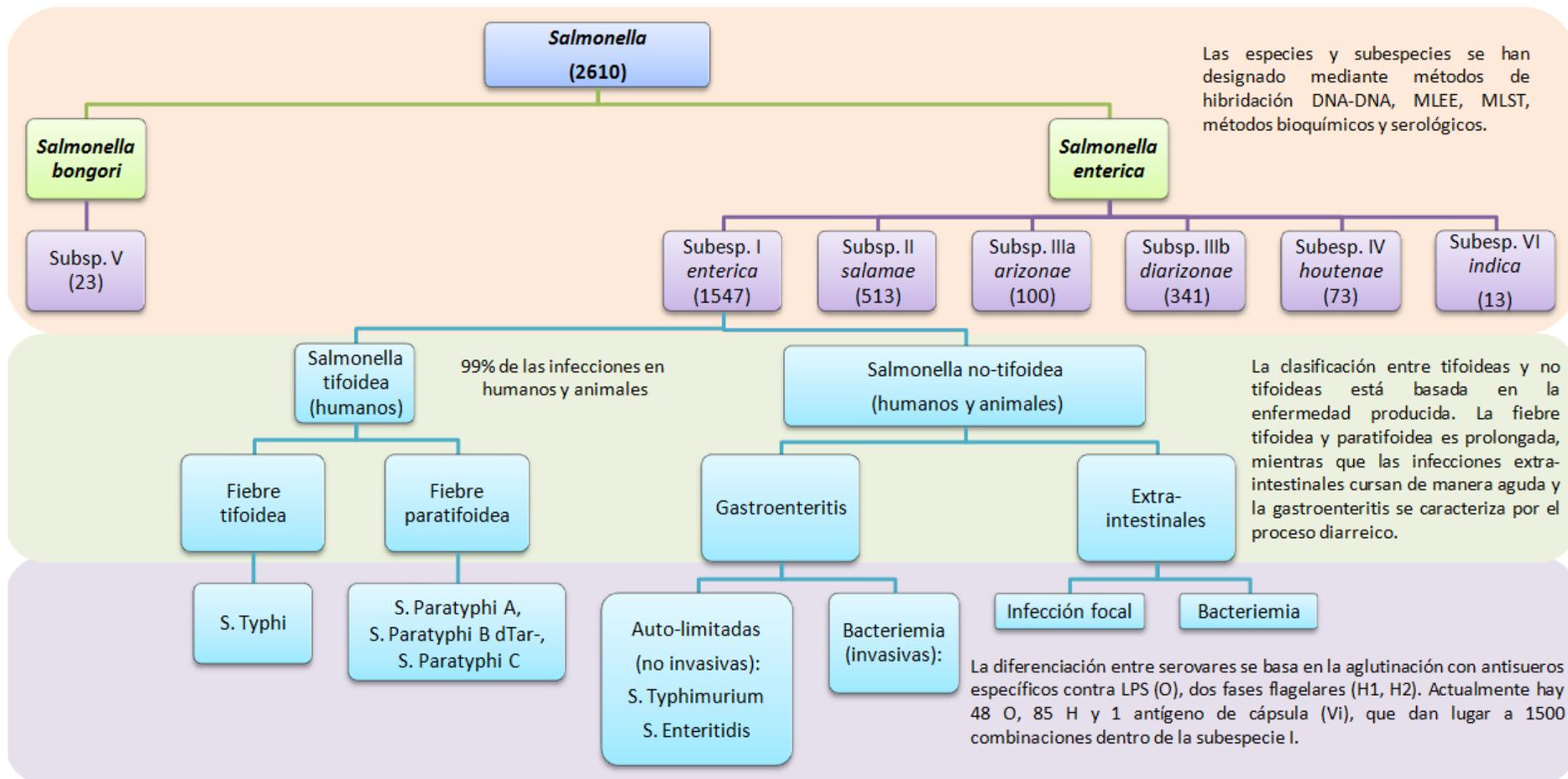


Figura 1.- Panorama general de la clasificación actual de *Salmonella enterica* (adaptación de Achtman *et al.*, 2012).

que tan solo presentan un tipo de antígeno H, son denominados monofásicos. En algunos casos uno de estos antígenos es preponderante, de manera que el segundo antígeno sólo se pone en evidencia sobre un cultivo de agar blando que contenga un antisuero contra la fase que se está expresando (método Sven Gard). El antígeno flagelar de primera fase se designa mediante letras minúsculas, y el de segunda fase, con números arábigos o letras, ambos separados por dos puntos. La ausencia de antígeno flagelar se representa por un guión (Tabla 1).

Por último, los antígenos capsulares o de superficie o antígenos K tienen naturaleza glucídica y se encuentran en aquellas cepas que poseen cápsula. En el caso de *Salmonella* se conoce como antígeno de virulencia o Vi y se encuentra en tres serotipos altamente invasivos: Typhi, Paratyphi C y Dublin. Es un factor determinante en la invasión, al evitar la destrucción de las bacterias en el interior de los fagocitos, y por tanto interfiere en la respuesta inmune del hospedador (Raffatellu *et al.*, 2006).

La mayoría de los serotipos aislados en el hombre y en los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *S. enterica enterica* y se suelen denominar según el lugar geográfico o especie animal donde se aislaron por primera vez. Para aquellas serotipo-variedades de otras especies menos frecuentes, se ha acordado una designación mediante el nombre de la especie seguido de la fórmula antigénica. La fórmula antigénica de todos los serotipos de *Salmonella* son definidos, condensados y actualizados por el “Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de París (Grimont & Weill, 2007). Los nuevos serotipos son incluidos en suplementos anuales del Esquema de Kauffmann-White.

Estos serotipos pueden a su vez dividirse en lo que se denominan fagotipos. La fagotipificación es muy utilizada para la tipificación de *Salmonella* y consiste en estudiar la sensibilidad o resistencia de las cepas a una serie de virus bacteriófagos seleccionados, capaces de infectar y lisar las bacterias. El sistema más elaborado es el descrito por Craigie y Yen en 1938 para *Salmonella* Typhi, pero se han desarrollado sistemas similares para los serotipos más comunes de *S. enterica*. Al igual que ocurre para el serotipado, es complejo mantener y utilizar una colección de fagos de manera adecuada es complejo, por lo que las fagotipias se suelen realizar solamente en los centros de referencia (Rabsch *et al.*, 2011).

Tabla 1.- Fórmula antigénica de algunos serogrupos y serotipos más comunes de *S. enterica* subespecie *enterica*.

Serogrupo Serotipo	Antígeno O	Antígeno H		
		Primera fase	Segunda fase	otros
<b>Grupo O:2 (A) (Antígenos 1, 2)</b>				
Paratyphi A	1,2,12	a	[1,5]	
<b>Grupo O:4 (B) (Antígeno 4)</b>				
Derby	1,4,[5],12	f,g	[1,2]	
Agona	1,4,[5],12	f,g,s	[1,2]	
Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2	
<b>Grupo O:7 (C1) (Antígeno 6)</b>				
Virchow	6,7,14	r	1,2	
Infantis	6,7,14	r	1,5	
Concord	6,7	l,v	1,2	
<b>Grupo O:8 (C2-C3) (Antígeno 6)</b>				
Hadar	6,8	z10	e,n,x	
Muenchen	6,8	d	1,2	[z67]
Lindenburg	6,8	i	1,2	
<b>Grupo O:9 (D1) (Antígeno 9)</b>				
Enteritidis	1,9,12	g,m	-	
Gallinarum	1,9,12	-	-	
Moscow	1,9,12	g,q	-	

Los antígenos entre corchetes [ ] pueden estar presentes o no y los subrayados dependen de la conversión lisogénica.

Aunque el serotipado y el fagotipado han sido tradicionalmente las técnicas de elección para clasificar y diferenciar aislados de *Salmonella* en base a sus características serológicas, las técnicas de biología molecular, basadas en la amplificación específica de fragmentos de DNA y su posterior secuenciación, se están planteando actualmente para la clasificación de aislados del género *Salmonella* y sobre todo, como una manera de estudiar el origen evolutivo de las mismas (Achtman *et al.*, 2012; Malorny *et al.*, 2011). Tanto el serotipado como el fagotipado conllevan muchos inconvenientes, incluyendo un alto coste económico y el requerimiento de personal especializado para poder analizar los resultados (Achtman *et al.*, 2012).

Entre las técnicas que se han propuesto se encuentran la técnica de Electroforesis en Campos Pulsado (PFGE), MultiLocus Variable number of tandem repeats Analysis (MLVA), MultiLocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) o MultiLocus Sequence Typing (MLST) (Malorny *et al.*, 2011). Aunque en este trabajo no se van a abordar algunas de ellas, conviene destacar que estudios recientes realizados por Achtman *et al.*, (2012), apuestan por el MLST, que es una técnica de tipado basada en el estudio de siete genes *housekeeping* de *Salmonella*, presentes en todo el género y que pueden amplificarse por PCR y posterior secuenciación. Esta técnica permite identificar agrupaciones de *S. enterica* genéticamente relacionadas, es muy accesible, puesto que existe una base de datos pública (<http://pubmlst.org/databases.shtml>). Además

los resultados obtenidos pueden compararse fácilmente a nivel inter-laboratorios. Los aislados que poseen alelos idénticos para todos los genes estudiados se asignan a una Secuencia Tipo (ST), y todas aquellas secuencias tipo que difieren en menos de dos alelos se clasifican dentro de un Complejo Clonal (CC). Con estos datos, se construyen diagramas gráficos eBurst (Figura 2).

Estudios realizados por varios autores (Achtman *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 2011; Lan *et al.*, 2009) demuestran una alta correlación entre el serotipo del aislado de *Salmonella* y la secuencia tipo (ST) al que pertenece. De esta forma, existe hoy en día una corriente que apuesta por el reemplazo del serotipado en pro de la técnica MLST cuando se trata de la rutina de laboratorio con fines epidemiológicos.

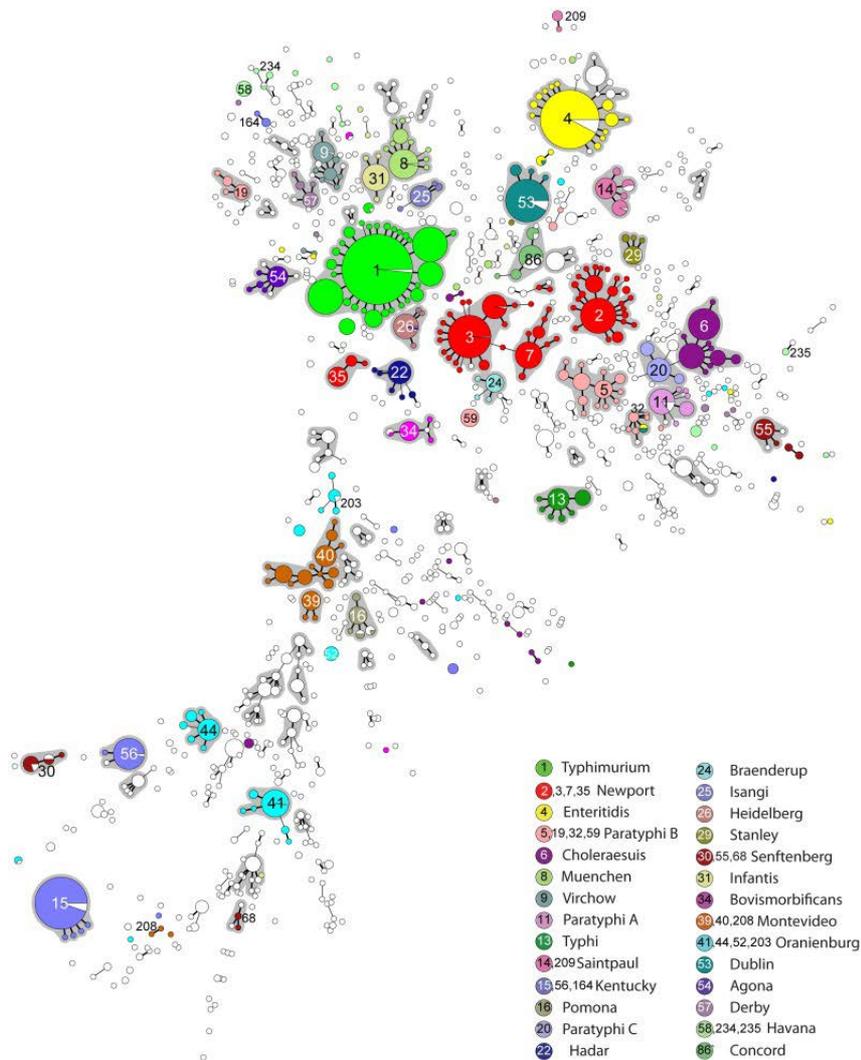


Figura 2.- Diagrama eBurst obtenido con los datos de MLST de *S. enterica* subsp. *enterica*. Cada círculo corresponde a uno de los 1095 STs, cuyo tamaño es proporcional al número de aislados y cada color se asocia con el serotipo de las cepas agrupadas en él (Achtman *et al.*, 2012).

### 1.3.- Cuadro clínico.

*Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo que dependiendo del serotipo y del hospedador puede presentar tres maneras de manifestarse: la bacteria puede ser eliminada del organismo gracias al sistema inmune del hospedador, puede mantenerse en el organismo dando lugar a un estado de portador asintomático; o bien, puede ocasionar distintos cuadros clínicos, como los siguientes:

3a.- Infección intestinal: Es la manifestación más común de la infección por serotipos no tifoideos de *S. enterica*, que se caracteriza por una inflamación intestinal aguda, que puede afectar al intestino delgado (enteritis) y/o grueso (enterocolitis) (Petska & Witt, 1985). El período de incubación tras la ingestión de alimentos o agua contaminada oscila entre 8 y 72 horas y se inicia con náuseas y vómitos, dolor abdominal y deposiciones diarreicas. A veces puede aparecer fiebre y cólicos abdominales. Se trata normalmente de una enfermedad autolimitada en adultos sanos, aunque en ocasiones necesita de tratamiento antibiótico.

3b.- Septicemia: Sobre todo asociada a pacientes inmunocomprometidos, *Salmonella* puede diseminarse por el organismo inicialmente por vía linfática y después por vía sanguínea. En este caso la infección puede llegar a afectar diversos órganos correspondientes al tracto urinario, vesícula biliar, hígado, huesos, etc. Según datos de la OMS, anualmente se registran millones de casos de salmonelosis no tifoideas, de las cuáles tan sólo unos miles acaban con la muerte del paciente, en aquellos países menos desarrollados.

3c.- Fiebre entérica: Está producida frecuentemente por los serotipos Typhi, responsable de la fiebre tifoidea y cuyo reservorio es el hombre, así como Paratyphi A, B y C (fiebres paratifoideas). La OMS estima que existen en el mundo unos 22 millones de casos al año y unas 200.000 muertes. La mayoría de este tipo de infecciones tiene lugar en países en vías de desarrollo, donde la enfermedad es endémica. En países como el nuestro, este tipo de enfermedad se asocia con personas que retornan de viajes a países que presentan este endemismo.

En general, el tratamiento antibiótico está desaconsejado para aquellas salmonelosis que provocan infección intestinal (Güerri, 2002; Humphries *et al.*, 2012), por el riesgo de fomentar la aparición de portadores crónicos. Sin embargo, en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas se puede necesitar el uso de distintos antibióticos como fluoroquinolonas (solo en adultos), amoxicilina-ácido clavulánico, tetraciclinas, cotrimoxazol, fosfomicina o cefalosporinas de 3ª ó 4ª generación (EFSA 2010).

Después por una infección por *Salmonella*, mayoritariamente cuando hablamos de infección intestinal, fiebre entérica o infección urinaria, la eliminación de la bacteria a través de las heces persiste durante tiempos variables, oscilando entre unas semanas hasta seis meses. En este caso se habla de portadores convalecientes.

También se pueden encontrar personas que son portadores crónicos asintomáticos, una forma de infección que puede deberse al contacto con dosis infectivas bajas de *Salmonella* o bien se observa en personas que, habiendo padecido la enfermedad, continúan eliminando la bacteria en períodos superiores a un año.

#### **1.4.- Epidemiología en la Unión Europea y en España.**

*Salmonella* spp., es por detrás de *Campylobacter* spp., el patógeno zoonótico más importante a nivel mundial, provocando millones de casos de gastroenteritis cada año, tanto en países en vías de desarrollo como en países industrializados. En el caso concreto de la Unión Europea (UE), se detectaron casi 100.000 casos de salmonelosis durante el año 2010, lo que implica 21,5 casos detectados por cada 100.000 personas. Es importante destacar que los casos de salmonelosis se encuentran en continuo descenso (8,8% en 2010 respecto al año anterior) debido fundamentalmente a las estrictas políticas de control de aves de corral, llevadas a cabo en la UE en los últimos años. Según los datos aportados desde los organismos europeos (EFSA y ECDC), estas medidas conllevan implícito un descenso en la presencia de *Salmonella* spp. tanto en aves como en los ovo-productos derivados, en tasas de un 20% (reportado en 2008) a un 2% (reportado en 2011), lo que sería la causa más directa en la disminución drástica de los casos de salmonelosis en humanos. Los datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO), extraídos de la página web <http://data.euro.who.int/hfad>, indican una disminución de los casos medios de salmonelosis por cada 100.000 habitantes en la zona europea, reflejando una disminución desde la media de 60,63 casos en 1995; 38,54 en el año 2000; 31,36 en 2005 a 21,75 casos en 2010. La tasa de mortalidad asociada a *Salmonella* spp. en humanos es de 0,13% en los países de la UE (ECDC, 2010; ECDC, 2012b).

Las tasas más altas de salmonelosis se dan entre los grupos de edad de 0-4 años (113 casos por cada 100.000 habitantes) y de 5-14 años (35 casos por cada 100.000 habitantes), aunque no se observan diferencias en cuanto al sexo de los pacientes. Se observan asimismo picos temporales de infección durante el verano y principios del otoño. Se estima que un 60% de las infecciones por salmonelosis son adquiridas en el ámbito doméstico, a través del consumo de alimentos contaminados. Asimismo, aproximadamente el 65% de estos casos

tiene relación con el consumo de ovo-productos, aunque otra importante fuente de salmonelosis son los productos de cerdo (28% de los casos), pavo (4.5%) y pollo (2.4%). Sin embargo, en algunos países nórdicos (Suecia, Finlandia y Dinamarca) la mayoría de los casos de enfermedad se asocia a una infección fuera del país de origen (ECDC 2010; ECDC 2012b; Pires *et al.*, 2011).

En cuanto a los serotipos implicados en las infecciones por *Salmonella* spp. los mayoritarios son Enteritidis (45%) y Typhimurium (22%), seguidos a una distancia importante por serotipos no tifoideos tales como Infantis, Newport, Kentucky o Virchow (Figura 3). Destaca la inclusión de *S. Typhimurium* variante monofásica 1,4,[5],12:i:- en el cuarto puesto de los serotipos más encontrados durante 2010 en la UE, no solo en el caso de infecciones en humanos, sino también detectado en cerdo, ganado vacuno y carne de cerdo y bovina, pero menos frecuentemente en aves de granja. En años anteriores este serotipo no se encontraba entre los 10 más comunes, pero esto confirma su rápida dispersión en un corto período de tiempo (desde 360 casos en 2007 a 1416 casos en 2009, informados por la EFSA), asociado a brotes alimentarios relacionados con carne de cerdo (ECDC 2010; ECDC 2012b; EFSA & BIOHAZ 2010).

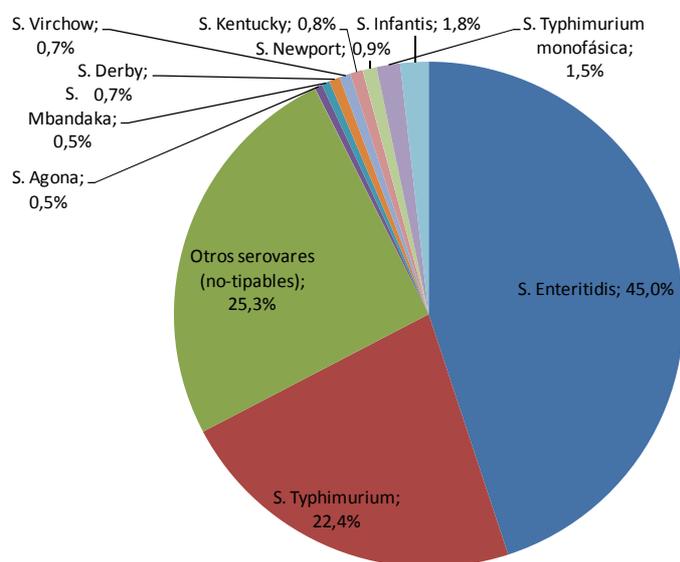


Figura 3.- Distribución de los diez serotipos más comunes encontrados en *Salmonella* en humanos. Datos del año 2010 (tomados de ECDC 2012b).

Es importante también destacar que estas tendencias son distintas en animales y productos derivados, así encontramos los serotipos Infantis (59% en aves), Saintpaul y Newport (14% en carne de pavo), Typhimurium y Derby (31 y 16%, respectivamente, en carne de cerdo) o Dublin (44%, carne de vacuno) (ECDC 2012b).

Atendiendo a los datos nacionales, proporcionados por el Instituto de Salud Carlos III, los casos de *Salmonella* han disminuido ligeramente desde el año 2003 en nuestro país, donde se observó un pico de más de 8.000 casos de salmonelosis detectadas, hasta llegar a los valores de hoy en día, 4.419 casos en el año 2010; mientras que *Campylobacter* se mantiene por encima de *Salmonella* con 6.177 casos anuales. Se observa una disminución drástica de la prevalencia del serotipo Enteritidis, llegando a un máximo de 4.800 casos en 2003 y decreciendo hasta 1.329 casos en la actualidad. El serotipo Typhimurium ha aumentado significativamente desde 665 casos en el año 2000 hasta los 1.279 casos recogidos en el año 2010. Este hecho, en concordancia con los datos europeos, pueden mostrar la efectividad de las medidas llevadas a cabo por los entonces Ministerios de Sanidad y Consumo, y de Agricultura, Pesca y Alimentación, que a partir de 2004 llevaron a cabo conjuntamente un programa de control de *Salmonella* en huevos y ovoproductos. La efectividad de estas medidas parece recaer sobre la disminución del serotipo Enteritidis, comúnmente asociado a ese tipo de productos, mientras que su efectividad no es tan clara para el serotipo Typhimurium. Dentro de los serotipos más frecuentes también se encuentran Infantis y Newport (ISCIII 2009; ISCIII 2011)

En cuanto a la distribución estacional, al igual que ocurre a nivel europeo, los casos de salmonelosis se concentran en los meses de verano, no afectan de manera desigual a hombres y a mujeres, y también se observa una gran prevalencia de casos en las franjas de edad 1-4 años (36% de los aislamientos) y de 15-44 años (45%). El 98% de los casos fueron diagnosticados por aislamiento en heces, y el 1,5% en sangre, siendo los porcentajes similares tanto para *S. Enteritidis* como para *S. Typhimurium*. Sin embargo, atendiendo a las franjas de edad, se observa que al aumentar la edad, aumenta el número de aislamientos en sangre. Este dato podría reflejar el mayor esfuerzo que se realiza ante un niño de corta edad en el diagnóstico microbiológico de una gastroenteritis, en relación al llevado a cabo en adultos (ISCIII 2009).

Aunque los resultados de los estudios tanto europeos como nacionales indican la efectividad de las medidas de control de *Salmonella*, este patógeno continúa siendo una de las causas principales de enfermedades gastrointestinales de transmisión alimentaria, además

de observarse que no todos los serotipos responden igual que *S. Enteritidis* ante las medidas de control. Es necesaria una continua vigilancia y estudio de los diferentes serotipos de *Salmonella*, así como la búsqueda de nuevas estrategias que permitan un mejor control de estas infecciones.

## 2.-VIRULENCIA EN SALMONELLA.

La estrategia patogénica de *S. enterica* es muy compleja e incluye la penetración de la barrera intestinal y la interacción con las células del sistema inmune donde actúa como patógeno intracelular. Como introducción para entender los factores de virulencia de *Salmonella*, se describirá brevemente el mecanismo de patogénesis que sigue esta bacteria.

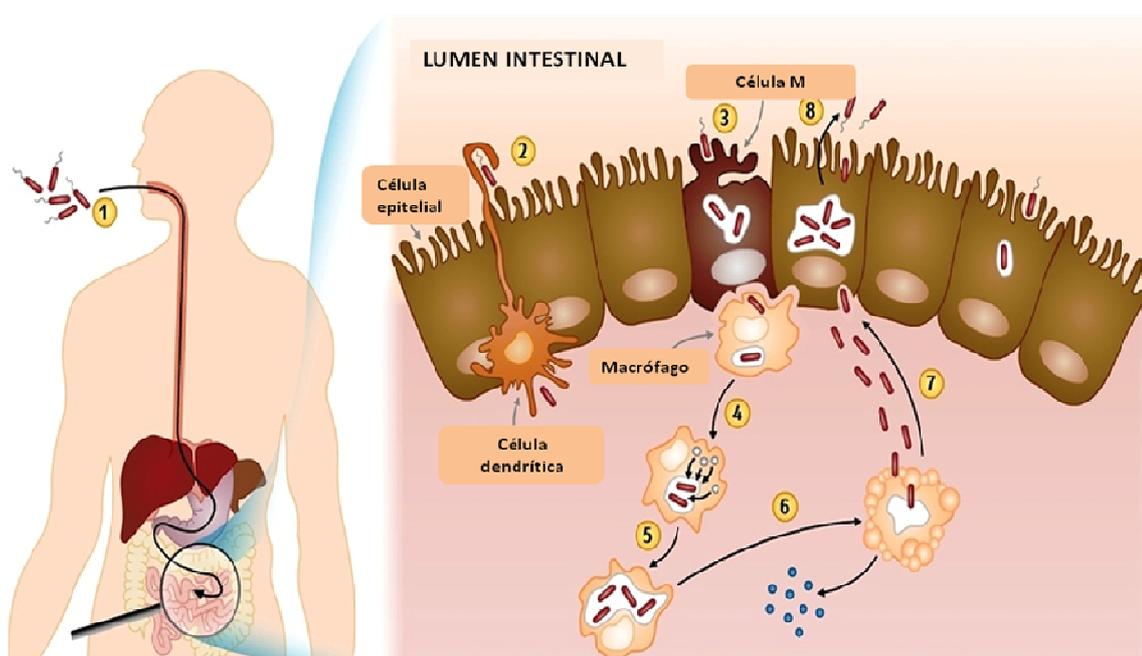


Figura 4.- Mecanismo de invasión de *Salmonella* (adaptación de la imagen proporcionada en <http://eng.sheba.co.il>).

Tras la ingestión de *Salmonella*, cuya dosis infectiva mínima es  $10^5$ - $10^6$ , las bacterias alcanzan el estómago donde se a los jugos gástricos y a un pH muy ácido. Aquellas bacterias capaces de sobrevivir a estas condiciones, así como a los mecanismos defensivos propios de nuestro organismo pueden llegar a colonizar el íleon y/o colon e invadir el epitelio (Figura 4). Esta invasión puede ser pasiva (facilitada por células dendríticas que emiten pseudópodos) o bien activa (unión a receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora, seguida de una internalización tanto en los enterocitos como en células M, ambas capaces de absorber antígenos presentes en el lumen). La invasión activa requiere que *Salmonella* inyecte

sobre la célula hospedadora unas proteínas efectoras, utilizando un sistema de secreción de tipo III (STT3) codificado en la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* de tipo I (SPI-1) (Ly & Casanova, 2007; McGhie *et al.*, 2009; Schlumberger & Hardt, 2006).

Una vez en el interior celular, *Salmonella* es capturada por células fagocíticas, tales como macrófagos que transportan a la bacteria hacia el sistema linfático y pueden facilitar su dispersión hacia el hígado, bazo o nódulos linfáticos. La persistencia de la bacteria en el interior de este tipo de células se debe a que *Salmonella* es capaz de crear una vacuola, conocida como “Vacuola de Contención de Salmonella” (SCV) que permite su supervivencia y replicación en el interior de los macrófagos. Esta etapa requiere la expresión de otro sistema de secreción de tipo III, codificado en la Isla de Patogenicidad de tipo 2 (SPI-2), y que permite la secreción de efectores de virulencia desde la vacuola al citoplasma celular del hospedador (Figura 4). Aunque se sabe que *Salmonella* puede provocar en este estadio una segregación de citoquinas que median en la inflamación epitelial (provocando el fenómeno de diarreas) e incluso una apoptosis de las células que las contienen, hasta el momento no quedan claros los mecanismos por los cuales la bacteria abandona la célula huésped y continúa infectando a otras células (Ly & Casanova, 2007; McGhie *et al.*, 2009; Schlumberger & Hardt, 2006).

Tal y como se ha descrito, el mecanismo de invasión de *Salmonella* es complejo y requiere de un gran número de factores de virulencia, entre los que destacan dos grupos generales: las estructuras superficiales de la bacteria y los genes de virulencia, localizados tanto en plásmido como en cromosoma.

### **2.1.- Estructuras de superficie. Fimbrias.**

Las estructuras superficiales de la bacteria son consideradas, además de factores de virulencia, dianas del sistema inmune del hospedador. En estas estructuras de superficie se incluyen el lipopolisacárido (LPS), formado por el antígeno O y el lípido A, este último con actividad tóxica; los flagelos, encargados de dirigir a la bacteria a través del epitelio intestinal; la cápsula, relacionada con la invasión en el serotipo Typhi y las fimbrias. Algunos de estos elementos ya han sido comentados en el apartado de serotipado, puesto que son utilizados como dianas antigénicas para el tipado de *Salmonella*. Por tanto, centraremos este apartado en las fimbrias como elemento de virulencia.

Las fimbrias o “pili” son estructuras proteicas de superficie consideradas como adhesinas, ya que facilitan la unión de la bacteria a receptores específicos del hospedador durante la primera etapa de la invasión. En *Salmonella* se han identificado más de 13 loci, la

mayoría de los cuales son inducidos *in vivo* y se requieren tanto para la formación de biofilms como para el ataque a células huésped y la colonización, pero no para la supervivencia en el interior celular (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009; van Asten & van Dijk, 2005). Destacan las fimbrias de tipo 1 o Fim (operón *fimAICDHF*), las denominadas “long polar fimbriae” o Lpf (operón *lpfABCDE*), “thin aggregative fimbriae” (Tafi) (operones *agfDEFG* y *agfBAC*) y las fimbrias asociadas a plásmidos (operón *pefABCDI*). Estos tipos de fimbrias no están presentes en todos los serotipos de *Salmonella*, sino que algunas de ellas, como las *lpf* se encuentran en *S. Typhimurium* pero no han sido descritas en serotipos relacionados ni en otro tipo de enterobacterias. Sin embargo, las fimbrias de tipo *fim* son estructuralmente similares, pero antigénicamente distintas a las fimbrias de tipo 1 encontradas en *E. coli* (Darwin & Miller, 1999; van Asten & van Dijk, 2005). Además, cabe destacar la gran variabilidad proteica y la diversificación en cuanto a estructura y composición que se ha observado entre los distintos tipos de fimbrias, que permiten a *Salmonella* evadir de manera más fácil las defensas del hospedador (Yue *et al.*, 2012).

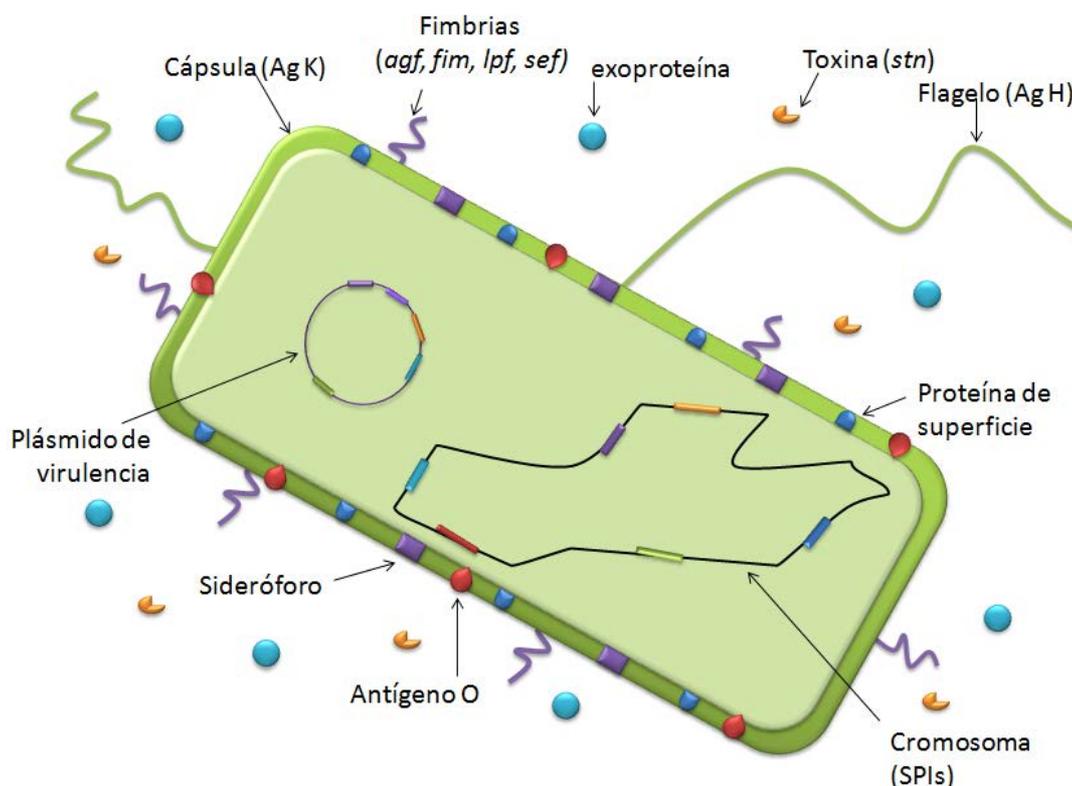


Figura 5.- Factores de virulencia representativos de *S. enterica* (adaptado de Madigan *et al.*, 1998).

## 2.2.- Islas de patogenicidad.

La mayoría de los genes de virulencia de *Salmonella* se encuentran agrupados en regiones distribuidas a lo largo del cromosoma denominadas “Islas de Patogenicidad” o SPI. Se cree que estas agrupaciones de genes han sido adquiridas en *Salmonella* a partir de otras especies bacterianas mediante transferencia horizontal, debido a que su bajo contenido en GC (37-47%), que difiere significativamente con el resto del contenido genómico de *Salmonella*, a que se encuentran flanqueadas por genes que codifican RNAt y además están asociadas a elementos genéticos móviles, lo que habría provocado un incremento en la patogenicidad de esta bacteria a lo largo de la evolución (Hensel, 2004; Marcus *et al.*, 2000; van Asten & van Dijk, 2005).

Las islas de patogenicidad tienen una estructura general (Figura 6) donde encontramos que están flanqueada por repeticiones directas (DR), insertadas en genes que codifican RNAt. Pueden albergar elementos genéticos móviles como IS (completas o defectivas) y contienen genes de virulencia ( $V_1$ - $V_4$ ) y de movilidad (*intI*). Además, se caracterizan por estar presentes en el genoma de bacterias patógenas, estando ausentes en los genomas de aquellas no patógenas, ocupar regiones grandes (10-200 kb), diferir en el % GC respecto del cromosoma bacteriano, presentar inestabilidad genética cuando están presentes elementos de movilización y por ser estructuras mosaico compuestas a través de fenómenos de adquisición consecutiva (Schmidt & Hensel, 2004).



Figura 6.- Características generales de una isla de patogenicidad (Schmidt & Hensel, 2004).

Hasta la fecha se han descrito 12 islas de patogenicidad en *Salmonella*, algunas de las cuales están presentes en todo el género *Salmonella*, mientras que otras tan solo se han detectado en algunos serotipos (Hensel, 2004). A continuación se detallan algunas de ellas, fundamentalmente las estudiadas en esta tesis.

**Isla de patogenicidad de tipo 1 (SPI-1):** se trata de una inserción de 40 kb en el cromosoma bacteriano, con un contenido GC inferior (47%) al esperado para el genoma de *Salmonella* (52%) y no se encuentra asociada con un gen RNAt. Esta isla es imprescindible en

la invasión de las células epiteliales. Codifica un sistema de secreción de tipo 3 (SST3) que media en el transporte al interior de la célula intestinal de proteínas efectoras (SopE, SopE2, SopA, SopB, SopD, etc.), no todas codificadas por ella misma. Algunas de estas proteínas actúan a nivel de la reorganización del citoesqueleto de actina de la célula eucariota, facilitando la macropinocitosis; otras en la activación de cascadas inmunológicas que desembocan en procesos inflamatorios y en los síntomas diarreicos que se observan. Está presente en *S. bongori* y en todas las subespecies y serotipos analizados de *S. enterica*, por lo que se cree que fue adquirida en un proceso temprano de la evolución de *Salmonella* (Hensel, 2004; Schmidt & Hensel, 2004).

**Isla de patogenicidad de tipo 2 (SPI-2):** esta isla, de un tamaño también de 40 kb, se encuentra insertada adyacente al gen *ValV*, que codifica el RNAt<sup>Val</sup>, está compuesta por dos fragmentos que fueron adquiridos independientemente. El primero de ellos, de 25 kb (43% GC) solo se encuentra en *S. enterica* y codifica un sistema de secreción de tipo 3 que se activa cuando la bacteria está en el interior de la célula hospedadora, traslocando proteínas efectoras a través de la membrana de la vacuola que la contiene. Esta región presenta cuatro operones diferentes (*ssa*, *ssr*, *ssc* y *ssr*) encargados de codificar proteínas esenciales para el sistema de secreción. La segunda región, de 15 kb y contenido GC del 54%, aporta genes que no son necesarios para la función del SST3. La función de esta isla es la supervivencia de la bacteria en el interior de células epiteliales y macrófagos, por lo que es indispensable para causar infecciones sistémicas y permitir la multiplicación de la bacteria en el órgano hospedador (Hensel, 2004; Marcus *et al.*, 2000; Schmidt & Hensel, 2004).

**Isla de patogenicidad de tipo 3 (SPI-3):** es una inserción de 17 kb en el locus *seIC*, que codifica el RNAt<sup>SeI</sup>, específico para selenocisteína y con un contenido GC del 47.5%. Esta isla, distribuida en las especies *S. bongori* y *S. enterica*, muestra que el operón *mgtCB*, un sistema de alta afinidad por el ión Mg<sup>2+</sup>, es el más importante en ella. Este operón permite a la bacteria adaptarse a las limitaciones nutricionales del hábitat intracelular. Se han observado variaciones estructurales en la zona adyacente a *seIC*, donde se han encontrado tanto inserciones como deleciones, sugiriendo éste como un punto caliente de integración de DNA exógeno (Hensel, 2004; Marcus *et al.*, 2000).

**Isla de patogenicidad de tipo 4 (SPI-4):** su tamaño es de 25 kb, está franqueada por el gen *ssb*, codificante de una proteína de unión a DNA de cadena sencilla y *soxSR*, gen regulador frente a superóxido. Se trata de una estructura mosaico, formada a partir de múltiples procesos de captación de DNA exógeno, aunque su función en virulencia no está del todo

dilucidada. Se cree que puede portar un sistema de secreción de tipo 1 (SST1) implicado en la liberación de toxinas (Hensel, 2004; Marcus *et al.*, 2000).

**Isla de patogenicidad de tipo 5 (SPI-5):** es un locus de pequeño tamaño (7,6 kb) insertado próximo al gen *serT* del RNAt<sup>Ser</sup>, específico para serina. Esta isla codifica algunas proteínas efectoras como SopB, PipA, PipB o PipC, que son traslocadas a través de los sistemas de secreción SPI-1-SST3 y SPI-2-SST-3. La región correspondiente a los genes *sopB* y *pipC* se encuentra altamente conservada y presente tanto en *S. bongori* como en *S. enterica*; sin embargo, la región *pipAB*, está ausente tanto en *S. bongori* como en *S. enterica* subesp. *salamae*. Ambas regiones pudieron adquirirse de manera independiente (Hensel, 2004; Schmidt & Hensel, 2004).

**Otras islas de patogenicidad:** La presencia de otras islas de este tipo, como SPI6-SPI10 han sido inferidas a partir del análisis genómico de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, donde se encuentran loci con características compatibles con la presencia de islas de patogenicidad, pero cuya función todavía no ha sido descubierta (Hensel, 2004; Schmidt & Hensel, 2004). Por otra parte, destaca la presencia de la isla mayor de patogenicidad (MPI o SPI-7), específica para los serotipos *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y *S. Dublin*, con un tamaño de 147 kb. Entre sus funciones se encuentra la síntesis del polisacárido capsular Vi de *S. Typhi*; el gen *sopE*, que proviene de fagos y codifica una proteína efectora de la SPI-1; una agrupación de genes que codifican un pili que media en la invasión de células epiteliales en *S. Typhi* y varios genes asociados a la movilidad del DNA (Schmidt & Hensel, 2004).

Como se puede observar, la mayoría de las islas de patogenicidad se encuentran muy conservadas en el género *Salmonella* y parecen haber sido adquiridas mediante procesos de transferencia horizontal, seguidos de reorganizaciones en la estructura. Junto con la presencia de plásmidos que codifican factores de virulencia, estos procesos de transferencia horizontal suponen un mecanismo de dispersión de factores no solo de resistencia, como veremos más adelante, sino también de virulencia.

### 2.3.- Islotes de patogenicidad y genes sueltos.

No todos los genes de virulencia que necesita *Salmonella* se encuentran agrupados en islas de patogenicidad, sino que existe una amplia variedad de éstos que se encuentran en pequeños loci denominados islotes. Su contenido GC, al igual que el de las islas de patogenicidad, también es menor, por lo que se cree que también fueron adquiridos a través de procesos de transferencia horizontal. Entre estos islotes se encuentran por ejemplo los

genes *sifA* (multiplicación en macrófagos), *pagC* y *msgA* (supervivencia en fagosomas) y algunos genes de fimbrias (Groisman, 1998). Otros genes como *stn* y *ast* (toxinas), *iroB* (sideróforos encargado de captación de hierro), *sodC1* (resistencia al estrés oxidativo), *phoP/Q* o *slyA* (reguladores transcripcionales de genes de virulencia) se encuentran localizados en el cromosoma y se encuentran detallados en el apartado de Material y Métodos, puesto que han sido objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

#### 2.4.- Plásmidos de virulencia.

Los plásmidos de virulencia son otra de las estructuras en las cuales podemos encontrar genes codificantes de proteínas involucradas en el proceso infeccioso de *Salmonella*. Hasta el momento se han encontrado en siete serotipos, todos ellos pertenecientes a *S. enterica* subesp. *enterica*. Suelen encontrarse en bajo número de copias y su tamaño es variable. Los serotipos encontrados, así como la denominación del plásmido y su tamaño son los siguientes: *S. Abortus-ovis* (pSAV, 66 kb), *S. Choleraesuis* (pSCV, 50 kb), *S. Dublin* (pSDV, 80 kb), *S. Enteritidis* (pSEV, 60 kb), *S. Gallinarum* (pSGV, 86 kb), *S. Pullorum* (pSPV, 86 kb) y *S. Typhimurium* (pSTV o pSLT, 94 kb) (Rychlik *et al.*, 2006; van Asten & van Dijk, 2005)].

Aunque el contenido genético es variable, existen regiones más o menos comunes entre todos los tipos de plásmidos (Marcus *et al.*, 2000; Rychlik *et al.*, 2006; van Asten & van Dijk, 2005).

**Locus *spvRABCD*** (*Salmonella* plasmid *virulence*). Es un operón de 8kb, altamente conservado y constituido por cinco genes que se especula están relacionados con la multiplicación intracelular de *Salmonella*.

**Locus *pefBACDI***. Este operón, que no está presente en los serotipos Dublin y Gallinarum, codifica fimbrias que median la adhesión de *Salmonella* a distintos tipos de células epiteliales. Su expresión está inducida por los genes *lpf*, de codificación cromosómica.

**Genes *rck* y *rsk***. Genes que median en la resistencia a la actividad lítica del suero.

**Gen *mig-5***. Se localiza en plásmidos de virulencia de los serotipos Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Gallinarum y Typhimurium. Su expresión se activa cuando *Salmonella* es ingerida por macrófagos, codificando una anhidrasa carbónica que cataliza la hidratación del dióxido de carbono para dar lugar al ión bicarbonato, aunque por ahora, no se sabe exactamente la función de este mecanismo.

**Genes *traT*.** Estos genes, que median en la capacidad de transferirse un plásmido por mecanismos de movilización horizontal, no se encuentran presentes en los serotipos Enteritidis, Dublin y Choleraesuis.

Tal y como expone Rychlik *et al.* (2006), puede existir un ancestro común a estos plásmidos que portaría *spvRABCD* y *mig-5* y sería conjugativo (genes *traT*). Por esta vía entraría en *Salmonella*, habría sufrido procesos de fusión con otros plásmidos y pérdida parcial de contenido para dar lugar a los plásmidos de virulencia que conocemos hoy en día.

Sin embargo, esta no es la única variación que se encuentra en los plásmidos de virulencia, ya que en los últimos años se han detectado plásmidos denominados “híbridos” que albergan tanto genes de virulencia como genes relacionados con la resistencia a los antibióticos (Guerra *et al.*, 2002; Herrero *et al.*, 2009; Mendoza *et al.*, 2009; Rodicio *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011) y que suponen un grave problema en la diseminación conjunta de este tipo de factores.

### **3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.**

#### **3.1- El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos.**

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y su producción industrial en la década de 1940, revolucionó la medicina de principios del siglo XX, dando lugar a un sentimiento de esperanza para la curación de muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, el panorama al que nos enfrentamos hoy en día es bien distinto.

Los antibióticos son sustancias naturales producidas por microorganismos como un mecanismo de defensa frente a otros, en su afán de competir por la supervivencia. Además, se piensa que podrían actuar como señales en la comunicación intercelular entre las bacterias (Martínez *et al.*, 2009; Yim *et al.*, 2007). Estos compuestos, inicialmente descubiertos en bacterias del medio ambiente, han sido modificados por síntesis química para dar lugar a compuestos análogos, denominados agentes antimicrobianos<sup>1</sup>, con notables mejoras en su

---

<sup>1</sup> A lo largo de la tesis doctoral nos referiremos al término “antibiótico” como aquella sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de microorganismos patógenos (acción bacteriostática) o causar la muerte de los mismos (acción bactericida); según la definición aportada por el diccionario RAE (22ª Edición, 2001).

actividad y reducción en su toxicidad. Todos ellos han sido ampliamente utilizados tanto en medicina como en veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos. Además, durante mucho tiempo, se utilizaron los antibióticos como promotores del crecimiento en animales, pollos y cerdos fundamentalmente. Actualmente la legislación europea ha prohibido su uso con este fin; sin embargo en países como Estados Unidos, este uso sigue vigente (Buckley, 2009; Errecalde, 2004; Torres *et al.*, 2010).

El fenómeno de la resistencia bacteriana frente a los antibióticos es un ejemplo de evolución constante, en el cual las bacterias han desarrollado mecanismos para evadir la actividad de estos compuestos (Baquero *et al.*, 2009; Nugent *et al.*, 2010). Las bacterias pueden adquirir los genes de resistencia a antibióticos por mecanismos de transferencia horizontal (Buckley, 2009; Martínez *et al.*, 2009; Partridge, 2011). La fuerte presión ejercida por el uso masivo de antibióticos tanto en humanos como en animales ha podido ser el factor determinante en el desarrollo de las altas tasas de resistencia que actualmente observamos en un gran número de bacterias, entre las que podemos destacar el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Streptococcus pneumoniae* o bacterias Gram-negativas productoras de beta-lactamasas de amplio espectro y carbapenemasas como ejemplos de graves problemas en el tratamiento de infecciones de gran importancia clínica (Sun *et al.*, 2012; Theuretzbacher, 2011).

El problema de la resistencia a los antibióticos es un problema mundial que preocupa a diferentes organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), el Centro para la Vigilancia y el Control de las Enfermedades (CDC), la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), etc. Desde estos organismos se llevan a cabo medidas educativas dirigidas al público y a los profesionales de la salud para reducir el uso inapropiado de antibióticos, fomentar el desarrollo de nuevos antibióticos, vigilar activamente la evolución de las tasas de resistencia, recoger datos sobre el consumo de antibióticos y fomentar la investigación coordinada de estas resistencias (Baquero & Garau, 2010; Campos *et al.*, 2010).

### **3.2.- Bacterias Gram-negativas. Bases bioquímicas de la resistencia a los antibióticos.**

Los antibióticos deben entrar en contacto con la bacteria para poder ejercer su acción tóxica. Para poder comprender los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias frente a los antibióticos es inevitable revisar en primer lugar su mecanismo de acción.

**Mecanismo de acción de los antibióticos.** Hoy en día existen numerosas familias de antibióticos que pueden clasificarse según su mecanismo de acción sobre la bacteria. Estos mecanismos, representados en la Figura 7 (1-6), pueden esquematizarse de la siguiente forma (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; van Hoek *et al.*, 2011):

- Aquellos que afectan a la síntesis de la pared celular; bien inhibiendo su síntesis (fosfomicina, cicloserina), afectando al transporte de sus precursores (bacitracina, mureidomicinas) o que afectan a su organización estructural (beta-lactámicos, glucopéptidos).
- Afectan a la membrana citoplasmática (poliximinas y daptomicina).
- Bloqueo de vías metabólicas esenciales de la bacteria, sobre todo las que se encargan de la obtención de elementos esenciales como los aminoácidos o las bases púricas y pirimidínicas de los nucleótidos, a través de la síntesis de folatos (sulfamidas, trimetoprim).
- Afectan directamente al DNA, tanto en su metabolismo como en su estructura, en los procesos de replicación y transcripción. En este grupo están las rifamicinas y quinolonas, que actúan indirectamente sobre estos procesos, y los nitromidazoles y nitrofuranos, que actúan directamente sobre el DNA dañándolo.
- Afectan a la síntesis proteica en sus diferentes fases de activación (mupirocina), inicio (oxazolidinonas, aminoglucósidos), fijación del RNAt (tetraciclinas, glicilciclinas) o la fase de elongación (lincosamidas, macrólidos, cetólidos, estreptograminas o ácido fusídico).

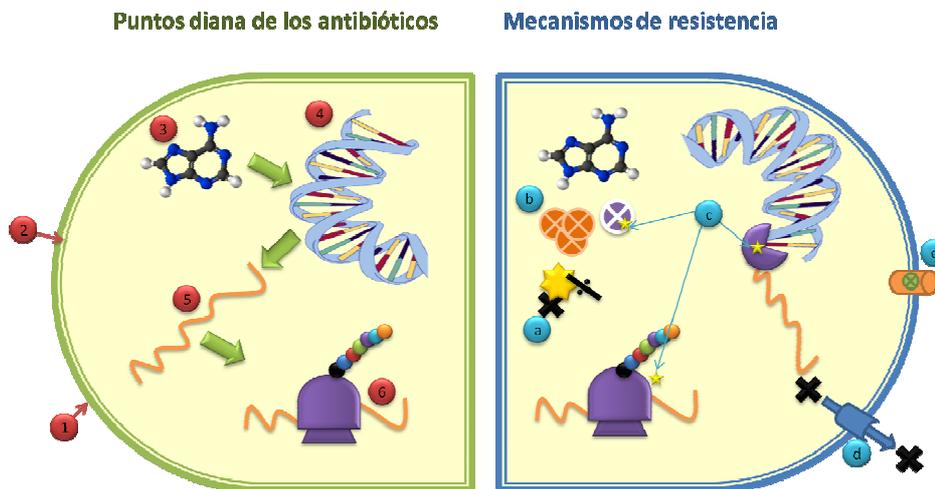


Figura 7.- Puntos diana de los antibióticos (1-6) y mecanismos de resistencia (a-e). Puntos diana de acción: (1) síntesis de la pared celular; (2) membrana citoplasmática; (3) metabolismo esencial de la bacteria; (4) replicación del DNA; (5) transcripción; (6) traducción. Mecanismos de resistencia: (a) enzimas inactivadoras/modificantes de antibiótico; (b) superproducción de la diana; (c) modificación de la diana celular; (d) expulsión activa del antibiótico; (e) alteración de la permeabilidad (porinas).

**Mecanismos de resistencia frente a los antibióticos.** Frente a estos mecanismos de acción, las bacterias han desarrollado sus propios mecanismos de defensa que quedan esquematizados en la Figura 7 (a-e) (Michael *et al.*, 2006; van Hoek *et al.*, 2011).

- Presencia de enzimas específicas que modifican o inactivan el antibiótico.
- Superproducción de la diana de acción del antibiótico.
- Modificación de la diana celular o síntesis de una diana alternativa.
- Expulsión del antibiótico al exterior celular mediante bombas de expulsión activa.
- Alteración de la permeabilidad de membrana por pérdida de funcionalidad de porinas, lo que restringe el acceso del antibiótico a la diana bacteriana.

Estos mecanismos de resistencia pueden alcanzarse bien por mutaciones cromosómicas en el DNA bacteriano, que alteran proteínas ya existentes y funcionales; o bien como resultado de una transferencia o adquisición de nuevo material genético entre las bacterias de la misma especie o distintas. Además, estos mecanismos no tienen por qué darse de forma aislada, sino que dos o más pueden interactuar para determinar el nivel final de resistencia a antibióticos de un microorganismo (Michael *et al.*, 2006).

En el caso de *S. enterica*, nuestro objeto de estudio, los mecanismos de resistencia que más nos interesan son aquellos que afectan a antibióticos de interés en el tratamiento de infecciones por este microorganismo, o bien aquellos que tienen un interés epidemiológico. En este sentido, nos centraremos en los mecanismos de resistencia a beta-lactámicos, aminoglucósidos, fenicoles/cloranfenicol, quinolonas/fluoroquinolonas, tetraciclinas, trimetoprim y sulfamidas.

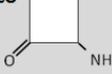
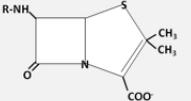
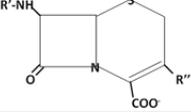
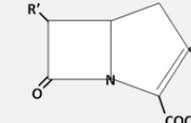
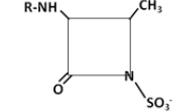
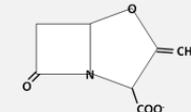
### **3.3.- Mecanismos de resistencia a beta-lactámicos.**

#### ***Estructura química y clasificación de los antibióticos beta-lactámicos.***

Los antibióticos beta-lactámicos, cuyo primer representante, la penicilina fue descubierta en 1929 por Alexander Fleming, constituyen uno de los grupos de antibióticos más prescritos, tanto en atención primaria como en hospitales. La presencia del anillo beta-lactámico define químicamente a esta familia de compuestos, que se caracterizan por presentar una baja toxicidad (actúan sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula animal), y su principal mecanismo de resistencia son la acción de las beta-lactamasas. Dentro de la familia de los beta-lactámicos existen distintos grupos (Tabla 2): penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las beta-lactamasas. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química modifican

las características de éste, tales como el espectro, afinidad o resistencia a beta-lactamasas (Marín & Gudiol, 2003; Suárez & Gudiol, 2009). Ejemplo de ello son las cefalosporinas, que pueden clasificarse en cuatro grupos o “generaciones”. Cada nueva generación de cefalosporinas tiene más potencia frente a bacterias Gram-negativas, perdiendo actividad frente a las bacterias Gram-positivas.

Tabla 2.- Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos (Suárez & Gudiol, 2009).

Anillo beta-lactámico	+ Anillo secundario	= núcleo del beta-lactámico	⇒ grupo antibiótico
			
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	<b>PENICILINAS</b> Bencilpenicilina, penicilina V, cloxacilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina.
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7-α-cefalosporínico	<b>CEFALOSPORINAS</b> Cefazolina, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, cefotetán, cefotaxima, ceftazidima, cefepime.
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	<b>CARBAPENÉMICOS</b> Imipenem, meropenem, doripenem.
	Ninguno	Monobactamo	<b>MONOBACTÁMICOS</b> aztreonam
	Anillo oxazolidínico	Clavamo/oxapenamo	<b>ACIDO CLAVULÁNICO</b>

Este tipo de antibióticos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen un efecto autolítico. La pared de las bacterias Gram-negativas, que posee una envuelta externa, está formada por una delgada capa de péptidoglicano. Éste está constituido por largas cadenas paralelas de oligosacáridos que alternan residuos de ácido N-acetilglucosamina (NAG) con residuos de ácido N-acetilmurámico (NAM). Cada unidad de NAM se encuentra unida a una cadena lateral de un tetrapéptido constituido por L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y lisina o ácido diaminopimélico (Figura 8). Las cadenas paralelas de oligosacáridos se encuentran unidas transversalmente por cadenas polipeptídicas cortas diferentes según la especie (Kong *et al.*, 2010; Suárez & Gudiol, 2009).

**Mecanismo de acción de los beta-lactámicos.**

Los antibióticos de tipo beta-lactámico bloquean la fase final de la síntesis del péptidoglicano al inhibir, en mayor o menor grado, las enzimas que participan en la formación

de esta estructura, las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, Penicillin Binding Proteins). Las PBP con actividad transpeptidasa son la diana preferente de los antibióticos beta-lactámicos, que interfieren en esta reacción de transpeptidación, durante la última etapa de la síntesis de la pared celular, de modo que la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Su actividad se debe a la similitud estereoquímica con la terminación D-alanil-D-alanina del pentapéptido. Para que el antibiótico pueda actuar es necesario que la bacteria se halle en fase de crecimiento celular, ya que es cuando se sintetiza la pared celular (Kong *et al.*, 2010; Suárez & Gudíol, 2009)

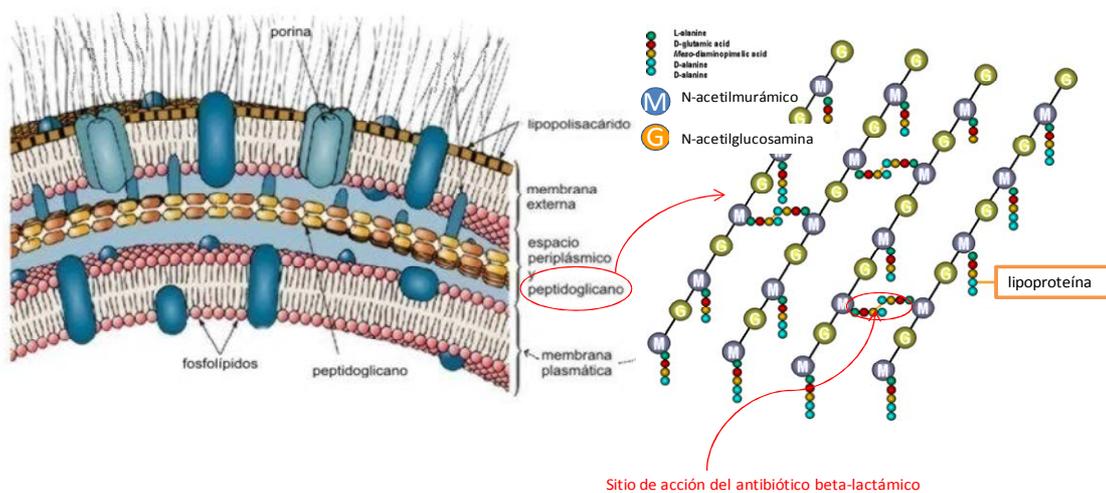


Figura 8.- Estructura del peptidoglicano y sitio de acción del antibiótico beta-lactámico.

Los beta-lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. Las cepas que carecen de ésta son denominadas cepas tolerantes a los beta-lactámicos, puesto que inhiben su crecimiento en presencia del antibiótico pero no se destruyen completamente (Kong *et al.*, 2010; Suárez & Gudíol, 2009).

### **Resistencia a beta-lactámicos.**

La resistencia a antibióticos beta-lactámicos puede ser debida a distintos mecanismos, como son la reducción de la permeabilidad de membrana, los mecanismos de expulsión activa del antibiótico, la modificación de las dianas (proteínas PBP) o la inactivación enzimática del antibiótico por las denominadas beta-lactamasas. A lo largo de esta introducción nos centraremos en las enzimas beta-lactamasas, por ser el mecanismo más importante de resistencia a beta-lactámicos entre bacterias Gram-negativas, especialmente en el grupo de las enterobacterias (Drawz & Bonomo, 2010; Kong *et al.*, 2010; Poole, 2004).

Las ***beta-lactamasas*** son enzimas bacterianas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo beta-lactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos beta-lactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana (Figura 9).

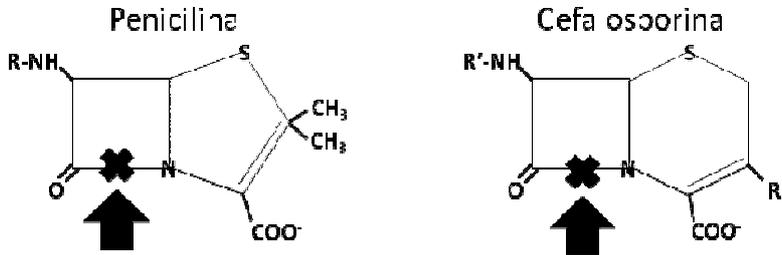


Figura 9.- Lugar de ataque de las beta-lactamasas sobre las moléculas de penicilina y cefalosporina.

Desde 1940, cuando fueron descubiertas en una cepa de *E. coli*, entonces denominada como *Bacillus coli*, se han descrito más de 900 enzimas de este tipo (Bush & Jacoby, 2010), que han sido clasificadas utilizando dos aproximaciones:

En función de su estructura proteica, propuesta por Ambler en 1980 (Ambler, 1980), divide las beta-lactamasas en las clases A, B, C y D. Las enzimas de la clase B son metalo-beta-lactamasas, dependientes de la presencia de iones  $Zn^{2+}$ ; mientras que las enzimas de la clase A, B y D son serin-beta-lactamasas, independientes de metales.

En función de sus características bioquímicas y funcionales, propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 y actualizada en 2010 (Bush *et al.*, 1995; Bush & Jacoby, 2010). Esta clasificación establece distintos grupos, en función del sustrato y perfil de inhibición por inhibidores de beta-lactamasas.

Un esquema de clasificación conjunta se muestra en la Tabla 3, junto con las beta-lactamasas representativas. Muchas de las enzimas que se comentarán están incluidas en la página web [www.lahey.org/Studies](http://www.lahey.org/Studies) que se encuentra en continua actualización por G.A. Jacoby y K. Bush.

Si repasamos por grupos estas beta-lactamasas, nos encontramos en primer lugar las **cefalosporinasas o enzimas de tipo AmpC** (grupo 1, clase C), que son las beta-lactamasas más abundantes en cuanto a número de microorganismos que las producen, ya que se encuentran como enzimas cromosómicas en muchas enterobacterias. Éstas afectan a penicilinas, combinaciones de beta-lactámico e inhibidor y cefalosporinas, incluyendo cefoxitina, cefotetan, ceftriaxona y cefotaxima. Este tipo de enzimas hidrolizan débilmente a cefepime

Tabla 3.- Esquemas de clasificación de beta-lactamasas (Drawz &amp; Bonomo, 2010).

Clasificación molecular (Ambler)	Clasificación funcional (Bush&Jacobyedeiros (2010))	Sustratos preferidos	Inhibición por		Beta-lactamasas representativas
			CLV o TZ	EDTA	
A (serin penicilinasas)	2a	Penicilinas	+	-	PC1 ( <i>S. aureus</i> )
	2b [penicilinasas]	Penicilinas, C1G	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be [beta-lactamasas de amplio espectro]	Penicilinas, C1G-C4G, monobactámicos	+	-	SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26, CTX-Ms
	2br	Penicilinas	-	-	TEM-30, SHV-10, SHV-72
	2c	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3
	2e 2f [serin-carbapenemasas]	C1G-C4G Carbapenémicos	+	-	CepA, FEC-1 KPC-2, IMI-1, SME-1
B (metalo-betalact.)	3a [metalo-B-lactamasa]	Carbapenémicos	-	+	IMP-1, VIM-1, CerA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
	3b [metalo-B-lactamasa]	Carbapenémicos	-	+	CphA, Sfh-1
C (cefalosporinasas)	1	Cefalosporinas	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Cefalosporinas	-	-	GC1, CMY-37
D (oxacilinasas)	2d [cloxacilinasas]	Cloxacilina	Variable	-	OXA-1 a OXA-10
	2de	C1G- C4G	Variable	-	OXA-11 a OXA-15
	2df [carbapenemasas]	Carbapenémicos	Variable	-	OXA-23, OXA-48

y son inhibidas por la cloxacilina, oxacilina y el aztreonam (Drawz & Bonomo, 2010). La producción de AmpC cromosómica en bacterias gram-negativas suele darse a bajo nivel, pero puede dereprimirse por inducción con algunos beta-lactámicos, especialmente con la cefoxitina. La presencia de estas enzimas cromosómicas e inducibles es un gran problema en el tratamiento por la posible emergencia de bacterias altamente resistentes. Por ello, en los últimos años, tanto el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), quien disminuyó los puntos de corte para cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima; como el recientemente creado European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) apuestan por bajos puntos de corte, que podrían ayudar a detectar aquellas cepas que aún siendo sensibles, pueden emerger como resistentes tras un tratamiento con cefalosporinas de amplio espectro. Por otra parte, las cefalosporinasas de tipo AmpC plasmídico (pAmpC), que pueden estar presentes en *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., o *Proteus* spp., están altamente relacionadas con aquellas AmpC cromosómicas de *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* o

*Aeromonas* spp., pero son fácilmente transferibles y suelen producir muy alto nivel de resistencia (Bush & Jacoby, 2010; Jacoby, 2009).

Las **penicilinasas** (grupo 2b, clase A) incluyen las enzimas SHV-1 y TEM-1, que fueron de las primeras en ser descubiertas y que hoy en día permanecen entre las más importantes detectadas en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, responsables de un gran número de infecciones. Este grupo de enzimas están inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam; por lo que el tratamiento de microorganismos portadores puede realizarse en combinación con un inhibidor de beta-lactamasas, como amoxicilina-ácido clavulánico; ampicilina-sulbactam o piperacilina-tazobactam (Bush & Jacoby, 2010; Drawz & Bonomo, 2010).

Un caso de particular importancia y preocupación son las **Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)**, localizadas en el grupo 2be y clase A de las clasificaciones anteriormente descritas. Además de estas clasificaciones, recientemente se propuso una clasificación que facilitase el control epidemiológico de estas beta-lactamasas (Giske *et al.*, 2009), estableciendo tres grupos: BLEE<sub>A</sub>, BLEE<sub>M</sub> y BLEE<sub>CARBA</sub>, subdivididos a su vez en subclases. El grupo BLEE<sub>A</sub> agrupa las beta-lactamasas de clase 2be, con las beta-lactamasas más prevalentes (TEM, SHV y CTX-M). El grupo BLEE<sub>M</sub> engloba las AmpC plasmídicas y las BLEE de tipo OXA; mientras que el grupo BLEE<sub>CARBA</sub> está compuesto por las carbapenemasas, incluyendo las metalo-beta-lactamasas y las serin-beta-lactamasas con actividad hidrolítica frente a carbapenémicos. Las BLEEs hidrolizan las oxy-imino-cefalosporinas (cefalosporinas de tercera y cuarta generación), como la cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima o cefepime; y los monobactámicos como el aztreonam; pero no afectan a las cefamicinas (cefexitina) ni a los carbapenémicos (imipenem, ertapenem, meropenem o doripenem) (Bush & Jacoby, 2010; Cantón *et al.*, 2012).

Aunque en un inicio las BLEEs se identificasen como variantes aminoacídicas de las conocidas SHV-1 y TEM-1, productoras de un gran número de brotes hospitalarios de *E. coli* o *K. pneumoniae* resistentes a las cefalosporinas (Bush & Jacoby, 2010; Poole, 2004), a comienzos de los años noventa se descubrieron las enzimas de la familia CTX-M. Éstas emergieron por una transferencia plasmídica de genes BLEE pre-existentes en el cromosoma de organismos no-patógenos, como *Kluyvera* spp. (Bonnet, 2004; Paterson & Bonomo, 2005). En una década, las beta-lactamasas de tipo CTX-M, actualmente con más de 100 variantes, se han convertido en la familia predominante y han reemplazado en frecuencia a las derivadas de TEM y SHV en muchas partes del mundo, especialmente en Europa (Cantón *et al.*, 2012;

Coque *et al.*, 2008a). Esta expansión, denominada por algunos autores como la “pandemia de las CTX-M”, no solo ha venido dada por el éxito en la supervivencia de clones que portan estas beta-lactamasas, sino que ha estado facilitada por el propio entorno genético donde las encontramos, que incluye secuencias de inserción IS, integrones y transposones. Gracias a las secuencias de inserción y quizás también a una movilización mediada por fagos, las CTX-M han sido movilizadas desde el cromosoma de *Kluyvera* spp. hacia elementos genéticos móviles o movilizables tales como integrones y plásmidos, fácilmente transmisibles por fenómenos de transferencia horizontal (Cantón *et al.*, 2012; Eckert *et al.*, 2006).

Aunque las enzimas de tipo SHV, TEM y CTX-M son las más prevalentes, dentro del grupo de las BLEEs también encontramos otras como las BES, GES-1, VEB y PER (Drawz & Bonomo, 2010; Paterson & Bonomo, 2005; Poole, 2004).

La familia de las **oxacilinasas o cloxacilinasas**, enzimas OXA (grupo 2, clase D), son capaces de hidrolizar, tal y como su nombre indica, oxacilinas y cloxacilina; aunque también confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas (grupo 2d) y, en algunas de sus variantes, a cefalosporinas de amplio espectro (grupo 2de, OXA-11 a OXA-15) o carbapenémicos (grupo 2df, OXA-23 y OXA-48). Generalmente, las enzimas de tipo OXA son resistentes a la inhibición por clavulanato, sulbactam y tazobactam.

Las **serin-carbapenemasas o carbapenemasas de clase A** son una familia emergente dentro de las beta-lactamasas (grupo 2f, clase A) capaces de hidrolizar la mayoría de los antibióticos beta-lactámicos, incluyendo los carbapenémicos. Este grupo engloba algunas variantes de las enzimas IMI, SME y KPC. Se describieron primeramente en *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *K. pneumoniae*, en las dos primeras especies en localización cromosómica, mientras que en la tercera localizada en plásmidos que contenían el transposón Tn4401, de fácil dispersión a otras especies como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (Bush & Jacoby, 2010; Drawz & Bonomo, 2010; Poole, 2004).

Las **metalo-beta-lactamasas (MBLs) o carbapenemasas de clase B** (grupo 3, clase B) son otra familia de carbapenemasas, dependientes de la presencia de iones  $Zn^{2+}$  en el medio y con un mecanismo de hidrólisis distinto a las enzimas hasta ahora descritas. Los organismos productores muestran resistencia a penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y a los inhibidores de beta-lactámicos, pero su perfil hidrolítico no siempre incluye el aztreonam. Los genes *bla*<sub>MBL</sub> pueden localizarse tanto en cromosoma como en plásmidos y/o integrones en

especies con implicación clínica como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* o *A. baumannii* (Bush & Jacoby, 2010; Drawz & Bonomo, 2010; Poole, 2004).

Como resumen, podemos decir que la resistencia a antibióticos beta-lactámicos está incrementándose de manera alarmante, en gran parte debido a la dispersión horizontal de los genes que median esta resistencia que se localizan en plásmidos, integrones y transposones que facilitan su movilización y dispersión entre bacterias de diferentes especies (Bush & Jacoby, 2010; Cantón *et al.*, 2012).

### **3.4.- Mecanismos de resistencia a quinolonas.**

#### ***Estructura química y clasificación de las quinolonas.***

Las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos caracterizados por una estructura bicíclica hetero-aromática, constituida por un núcleo piridona beta-ácido carboxílico y un anillo aromático. El ácido nalidíxico, primera quinolona sintetizada en el año 1962 (Leshner *et al.*, 1962), representa al grupo de las 4-quinolonas. Pese a su potente actividad, su uso clínico estaba limitado a infecciones del tracto urinario y finalmente fue relegada a un segundo plano con la síntesis de las fluoroquinolonas, derivados 6-fluoro y 7-piperazinil, que aumentan la potencia y el espectro de acción (Alós, 2003; Mella *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2012). Destacan las fluoroquinolonas que en la posición 7 poseen un grupo piperacínico (norfloxacin, ciprofloxacina) o un grupo metil-piperacínico (ofloxacina, levofloxacina). Recientemente se ha desarrollado un nuevo grupo de quinolonas (quinolonas de cuarta generación) caracterizadas por la ausencia del átomo de flúor en la posición 6, característico de las fluoroquinolonas. Estos compuestos, entre los que destaca el garenoxacino como representante, han sido denominados quinolonas no fluoradas y su espectro de acción se extiende a bacterias tanto Gram-positivas, como Gram-negativas y anaerobias (Morosini *et al.*, 2003; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). En la Figura 10, se observa la estructura de las quinolonas más conocidas. Las quinolonas pueden clasificarse en generaciones (Mella *et al.*, 2000; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011):

De primera generación (Q1G): ácido nalidíxico, ácido pipemídico, ácido oxolínico, ácido piromídico, cinoxacino y flumequino. Actualmente son poco usadas ya que pese a que son activas frente a enterobacterias, son prácticamente inactivas frente a bacterias Gram-positivas, patógenos atípicos y bacterias anaerobias. Su fármaco-cinética no es muy buena y sólo son usadas para el tratamiento de infecciones urinarias.

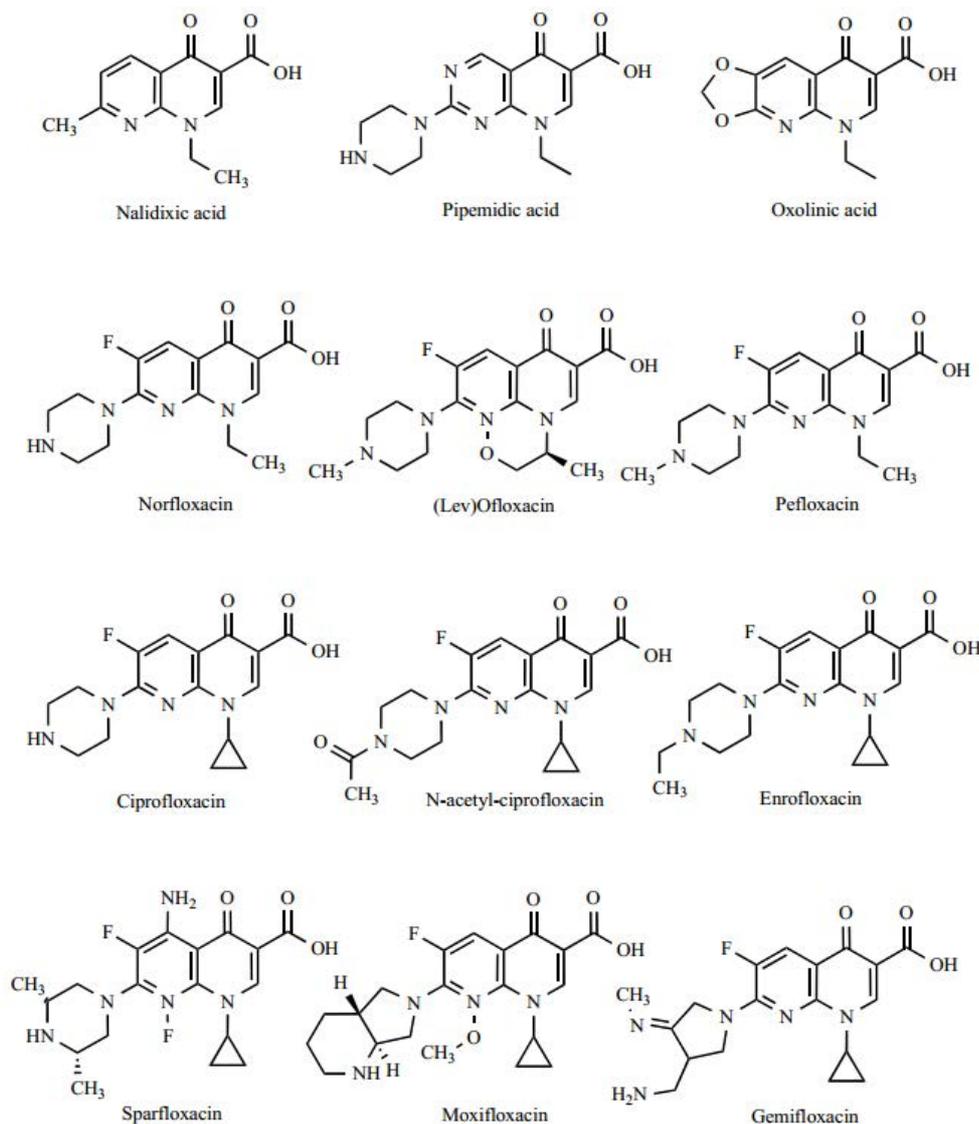


Figura 10.- Estructura de algunas quinolonas y fluoroquinolonas representativas (Cattoir & Nordmann, 2009).

De segunda generación (Q2G): norfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, enoxacin, lomefloxacin, fleroxacin, amifloxacin y temafloxacin. Estas quinolonas incorporan un átomo de flúor en la posición 6 y por ello se llaman fluoroquinolonas. Se caracterizan también por el sustituyente piperazina o metil-piperazina en la posición 7. Presentan mayor actividad frente a Gram negativos, incluida *Pseudomonas aeruginosa*, son activas frente a algún patógeno atípico pero tienen actividad moderada frente Gram-positivos. Su actividad es mínima frente a microorganismos anaerobios. Suelen ser usadas en el tratamiento en infecciones sistémicas.

De tercera generación (Q3G): Esparfloxacin, levofloxacin, tosufloxacin, gatifloxacin, pazufloxacin, grepafloxacin. Se caracterizan por la presencia de grupos aminados en la posición 7, siendo importantes por su frecuencia y originalidad la presencia de

aminopirrolidinas y grupos azabicyclo, junto con la presencia de sustituciones en los carbonos 5 y 8. Su actividad es más fuerte sobre Gram positivos como *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

De cuarta generación (Q4G): garenoxacino, trovafloxacina, clinafloxacina, sitafloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina. Son las denominadas quinolonas des-fluoradas que presentan actividad anti-anaerobia lo que amplía su espectro de acción.

### ***Mecanismo de acción de las quinolonas.***

El mecanismo de acción de las quinolonas es bastante complejo. De manera sencilla, podríamos decir que las quinolonas inhiben la síntesis del DNA. Una vez que han penetrado en el interior de la bacteria, éstas interactúan con el complejo formado entre el DNA cromosómico bacteriano y la topoisomerasa II que está actuando en el proceso de replicación. Las topoisomerasas II implicadas en este proceso son la DNA-girasa o la topoisomerasa IV que controlan la topología del DNA cromosómico, facilitando la replicación, recombinación y expresión del mismo (Hawkey, 2003).

La DNA-girasa es una topoisomerasa II que posee la función de mantener un nivel de enrollamiento del DNA que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y la transcripción. También libera enrollamientos negativos en un proceso dependiente de ATP. Es un tetrámero que posee cuatro subunidades, denominadas GyrA (dos subunidades) y GyrB (dos subunidades) y codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. Esta enzima es la diana primaria de las quinolonas en bacterias Gram-negativas (Hawkey, 2003).

La topoisomerasa IV es la diana primaria en bacterias Gram-positivas; al igual que la DNA-girasa posee cuatro subunidades, dos ParC y dos ParE. Su función es separar las hebras de DNA tras cada replicación, aunque también se detecta que posee una actividad relajante sobre la cadena de DNA (Hawkey, 2003).

Se ha observado que la secuencia aminoacídica de las subunidades GyrA y GyrB es homóloga a la secuencia de las subunidades ParC y ParE, respectivamente; sobre todo en la región denominada QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region, región determinante de resistencia a quinolonas). Esta similitud explicaría el porqué las quinolonas son de inhibir ambas enzimas.

El mecanismo de acción de las quinolonas sobre estas dos enzimas tiene un paso importante, que es la formación de un complejo quinolona-enzima-DNA. Este proceso ocurre

cuando la enzima ya ha producido extremos libres en el DNA, con lo que la unión de la quinolona estabiliza un complejo que supone una barrera física para el movimiento de la horquilla de replicación, la RNA-polimerasa y la DNA-helicasa (Figura 11). Por tanto, se bloquea la síntesis del DNA y el crecimiento celular, responsable de la acción bacteriostática de las quinolonas. Se postula un mecanismo similar en el bloqueo de la topoisomerasa IV, ya que este mecanismo no es conocido (Alós, 2003; Hawkey, 2003; Rodríguez-Martínez, 2005).

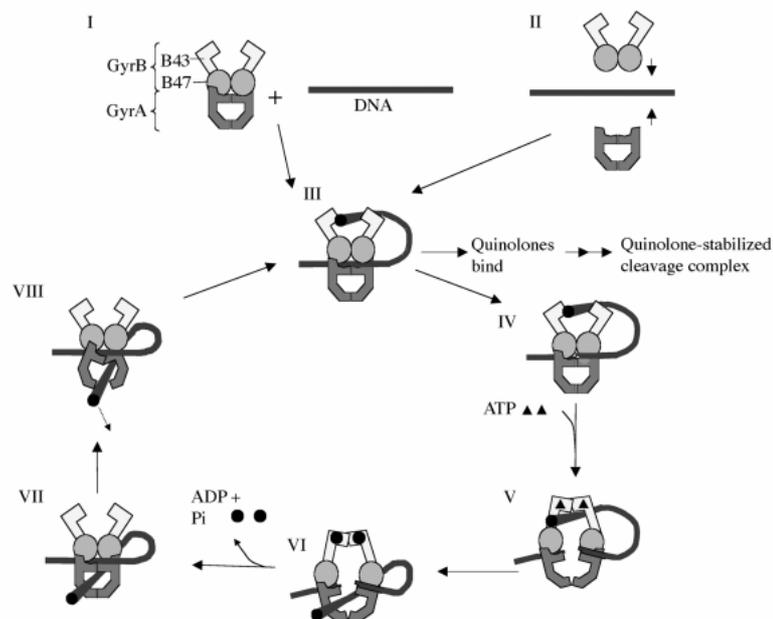


Figura 12.- Ilustración esquemática del ciclo de superenrollamiento de la DNA-girasa, donde se muestra el punto de acción de las quinolonas (Hawkey, 2003).

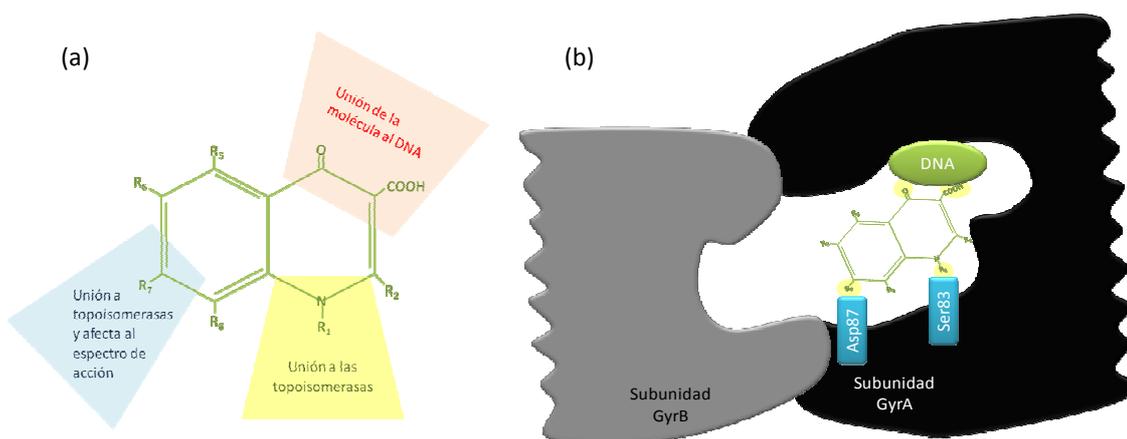


Figura 11.- (a) Esquema de la molécula de quinolona genérica con las posiciones de anclaje para el bloqueo de las topoisomerasas de tipo II, y (b) esquema del complejo topoisomerasa-DNA-quinolona (derecha).

En la figura (Figura 12-a) se observa la estructura química de una molécula de quinolona general, donde están marcadas las regiones de unión al DNA y de unión a la

topoisomerasa II. En la parte derecha, en un corte transversal, se representan las subunidades de la topoisomerasa DNA-girasa y el DNA. Este complejo es bloqueado por el anclaje de la molécula de quinolona en las dos posiciones aminoacídicas marcadas de la subunidad GyrA y también a la hebra de DNA.

### **Resistencia a quinolonas.**

Las quinolonas y fluoroquinolonas son antibióticos usados para el tratamiento de salmonelosis invasiva y sistémica. Aunque probablemente el uso en el ámbito clínico ha contribuido a la emergencia de cepas resistentes a quinolonas, no debemos olvidar que existen estudios realizados sobre poblaciones no sometidas a presión antibiótica (comunidades indígenas en la selva amazónica) en donde se han encontrado tasas de resistencia de hasta un 50% para ácido nalidíxico y un 23% para ciprofloxacina (Pallecchi *et al.*, 2012).

En muchas ocasiones la resistencia a este tipo de antibiótico viene acompañada por multirresistencia a otro gran número de antibióticos. Aún así, la resistencia a fluoroquinolonas en el género *Salmonella* es relativamente poco frecuente comparado con su tasa de incidencia en otras enterobacterias. Esto sugiere la posibilidad de que el coste energético que le supone esta resistencia a *Salmonella* limita su aparición (Giraud *et al.*, 2006). Sin embargo, la emergencia y dispersión de cepas de *S. enterica* resistentes a fluoroquinolonas comenzó a observarse a principios de los años noventa con la emergencia en Europa de un clon de *S. Typhimurium* DT204, que fue seguido por su dispersión a varios serotipos, como Choleraesuis o Schwarzengrund (Giraud *et al.*, 2006; Michael *et al.*, 2006).

La resistencia a fluoroquinolonas que podemos observar es el punto final de una acumulación de varios mecanismos bioquímicos cooperativos que resultan de la acumulación de varios eventos genéticos. Los mecanismos de resistencia a quinolonas incluyen tanto mecanismos cromosómicos (mutaciones en las topoisomerasas diana, expulsión activa del antibiótico del interior celular, disminución de la permeabilidad de la membrana) como mecanismos plasmídicos (protección de las topoisomerasas diana por proteínas Qnr, modificación enzimática del antibiótico y expulsión activa del mismo) (Giraud *et al.*, 2006; Hawkey, 2003).

### Mecanismos cromosómicos.

Mutaciones asociadas a las topoisomerasas diana de las quinolonas y fluoroquinolonas. En bacterias Gram-negativas, las mutaciones aparecen en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de la subunidad GyrA (gen *gyrA*), correspondiente al extremo amino-terminal (aminoácidos 67-106) de la proteína. Los cambios aminoacídicos más frecuentes son la sustitución de Ser83→Tyr, Phe, Ala y Asp87→Asn, Gly, Tyr, Lys (lugares de anclaje del antibiótico, tal y como se muestra en la Figura 11-b). Tanto las mutaciones sencillas como combinaciones de las mismas provocan diferentes niveles de sensibilidad reducida a quinolonas y fluoroquinolonas. Las mutaciones en el gen *gyrB*, que codifica la subunidad B de la girasa han sido descritas en menor frecuencia (Giraud *et al.*, 2006).

Tanto en *E. coli* como *Salmonella* y otras bacterias Gram negativas, la diana secundaria es la topoisomerasa IV, codificada por los genes *parC* y *parE*. Se ha observado que no aparecen mutaciones en esta diana si previamente no está mutado el gen *gyrA*. Los residuos susceptibles de cambios aminoacídicos en ParC son Ser80 y Glu84; mientras que puede encontrarse el residuo Ser458 mutado en *parE* (Giraud *et al.*, 2006).

Las mutaciones en las dianas de las quinolonas actúan con un efecto aditivo, así por ejemplo en *E. coli* (Sáenz *et al.*, 2003) se ha demostrado que las cepas con fenotipo de sensibilidad a ácido nalidíxico no presentan generalmente ningún cambio aminoacídico en GyrA o ParC. Sin embargo, las mutaciones sucesivas en GyrA y ParC crean un efecto aditivo, que en ausencia de otros mecanismos de resistencia, dan los valores aproximados de CMI a ciprofloxacina observados en la Figura 13.

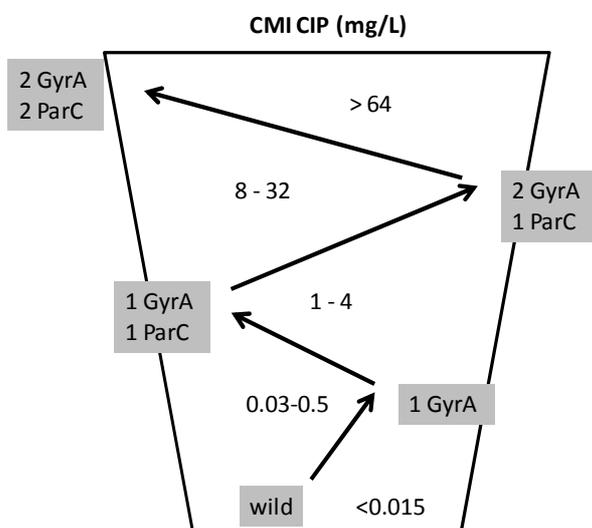


Figura 13.- Efecto de las mutaciones en las proteínas GyrA y ParC sobre la CMI de ciprofloxacina en cepas de *E. coli* (Sáenz *et al.*, 2003).

Por sí mismas, estas mutaciones no lograban explicar que cepas que presentaban idénticas mutaciones en sus genes de topoisomerasa II mostraran distinto fenotipo de resistencia a quinolonas, por lo que se sospechó que podían existir otros mecanismos adicionales.

*Pérdida de porinas o expresión de porinas alteradas estructuralmente.* Las quinolonas son capaces de entrar en el interior celular por dos mecanismos: difusión a través de la bicapa lipídica o bien, entrada a través de un canal proteico (porina). La difusión eficaz a través de la bicapa lipídica depende del grado de hidrofobicidad que las quinolonas presenten, favoreciéndose la entrada de aquellas con altos niveles de hidrofobicidad (Chapman & Georgopapadakou, 1988). Por otra parte, la alteración en las porinas puede deberse a mutaciones, deleciones o inserciones que causan la inactivación de sus genes codificantes o mutaciones en los genes reguladores de éstas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

*Sobreexpresión de sistemas de expulsión activa. Bombas de eflujo.* Los sistemas de expulsión activa o bombas de eflujo, cuya principal función es la eliminación de compuestos tóxicos y metabolitos secundarios producidos por la propia bacteria, son capaces también de eliminar antibióticos como las quinolonas provocando una resistencia intrínseca de bajo nivel en la mayoría de los microorganismos (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). La sobreexpresión de estos sistemas, normalmente determinado por mutaciones en los genes reguladores (*mar* o *sox*) (Giraud *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2001) ha sido en ocasiones relacionado con una disminución en la expresión de porinas, de manera que se alcanza un efecto sinérgico apreciable ocasionando mayores niveles de resistencia (Cohen *et al.*, 1989; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Las bombas de eflujo AcrAB y AcrEF, ambas pertenecientes a la familia de bombas RND -Resistant Nodulation Division- y codificadas en cromosoma, son las que se han relacionado más con este tipo de resistencia, aunque la magnitud en la variación de la CMI a los antibióticos, que refleja la eficiencia de estas bombas, es dependiente de la fluoroquinolona utilizada (Giraud *et al.*, 2006).

### **Mecanismos plasmídicos.**

Los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas o PMQR (Plasmid Mediated Quinolone Resistance) fueron descubiertos a finales de los años noventa con la descripción del primer gen de tipo *qnr* (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). A partir de este momento, fueron describiéndose nuevas variantes alélicas de estos genes; así como otros mecanismos cuya dispersión estaba mediada por plásmidos (Jacoby *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009). Hasta

la fecha, han sido identificados varios mecanismos de tipo PMQR: proteínas Qnr, la enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr y las bombas de eflujo QepA y OqxAB (Poirel *et al.*, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Actualmente y debido a la detección de algunos de ellos asociados a cromosoma (Ruiz *et al.*, 2012a), estos mecanismos han adquirido el nombre de “mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas” o TMQR (Transferable Mechanism of Quinolone Resistance) (Ruiz *et al.*, 2012a; Ruiz *et al.*, 2012b).

Proteínas de tipo Qnr. Las proteínas de este tipo actúan como protectoras de la diana de las quinolonas, las topoisomerasas II. Los genes *qnr* codifican una proteína de 218 aminoácidos que se caracteriza por una serie de repeticiones tándem de 5 aminoácidos. Se observa que existe un motivo semiconservado [(Ser, Thr, Ala o Val), (Asp o Asn), (Leu o Phe), (Ser, Thr o Arg) y (Gly)]. Hasta el momento se conocen cinco grandes grupos de proteínas Qnr, agrupadas como QnrA (219 aa), QnrB (214 aa), QnrC (221 aa), QnrD (214 aa) y QnrS (218 aa), en función de su secuencia aminoacídica. Además, dentro de cada grupo de proteínas, existen distintos alelos de cada gen *qnr*, que difieren en dos o más aminoácidos (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Strahilevitz *et al.*, 2009).

La nomenclatura de los genes *qnr* (Jacoby *et al.*, 2008) está recogida en la página web <http://www.lahey.org/qnrStudies>, donde aparecen todas las variantes descritas hasta el momento. Hasta la fecha existen 61 variantes de QnrB, 8 variantes de QnrS, 7 variantes de QnrA, una variante de QnrC y una variante de QnrD, aunque estos datos varían día a día con la incorporación de nuevas secuencias aminoacídicas. Las proteínas QnrB1, QnrC1, QnrD1 y QnrS1 comparten un 40, 60, 47 y 59% de identidad con la proteína QnrA1, respectivamente (Poirel *et al.*, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

Tras el estudio de varias especies Gram-negativas presentes tanto en el ámbito clínico como en el medio ambiente, pertenecientes a la familia de las enterobacterias, o a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Moraxella* y *Shewanella*, hay autores que establecen el origen de los genes plasmídicos de tipo *qnr* en el cromosoma de muchas de estas especies, que han podido actuar como reservorio bacteriano (Poirel *et al.*, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Entre ellas destacan genes de tipo *qnrA* en *Shewanella algae* (Poirel *et al.*, 2005), *qnrB* en *Citrobacter* spp. (Jacoby *et al.*, 2011), *qnrS* en *Vibrio* spp. (Cattoir *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2005) o genes denominados como *Smaqnr*/*Smqnr* en *Serratia marcescens* y *Stenotrophomonas maltophilia*, respectivamente (Sánchez & Martínez, 2010; Velasco *et al.*, 2010). Además de la presencia en estas especies bacterianas, las proteínas pentapeptídicas de tipo Qnr han sido identificadas en el cromosoma de bacterias Gram-

positivas como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

Aunque no se sabe exactamente la función de estos genes, se ha postulado que las proteínas codificadas puedan actuar como una antitoxina, protegiendo la DNA-girasa y la topoisomerasa IV de algunas toxinas naturales, tales como las correspondientes a los sistemas de adición, CcdB o ParE, presentes en plásmidos ampliamente diseminados (Ellington & Woodford, 2006; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Strahilevitz *et al.*, 2009). Por otra parte, los alelos plasmídicos de *qnrB* albergan lugares de unión a la proteína LexA, involucrada en la respuesta SOS bacteriana, sugiriendo que QnrB posee una función de protección de la bacteria de aquellas agresiones naturales que pueden dañar el DNA (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009). Lo que sí queda claro es que los genes *qnr* se han encontrado circulando en distintos ambientes, especialmente asociados al medio acuático, y que una presión selectiva de las quinolonas ha podido provocar que entren en circulación facilitados por los elementos genéticos móviles (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

La adquisición de genes *qnr* por si solo no provoca el paso de la bacteria desde un nivel de sensibilidad a fluoroquinolonas hasta niveles de resistencia recogidos por los puntos de corte del CLSI. Los experimentos que se han llevado a cabo comparando la CMI de bacterias “wild type” y bacterias que han adquirido estos genes deja patente que para llegar a niveles altos de resistencia a quinolonas es necesaria la coexistencia de mecanismos adicionales. Es difícil establecer cómo afecta directamente un gen *qnr* a la resistencia a fluoroquinolonas, ya que también afecta el número de copias del gen y su nivel de expresión transcripcional; sin olvidar que hay que tener en cuenta los mecanismos adicionales de resistencia que puedan existir. De modo general, se puede decir que la única presencia de un gen *qnr* en una bacteria provoca un incremento en 16-125 veces en la CMI de casi todas las fluoroquinolonas, mientras que afecta en menor medida (16-32 veces) al ácido nalidíxico. Estos genes permiten sobrevivir a una bacteria con una resistencia de bajo nivel a quinolonas el tiempo suficiente para imponerse durante el tratamiento con fluoroquinolonas, de forma que ayudan a seleccionar mutantes que puedan desarrollar niveles más altos de resistencia a este tipo de antibióticos (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Strahilevitz *et al.*, 2009).

Los genes *qnr* pueden estar vehiculizados en plásmidos que poseen una amplia variedad de tamaños (7-320 kb) y que en la mayoría de los casos portan múltiples determinantes de resistencia a beta-lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y rifampicina. Estos genes están asociados en muchos casos a integrones, incluso en el caso de *qnrA1* asociado a integrones de tipo *sul1* complejos con la región 3'-conservada duplicada; secuencias de inserción (en el caso de genes de tipo *qnrB* o *qnrS*) y acompañados por genes que codifican beta-lactamasas de tipo AmpC, CTX-M, SHV, etc. (Poirel *et al.*, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Strahilevitz *et al.*, 2009).

Enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr. Tras los primeros descubrimientos de los genes *qnr*, algunos investigadores se preguntaron por qué los niveles de resistencia a fluoroquinolonas eran tan distintos cuando se transferían plásmidos portadores de genes *qnr*. Estos fueron los primeros pasos en el descubrimiento de la variante “-cr” de la acetiltransferasa AAC(6')-Ib. Por sí misma, esta enzima confiere resistencia a kanamicina, amikacina y tobramicina; pero cuando el gen codificante posee las modificaciones aminoacídicas Trp102Arg y Asp179Tyr, se define la variante AAC(6')-Ib-cr, que confiere resistencia adicional a ciprofloxacina y norfloxacina (aumento en 2-4 veces en la CMI). Dado que su modo de acción es la N-acetilación del nitrógeno amino del sustituyente piperazilina (Figura 14), no afecta a otros antibióticos de la familia como ácido nalidíxico, levofloxacina, moxifloxacina u ofloxacina (Poirel *et al.*, 2012; Robicsek *et al.*, 2006).

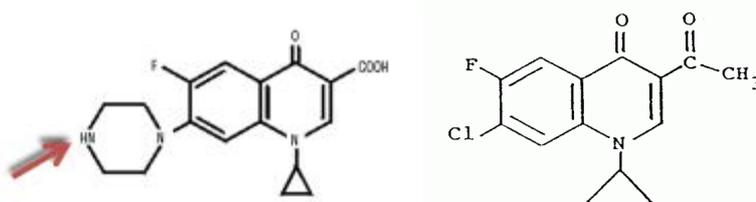


Figura 14.- Estructura de la ciprofloxacina y posición de actuación de la enzima acetiltransferasa mutada. A la derecha, estructura de levofloxacina, donde la enzima no puede actuar.

El gen de resistencia *aac(6')-Ib-cr* ha sido identificado como casete génico formando parte de integrones de tipo 1 (Cattoir & Nordmann, 2009; Partridge *et al.*, 2009), asociado a transposones de tipo *Tn1331* o derivados (Ramírez & Tolmasky, 2010), así como a genes de resistencia a beta-lactámicos (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>) o genes de resistencia a quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*) (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009). Los distintos entornos genéticos, así como las diferentes longitudes de su extremo N-terminal descritas

para este gen pueden ser la consecuencia directa de su alta movilidad, aunque en todos los casos esta flexibilidad estructural no ha afectado a su función y dispersión (Casin *et al.*, 1998; Partridge *et al.*, 2009; Ramírez & Tolmasky, 2010). Los estudios llevados a cabo hasta ahora parecen demostrar la localización plasmídica de este gen; sin embargo un reciente estudio (Ruiz *et al.*, 2012a) demuestra la co-localización de este gen tanto en plásmidos como en cromosoma en cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas en España.

Bombas de eflujo: QepA y OqxAB. La bomba QepA fue descubierta en Japón en 2002 en una cepa de *E. coli*, está constituida por 511 aminoácidos y pertenece a la familia de las bombas de tipo MFS. Hasta el momento se han descubierto dos variantes que difieren en dos sustituciones aminoacídicas: QepA1 y QepA2, codificadas por los genes *qepA1* y *qepA2*, respectivamente. Estas bombas de eflujo causan un incremento moderado (5 diluciones aproximadamente) en la CMI de norfloxacina y ciprofloxacina, pero no afectan a la actividad de las fluoroquinolonas menos hidrofílicas como la pefloxacina, esparfloxacina, gatifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina; ni al ácido nalidíxico por su naturaleza hidrofóbica. Se han descrito varios plásmidos donde se localizan estos genes y se puede decir que en algunos casos su presencia viene asociada a un perfil de multiresistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y beta-lactámicos de amplio espectro (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2012; Strahilevitz *et al.*, 2009).

La bomba de eflujo OqxAB fue descubierta en 2003 en una cepa de *E. coli* resistente a olaquinox, un antibiótico utilizado como promotor de crecimiento en usos agrícolas. Pertenece a la familia de las bombas de tipo RND y confiere resistencia también a otros antibióticos, como el cloranfenicol. Afecta a la CMI del ácido nalidíxico y de la ciprofloxacina en 8 y 16 diluciones, respectivamente. El gen *oqxAB* es intrínseco de *Klebsiella pneumoniae*, donde está presente en el cromosoma (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2012; Strahilevitz *et al.*, 2009).

Se puede decir, que como regla general, el fenotipo de resistencia no nos permite diferenciar entre mecanismos de resistencia mediados por plásmidos (PMQR) y otro tipo de mecanismos. Los mecanismos PMQR confieren un nivel de resistencia a quinolonas por debajo del punto de corte establecido tradicionalmente como resistente por el CLSI. Sin embargo, tanto la edición 2012 de CLSI como la edición 2013 de EUCAST han disminuido el punto de corte de sensibilidad para ciprofloxacina a un valor de CMI  $\leq 1$  mg/L y  $\leq 0.5$  mg/L, respectivamente, para aquellas *Salmonella* intestinales; mientras que la edición 2013 de CLSI plantea reducir este valor hasta  $\leq 0.06$  mg/L para todos los tipos de *Salmonella* (Humphries *et*

*al.*, 2012). Todas estas modificaciones son un intento para evitar la emergencia de bacterias con alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas y los posibles fallos terapéuticos derivados, especialmente en aquellos casos de salmonelosis tifoideas y de diseminación extraintestinal (Leclercq *et al.*, 2011; Humphries *et al.*, 2012). El fenotipo de bajo nivel de resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad disminuida a ciprofloxacina observada en cepas *qnr*-positivas ni es sensible ni específica; por lo tanto la determinación de estos genes debe hacerse por amplificación mediante PCR y posterior secuenciación para determinar qué alelo tenemos del gen. En el caso de diferenciar el gen *aac(6')-Ib* de su variante mutado, dado que la diferencia son tan solo dos mutaciones nucleotídicas, es necesario realizar secuenciación (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Strahilevitz *et al.*, 2009).

### 3.5.- Mecanismos de resistencia a otros antibióticos.

#### **Resistencia a aminoglucósidos.**

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos descubierto a principios de los años cuarenta a partir del microorganismo *Streptomyces griseus*, que da nombre a uno de los aminoglucósidos más conocidos: la estreptomina. Posteriormente, se lograron caracterizar más compuestos de este tipo como la neomicina, kanamicina o gentamicina. Todos ellos derivan de varias especies de *Streptomyces* o *Micromonospora*, aunque actualmente existen en el mercado antibióticos aminoglucósidos semi-sintéticos, como la netilmicina y la amikacina. Su mecanismo de acción es bactericida y pasa por la inhibición de la síntesis proteica (por su fijación a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano), lo que afecta directamente a la integridad de la membrana celular bacteriana, creando porosidades en ésta (Ramírez & Tolmasky, 2010; van Hoek *et al.*, 2011).

Aunque los mecanismos de resistencia adquiridos frente a los antibióticos aminoglucósidos son variados; el mecanismo más común tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas son las enzimas capaces de modificar los grupos amino o hidroxilo de la molécula de antibiótico, bloqueando de esta manera su actividad antibacteriana. Se conocen tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos: O-fosfotransferasas [APHs, genes *aphA*, *strA*, *strB*], N-acetiltransferasas [ACCs, genes *aac(3)*, *aac(6')*] y O-adeniltransferasas [ANTs, genes *aadA*, *aadB* o también denominados como *ant*]. Cada familia se subdivide en clases en función de su sitio de modificación, que está indicado entre paréntesis. A continuación, mediante números romanos se especifica el tipo de enzima asociado a un fenotipo de resistencia y, finalmente, mediante letras minúsculas se designan los diferentes

genes (Michael *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 1993; van Hoek *et al.*, 2011). En la Tabla 4 pueden observarse los fenotipos de resistencia asociados a enzimas modificantes de aminoglucósidos.

Tabla 4.- Fenotipos de resistencia asociados a enzimas modificantes de aminoglucósidos (Martínez-Martínez & Ruiz de Alegría, 2009).

Fenotipo de resistencia	Enzima modificante
STR	APH(3'')
GEN	AAC(3)-I
KAN, AMK	APH(3')-IV
STR, SPT	ANT(3'')
KAN, NEO	APH(3')-I, APH(3')-II
KAN, TOB, AMK	ANT(4')-II
KAN, GEN, TOB	ANT(2'')-I
KAN, GEN, TOB, NET	AAC(3)-II, AAC(3)-IV
KAN, TOB, AMK, NET	AAC(6')-I
GEN, TOB, NET, NEO	AAC(2')

STR: estreptomicina, GEN: gentamicina, KAN: kanamicina, AMK: amikacina, SPT: espectinomicina, TOB: tobramicina, NET: netilmicina, NEO: neomicina.

Otros mecanismos de resistencia a aminoglucósidos están ocasionados por la disminución de la concentración celular mediada por bombas de expulsión activa, la disminución de la permeabilidad de la membrana, alteraciones ribosomales (mediante mutaciones en las proteínas ribosomales o en la subunidad 16S del RNAr) o la metilación del sitio de unión del antibiótico al ribosoma mediado por enzimas metilasas. Estas enzimas, que producen un alto nivel de resistencia y están codificadas por los genes *armA*, *npmA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* o *rmtD*, están siendo ampliamente estudiadas por su facilidad de dispersión mediante plásmidos de resistencia (van Hoek *et al.*, 2011).

### **Resistencia a fenicoles/cloranfenicoles.**

El cloranfenicol fue obtenido por primera vez a partir de la bacteria del suelo *Streptomyces venezuelae* y aunque posteriormente se ha logrado obtener de otras especies de *Streptomyces*, actualmente se produce por síntesis. Los cloranfenicoles poseen una alta especificidad y actúan como potentes inhibidores de la síntesis proteica debido a su afinidad y bloqueo de la peptidiltransferasa de la subunidad 50S ribosomal, interfiriendo de esta forma en la elongación de las cadenas peptídicas. Los fenicoles son derivados fluorados que mantienen el amplio espectro de acción tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, aerobias como anaerobias; sin embargo, la alta toxicidad de fenicoles/cloranfenicoles limita su uso (Shaw, 1984; van Hoek *et al.*, 2011).

Entre los mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos encontramos la inactivación enzimática y la expulsión activa mediante bombas de eflujo. La inactivación enzimática se da gracias a las enzimas denominadas “Cloranfenicol Acetil Transferasas, CAT”. Se han encontrado dos tipos diferentes de proteínas CatA (genes *catA1*, *catA2*) y distintos tipos de proteínas CatB (*catB2*, *catB3* y *catB8*) en *Salmonella*. Por otra parte, también existen proteínas que actúan como transportadores que median en la expulsión de cloranfenicol y florfenicol de la célula, como son las proteínas Cml y Flo. En *Salmonella* encontramos los genes *cmlA*, responsables de codificar la proteína mediadora de la expulsión de cloranfenicol, y *floR*, gen responsable de mediar la expulsión de cloranfenicol y florfenicol (Michael *et al.*, 2006; van Hoek *et al.*, 2011).

### **Resistencia a tetraciclina.**

Las tetraciclinas fueron descubiertas en distintas especies de *Streptomyces*, comenzando por *Streptomyces aureofacines* aunque actualmente disponemos de productos semi-sintéticos como doxiciclina, minociclina o tigeciclina (Chopra, 1994; Chopra & Roberts, 2001; Vicente & Pérez-Trallero, 2010). Las tetraciclinas fueron los primeros compuestos donde se pudo aplicar el término “amplio espectro”. Debido a esto, a su relativa baja toxicidad y su bajo coste las tetraciclinas han sido utilizadas en todo el mundo y han destacado en segunda posición del *ranking* mundial de consumo de antibióticos, después de las penicilinas (Chopra & Roberts, 2001; van Hoek *et al.*, 2011).

Aunque inicialmente se pensó que las tetraciclinas y sus derivados actuaban solo inhibiendo el crecimiento bacteriano mediante su interacción con el ribosoma y bloqueo de la síntesis proteica (tetraciclinas denominadas “típicas”, como chlortetraciclina, doxiciclina, minociclina y tetraciclina); se ha sugerido un modo de acción adicional. Algunos derivados de tetraciclina, denominadas “atípicas” (anhidrotetraciclina y 6-thiotetraciclina) se muestran como inhibidores pobres de la síntesis proteica por su baja afinidad al ribosoma. En su lugar, estas tetraciclinas actúan interaccionando con la membrana bacteriana (Chopra, 1994; Roberts, 2002; van Hoek *et al.*, 2011).

El principal mecanismo de resistencia a tetraciclinas son las bombas de expulsión activa del antibiótico al exterior de la bacteria. Se han descrito más de 40 genes diferentes relacionados con la resistencia a este tipo de antibióticos, aunque tan sólo cinco de ellos han sido encontrados en *Salmonella*: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)* y *tet(G)*. Estas bombas de expulsión asociadas a membrana están formadas por 12 segmentos proteicos transmembrana

cuya función es la de exportar tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina (Michael *et al.*, 2006). Cada uno de estos genes está bajo la regulación de un gen represor, gen *tetR*, cuya orientación es opuesta al gen que regula y su función represora es necesaria en condiciones de ausencia de antibiótico para evitar el daño celular que puede provocar la sobreexpresión de una bomba de eflujo continua (Berens & Hillen, 2003).

**Resistencia a sulfamidas.**

Las sulfamidas, que comenzaron a utilizarse a principios de los años treinta, representan los antibióticos sintéticos más antiguos (Skold, 2001). A partir de los años sesenta comenzó a utilizarse la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol (cotrimoxazol) debido a que en combinación, mostraban mayor efecto bactericida (Bean *et al.*, 2009; van Hoek *et al.*, 2011).

Las sulfamidas son estructuralmente análogas al ácido p-aminobenzoico (PABA), involucrado en la ruta sintética del ácido fólico, precursor indispensable en la síntesis de bases nitrogenadas y aminoácidos. Por tanto, las sulfonamidas compiten con el ácido paraaminobenzoico por la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS), llegando a su inhibición (Figura 15) (Michael *et al.*, 2006; van Hoek *et al.*, 2011).

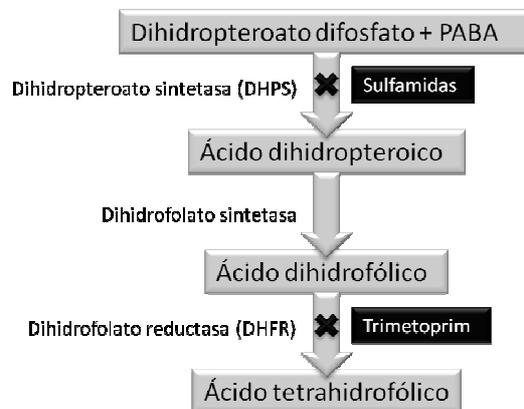


Figura 15.- Metabolismo del ácido tetrahidrofólico.

A pesar de su naturaleza sintética, la resistencia a sulfamidas entre las bacterias patógenas se detectó casi de inmediato a su introducción en la práctica clínica. La resistencia de bajo nivel se debe a mutaciones localizadas en el gen *folP*, gen codificante de la enzima DHPS (Skold, 2001; van Hoek *et al.*, 2011). En cuanto a la resistencia adquirida a sulfamidas, en *Salmonella* se conocen tres tipos de genes de resistencia a sulfamidas: *sul1*, *sul2* y *sul3*, que codifican la forma resistente de la enzima DHPS (Michael *et al.*, 2006). El gen *sul1* forma parte

del segmento 3' conservado de los integrones de clase 1, por lo que se encuentra ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas; mientras que el gen *sul2* se encuentra muy relacionado con los genes *strA* y *strB* de resistencia a aminoglucósidos (Bean *et al.*, 2009). Se ha identificado el gen *sul3* en cepas de *E. coli* (Perreten & Boerlin, 2003), que ya ha sido detectado en algunos serotipos de *Salmonella* como Agona, Brandenburg y Typhimurium (Guerra *et al.*, 2004).

### **Resistencia a trimetoprim.**

El trimetoprim comenzó a comercializarse en los años sesenta y, al igual para las sulfamidas, se trata de un antibiótico sintético. Su mecanismo de acción se basa en inhibir la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que actúa en la última etapa del metabolismo del ácido tetrahidrofólico (Figura 15) (Michael *et al.*, 2006; van Hoek *et al.*, 2011).

Se han observado niveles basales de resistencia a trimetoprim debido a variantes cromosómicas del gen *folA*, codificante de la enzima DHFR (Skold, 2001; van Hoek *et al.*, 2011). Los altos niveles de resistencia se deben generalmente a la adquisición de manera horizontal de genes codificantes de una enzima dihidrofolato reductasa (*Dhfr* o *Dfr*). En base a su estructura se dividen estas enzimas en dos tipos: DfrA y DfrB. La familia DfrA se caracteriza por presentar una longitud de 157 aminoácidos, mientras que la familia DfrB suele presentar 78 aminoácidos. Actualmente se conocen seis familias codificadas en plásmidos, de las cuales el grupo *dfrA* alberga más de 30 genes distintos. Aunque hoy en día no se han descrito genes *dfrB* en *Salmonella*, que es una familia reducida a ocho genes hasta el momento (Partridge *et al.*, 2009), han sido secuenciados un total de 13 genes diferentes de *dfrA* en distintos serotipos. La mayor parte de ellos se encuentran localizados en integrones de clase 1 o clase 2, siendo *dfrA1*, *dfrA12* y *dfrA17* los más frecuentes (Michael *et al.*, 2006; Partridge *et al.*, 2009; van Hoek *et al.*, 2011).

## **4.- ELEMENTOS DE LA DISEMINACIÓN HORIZONTAL DE LA RESISTENCIA.**

La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede ser tipo intrínseca o adquirida. La *resistencia intrínseca* es aquella que presentan las poblaciones bacterianas de forma

natural, asociada a genes cromosómicos, tales como los codificantes de las beta-lactamasas AmpC inducibles o algunas bombas de eflujo.

La *resistencia adquirida* es aquella que presenta una población bacteriana de una manera no natural, sino como consecuencia de mutaciones en sus propios genes o tras recibir uno o más genes procedentes de otra bacteria resistente. Las poblaciones bacterianas pueden adquirir determinantes de resistencia mediante un mecanismo de transferencia horizontal. Estos mecanismos pueden ser procesos de conjugación (plásmidos y transposones conjugativos), transformación (DNA desnudo cromosómico o plásmidos) y transducción mediada por bacteriófagos (Alekhun & Levy, 2007; Kelly *et al.*, 2009; van Hoek *et al.*, 2011).

Los elementos genéticos móviles son segmentos de DNA que codifican las proteínas necesarias para mediar el movimiento del DNA entre genomas, desempeñando un papel importante en la evolución de éstos. A continuación se detallarán los elementos genéticos móviles implicados en los procesos de transferencia horizontal, como son los casetes génicos e integrones, los elementos genéticos transponibles (secuencias de inserción y transposones), los plásmidos, los elementos integrativos y conjugativos y por último, la Isla Genómica de resistencia (Frost *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2009).

#### **4.1.- Casetes génicos e integrones.**

Los integrones pueden ser definidos como mecanismos naturales de captación y expresión de genes que carecen de promotor (denominados casetes génicos, CG), por un mecanismo de recombinación sitio-específico. Están compuestos por tres elementos necesarios para su función de captura y expresión de los casetes génicos (Figura 16) (Cambray *et al.*, 2010; Cambray *et al.*, 2011; Partridge *et al.*, 2009):

- un gen que codifica una integrasa (*intI*), que pertenece a la familia de las tirosin-recombinasas y que media en la recombinación,
- un lugar de recombinación sitio-específica (*attI*), donde se produce la integración de los casetes génicos,
- y un promotor para la expresión de los genes integrados (P<sub>c</sub>). A veces los integrones poseen un segundo promotor más fuerte (P<sub>2</sub>), adyacente al primero y que incrementa el grado de expresión y transcripción de los casetes génicos incluidos.

Los casetes génicos (CG) son considerados pequeños elementos móviles, consistentes en una pauta abierta de lectura (“open reading frame”, *orf*) y un lugar de recombinación (*attC*). La *orf* comprende la mayoría de la longitud del casete génico, carece de promotor y codifica una función adaptativa. Hacia el extremo 3’ de ésta se encuentra el sitio de recombinación *attC*, cuya secuencia y longitud varía entre los diferentes casetes génicos. Estos casetes génicos pueden existir de manera transitoria en forma circular, pero no incluyen las funciones necesarias para su expresión y movimiento, por lo que son captados por los integrones (Partridge *et al.*, 2009; Stokes & Hall, 1989).

La integración de los nuevos casetes génicos se produce en el lugar de recombinación *attI* por un mecanismo de recombinación sitio-específica entre una secuencia *attI* y un lugar *attC* del casete génico. La expresión de estos casetes génicos queda bajo el control del promotor *P<sub>C</sub>*. Varios casetes génicos pueden insertarse en *tándem* en el mismo integrón, siempre en la misma orientación, y hemos de tener en cuenta que pueden llegar a escindirse, por una recombinación entre sitios *attC*.

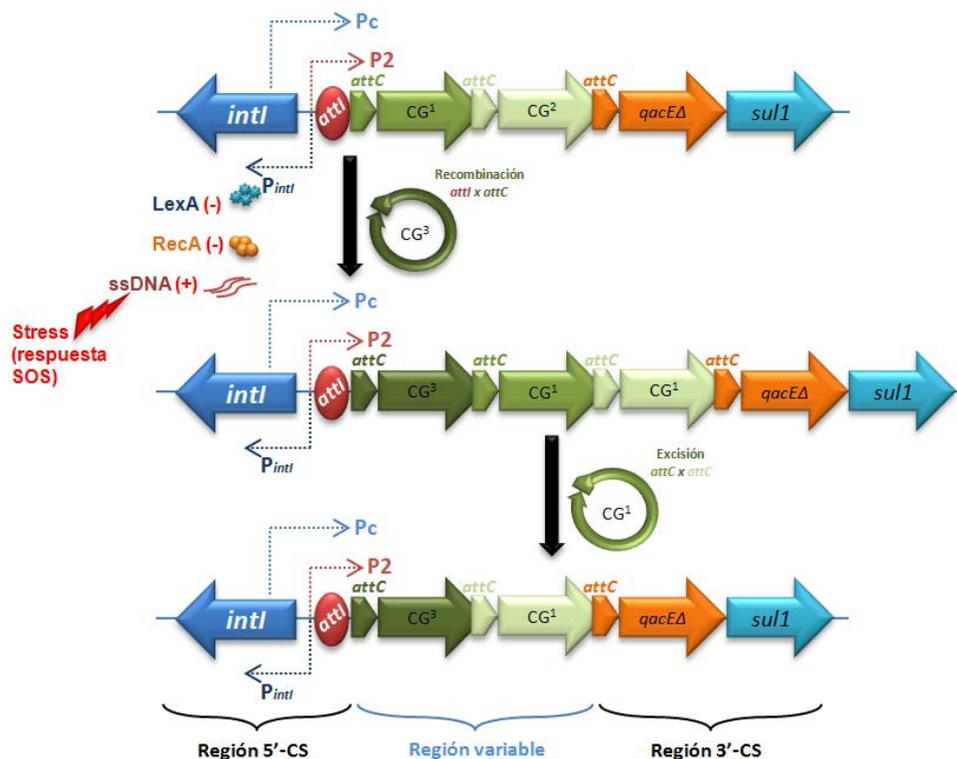


Figura 16.- Modelo de incorporación y escisión de casetes génicos de la estructura del integrón (Cambray *et al.*, 2011; Stalder *et al.*, 2012).

El fragmento *intI-attI* está altamente conservado en todos los integrones y se denomina segmento conservado 5’ (5’-CS). Es la región mínima necesaria para poder definir un integrón (Cambray *et al.*, 2011; Partridge *et al.*, 2009).

Aunque en un primer momento los integrones se identificaron como resultado de la asociación de genes de resistencia a antibióticos con elementos genéticos móviles (Stokes & Hall, 1989); posteriormente se encontró que están presentes en el cromosoma de un gran número de especies y constituyen un importante reservorio de elementos genéticos (Cambray *et al.*, 2010).

Hasta la fecha se han descritos dos grandes grupos de integrones. Por un lado, los *integrones cromosómicos* (CIs) han sido identificados en el genoma de varias especies bacterianas, prestando especial atención a los denominados *superintegrones* (SIs) identificados en *Vibrio* spp. y *Xantomonas* spp. Los superintegrones albergan entre 20 a 200 casetes génicos, la mayoría de ellos de función desconocida (Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Rowe-Magnus & Mazel, 2001; Stalder *et al.*, 2012).

Los denominados *integrones móviles* o *integrones de multiresistencia* (MIs) contienen unos pocos (entre dos y ocho) casetes génicos que codifican resistencia a diversos antibióticos. Se han descrito en un gran número de bacterias Gram-negativas, pero solo esporádicamente en algunas Gram-positivas. Dentro de este grupo, y en función de la secuencia aminoacídica de la proteína IntI, se han descrito cinco clases de integrones: clase 1 (*intI1*), clase 2 (*intI2*), clase 3 (*intI3*), clase 4 (*intISXT* o *intI9*) y clase 5 (*intIHS*); siendo las más comunes las clases 1, 2 y 3. Estos integrones móviles suelen estar asociados a transposones y plásmidos conjugativos, de manera que su dispersión queda asegurada (Cambray *et al.*, 2010; Stalder *et al.*, 2012).

Los integrones de clase 1 han sido ampliamente estudiados debido a su amplia distribución entre bacterias Gram-negativas de interés clínico, asociados a su vez a transposones derivados del transposón *Tn402* o de la familia *Tn3* (*Tn21*, *Tn1696*), que median en su dispersión (Stalder *et al.*, 2012). Todos los integrones de clase 1, definidos por su integrasa *intI1*, poseen la región 5' altamente conservada (5'-CS); además, muchos de ellos, denominados como integrones de clase 1 "clásicos" poseen una zona 3' con los genes *qacEΔ1* y *sul1*, de resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfamidas, respectivamente (Figura 16). Esta zona se denomina segmento conservado 3' (3'-CS) (Cambray *et al.*, 2010; Cambray *et al.*, 2011; Stalder *et al.*, 2012).

Tal y como se ha dicho, los casetes génicos carecen de promotor y se transcriben a partir de un promotor común, Pc (o también denominado Pant), localizado en la región codificante de la integrasa de tipo 1 (Figura 16). Se han descrito trece variantes de promotor

Pc de distinta fuerza en función de las secuencias de los hexámeros -35, -10 y -10-extendida; aunque son cuatro las variantes que predominan: PcS (promotor fuerte), PcW (promotor débil), PcW<sub>TGN-10</sub> (promotor que contiene las secuencias -35 y -10 del promotor de tipo PcW con el motivo -10 TGN extendido) y PcH1 (promotor híbrido que contiene el motivo -35 como PcW y el motivo -10 como el promotor PcS). Además, algunos integrones de clase 1 pueden albergar adicionalmente un segundo promotor, denominado P2 y localizado a 90 pb debajo del primer promotor Pc que se caracteriza por la inserción de tres residuos de guanina G que incrementa el espacio entre los sitios -35 y -10 hasta el espaciado óptimo de 17 pb (Guérin *et al.*, 2011; Jové *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2009). La fuerza de estos promotores, y de la combinación de los mismos, se correlaciona con la actividad de escisión de la integrasa: cuanto más débil es el promotor, mayor capacidad de escisión e incorporación de casetes génicos muestra la integrasa (Cambrey *et al.*, 2010; Jové *et al.*, 2010). Hay que destacar, que el análisis transcriptómico muestra que la posición del casete génico en el tándem formado determina su expresión; así, aquellos casetes génicos más cercanos al promotor Pc se expresan en mayor medida, disminuyendo el nivel de expresión al alejarse la posición del promotor (Jové *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2009). Asimismo se ha observado que algunos casetes génicos pueden desplazarse hasta las primeras posiciones del integrón tras la exposición a antibióticos que los seleccionan. Esta reorganización puede darse vía una escisión-recombinación mediada por la integrasa o bien por un proceso de recombinación homóloga (Partridge *et al.*, 2009; Rowe-Magnus & Mazel, 2001).

Seguramente la presión antibiótica ha sido determinante en la dispersión y selección de los integrones. Actualmente, se han descrito genes codificantes de resistencia a varias familias de antibióticos, tales como beta-lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim, cloranfenicol, fosfomicina, macrólidos, lincosamidas, rifampicina y quinolonas, así como resistencia a metales pesados dentro de integrones de este tipo (Partridge *et al.*, 2009; Stalder *et al.*, 2012).

En los últimos años se han llevado a cabo varios estudios *in vitro* que demuestran que la presión antibiótica es capaz de inducir la transcripción de la integrasa, vía respuesta SOS, y por tanto favorecer la recombinación de casetes génicos (Guérin *et al.*, 2009). Tal y como se muestra en la Figura 16, la respuesta SOS es una red de regulación, activada por una situación de stress, como puede ser el daño al DNA debido a antibióticos como fluoroquinolonas, beta-lactámicos, trimetoprim o aminoglucósidos. En condiciones normales, la proteína LexA se une a un lugar específico (LexA box), que está superpuesto parcialmente con el promotor de la

integrasa *Pint1* y bloquea la transcripción de *int1*. De una manera sencilla, podemos decir que en situaciones de stress celular, donde el DNA sufre daño, hay presencia de fragmentos de cadena sencilla (ssDNA) que se unen a la proteína RecA, permitiendo que ésta inactive LexA por un proceso autocatalítico. La ausencia de LexA reprimiendo la transcripción de *int1*, activa su expresión y por tanto los fenómenos de recombinación y escisión mediados por la integrasa. Parece ser, por tanto, que la respuesta SOS, que media en gran número de procesos como la activación de factores de virulencia, transposones o islas de patogenicidad, también está presente en la expresión de la proteína integrasa de estos elementos genéticos móviles, e incluso se marcan hipótesis en función de la fuerza del promotor de éstos (Cambray *et al.*, 2011; Guérin *et al.*, 2009; Guérin *et al.*, 2011).

Los integrones han sido clasificados y nombrados y se encuentran todos estos datos disponibles en la base de datos INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>).

#### **4.2.- Elementos genéticos transponibles.**

Los elementos genéticos transponibles son elementos genéticos móviles que poseen la maquinaria necesaria (la enzima transposasa y las proteínas reguladoras) para poder trasladarse desde un sitio dador a un sitio receptor dentro del propio genoma, sin necesidad de homología entre estas localizaciones. Estos elementos contienen genes accesorios entre los que se encuentran genes de resistencia a antibióticos (Roberts *et al.*, 2008; Wagner, 2006).

Estos elementos pueden dividirse dos grandes grupos:

- secuencias de inserción (IS): son los elementos más sencillos, cuyo tamaño oscila entre 700 y 1000 pb. Poseen una secuencia central con información para la transposasa y en los extremos secuencias repetidas de entre 10 y 40 pb en orden inverso (Figura 17).
- Transposón compuesto (Tn): son mayores que las secuencias de inserción y contienen un elemento de inserción (IS) en cada extremo en orden directo o inverso y una región central que puede contener información, como genes de resistencia a antibióticos. Su tamaño oscila entre 2-50 kb (Figura 17).

Existe un gran número de tipos de transposones o familias, así como de secuencias de inserción que se recogen en la base de datos ISFinder ([www-is.biotoul.fr](http://www-is.biotoul.fr)).

La transposición puede darse mediante dos mecanismos. Un mecanismo denominado transposición conservativa, en el cual el transposón sale de un lugar del genoma que queda

vacío y se incorpora a su nueva localización, sin incremento en el número de copias de este transposón en la célula. Por otra parte, el mecanismo de transposición replicativa, implica que el transposón queda en su lugar de origen y mediante un mecanismo de replicación-recombinación aparece una nueva copia del mismo en otro lugar del genoma bacteriano. De este modo, aumenta el número de copias del transposón en el interior de la bacteria (Bennett, 2004).



Figura 17.- Estructura básica de los elementos transponibles.

Además de las secuencias de inserción y los transposones, existe otro tipo de elementos genéticos móviles con capacidad de transposición, pero que se realiza por el mecanismo de transposición por círculo rodante. Estos elementos son los ISCR (Figura 17), capaces de movilizar DNA localizado en su extremo terminal (Bennett, 2008; Toleman *et al.*, 2006). Estos elementos fueron descubiertos en los años noventa localizados adyacentes a la región 3'-CS de integrones de clase 1 y fueron denominados "common regions" (CRs). Posteriormente, se observó una similitud parcial con algunas secuencias de inserción IS, especialmente con aquellas de la familia IS91, por lo que pasaron a conocerse como ISCR. Se caracterizan porque carecen de las IR características de las IS convencionales y en su lugar tienen en sus extremos finales las secuencias *oriIS* y *terIS*. El mecanismo de transposición por círculo rodante les permite movilizar secuencias a las que está próxima, provocando de esta manera reorganizaciones génicas y movilizar genes de resistencia desde cualquier localización (Toleman *et al.*, 2006; Toleman & Walsh, 2011).

#### 4.3.- Plásmidos.

Los plásmidos pueden definirse como moléculas de DNA extracromosómico y de cadena doble, generalmente circulares, que tienen replicación y transcripción autónoma de la

bacteria hospedadora. Los plásmidos no codifican funciones esenciales para la supervivencia bacteriana, pero sí genes que otorgan ventajas selectivas, como pueden ser genes de resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados o de virulencia. Están presentes en casi todas las especies bacterianas y su tamaño varía desde unos pocos pares de bases (2 kb) hasta unos 400 Kb (Bennett, 2008; Carattoli, 2009; Leplae *et al.*, 2004).

Podríamos decir que todos los plásmidos poseen una parte conservada o esqueleto plasmídico (“plasmid backbone”). Este esqueleto es característico de cada tipo de plásmido y está formado por el conjunto de genes que aporta el plásmido y que sirven para su mantenimiento, replicación y dispersión; puesto que las enzimas DNA polimerasas, ligasas y helicasas las aporta la bacteria huésped. Siguiendo un modelo de mosaico, podemos encontrar las siguientes zonas o módulos que pueden verse en la Figura 18 (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011; Thomas, 2000).

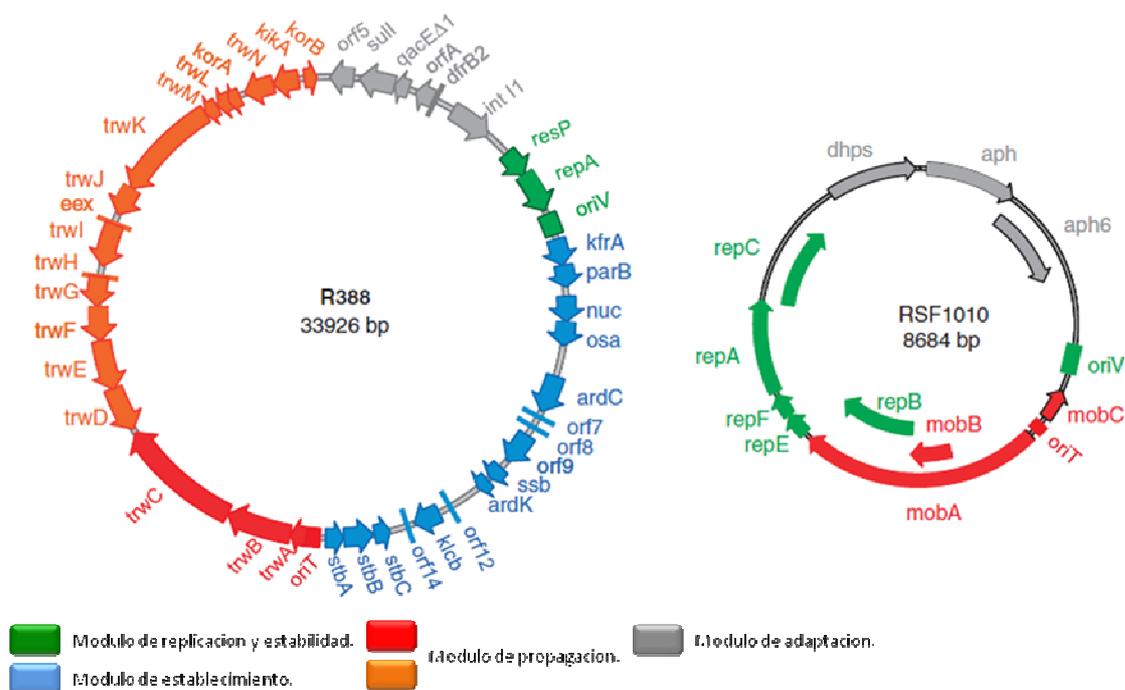


Figura 18.- Organización modular de un plásmido conjugativo (R388) y uno movilizable (RSF1010) (tomada de Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

**Módulo de replicación. Replicón.** Es el elemento genético que controla el número de copias del plásmido y su estabilidad en distintos hospedadores (denominado “host-range”). En esta región se encuentra el origen de replicación *ori*, los genes que codifican las proteínas necesarias para el origen de la replicación (*rep*) y las proteínas de unión al *ori* y a los factores de regulación. Existen tres mecanismos principales mediante los cuales los plásmidos pueden

replicarse: replicación theta ( $\Theta$ ), replicación por círculo rodante o por desplazamiento de hebras. Aunque no vamos a entrar en explicar cada tipo de replicación, es importante destacar que el tipo de replicación es específico de cada plásmido y viene determinado por las proteínas codificadas en la región o módulo de replicación, que a su vez determina el rango de hospedador donde el plásmido puede habitar (del Solar *et al.*, 1998; del Solar & Espinosa, 2000; Kües & Stahl, 1989). Hay que decir, que dos plásmidos que poseen igual mecanismo de replicación son incompatibles, es decir, no pueden cohabitar en la misma célula huésped; sin embargo, también existen plásmidos, denominados multirreplicón, que poseen más de un origen de replicación, aunque no ambos tienen por qué ser funcionales (Alvarado *et al.*, 2012; Carattoli, 2009).

Módulo de estabilidad. Los plásmidos con bajo número de copias codifican sistemas de estabilidad, encargados de asegurar una correcta segregación de los plásmidos entre las células hijas; mientras que los plásmidos de alto número de copias son segregados por una distribución aleatoria. En la región de estabilidad se codifican las proteínas encargadas de asegurar esta herencia estable. Estos mecanismos comprenden los mecanismos de resolución de multímeros, sistemas de muerte post-segregacional o sistemas de partición. Aunque estos sistemas funcionan de manera distinta, su finalidad de conservar la herencia del plásmido a lo largo de las generaciones bacterianas estable es la misma.

Los sistemas de resolución de multímeros, incluidos en muchos de los plásmidos que poseen replicación theta, previenen de la formación de dímeros o multímeros cuando existen más de una copia por célula del plásmido, en lo que se ha denominado por algunos autores como “la catástrofe del dímero”, al heredar una de las células hijas el multímero plasmídico y dejar vacía a la otra célula hija (Dmowski, 2009; Sengupta & Austin, 2011).

Los sistemas de muerte post-segregacional pueden subdividirse en aquellos regulados por RNAs antisentido (post-segregational killing, PSK), como los sistemas *hok-sok* o *pnd*; o bien aquellos sistemas regulados por un sistema toxina-antitoxina (TA), también denominados sistemas de adición plasmídica. En ambos casos el mecanismo de acción general es la síntesis de un regulador antagonista que neutraliza una toxina. La toxina puede ser un RNA antisentido (sistemas PSK) o una proteína (sistemas TA). Su función en los plásmidos es la muerte post-segregacional de aquellas células hijas que no hayan heredado el plásmido; mientras que podemos encontrarlos en el cromosoma con una función de muerte celular programada como respuesta ante situaciones de stress celular (Engelberg-Kulka & Glaser, 1999; Gerdes *et al.*, 2005; Hayes, 2003; Sengupta & Austin, 2011).

Finalmente, los sistemas de partición, denominados genéricamente sistemas *parA-parB* o sistemas *par*, son los encargados de repartir las copias del plásmido de manera equitativa entre las células hijas, mediante un sistema similar al sistema mitótico en las células eucariotas de formación de filamentos de naturaleza proteica (Dmowski, 2009; Malik & Henikoff, 2009; Moller-Jensen & Gerdes, 2007; Schumacher, 2007; Sengupta & Austin, 2011).

Módulo de conjugación o propagación. De acuerdo a la capacidad de transmisión de un plásmido mediante conjugación se describen dos tipos de plásmidos: conjugativos y movilizables. En el proceso de conjugación es necesaria la ruptura del DNA a transferir en un lugar denominado origen de transferencia *oriT*, mediante una proteína denominada relaxasa. Como resultado de la reacción, la proteína y el DNA se unen covalentemente y la nucleoproteína es transportada a la célula receptora por un sistema de secreción de tipo IV (T4SS) y gracias a la acción impulsora de una proteína acopladora (T4CP) (Llosa *et al.*, 2002; Smillie *et al.*, 2010). Cuando un plásmido codifica totalmente la maquinaria de conjugación descrita, es denominado auto-transmisible o *conjugativo*; mientras que aquellos plásmidos que contienen los mínimos genes necesarios para ser transferidos por conjugación y requieren la ayuda y maquinaria de un plásmido conjugativo, son denominados *movilizables*. Éstos solo poseen el lugar *oriT*, algún gen de relaxasa y una o más proteínas accesorias que se encargan de la ruptura de las hebras. Mientras que los plásmidos conjugativos tienen tamaños mayores de 30 kb y están presentes en bajo número de copias en la célula; los plásmidos movilizables son menores (10-15 kb máximo) y están presentes en alto número de copias.

De modo general, podemos decir que todos los plásmidos transmisibles poseen una región de movilización (denominada *mob/mbe* en los plásmidos movilizables y *tra/trw* en los conjugativos) y un origen de transferencia *oriT*; mientras que los plásmidos auto-transmisibles poseen además las proteínas necesarias para la formación del canal de transferencia y el bombeo del DNA a través de él (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; Garcillán-Barcia *et al.*, 2011; Smillie *et al.*, 2010).

Módulo de establecimiento. El esqueleto de los plásmidos conjugativos tiene más genes de los que son requeridos para la replicación, la estabilidad y la propagación. De hecho, la mayoría de este tipo de plásmidos parecen tener una región adicional de DNA de un tamaño entre 10 y 20 kb que contiene genes relacionados con el mantenimiento del plásmido en condiciones *in vivo*. Estos genes, denominados genes de establecimiento, están altamente conservados en distintos tipos de plásmidos y se localizan en la región líder de conjugación, es decir, en la primera parte que entra en la célula hospedadora en el proceso de conjugación.

Entre ellos, se han estudiado el operón *stbABC*, genes homólogos a *ardA*, *klcA/ardB*, *psiB*, etc., que codifican funciones de protección y estabilidad del DNA plasmídico en la célula hospedadora y que ven esta estabilidad afectada cuando muestran mutaciones. Diversos autores coinciden en que todavía estamos lejos de comprender completamente la importancia de estos genes (Fernández-López *et al.*, 2006; Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

Módulo de adaptación. Esta es la región más variable del plásmido puesto que contiene los genes adicionales, como genes de resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados o virulencia, entre otros. Si nos centramos en los plásmidos que albergan genes de resistencia, se puede ver cómo hay plásmidos que comparten el mismo esqueleto, pero que en ciertos puntos, denominados “puntos calientes”, hay inserciones de genes de resistencia (Carattoli, 2009; Garcillán-Barcia *et al.*, 2011). Sin embargo, portar genes de resistencia no está libre de coste, sino que afecta al coste biológico del plásmido. Mientras que hay estudios que demuestran la pérdida total o parcial de estos genes de resistencia durante experimentos de evolución en ausencia de presión de antibiótico (Andersson & Hughes, 2010; Brown *et al.*, 1991; Dahlberg & Chao, 2003; Godwin & Slater, 1979; Subbiah *et al.*, 2011); otros estudios apuntan a mutaciones compensatorias que pueden disminuir este coste biológico sin pérdida de la resistencia (Andersson & Levin, 1999; Hossain *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2011); o que incluso algunos plásmidos imponen un bajo coste biológico (Cottell *et al.*, 2012). Muchos de estos plásmidos, que poseen genes de resistencia han sido incluidos en la base de datos ACLAME (<http://aclame.ulb.ac.be>) (Leplae *et al.*, 2006).

En función del replicón de cada plásmido, en 1988 Couturier *et al.* desarrollaron un método de tipado de plásmidos en enterobacterias, basado en la hibridación con sondas específicas diseñadas sobre los replicones de plásmidos tipo. Este método, muy tedioso, poseía una baja especificidad debido a reacciones de hibridación cruzadas. Propuesto en principio por Götz *et al.*, 1996 y posteriormente por Carattoli *et al.*, 2005 se desarrollaron métodos de tipado mediante la técnica de PCR con cebadores diseñados en la región de replicación. Este último método, conocido como “Inc/rep PCR-based replicon typing (PBRT)” está en continua actualización, como demuestran los últimos artículos en los que se proponen cebadores adicionales para abarcar un mayor número de replicones (Carattoli *et al.*, 2005; García-Fernández *et al.*, 2009; Villa *et al.*, 2010). En algunos casos, como para los replicones IncF, IncN, IncI1, IncHI1 e IncHI2, se han propuesto cebadores adicionales para lograr un subtipado de los plásmidos mediante PCR, posterior secuenciación y comparación con la base de datos recogida en <http://pubmlst.org/plasmid/> (García-Fernández *et al.*, 2008; García-

Fernández & Carattoli, 2010; García-Fernández *et al.*, 2011; Villa *et al.*, 2010). Esta técnica, inicialmente desarrollada para el estudio epidemiológico de plásmidos en cepas clínicas de enterobacterias, no está exenta de limitaciones, puesto que podemos encontrar plásmidos multirreplicón, se limita a los replicones clásicos descritos en enterobacterias, una mutación puede alterar el grupo de incompatibilidad y promover que dos plásmidos a priori incompatibles se tornen compatibles; y además, debemos tener en cuenta que existen mecanismos de replicación alternativos no fácilmente identificables y que por esta técnica no es posible detectarlos (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

Muy recientemente se ha descrito un método alternativo de tipado de plásmidos, basado en la secuencia nucleotídica de las proteínas relaxasa (MOB) que median en la conjugación plasmídica. Las proteínas relaxasa de un gran número de plásmidos de gamma-proteobacteria contenidos en la base de datos GenBank fueron clasificadas previamente en seis familias de proteínas de acuerdo a su filogenia (Francia *et al.*, 2004; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; Smillie *et al.*, 2010) y han servido para el desarrollo del método denominado "Degenerate Primer MOB Typing, DPMT", basado en la técnica de PCR con 19 pares de cebadores degenerados (Alvarado *et al.*, 2012). Mediante esta técnica se detectan no solo la mayor parte de los grupos Inc/Rep, sino también plásmidos que previamente no habían sido asignados a ningún grupo de incompatibilidad. Además, ofrece un análisis filogenético de una región altamente conservada en el esqueleto de cada plásmido, la región de conjugación; y ofrece la posibilidad de clasificar aquellos elementos móviles que poseen proteína relaxasa pero no son considerados plásmidos, como las secuencias ICE. Este método no puede detectar aquellos plásmidos no-transmisibles (estimados en el 50% de los plásmidos existentes), puesto que no poseen los genes de movilidad *mob/mbe* (Alvarado *et al.*, 2012; Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

En todo caso, ambos métodos de tipado no son excluyentes, sino complementarios, puesto que analizan características distintas de los plásmidos. Varios estudios han sido ya publicados analizando los plásmidos desde los dos puntos de vista con la finalidad de análisis epidemiológico (Mata *et al.*, 2010; Valverde *et al.*, 2009).

Además de su implicación en la diseminación de genes de resistencia y elementos móviles tales como integrones (Carattoli, 2011; Schultsz & Geerlings, 2012; Strahilevitz *et al.*, 2009), no debemos olvidar que en alguno de los serotipos de *Salmonella*, por ser la bacteria que nos ocupa, aparecen plásmidos de virulencia (Chu & Chiu, 2006; Feng *et al.*, 2012; Rychlik *et al.*, 2006). Éstos a su vez pueden adquirir determinantes de resistencia, o incluso plásmidos

de resistencia pueden adquirir determinantes de virulencia, para dar lugar a plásmidos híbridos virulencia-resistencia (Guerra *et al.*, 2002; Herrero *et al.*, 2008a; Herrero *et al.*, 2008b; Mendoza *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2011).

#### **4.4.- Elementos integrativos y conjugativos (ICEs).**

Los elementos integrativos y conjugativos (ICE), también denominados transposones conjugativos, son elementos genéticos móviles que en su mayor parte contienen un origen de transferencia y los genes necesarios para mediar en la conjugación. A diferencia de los plásmidos, la mayoría de ellos no contienen un origen de replicación, por lo que se integran en cromosoma o en plásmidos para poder replicarse con ellos. Esto les confiere una ventaja sustancial respecto a los plásmidos, puesto que al no poseer origen de replicación, muestran un mayor rango de hospedador (Guglielmini *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2010; Toleman & Walsh, 2011; Wozniak & Waldor, 2010). Estos elementos muestran una gran diversidad y capacidad de portar largos segmentos de DNA que contienen genes de resistencia, transposones, integrones o elementos ISCR (Toleman & Walsh, 2011).

#### **4.5.- Isla Genómica de resistencia de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1).**

Las islas genómicas de resistencia son agrupaciones físicas y funcionales de genes de resistencia incluidas en el grupo de los elementos integrativos y movilizables (IMEs). En el caso de *Salmonella*, la estructura denominada “Isla Genómica de resistencia de *Salmonella* de tipo 1, SGI1” es uno de los ejemplos más representativos y relevantes debido a su emergencia y a su implicación en la dispersión de multirresistencia a nivel internacional (Beutlich *et al.*, 2011; Miriagou *et al.*, 2006).

La SGI1, identificada por primera vez en el año 2000 en cepas multi-resistentes de *S. Typhimurium* fagotipo DT104, es una región cromosómica movilizable de 43 kb flanqueada por repeticiones directas imperfectas de 18 pb y localizada entre los genes *thdF* y *yidY* del genoma de *S. Typhimurium* (Figura 19, Figura 20) (Boyd *et al.*, 2001; Mulvey *et al.*, 2006). En los últimos años se han encontrado lugares alternativos de integración de la SGI1, lo que explica su alta dispersión no solo en varios serotipos de *Salmonella*, tales como Agona, Albany, Paratyphi B, Newport, Derby, Emek, Infantis, etc, sino también en *Proteus mirabilis* (Ahmed *et al.*, 2007; Doublet *et al.*, 2008; Kiss *et al.*, 2012).

Contiene 44 *orfs*, no todas ellas de función conocida y que presentan función de recombinación, replicación, transferencia conjugativa, regulación o resistencia a los

antibióticos. Los genes de resistencia están incluidos en un segmento de 13 kb localizado en el extremo 3' de la SGI1 (Figura 19). Esta región tiene estructura de integrón complejo del grupo In4, denominado In104, que confiere un fenotipo de pentaresistencia a ampicilina (conferido por el gen de resistencia *bla*<sub>PSE-1</sub>), cloranfenicol (*floR*), estreptomina (*aadA2*), sulfamidas (*sul1*) y tetraciclina [*tet*(G)], característico de la cepa pandémica *S. Typhimurium* DT104. El integrón complejo In104 se subdivide a su vez en dos integrones, InC e InD. El integrón InC contiene el casete génico *aadA2*, mientras que el casete génico *sul1* de su región 3'-CS se encuentra delecionado. Por otra parte, el integrón InD, cuyo gen integrasa *int1* se encuentra delecionado por *groEL*, porta el casete génico *bla*<sub>PSE-1</sub> y en su segmento 3'-CS el casete génico *sul1* intacto. Flanqueados por ambos integrones se encuentran los genes de resistencia *floR* y *tet*(G) (Boyd *et al.*, 2001; Mulvey *et al.*, 2006; Targant *et al.*, 2010b).

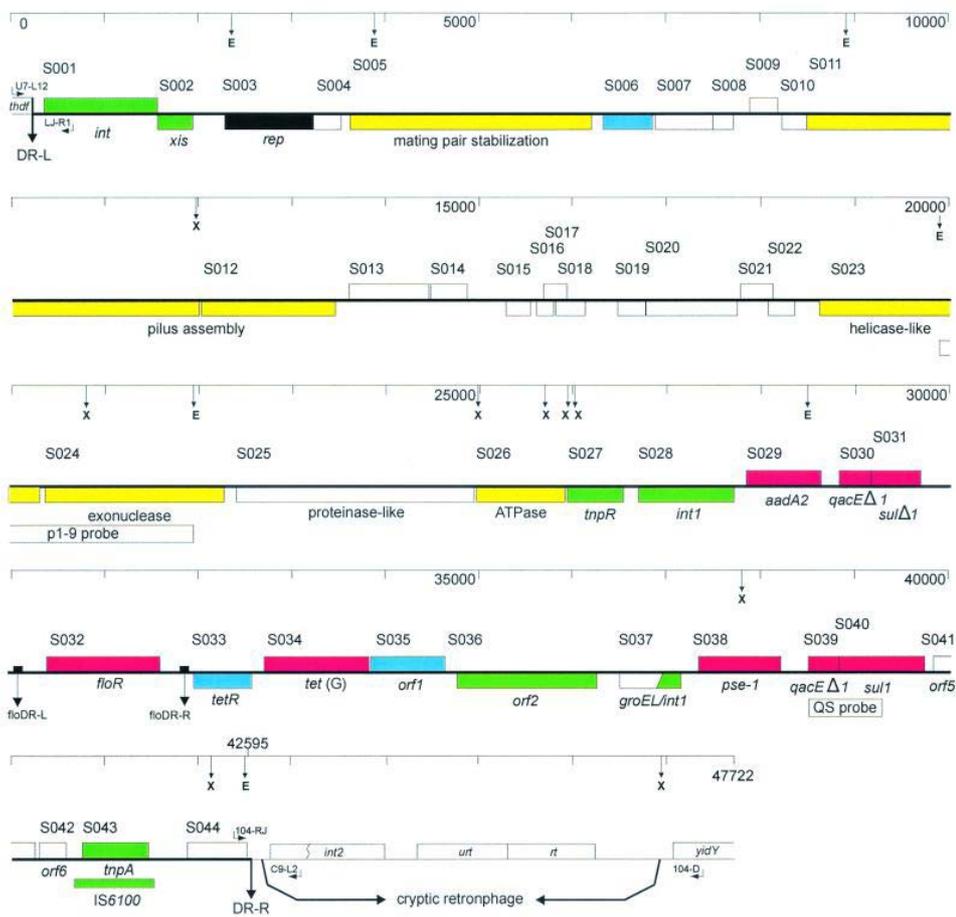


Figura 19.- Representación lineal de la SGI1 y regiones flanqueantes. Los genes de resistencia están coloreados en fucsia (tomado de Boyd *et al.*, 2001).

Hasta la actualidad se han descrito diversas variantes de SGI1, denominadas SGI1-A hasta SGI1-V (Kiss *et al.*, 2012) que aparecen probablemente debido a procesos de

recombinación entre segmentos de DNA homólogos y a la presencia de elementos ISCR en la SGI1 (Beutlich *et al.*, 2011; Doublet *et al.*, 2005; Kiss *et al.*, 2012; Mulvey *et al.*, 2006; Toleman *et al.*, 2006).

Varios estudios demuestran la capacidad de la SGI1 de circularizarse y de ser transferida de manera horizontal ayudada por plásmidos conjugativos de tipo IncA/C (Figura 20). Por tanto, la importancia de la SGI1 radica en que es un potente elemento de dispersión del fenotipo de pentaresistencia (variable tal y como puede verse en las distintas variantes de la isla), así como su capacidad de conjugación en diversos sitios de inserción potenciales en bacterias patógenas como *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Brucella* spp. o *Klebsiella pneumoniae*, que no limitan su aparición tan solo en el género *Salmonella* (Douard *et al.*, 2010; Doublet *et al.*, 2005; Doublet *et al.*, 2008; Kiss *et al.*, 2012).

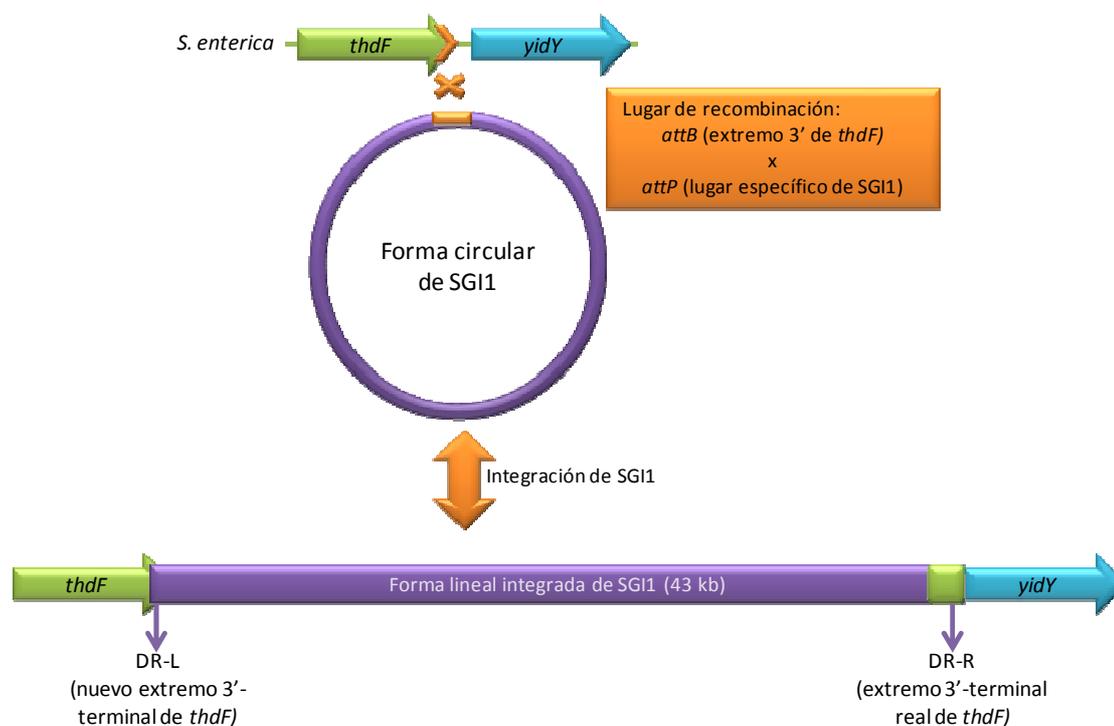


Figura 20.- Modelo de integración y escisión sitio-específico de SGI1 (adaptada de Doublet *et al.*, 2005).



# **Objetivos**

*“El investigador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo  
que encuentra”*

*Claude Bernard*



## **OBJETIVOS**

1. Análisis del fenotipo de resistencia a antibióticos y su relación con el serotipo en aislados clínicos de *S. enterica*.
2. Caracterización de los aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> de hospitales de diferentes localizaciones geográficas españolas.
  - 2.1. Analizar los mecanismos de resistencia a beta-lactámicos y a otros antibióticos.
  - 2.2. Detectar y caracterizar los integrones.
3. Caracterización de cepas de *S. enterica* portadoras del gen de resistencia a beta-lactámicos *bla*<sub>PSE-1</sub>.
  - 3.1. Tipificar molecularmente las cepas.
  - 3.2. Estudiar la presencia de la Isla Genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1).
  - 3.3. Determinar sus factores de virulencia (virulotipos).
4. Estudio de cepas de *S. enterica* con fenotipo de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro.
  - 4.1. Caracterizar los genes codificantes de BLEEs y de AmpC y sus entornos genéticos.
  - 4.2. Determinar el fenotipo y genotipo de resistencia a otras familias de antibióticos.
  - 4.3. Caracterizar los integrones.
  - 4.4. Estudiar los plásmidos portadores de los genes *bla*.
  - 4.5. Analizar la estabilidad de los fenotipos BLEE/AmpC en ausencia de presión antibiótica selectiva.
5. Selección *in vivo* de resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos en una cepa de *S. enterica* serotipo Typhimurium y caracterización del plásmido portador del gen *aac(6′)-Ib-cr4*. Estudio de un caso clínico.

## **OBJECTIVES**

1. Analysis of the antibiotic resistance phenotype and its relation with the serotype in clinical *S. enterica* isolates.
2. Characterization of the ampicillin-resistant *S. enterica* isolates from geographically distant Spanish hospitals.
  - 2.1. To analyze the mechanisms of resistance to beta-lactams and other antibiotics.
  - 2.2. To detect and characterize the integrons.
3. Characterization of *S. enterica* strains carrying the *bla*<sub>PSE-1</sub> beta-lactam resistance gene.
  - 3.1. To carry out the molecular typing of the strains.
  - 3.2. To study the presence of the *Salmonella* Genomic Island Type 1 (SGI1).
  - 3.3. To determine the virulence content (virulotypes).
4. Study of the *S. enterica* strains displaying a broad-spectrum cephalosporin-resistant phenotype.
  - 4.1. To characterize the genes encoding ESBL and AmpC and their genetic environments.
  - 4.2. To determine the phenotype and genotype of resistance to other antibiotic families.
  - 4.3. To characterize integrons.
  - 4.4. To study plasmids carrying the *bla* genes.
  - 4.5. To analyze the stability of the ESBL/AmpC phenotype in the absence of antibiotic selection pressure.
5. *In vivo* selection of resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides in a *S. enterica* serotype Typhimurium strain and characterization of the plasmid carrying the *aac(6′)-Ib-cr4* gene. A case report.

# ***Material y Métodos***

*“Tened paciencia y tendréis ciencia”*

*Baltasar Gracián*



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1.- AISLADOS DE *Salmonella enterica* ESTUDIADOS Y MUESTRAS ANALIZADAS.**

#### **1.1.- Aislados clínicos de *Salmonella enterica*.**

Un total de 364 aislados clínicos de *S. enterica* fueron analizados en este trabajo gracias a la colaboración con seis hospitales españoles: Hospital San Pedro de Logroño (Dra. Ester Undabeitia); Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (Dr. Javier Castillo y Dra. Cristina Seral); Hospital Gregorio Marañón de Madrid (Dra. Emilia Cercenado); Hospital Universitario Central de Asturias (Dra. Marta Lantero); Complejo Hospitalario de Pontevedra (Dra. Marta García-Campello) y Hospital Royo Villanova de Zaragoza (Dra. Carmen Aspiroz).

##### **1.1.1.- Aislados no seleccionados de *S. enterica*.**

Se obtuvieron 158 aislados procedentes del Laboratorio de Microbiología del Hospital San Pedro (HSP) de Logroño durante el período septiembre 2007- diciembre 2009 y 122 aislados procedentes del Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) de Zaragoza durante el período septiembre 2009 a noviembre 2010. Estos aislados fueron seleccionados en el hospital de origen sin restricción en cuanto al fenotipo que presentaban y todos ellos procedían de muestras fecales, salvo 4 aislados de muestras de orina y un aislado de una muestra de sangre. En el HSP de Logroño se enviaron las muestras para serotipar al Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III) de Madrid; mientras que en el HCULB de Zaragoza, donde se disponía de una gran cantidad de sueros, el serotipado fue realizado en el propio hospital.

##### **1.1.2.- Aislados seleccionados por su fenotipo de resistencia: AMP<sup>R</sup>, AMC<sup>R</sup>.**

Se estudiaron 29 aislados recogidos en los períodos 2004-2005 y 2007-2009 procedentes del Complejo Hospitalario de Pontevedra (CHP) y 46 aislados del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGM) de Madrid (período 2007-2009) y 5 aislados del Hospital Royo Villanova (HRV) de Zaragoza. Estos aislados fueron seleccionados en los hospitales de origen por presentar valores de resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico superiores a >16/8 mg/L y todos ellos fueron tomados de muestras de heces, a excepción de 3

aislados procedentes de muestras de sangre. En todos estos hospitales se enviaron las muestras para serotipar al Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III) de Madrid.

### **1.1.3.- Otros aislados incluidos.**

Además, 4 aislados procedentes de muestras fecales de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Asturias (HUCA) fueron remitidos por los hospitales de origen por ser sospechosos de presentar un fenotipo de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE).

## **2.- MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN.**

A lo largo del trabajo reflejado en la presente tesis doctoral, se han utilizado los siguientes medios de cultivo y pruebas de identificación bacteriana.

### **2.1.- Medios de cultivo.**

Brain Heart Infusion (BHI) agar y caldo (Difco): se empleó para el crecimiento de *Salmonella*.

Müller-Hinton (MH) agar y caldo (Difco): se empleó para la determinación de la sensibilidad a antibióticos.

Luria-Bertani (LB) agar y caldo (Sigma): medio empleado para el crecimiento de *S. enterica* y para la selección de transformantes (TF).

Agua de peptona tamponada (Scharlau): medio líquido de preenriquecimiento, previo al enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp. La presencia del tampón fosfato en su formulación permite mantener un pH elevado durante el periodo de incubación y revivificar las células que puedan presentar una creciente sensibilidad a los pH ácidos. Tras la incubación en este medio, se debe sembrar una alícuota en el medio de enriquecimiento selectivo adecuado.

Vassiliadis Rappaport caldo (VR) (Pronadisa-Conda): medio líquido para el enriquecimiento de *Salmonella* a partir de muestras fecales y diversos materiales no clínicos tales como alimentos y aguas residuales. Tras la inoculación de cultivo previamente enriquecido (por ejemplo en agua de peptona tamponada), se incuba 18-48 h, tiempo tras el cual se puede detectar el

crecimiento por el aspecto lechoso del medio o por la turbidez. Es necesaria la inoculación sobre medios selectivos adecuados para *Salmonella*, así como otros medios menos selectivos como MacConkey agar.

MacConkey agar (McC) (Difco): medio selectivo diferencial que permite distinguir bacterias Gram negativas fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, fue utilizado en el aislamiento e identificación de muestras fecales de individuos sanos. Las cepas lactosa positivas se visualizan de color rosa y las lactosa negativas de color marrón.

Shigella-Salmonella agar (SS) (Difco): medio empleado para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Estas especies son no fermentadoras de la lactosa, por lo que forman colonias incoloras en este medio. Las especies de *Salmonella* son productoras de sulfuro de hidrógeno y desarrollan colonias de centro oscuro.

Hektoen agar (HK) (Pronadisa-Conda): medio diferencial y selectivo para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*, basado en la reacción de fermentación de lactosa y la producción de H<sub>2</sub>S. Tras la incubación de las placas, *Shigella* spp. se muestra como colonias verdes translúcidas y húmedas; *Salmonella* spp. como colonias azul-verdosas con centro negro y aquellas bacterias coliformes se muestran como colonias de color salmón-rosáceo rodeadas de precipitado biliar.

Leche deshidratada (Difco): se empleó para la crio-conservación de las cepas bacterianas.

## **2.2.- Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana.**

Aquellos aislados en las que se precisaba confirmar su identificación se procedió a realizar las siguientes pruebas bioquímicas:

Agar triple azúcar y hierro (TSI) (Difco): prueba de identificación, con la que se pueden diferenciar géneros bacterianos, basada en la capacidad del microorganismo de fermentar glucosa, lactosa/sacarosa y de producir gas y/o sulfuro de hierro. Dado que el medio contiene glucosa y lactosa, si la bacteria no los metaboliza, el medio permanece de color rojizo. Si la bacteria metaboliza la glucosa, acidifica el medio que vira a color amarillo en la zona de profundidad. Si metaboliza lactosa, todo el medio vira a color amarillo. La presencia de tiosulfato de sodio y de citrato amónico de hierro permite la formación de sulfuro de hierro en las bacterias capaces de reducir el tiosulfato. Se realizó la prueba en tubos de ensayo en slant con 8 ml de medio, se sembró en superficie y profundidad y se incubó en aerobiosis a 37°C

durante 24 h. La lectura se realiza en base al color en superficie y profundidad y la formación de gas y/o precipitado.

Prueba del indol: el medio de cultivo para esta prueba es un caldo de peptona rico en triptófano. Se compone de 10 g de peptona de soja (Difco), 5 g de NaCl en 1 l de agua destilada a un pH 7,2. Los tubos de 4 ml de medio se inocularon con colonias sospechosas y se incubaron a 37°C durante 24 h. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano, dando como productos indol, ácido pirúvico y amoníaco. Al añadir al medio el reactivo de Kovac (p-dimetilaminobenzaldehído) se producirá una reacción del indol con el grupo aldehído del reactivo de Kovac. Si se forma un anillo rojo en la superficie del medio la prueba se considerará positiva, mientras que si permanece amarillo es negativo.

Prueba del citrato (Simmons Citrate Agar, Difco): esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Contiene citrato como única fuente de carbono, fosfato de amonio como fuente de fosfato y azul de bromotiol como indicador de pH. Las bacterias capaces de metabolizar el citrato utilizarán los fosfatos presentes liberando iones amonio. Esta liberación de iones básicos, junto con la metabolización del citrato, generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color de verde a azul. La prueba del citrato se considera positiva cuando, tras sembrar una colonia sobre la superficie en *slant* del medio e incubarlo 24 h a 37°C, el medio vira de color verde a color azul. Entre las enterobacterias esta característica se da en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer con esos nutrientes.

Prueba de la catalasa: sobre un portaobjetos se añadió una gota de peróxido de hidrógeno 3%, sobre la que se extendió una colonia bacteriana. La descomposición del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por acción de la enzima catalasa genera H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>; por lo que la formación inmediata de burbujas implica que las bacterias son catalasa positivas.

### **3.- MUESTRAS FECALES DE PERSONAS SANAS.**

Se recogieron 100 muestras fecales de voluntarios sanos con edades comprendidas entre 9 días y 89 años; 53 mujeres y 47 varones (período septiembre de 2010 a marzo de 2011) y procedentes de la Comunidad Autónoma de La Rioja. Ninguno de los individuos había tomado antibiótico ni había sufrido salmonelosis en los tres meses previos a la toma de muestras. Entre los datos solicitados se incluyeron: edad, sexo, contacto con animales, presencia de alergias, enfermedades crónicas, toma de antibiótico en los últimos tres meses, toma de otros medicamentos de manera continuada, padecimiento de salmonelosis en los últimos tres meses o seguimiento de una dieta vegetariana. Todos los individuos dieron su consentimiento informado para la participación en este estudio.

#### **3.1.- Procesamiento de las muestras para el aislamiento de *Salmonella* spp.**

El análisis de muestras fecales para la detección de *Salmonella* spp. se realizó siguiendo una adaptación de la normativa ISO 6579:2002/Amd 1:2007. Las muestras fecales que fueron recogidas con torundas estériles, se suspendieron y homogeneizaron en 2 ml de solución salina estéril 0.9%. Se realizó una primera etapa de preenriquecimiento suspendiendo una alícuota en 100 µl de agua de peptonada tamponada (Scharlau). Se incubaron 48 horas a 37 °C. Esta etapa fue seguida por una etapa de enriquecimiento. De aquellos tubos de agua peptonada donde se observó turbidez, se transfirieron 100 µl a tubos de medio Vassiliadis Rappaport líquido (Pronadisa-Conda) y se incubaron a 42°C. Tras 24 h de incubación, 100 µl del cultivo se sembraron en placas selectivas de agar Hektoen (Pronadisa-Conda). Se incubaron a 37°C durante 24-48 h. Como colonias sospechosas de ser *Salmonella* se consideraron aquellas de coloración negra que se aislaron en placas de BHI agar (Difco), para su posterior identificación en placas agar *Shigella-Salmonella* (Difco) y agar MacConkey (Difco) e identificación mediante pruebas bioquímicas: TSI, indol, citrato y catalasa.

### **4.- ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.**

#### **4.1.- Difusión en agar.**

Se estudió la sensibilidad a 20 antibióticos representativos de las distintas familias por el método de difusión en agar (antibiograma) que define la actividad *in vitro* de un antibiótico

frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Se realizó e interpretó siguiendo las recomendaciones del CLSI (2012). Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina (0,9%) con una turbidez de 0,5 McFarland a partir de un cultivo fresco. Se inoculó de manera homogénea con un hisopo estéril sobre la superficie de una placa de MH Agar y se colocaron los discos de antibiótico (BioMérieux, Oxoid) con las concentraciones recomendadas por el CLSI (Tabla 5) Las placas se incubaron a 37°C. Se leyeron los halos de inhibición producidos a las 18-24 h. La interpretación se realizó siguiendo los puntos de corte propuestos por el CLSI.

Tabla 5.- Antibióticos testados por difusión en agar y puntos de corte en los halos de inhibición (CLSI, 2012).

Antibiótico	Concentración (µg/disco)	Halo de inhibición (mm)		
		R	I	S
Ampicilina (AMP)	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)	20 + 10	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefalotina (CF)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefoxitina (FOX)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima (CTX)	30	≤ 22	23-25	≥ 26
Ceftazidima (CAZ)	30	≤ 17	18-20	≥ 21
Cefepime (FEP)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Aztreonam (ATM)	30	≤ 17	18-20	≥ 21
Gentamicina (GEN)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Tobramicina (TOB)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Amikacina (AMK)	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Kanamicina (KAN)	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Estreptomina (STR)	10	≤ 11	12-14	≥ 15
Tetraciclina (TET)	30	≤ 11	12-14	≥ 15
Ácido Nalidíxico (NAL)	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Ciprofloxacina (CIP)	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Trimetoprim (TRM)	5	≤ 10	11-15	≥ 16
Trimetoprim/sulfametoxazol (SXT)	1,25 + 23,75	≤ 10	11-15	≥ 16
Sulfamidas (SUL)	200	≤ 12	13-16	≥ 17
Cloranfenicol (CHL)	30	≤ 12	13-17	≥ 18

#### 4.2.- Detección fenotípica de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs).

Debido a la capacidad de inhibición que los inhibidores de beta-lactamasas (como ácido clavulánico o sulbactam) producen sobre las BLEEs, las cepas de *S. enterica* productoras de este tipo de enzimas pueden ser identificadas mediante la técnica del doble disco. Esta técnica consiste en realizar un antibiograma colocando de manera próxima un disco de amoxicilina-ácido clavulánico y un disco de cefalosporinas de amplio espectro o aztreonam. Si la cepa es productora de BLEEs se observa una sinergia entre los discos, un aumento y

deformación del halo en las proximidades del disco de amoxicilina-ácido clavulánico, debido a la inhibición de la beta-lactamasa por la acción del ácido clavulánico contenido en éste (Jarlier *et al.*, 1988). Esta técnica se ha realizado en este trabajo colocando un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg) entre los discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), aztreonam (30 µg) y cefepime (30 µg). Tras el período de incubación (24 h a 37°C) se consideró productora de BLEE cuando aparecía un ensanchamiento del halo.

#### **4.3.- Detección fenotípica de beta-lactamasas tipo AmpC plasmídicas (AmpC).**

Se estudió la producción de beta-lactamasas de tipo AmpC entre las cepas del estudio. Para ello se compararon los halos producidos por un disco de cefoxitina (30 µg) y cefoxitina suplementado con cloxacilina (200 µg) (Tan *et al.*, 2009), un potente inhibidor de este tipo de beta-lactamasas. Un ensanchamiento del halo (6-8 mm) en presencia de cloxacilina nos indicó que la cepa era productora de beta-lactamasa de tipo AmpC.

#### **4.4.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Método de dilución en agar.**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de una población bacteriana. Para la determinación de la CMI en *S. enterica* se siguieron las recomendaciones del CLSI (2012) y EUCAST (2013). Los antibióticos en polvo testados (Tabla 6) se compraron en la casa comercial Sigma Aldrich.

Para la preparación de las placas, se realizaron diluciones seriadas (1:2) de cada antibiótico en agua destilada estéril o diluyente, partiendo de una solución diez veces superior que la máxima concentración en placa deseada. Se adicionaron 2 ml de la disolución de antibiótico y 18 ml de MH agar atemperado a 50°C sobre cada placa Petri. Se homogeneizó la mezcla y se dejó solidificar. También se prepararon placas sin antibiótico para controlar el crecimiento bacteriano.

A partir de un cultivo fresco (24 h) a 37°C en BHI agar, se prepararon suspensiones 0,5 McFarland con las cepas objeto de estudio en tubos de solución salina. Se diluyeron 1:10 en solución salina y se llenaron los pocillos del replicador Steers. El replicador permite sembrar 32 inóculos diferentes al mismo tiempo en una misma placa, depositando aproximadamente 1 µl/gota, lo que equivale a 10<sup>4</sup> UFC/gota. Se incluyeron las placas control al comienzo y final de la replicación para comprobar un crecimiento correcto del microorganismo, así como las cepas control *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, tras lo que se procedió a la lectura de las mismas. Se consideró la CMI de cada cepa como la menor concentración de antibiótico que inhibió el crecimiento bacteriano.

Tabla 6.- Antibióticos testados por CMI en este estudio y puntos de corte considerados (CLSI 2012 y EUCAST 2013).

Antibiótico	CLSI, 2012		EUCAST, 2013	
	Punto de corte CMI (µg/ml)		Punto de corte CMI (µg/ml)	
	S	R	S	R
Ampicilina (AMP)	≤ 8	≥ 32	≤ 8	> 8
Cefotaxima (CTX)	≤ 1	≥ 4	≤ 1	> 2
Ceftazidima (CAZ)	≤ 4	≥ 16	≤ 1	> 4
Aztreonam (ATM)	≤ 4	≥ 16	≤ 1	> 4
Cefoxitina (FOX)	≤ 8	≥ 32	-	-
Ácido Nalidíxico (NAL)	≤ 16	≥ 32	-	-
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 1	≥ 4	≤ 0,5	> 1
Norfloxacina (NOR)	≤ 4	≥ 16	≤ 0,5	> 1
Levofloxacina (LEV)	≤ 2	≥ 8	≤ 1	> 2
Ofloxacina (OFL)	≤ 2	≥ 8	≤ 0,5	> 1
Gentamicina (GEN)	≤ 4	≥ 16	≤ 2	> 4
Tobramicina (TOB)	≤ 4	≥ 16	≤ 2	> 4
Kanamicina (KAN)	≤ 16	≥ 64	-	-
Amikacina (AMK)	≤ 16	≥ 64	≤ 8	> 16
Trimetoprim (TRM)	≤ 8	≥ 16	≤ 2	> 4
Trimetoprim/sulfametoxazol (SXT)	≤ 2/38	≥ 4/76	≤ 2	> 4

#### 4.5.- Estudio de la estabilidad de los fenotipos BLEE y AmpC.

Con el fin de analizar la estabilidad del fenotipo BLEE o AmpC se realizaron pases consecutivos en medio BHI agar en ausencia de antibiótico durante un período de 100 días. Una vez a la semana se realizaba el antibiograma de detección fenotípica de BLEE y AmpC para testar si alguna de ellas había perdido el fenotipo de interés. Además, cada día se almacenaba una copia de la cepa en tubos de leche y se realizaba la extracción de DNA total. De esta manera, el día que se detectaba la pérdida de fenotipo, se estudiaban todas las cepas intermedias para localizar exactamente qué día se observaba la pérdida del fenotipo y para esas cepas se paraba el experimento (Figura 21). Una vez alcanzados los 100 días, se realizó el antibiograma de los 20 antibióticos para todas las cepas restantes, de manera que se pudiera detectar la pérdida de otros determinantes que no estuviesen implicados en el fenotipo de resistencia a beta-lactámicos. La nomenclatura empleada para estas cepas fue: LP - nº de la cepa – día de pérdida de fenotipo BLEE o AmpC o bien, LP – nº de la cepa – 100, cuando la cepa fue estudiada y presentaba alguna variación en el día 100.

### Cepa C1221 (SHV-12)

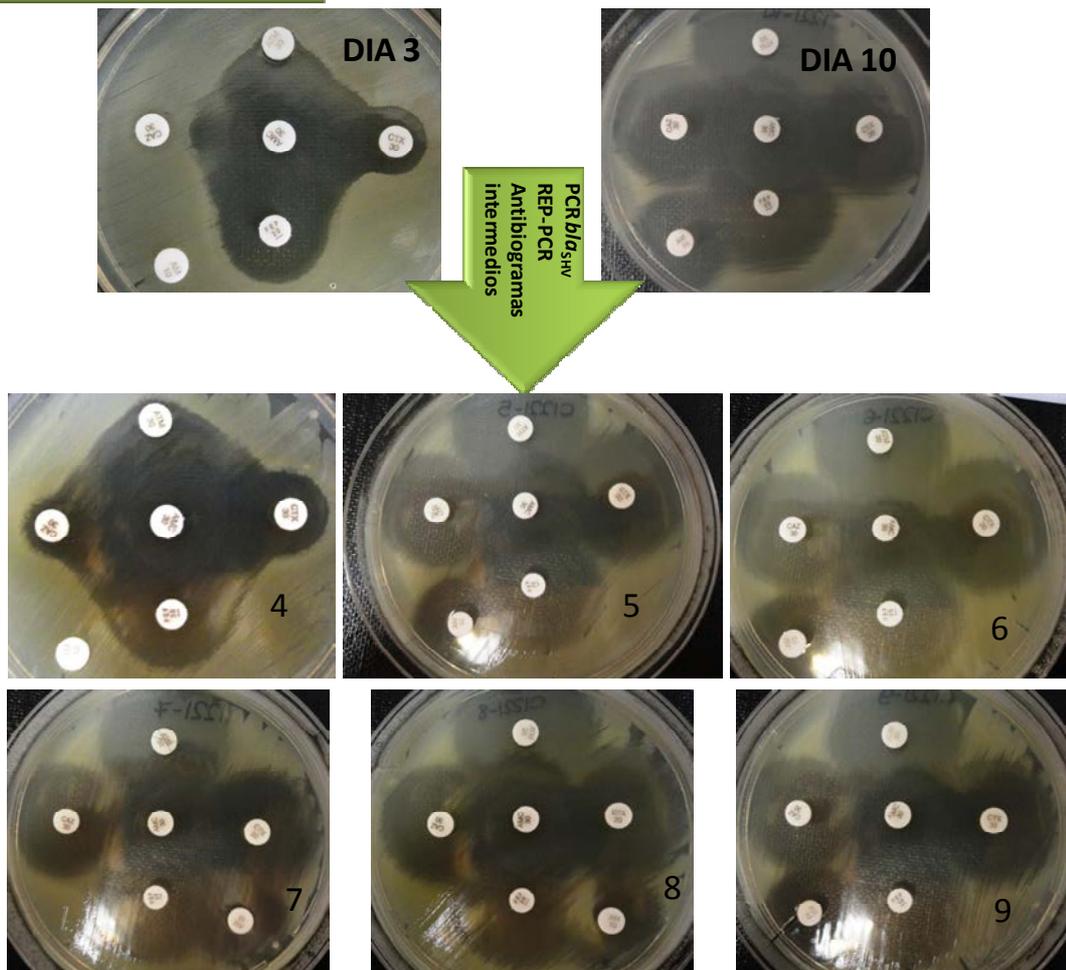


Figura 21.- Test de doble disco para la detección de fenotipo BLEE observado en la cepa C1221, portadora del gen *bla*<sub>SHV-12</sub> en el experimento de estabilidad de fenotipo.

## 5.- EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA.

### 5.1.- Extracción de DNA: método de hervido.

Esta técnica se basa en la ruptura de la membrana celular mediante hervido, de manera que el contenido celular es expulsado y queda en suspensión. A partir de un cultivo puro en placa de BHI (24 h) se recogió un asa de siembra y tras resuspender en 500  $\mu$ L de agua destilada estéril, se sometió a 100°C durante 8 min en un bloque calefactor. Se vorteo durante unos segundos vigorosamente, se dejó enfriar y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se recogió en un tubo eppendorf estéril.

### **5.2.- Extracción de DNA por el método de resina (InstaGene™ Purification Matrix, Bio-Rad).**

Mediante este método se utilizó una resina comercial para la extracción del DNA, ya que ésta ayuda en la lisis de la membrana celular. A partir de un cultivo puro en placa se recogió un asa de siembra y se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. El precipitado se resuspendió en 200 µl de la resina de extracción (InstaGene Matrix, Bio-Rad) y se incubó en un baño de agua a 56°C durante 20 min. Posteriormente los tubos se agitaron vigorosamente durante 10 seg y se mantuvieron a 100°C durante 8 min. Finalmente, se agitaron en vortex otros 10 seg y se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se recogió en un tubo eppendorf estéril.

### **5.3.- Cuantificación de DNA.**

Con el fin de determinar la concentración y pureza del DNA obtenido se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop). Nos basamos en la determinación de la curva de absorbancia del DNA a 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración de DNA de doble hebra, mientras que la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm nos indica la pureza del DNA. Una preparación pura mostraría un cociente 1.8 - 2. Si hay contaminación por proteínas este cociente es menor. Tras realizar un blanco con agua destilada, la cuantificación del DNA se llevó a cabo con 3 µl de la preparación.

## **6.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

La técnica de PCR se utilizó para llevar a cabo la amplificación de genes para la caracterización de integrones, estudio de genes de resistencia a antibióticos y genes de virulencia en *Salmonella*, caracterización de regiones de resistencia y tipado molecular tanto de las cepas como de plásmidos en *Salmonella enterica*.

De manera general, los componentes y cantidades empleadas para un volumen final de 50 µl en cada tubo de reacción se detallan a continuación.

<i>Componentes (distribuidor)</i>	<i>Concentración stock</i>	<i>Volumen por tubo</i>	<i>Concentración final de reacción</i>
Cebador "forward" (Sigma Aldrich)	25 µM	1 µl	0,5 µM
Cebador "reverse" (Sigma Aldrich)	25 µM	1 µl	0,5 µM
BIOTAQ™ DNA polimerasa (Bioline)	5 U/µl	0,3 µl <sup>a</sup>	1.5 U
Tampón de reacción NH <sub>4</sub> (Bioline)	10 X	5 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	50 mM	1,5 µl	1,5 mM
dNTPs (Bioline)	10 mM	1 µl	0,2 mM
DNA	---	10 µl	---
Agua miliQ estéril	---	Hasta 50 µL	---

<sup>a</sup>Se empleó 0,5 µl de Taq en el estudio de integrones y en la amplificación de fragmentos grandes de DNA.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termocicladores T3 y T3000 (Biometra). En todas las reacciones se incluyeron controles positivos y un tubo sin DNA como control negativo.

A continuación se exponen las secuencias nucleotídicas de los cebadores de PCR y las condiciones de amplificación de los genes estudiados.

### 6.1.- Detección de genes de resistencia a distintos antibióticos.

Tabla 7.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de genes que codifican beta-lactamasas (resistencia a beta-lactámicos).

<i>Cebadores (secuencia 5'-3')</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>	<i>Referencia (tamaño de amplicón)</i>
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> ACACAATACATATCAACTTCGC AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	96°C 5 min 1 ciclo 96°C 1 min 61°C 1 min 35 ciclos 72°C 2 min 72°C 10 min 1 ciclo	Steward <i>et al.</i> , 2001 (813 pb)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> ATTCTTGAAGACGAAAGGGC ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 60°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Belaouaj <i>et al.</i> , 1994 (1150 pb)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> CACTCAAGGATGTATTGTG TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96°C 15 seg 1 ciclo 96°C 15 seg 52°C 15 seg 30 ciclos 72°C 2 min 72°C 3 min 1 ciclo	Pitout <i>et al.</i> , 1998 (885 pb)

Tabla 7 (continuación).

<i>Cebadores (secuencia 5'-3')</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>	<i>Referencia (tamaño de amplicón)</i>
<p><i>bla</i><sub>CTX-M-9</sub> (grupo 9)</p> <p>GTGACAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC</p>	<p>94°C 3 min 1 ciclo</p> <p>94°C 45 seg 62°C 45 seg 30 ciclos 72°C 45 seg</p> <p>72°C 10 min 1 ciclo</p>	<p>Coque <i>et al.</i>, 2002 (857 pb)</p>
<p><i>bla</i><sub>CTX-M-3G</sub> (grupo 1)</p> <p>GTTACAATGTGTGAGAAGCAG CCGTTTCCGCTATTACAAAC</p>	<p>94°C 7 min 1 ciclo</p> <p>94°C 50 seg 50°C 40 seg 35 ciclos 68°C 1 min</p> <p>68°C 5 min 1 ciclo</p>	<p>Pagani <i>et al.</i>, 2003 (1017 pb)</p>
<p><i>bla</i><sub>CTX-M-10</sub> (grupo 10)</p> <p>CCGCGCTACACTTTGTGGC TTACAAACCGTTGGTGACG</p>	<p>94°C 3 min 1 ciclo</p> <p>94°C 45 seg 56°C 45 seg 35 ciclos 72°C 45 seg</p> <p>72°C 10 min 1 ciclo</p>	<p>Coque <i>et al.</i>, 2002 (944 pb)</p>
<p><i>bla</i><sub>CTX-M-UNIVERSAL</sub></p> <p>CGATGTGCAGTACCAGTAA TTAGTGACCAGAATCAGCGG</p>	<p>94°C 5 min 1 ciclo</p> <p>94°C 30 seg 52°C 30 seg 35 ciclos 72°C 1 min</p> <p>72°C 5 min 1 ciclo</p>	<p>Batchelor <i>et al.</i>, 2005 (585 pb)</p>
<p><i>bla</i><sub>CMY</sub></p> <p>GATTCCTTGGACTCTTCAG TAAACCAGGTTCCAGATAGC</p>	<p>95°C 3 min 1 ciclo</p> <p>95°C 30 seg 55°C 30 seg 30 ciclos 72°C 30 seg</p> <p>72°C 3 min 1 ciclo</p>	<p>Stapleton <i>et al.</i>, 1999 (1807 pb)</p>

La búsqueda de beta-lactamasas de tipo AmpC se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Pérez-Pérez y Hanson (2002). Ésta consiste en una PCR multiplex que amplifica varios tipos de genes codificantes de estas beta-lactamasas, así como varias de sus variantes.

Tabla 8.- Secuencia nucleotídica de los cebadores para la detección de variantes de beta-lactamasas de tipo AmpC (Pérez-Pérez & Hanson, 2002).

<i>Beta-lactamasas amplificadas</i>	<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Tamaño de amplicón</i>
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11	MOXM GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520 pb
	CITM TGGCCAGAAGTACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1	DHAM AACTTTACAGGTGTGCTGGGT CCGTACGCATACTGGCTTTGC	462 pb
	AACM AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA TTCGCCGAATCATCCCTAGC	
DHA-1, DHA-2	EBCM TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	405 pb
	FOXM ACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	
AAC		346 pb
MIR-1T; ACT-1		302 pb
FOX-1 a FOX-5b		190 pb

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 3 min); 25 ciclos (94°C, 30 seg; 64°C, 30 seg; 72°C, 1 min) y elongación final (72°C, 7 min).

El pool de PCR fue preparado según las indicaciones propuestas en el artículo original; así, la concentración de primers fue variable (0,4 – 0,6 µM).

Tabla 9.- Reactivos y cantidades añadidas al realizar la PCR Multiplex para la detección de beta-lactamasas de tipo AmpC (Pérez-Pérez & Hanson, 2002).

<i>Componentes</i>	<i>Concentración stock</i>	<i>Volumen por tubo</i>	<i>Concentración final de reacción</i>
Cebadores (Sigma Aldrich) <sup>1</sup>			
CITM-F, CITM-R	25 µM	1,2 µl/cu	0,6 µM
DHAM-F, DHAM-R	25 µM	1,2 µl/cu	0,6 µM
MOXM-F, MOXM-R	25 µM	1,2 µl/cu	0,6 µM
EBCM-F, EBCM-R	25 µM	1 µl/cu	0,5 µM
AACM-F, AACM-R	25 µM	1 µl/cu	0,5 µM
FOXM-F, FOXM-R	25 µM	0,8 µl/cu	0,4 µM

Tabla 9 (continuación).

Componentes	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Tampón de reacción			
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (Bioline)	10X	5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	50 mM	1,5 µl	1,5 mM
dNTPs (Bioline)	10 mM	1 µl	0,2 mM
BIOTAQ™ DNA polimerasa (Bioline)	5 U/µl	0,3 µl	0,03 U/µl
DNA	-	10 µl	-
Agua miliQ estéril	-	Hasta 50 µl	

<sup>1</sup>/cu: por cada uno

Tabla 10.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia quinolonas.

Cebadores (secuencia 5' → 3')	Condiciones amplificación	Referencia (tamaño amplicón)
	92°C 3 min 1 ciclo	
<i>gyrA</i>		
TGTCGAGATGGCCTGAAGC	92°C 30 seg	Griggs <i>et al.</i> , 1996 (347 pb)
TACCGTCATAGTTATCCACG	63°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 3 min 1 ciclo	
	95°C 5 min 1 ciclo	
<i>parC</i>		
CTATGCGATGTCAGAGCTGG	95°C 1 min	Griggs <i>et al.</i> , 1996 (350 pb)
TAACAGCAGCTCGGCGTATT	55°C 1 min 32 ciclos	
	72°C 1,5 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
	95°C 5 min 1 ciclo	
<i>qnrA</i>		
GGGTATGGATATTATTGATAAA	95°C 1 min	Cattoir <i>et al.</i> , 2007b (650 pb)
CTAATCCGGCAGCACTATTA	55°C 1 min 40 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
	94°C 5 min 1 ciclo	
<i>qnrB</i>		
GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	94°C 45 seg	Wang <i>et al.</i> , 2008 (469 pb)
ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	53°C 45 seg 35 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 7min 1 ciclo	

Tabla 10 (continuación).

<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Condiciones amplificación</i>			<i>Referencia (tamaño amplicón)</i>
<i>qnrS</i> AGTGATCTCACCTTCACCGC CAGGCTGCAATTTTGATACC	95°C	5 min	1 ciclo	Cattoir <i>et al.</i> , 2007b (550 pb)
	95°C	1 min	35 ciclos	
	55°C	1 min		
	72°C	1 min		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<i>qepA</i> GGACATCTACGGCTTCTTCG CAACTGCTTGAGCCCGTAG	96°C	1 min	1 ciclo	Yamane <i>et al.</i> , 2008 (500 pb)
	96°C	1 min	30 ciclos	
	60°C	1 min		
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>oqxA</i> CTCGGCGCGATGATGCT CCACTCTTCACGGGAGACGA	95°C	10 min	1 ciclo	Kim <i>et al.</i> , 2009 (392 pb)
	94°C	1 min	30 ciclos	
	56°C	2 min		
	72°C	4 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>oqxB</i> TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC CTCGGCCATTTTGCGCGTA	95°C	10 min	1 ciclo	Kim <i>et al.</i> , 2009 (512 pb)
	94°C	1 min	30 ciclos	
	56°C	2 min		
	72°C	4 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	

Tabla 11.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a tetraciclinas.

<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Condiciones amplificación</i>			<i>Referencia (tamaño amplicón)</i>
<i>Tet(A)</i> GTAATTCTGAGCACTGTCGC CTGCCTGGACAACATTGCTT	95°C	5 min	1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (937 pb)
	95°C	30 seg	23 ciclos	
	62°C	30 seg		
	72°C	45 seg		
	72°C	7 min	1 ciclo	

Tabla 11 (continuación).

<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Condiciones amplificación</i>	<i>Referencia (tamaño amplicón)</i>
<i>Tet(B)</i> CTCAGTATTCCAAGCCTTTG CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	95°C 5 min 1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (416 pb)
	95°C 30 seg	
	57°C 30 seg 25 ciclos	
	72°C 20 seg	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>Tet(C)</i> TCTAACAAATGCGCTCATCGT GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC	95° 5 min 1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (570 pb)
	95°C 30 seg	
	62°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 20 seg	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>Tet(D)</i> ATTACACTGCTGGACGCGAT/ CTGATCAGCAGACAGATTGC	95°C 5 min 1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (1104 pb)
	95°C 30 seg	
	57°C 30 seg 25 ciclos	
	72°C 20 seg	
	72° 7 min 1 ciclo	
<i>Tet(E)</i> GTGATGATGGCACTGGTCAT CTCTGCTGTACATCGCTCTT	95°C 5 min 1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (1179 pb)
	95°C 30 seg	
	62°C 30 seg 23 ciclos	
	72°C 45 seg	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>Tet(G)</i> TTTCGGATTCTTACGGTC TCCTGCGATAGAGCTTAGA	94°C 1 min 1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (840 pb)
	94°C 1 min	
	55°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 10 min 1 ciclo	

Tabla 12.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a cloranfenicol.

<i>Cebadores (secuencia 5'→3')</i>	<i>Condiciones amplificación</i>	<i>Referencia (tamaño amplicón)</i>
<i>catA</i>  GGTGAGCTGGTGATATGG GGGATTGGCTGAGACGA	95°C 3 min 1 ciclo	Sunde <i>et al.</i> , 2006 (209 pb)
	95°C 1 min	
	48°C 1 min 23 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<i>cmlA</i>  TGTCATTACGGCATACTCG ATCAGGCATCCATTCCCAT	94°C 5 min 1 ciclo	Sáenz <i>et al.</i> , 2004 (455 pb)
	94°C 1 min	
	55°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>floR</i>  CACGTTGAGCCTCTATAT ATGCAGAAGTAGAACGCG	94° 5 min 1 ciclo	Ng <i>et al.</i> , 1999 (868 pb)
	94°C 30 seg	
	55°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

Tabla 13.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos.

<i>Cebadores (secuencia 5'→3')</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>	<i>Referencia (Tamaño amplicón)</i>
<i>aac(3)-I</i> (resistencia a gentamicina)  ACCTACTCCCAACATCAGCC ATATAGATCTCACTACGCGC	94°C 5 min 1 ciclo	Van de Klundert y Vliegenthart, 1993 (169 pb)
	94°C 30 seg	
	60°C 45 seg 32 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
<i>aac(3)-II</i> (resistencia a gentamicina)  ACTGTGATGGGATACGCGTC CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	94°C 5 min 1 ciclo	Van de Klundert y Vliegenthart, 1993 (237 pb)
	94°C 30 seg	
	60°C 45 seg 32 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	

Tabla 13 (continuación).

<i>Cebadores (secuencia 5'→3')</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>			<i>Referencia (Tamaño amplicón)</i>
<i>aac(3)-IV</i> (resistencia a gentamicina y apramicina) CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	94°C	5 min	1 ciclo	Van de Klundert y Vliegenthart, 1993 (286 pb)
	94°C	30 seg	32 ciclos	
	60°C	45 seg		
	72°C	2 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>aph(3')-Ia</i> (resistencia a kanamicina) ATGGGCTCGGATAATGTC CTCACCGAGGCAGTTCCAT	94°C	5 min	1 ciclo	Maynard <i>et al.</i> , 2003 (600 pb)
	94°C	30 seg	30 ciclos	
	50°C	30 seg		
	72°C	1,5 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>aph(3')-IIa</i> (resistencia a kanamicina) GAACAAGATGGATTGCACGC GCTCTTCAGCAATATCACGG	94°C	5 min	1 ciclo	Maynard <i>et al.</i> , 2003 (680 pb)
	94°C	30 seg	30 ciclos	
	50°C	30 seg		
	72°C	1,5 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>aac(6')-Ib</i> (resistencia a tobramicina, kanamicina y amikacina) TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGT	94°C	5 min	1 ciclo	Park <i>et al.</i> , 2006 (500 pb)
	94°C	45 seg	34 ciclos	
	55°C	45 seg		
	72°C	45 min		
* CGTCACTCCATACATTGCAA	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>aadA (1 ó 2)</i> (resistencia a estreptomycin) GCAGCGCAATGACATTCTTG ATCCTTCGGCGCGATTTTG	94°C	5 min	1 ciclo	Madsen <i>et al.</i> , 2000 (282pb)
	94°C	1 min	35 ciclos	
	60°C	1 min		
	72°C	1 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>aadA5</i> (resistencia a estreptomycin) CTTCAGTTCGGTGAGTGGC CAATCGTTGCTTTGGCATAT	95°C	5 min	1 ciclo	Wei <i>et al.</i> , 2009 (453pb)
	95°C	1 min	35 ciclos	
	55°C	1 min		
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	

Tabla 13 (continuación).

<i>Cebadores (secuencia 5'→3')</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>			<i>Referencia (Tamaño amplicón)</i>
<i>strA-strB</i> (resistencia a estreptomycin)	94°C	5 min	1 ciclo	Curiao <i>et al.</i> , 2008 (1562pb)
	94°C	1 min		
	55°C	1 min	35 ciclos	
	65°C	8 min		
ATTCTGACTGGTTGCCTGTC TAGATCGCGTTGCTCCTCTT	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>armA</i> (resistencia a amikacina)	95°C	5 min	1 ciclo	Ma <i>et al.</i> ; 2009 (591 pb)
	95°C	1 min		
	54°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	1 min		
AGGTTGTTTCCATTTCTGAG TCTCTCCATTCCTTCTCC	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>rmtB</i> (resistencia a amikacina)	95°C	5 min	1 ciclo	Ma <i>et al.</i> ; 2009 (585 pb)
	95°C	1 min		
	54°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	1 min		
CCCAAACAGACCGTAGAGGC CTCAAACCTGGCGGGCAAGC	72°C	10 min	1 ciclo	

\*cebador empleado para secuenciar el amplicón.

Tabla 14.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a sulfamidas.

<i>Cebadores (secuencia 5'→3')</i>	<i>Condiciones amplificación</i>			<i>Referencia (tamaño amplicón)</i>
<i>sul1</i>	94°C	5 min	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> ; 2000 (789 pb)
	94°C	30 seg		
	63°C	30 seg	30 ciclos	
	72°C	1 min		
TGGTGACGGTGTTCGGCATT GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>sul2</i>	94°C	5 min	1 ciclo	Maynard <i>et al.</i> , 2003 (722pb)
	94°C	30 seg		
	50°C	30 seg	30 ciclos	
	72°C	1,5 min		
CGGCATCGTCAACATAACC GTGTGCGGATGAAGTCAG	72°C	8 min	1 ciclo	

Tabla 14 (continuación).

<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Condiciones amplificación</i>	<i>Referencia (tamaño amplicón)</i>
	94°C 5 min 1 ciclo	
<i>sul3</i>	94°C 1 min	Perreten y Boerlin, 2003 (792 pb)
GAGCAAGATTTTGGGAATCG	51°C 1 min 30 ciclos	
CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

Tabla 15.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de genes relacionados con la resistencia a trimetoprim.

<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>	<i>Referencia (Tamaño amplicón)</i>
<i>dfrA1, dfrA5, dfrA15, dfrA15b, dfrA16, dfrA16b</i> (cebadores Df <sub>rIa</sub> )	94°C 5 min 1 ciclo	Navia <i>et al.</i> , 2003 (474 pb)
	94°C 1 min	
GTGAAACTATCACTAATGG	55°C 1 min 30 ciclos	
TTAACCCCTTTTGCCAGATTT	72°C 1 min	
	72°C 7min 1 ciclo	
<i>dfrA7, dfrA17</i> (cebadores Df <sub>rVII</sub> )	94°C 5 min 1 ciclo	Navia <i>et al.</i> 2003 (474 pb)
TTGAAAATTTTCATTGATT	94°C 1 min	
TTAGCCCTTTTCCAAATCT	55°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>dfrA12, dfrA13</i> (cebadores Df <sub>rXII</sub> )	94°C 5 min 1 ciclo	Navia <i>et al.</i> 2003 (319 pb)
	94°C 1 min	
GGTGS GCAGAAGATTTTCGC	60°C 1 min 30 ciclos	
TGGGAAGAAGGCGTCACCCTC S= G ó C	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>dfrA14, dfrA6</i> (cebadores Df <sub>rIb</sub> )	94°C 5 min 1 ciclo	Navia <i>et al.</i> 2003 (393 pb)
GAGCAGCTICTITTTAAAGC	94°C 1 min	
TTAGCCCTTTTICCAATTTT I= desoxiinosina	60°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	

Tabla 15 (continuación).

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño amplicón)
<i>dfrB1</i> , <i>dfrB2</i> , <i>dfrB3</i> (cebadores <i>dfrII</i> )	94°C	5 min	1 ciclo	Navia <i>et al.</i> 2003 (141 pb)
	94°C	1 min		
GATCACGTGCGCAAGAAATC	60°C	1 min	30 ciclos	
AAGCGCAGCCACAGGATAAAT	72°C	1 min		
	72°C	7 min	1 ciclo	

## 6.2.- Estudio de los entornos genéticos de beta-lactamasas tipo BLEEs y AmpC.

Se estudiaron los entornos genéticos de aquellos genes codificantes de BLEE y AmpC encontradas a lo largo del estudio según se detalla a continuación.

Tabla 16.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR para caracterizar el entorno genético de BLEEs de tipo CTX-M.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño amplicón)
<i>sul1-orf513</i> ( <i>ISCR1</i> )	94°C	5 min	1 ciclo	Lartigue <i>et al.</i> , 2004 (2120 pb)
(1) <i>sul1</i> -F: TGGTGACGGTGTTCGGCATTTC	94°C	1 min		
(2) <i>orf513</i> -D3: CTCACGCCCTGGCAAGGTTT	60°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>orf513</i> ( <i>ISCR1</i> )	94°C	5 min	1 ciclo	Lartigue <i>et al.</i> , 2004 (594 pb)
(3) <i>orf513</i> -D5: CTTTTGCCCTAGCTGCGGT	94°C	1 min		
(2) <i>orf513</i> -D3: CTCACGCCCTGGCAAGGTTT	56°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>orf513-bla</i> <sub>CTX-M</sub>	94°C	5 min	1 ciclo	Lartigue <i>et al.</i> , 2004 (1600 pb)
(3) <i>orf513</i> -D5: CTTTTGCCCTAGCTGCGGT	94°C	1 min		
(4) MA3(CTX-M): ACYTTACTGGTRCTGCACATA	58°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	

Tabla 16 (continuación).

<i>Cebadores (secuencia 5'→3')</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>			<i>Referencia (Tamaño amplicón)</i>
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> - <i>orf1005</i> (IS3000)	94°C	5 min	1 ciclo	
(5) M9rlower: GAGAATCATCGCCGAAGGG	94°C	1 min	30 ciclos	Eckert <i>et al.</i> , 2004 (1729 pb)
(6) Orf1005-R: ATCCATAATAGCATCCATCAT	55°C	1 min		
	72°C	3 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>orf1005</i> (IS3000)	94°C	5 min	1 ciclo	
(7) Orf1005int- F:TGGGTATCGGTTGAGAGCACA	94°C	1 min	30 ciclos	Briñas (tesis doctoral) 2005 (469 pb)
(8) Orf1005int-R: CAATCCAGAAGCCGTTCCCA	68°C	30 seg		
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>ISEcp1- bla</i> <sub>CTX-M</sub>	94°C	3 min	1 ciclo	
(9) <i>ISEcp1U2</i> : AATACTACCTTGCTTTCTGA	94°C	30 seg	30 ciclos	Saladin <i>et al.</i> , 2002 (831 pb)
(10) MA3(CTX-M): ACYTTACTGGTRCTGCACAT <sup>a</sup>	55°C	30 seg		
	72°C	30 seg		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<i>IS26- bla</i> <sub>CTX-M</sub>	94°C	3 min	1 ciclo	
(11) <i>IS26U</i> : AGCGGTAAATCGTGGAGTGA	94°C	30 seg	30 ciclos	Saladin <i>et al.</i> , 2002 Briñas (tesis doctoral), 2005 (538 pb)
(12) MA3( <i>IS26</i> ): CGCCATAACTTTACTGGTA	55°C	30 seg		
	72°C	30 seg		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> - <i>IS903</i>	94°C	3 min	1 ciclo	
(13) M9 <i>IS903</i> : CTACGGCACCACCAATGATA	94°C	1 min	30 ciclos	Eckert <i>et al.</i> , 2004 Vinué (tesis doctoral), 2010 (320 pb) (991 pb)
(14) <i>IS903</i> r5'Eckert: CATCATCCAGCCAGAAAGTT	55°C	1 min		
(15) <i>IS903</i> reverse: CGGTTGTAATCTGTTGTCCA	72°C	1 min		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> - <i>orf477</i>	94°C	3 min	1 ciclo	
(16) M3 int upp: TCACCCAGCCTCAACCTAAG	94°C	1 min	30 ciclos	Eckert <i>et al.</i> , 2004 (450 pb)
(17) ORF1 polM3: GCSCCGACACCCTCACACCTa	55°C	1 min		
	72°C	1 min		
	72°C	7 min	1 ciclo	

Tabla 16 (continuación).

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño amplicón)
<i>Tn1000</i> -like – <i>orf2</i>	94°C	1 min	1 ciclo	
(18) RYCE21-F1: CAGGACGCGGTATCACC	94°C	30 seg		Oliver <i>et al.</i> , 2005 (1500 pb)
(19) RYCE21-R1: GGCTGGGATGTCGCGTAAC	55°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	5 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>orf2</i> – <i>orf4</i>	94°C	1 min	1 ciclo	
(20) RYCE21-F2: GACATTTCCATCGAAGAGCC	94°C	30 seg		Oliver <i>et al.</i> , 2005 (2000 pb)
(21) RYCE21-R2: GCCGAGCGGATTAATCAGG	55°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	5 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>orf4</i> – DNA invertasa	94°C	1 min	1 ciclo	
(22) RYCE21-F3: CCCATGAGCCCGCTTACG	94°C	30 seg		Oliver <i>et al.</i> , 2005 (1100 pb)
(23) RYCE21-R3: GAGCCACAAAGTGTAGCGC	55°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	5 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
DNA invertasa – <i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>	94°C	3 min	1 ciclo	
(24) CTX-M-F8: CCGCGTACACTTTGTGGC	94°C	1 min		Oliver <i>et al.</i> , 2005 (1000 pb)
(25) CTX-M-R3: TTACAAACCGTCGGTGACG	55°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> – <i>orf7</i>	94°C	3 min	1 ciclo	
(26) RYCE21-F4: CCCAACCTAAGGCAGAAAG	94°C	1 min		Oliver <i>et al.</i> , 2005 (600 pb)
(27) RYCE21-R4: ATCGACAAGGTCATGCTGATG	58°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> – <i>orf8</i>	94°C	3 min	1 ciclo	
(26) RYCE21-F4: CCCAACCTAAGGCAGAAAG	94°C	1 min		Oliver <i>et al.</i> , 2005 (1000 pb)
(28) RYCE21-R5: CCATGCTGTTTTCCGTAGTAC	58°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	

Tabla 16 (continuación).

<i>Cebadores (secuencia 5'→3')</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>			<i>Referencia (Tamaño amplicón)</i>
<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> – IS4321  (26) RYCE21-F4: CCCAACCTAAGGCAGAAAAG (29) RYCE21-R6: CTCGCTTACTAATTCCCAGC	94°C	1 min	1 ciclo	Oliver <i>et al.</i> , 2005 (2200 pb)
	98°C	5 seg		
	68°C	15 min	30 ciclos	
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> – <i>orf10</i>  (26) RYCE21-F4: CCCAACCTAAGGCAGAAAAG (30) RYCE21-R7: GGGTTCTGTCACCCTGAC	94°C	1 min	1 ciclo	Oliver <i>et al.</i> , 2005 (2700 pb)
	98°C	5 seg		
	68°C	15 min	30 ciclos	
	72°C	10 min	1 ciclo	
<i>orf10</i> – IS5  (31) RYCE21-F5: GCTGAATGTGGACTATGTC (32) RYCE21-R8: GCACGATCATTCTGATAC	94°C	1 min	1 ciclo	Oliver <i>et al.</i> , 2005 (2600 pb)
	98°C	5 seg		
	68°C	15 min	30 ciclos	
	72°C	10 min	1 ciclo	

<sup>a</sup> Y=C o T; R= A o G; S=C o G. El número que define el cebador es el otorgado para su localización en la Figura 22.

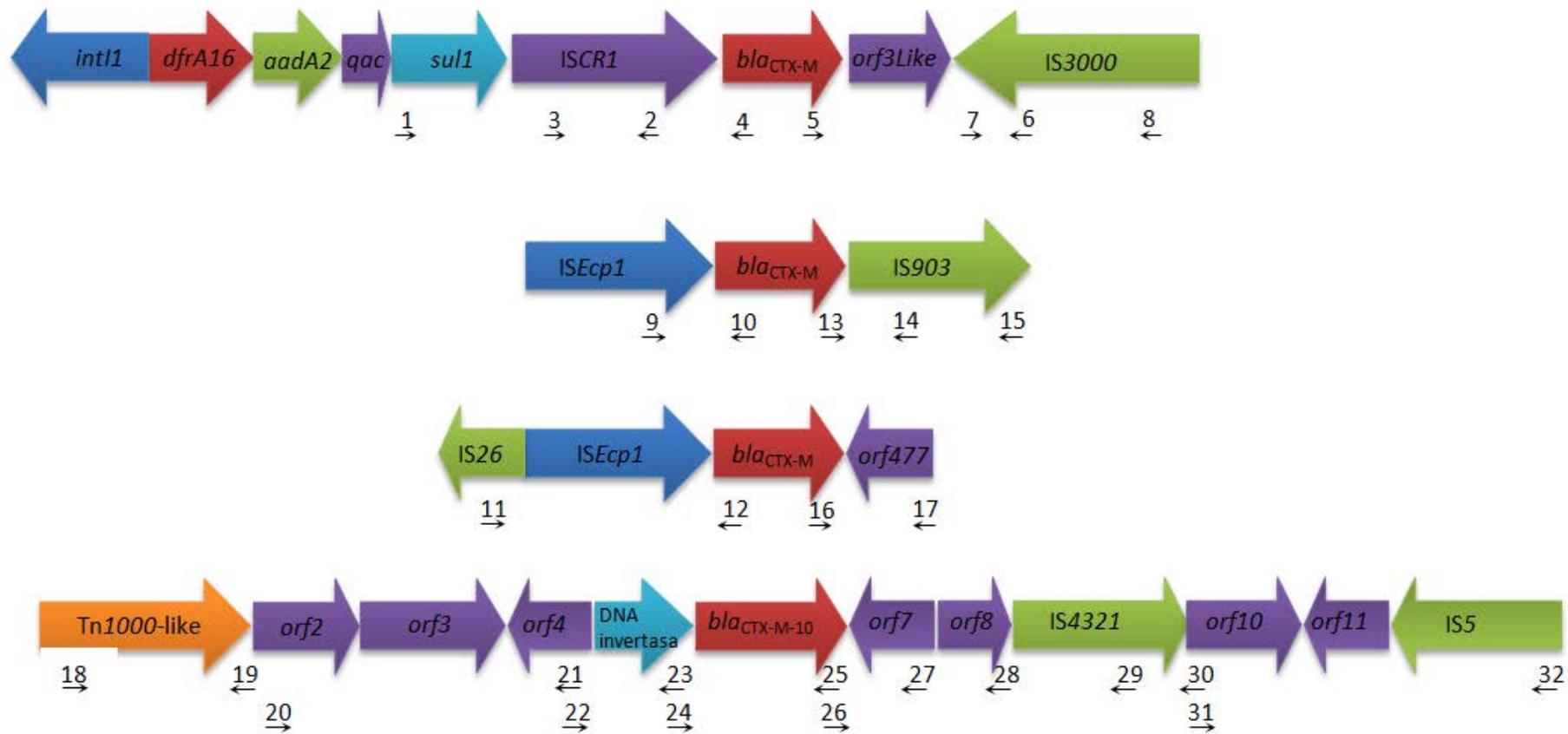


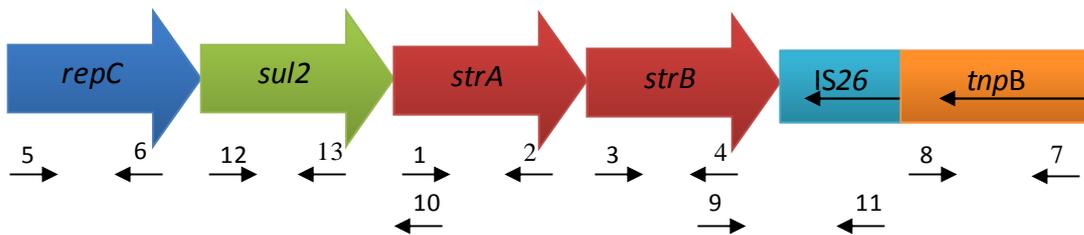
Figura 22.- Posibles entornos genéticos de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>CMY</sub> y posición de los cebadores utilizados para su estudio.

### 6.3. Detección de los entornos genéticos para los genes *sul2* y *sul3*.

La caracterización molecular del entorno del gen *sul2* se realizó empleando los siguientes cebadores

Tabla 17.- Cebadores empleados en la caracterización del entorno genético del gen *sul2*.

Cebadores (secuencia 5' → 3')		Referencia	
1	strA-F	ATTCTGACTGGTTGCCTGTC	Curiao <i>et al.</i> , 2008
2	strA-R	CGCAGATAGAAGGCAAGG	Bean <i>et al.</i> , 2009
3	strB-F	TTCTCATTGCGGACAACCT	Bean <i>et al.</i> , 2009
4	strB-R	TAGATCGCGTTGCTCCTCTT	Curiao <i>et al.</i> , 2008
5	repC-F	AAGAACAAGCACAGCCTCAG	Curiao <i>et al.</i> , 2008
6	repC-R	CCGGGTGATGTCGTAATTG	Curiao <i>et al.</i> , 2008
7	tnpB-F	TATGTGCAACGGGAATTTGA	Curiao <i>et al.</i> , 2008
8	tnpB-R	ACTATAGGGTCTTCAATGCA	Curiao <i>et al.</i> , 2008
9	strB-Rnew	AAGAGGAGCAACGCGATCTA	Vinué (tesis doctoral), 2010
10	strA-Fnew	GACAGGCAACCAGTCAGAAT	Vinué (tesis doctoral), 2010
11	IS26Urev	TCACTCCACGATTTACCGCT	Vinué (tesis doctoral), 2010
12	Sul2-F	CGGCATCGTCAACATAACC	Maynard <i>et al.</i> , 2003
13	Sul2-R	GTGTGCGGATGAAGTCAG	Maynard <i>et al.</i> , 2003



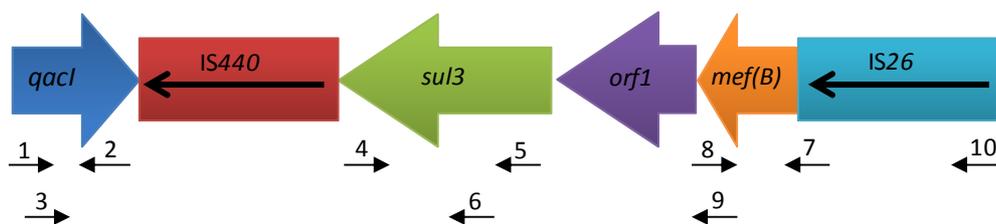
Genes	Cebadores	Tamaño amplicón
<i>strA-strB</i>	1 - 4	1562 pb
<i>sul2-strA-strB</i>	12 - 4	2378 pb
<i>sul2-strA</i>	12 - 2 ó 12-10	1631 pb / 906 pb
<i>repC</i>	5 - 6	821 pb
<i>repC-sul2</i>	5 - 13	1328 pb
<i>tnpB</i>	7 - 8	1226 pb
<i>strB-tnpB</i>	3 - 7	1928 pb
<i>strB-IS26</i>	3 -11	702 pb

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5min); 35 ciclos (94°C, 1min; 55°C, 1min y 65°C, 8min) y elongación final (72°C, 8min).

Se realizó la caracterización molecular del entorno del gen *sul3* siguiendo el esquema:

Tabla 18.- Cebadores empleados en la caracterización del entorno genético del gen *sul3*.

Cebadores (secuencia 5' → 3')			Referencia
1	qacl-F	TGAAGAAGCTGGCTCTTCTGG	Vinué (tesis doctoral), 2010
2	qacl-R	CGCTGACCTTGGATAGCAG	Vinué (tesis doctoral), 2010
3	aadA-F new	GCCATGGATTCACCAAGT	Vinué (tesis doctoral), 2010
4	Sul3-R	CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	Perreten and Boerlin, 2003
5	Sul3-F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	Perreten and Boerlin, 2003
6	Sul3-F new	GCACCAACTCTTGCAAGCA	Vinué (tesis doctoral), 2010
7	MefBi-F	ATGAACAGAATAAAAAATTG	Liu <i>et al.</i> , 2009
8	MefBi-R	AAATTATCATCAACCCGGTC	Liu <i>et al.</i> , 2009
9	MefBi-R inv	GACCGGGTTGATGATAATTT	Vinué (tesis doctoral), 2010
10	IS26-U rev	TCACTCCACGATTTACCGCT	Vinué (tesis doctoral), 2010



Genes	Cebadores	Tamaño amplicón
<i>qacl</i>	1-2	324 pb
<i>qacl-sul3</i>	1-5	2299 pb
	3-4	1538 pb
<i>mef(B)</i>	7-8	1229 pb
<i>sul3-mef(B)</i>	4-9	2545 pb
<i>mef(B)-IS26</i>	8-10	2235 pb
<i>sul3-IS26</i>	4-10	4763 pb

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5min); 35 ciclos (94°C, 1min; 55°C, 1min y 65°C, 8min) y elongación final (72°C, 8min).

#### 6.4.- Estudio del entorno genético del gen de resistencia a quinolonas *qnrS1*.

Se estudió el entorno genético del gen de resistencia a quinolonas *qnrS1* mediante PCR y secuenciación de los amplicones obtenidos. Los cebadores utilizados así como las condiciones de amplificación y las combinaciones realizadas se detallan a continuación:

Tabla 19.- Cebadores empleados para caracterizar el entorno genético del gen de resistencia a quinolonas *qnrS1* (Figura 23).

Cebadores (5' → 3')			Referencia
1	LAP-1F	CAATACAAAGCACAGAAGACC	Poirel <i>et al.</i> , 2007
2	LAP-1R	CCGATCCCTGCAATATGCTC	Poirel <i>et al.</i> , 2007
3	orfB-B	CAGCAGTCCTGCGCGAAGG	Poirel <i>et al.</i> , 2007
4	213A	GCTTCAGCCTCAGCGTCAAG	Poirel <i>et al.</i> , 2007
5	213B	CGATGAATCAGGCTCCAGTC	Poirel <i>et al.</i> , 2007
6	qnrS-5'ext	GCGAATGAATGTGCAAGCGG	Poirel <i>et al.</i> , 2007
7	qnrS-3'ext	GAATTCGACGGTTTAGATCC	Poirel <i>et al.</i> , 2007
8	Mob-1F	TTCTCCCGTTGCATAAGACC	Este trabajo
9	Mob-1R	TTACTGAGGCGCTGGAAAAC	Este trabajo
10	Mob-2F	CTGACTTGCCACCACAGAA	Este trabajo
11	Mob-2R	TTTGCCGAACAGGACTTACC	Este trabajo
12	Mob-3R	TGGGTAAGTGAAGACGAGCA	Este trabajo
13	qnrS-F	TAAATTGGCACCTGTAGGC	García-Fernández <i>et al.</i> ; 2009
14	ColE <sub>TP</sub> -R	GGTTTACCGGTGTCATTCC	García-Fernández <i>et al.</i> ; 2009

Genes	Cebadores	Tamaño del amplicón
<i>bla</i> <sub>LAP-1</sub> <sup>a</sup>	1-2	800 pb
213 <sup>a</sup>	4-5	500 pb
213 + <i>qnrS1</i> <sup>b</sup>	4-7	3000 pb
	5-7	3000 pb
<i>orfB</i> + <i>qnrS1</i> <sup>b</sup>	3-6	1300 pb
<i>mobA-mobB</i> <sup>b</sup>	8-9	700 pb
<i>mobA</i> <sup>b</sup>	10-11	800 pb
<i>mobA</i> + <i>mobC</i> <sup>b</sup>	10-12	1300 pb
<i>colE</i> <sub>TP</sub> + <i>qnrS1</i> <sup>b</sup>	13-14	2751 pb
Plásmido completo <sup>c</sup>	6-7	>10000 pb
	5-6	~10000 pb
	9-5	3500 pb

<sup>a</sup>Condiciones de PCR: desnaturalización inicial (94°C, 7min); 30 ciclos (94°C, 1min; 57°C, 1min y 72°C, 1min) y elongación final (72°C, 5min).

<sup>b</sup>Condiciones de PCR: desnaturalización inicial (94°C, 5min); 35 ciclos (94°C, 1min; 55°C, 1min y 65°C, 8min) y elongación final (72°C, 8min).

<sup>c</sup>Condiciones de PCR: desnaturalización inicial (94°C, 1min); 30 ciclos (98°C, 10seg y 68°C, 15min) y elongación final (72°C, 10min). Utilizamos la enzima TaKaRa La Taq (TM, Takara Bio Inc.).

En el caso de fragmentos de gran tamaño (>3-5kb) se empleó la DNA polimerasa TaKaRa La Taq (TM, Takara Bio Inc.) que se utilizó con los reactivos proporcionados por el fabricante (salvo los cebadores) en las concentraciones indicadas a continuación.

<i>Componentes (distribuidor)</i>	<i>Concentración stock</i>	<i>Volumen por tubo</i>	<i>Concentración final de reacción</i>
Cebador "forward" (Sigma)	25 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Cebador "reverse" (Sigma)	25 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Taq-Takara LA (Takara)	5 U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	2,5 U
Buffer II (Takara)	10 X	5 $\mu$ l	1 X
MgCl <sub>2</sub> (Takara)	25 mM	5 $\mu$ l	2,5 mM
dNTPs mix (Takara)	2,5 mM	8 $\mu$ l	0,4 mM
DNA	-	20 $\mu$ l	-
Agua miliQ estéril	-	Hasta 50 $\mu$ l	-

Las condiciones de amplificación cuando se usó la Taq-Takara polimerasa dependieron de la pareja de cebadores elegida y del tamaño de amplicón deseado. Se testaron las siguientes condiciones:

A) *Condiciones de amplificación para fragmentos de 2000 pb a 3000 pb*: desnaturalización inicial (94°C, 1min); 30 ciclos (94°C, 30 seg; 55°C, 1 min y 72°C, 3min) y elongación final (72°C, 10min).

B) *Condiciones de amplificación para fragmentos >3000 pb*: desnaturalización inicial (94°C, 1min); 30 ciclos (98°C, 5 seg y 68°C, 15 min) y elongación final (72°C, 10min).



### 6.5.- Estudio de integrones y promotores.

Se estudió la presencia de integrones de tipo 1, 2 y 3 mediante la detección por PCR de los genes codificantes de las integrasas de clase 1, 2 y 3 (*int11*, *int12*, *int13*). Se estudiaron además la región 3'-conservada (*qacEΔ1-sul1*) y la región variable de los integrones de clase 1 detectados. Los cebadores y las condiciones de amplificación de PCR, así como el tamaño del amplicón están descritos en la Tabla 20.

Tabla 20.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR para el estudio de integrones.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño amplicón)
<i>Int11</i> (integrasa clase 1)  GGGTCAAGGATCTGGATTTCG ACATGGGTGTAAATCATCGTC	94°C	5 min	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (483 pb)
	94°C	30 seg	30 ciclos	
	62°C	30 seg		
	72°C	1 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	
Región variable de integrón clase 1  GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	94°C	5 min	1 ciclo	Levesque y Roy, 1993 (variable)
	94°C	1 min	35 ciclos	
	55°C	1 min		
	65°C	8 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>qacEΔ1 + sul1</i>  GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG GCGAGGGTTCCGAGAAGGTG	94°C	5 min	1 ciclo	Sáenz (tesis doctoral), 2004 (1125 pb)
	94°C	30 seg	30 ciclos	
	63°C	30 seg		
	72°C	1 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	
<i>int12</i> (integrasa clase 2)  CACGGATATGCGACAAAAGGT GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C	5 min	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (788 pb)
	94°C	30 seg	30 ciclos	
	62°C	30 seg		
	72°C	1 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	
Región variable de integrón clase 2  CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	94°C	5 min	1 ciclo	White <i>et al.</i> , 2001 (variable)
	94°C	1 min	35 ciclos	
	60°C	1 min		
	72°C	6 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	

Tabla 20 (continuación).

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño amplicón)
	94°C	5 min	1 ciclo	
<i>intI3</i> (integrasa clase 3)	94°C	30 seg		Mazel <i>et al.</i> , 2000 (979 pb)
GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	62°C	30 seg	30 ciclos	
ACGGATCTGCCAACCTGACT	72°C	1 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	

El estudio de integrones requirió en algunos casos una estrategia de "PCR walking-primer", combinando distintos cebadores para amplificar y secuenciar de manera solapante y lo más completo posible el integrón. La elección de los distintos cebadores dependió del fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos del aislado, empleando cebadores de las tablas anteriores (Tabla 7-Tabla 20) o nuevos diseños en base a descripciones previas de la bibliografía como los siguientes [Vinué (tesis doctoral), 2010]:

*intI-centro*: CGAAATCCAGATCCTTGACCC (se une en el gen *intI1*).

*sat-R*: GAACCACGAATCGCATCTTT (se une en el gen que codifica una esterasa *estX*).

*psp-R*: ATATGTCGCCAGGTCGTAGC (se une en el gen que codifica una fosfoserina fosfatasa *psp*).

*aad-rev*: CAAGAATGTCATTGCGCTGC (se une en el gen *aadA* que confiere resistencia a estreptomicina).

En aquellos integrones de interés se estudió el polimorfismo de los promotores (Pc y P2) de los casetes génicos en los integrones de clase 1. Se amplificó el fragmento contenido entre los genes *intI1* y el primer casete génico situado inmediatamente después de *intI1*.

Para ello, se eligió el cebador *IntI-centro* y el correspondiente al casete génico y se realizó la PCR. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 35 ciclos (94°C, 1 min; 55°C, 1 min y 65°C, 8 min) y elongación final (72°C, 8 min). Posteriormente, el amplicón fue secuenciado utilizando los mismos cebadores que los empleados en la reacción de PCR.

La secuencia nucleotídica abajo descrita recoge la zona de amplificación donde se encuentra parte de la secuencia del gen de la integrasa 1, desde el cebador IntI1-centro (coloreado en fucsia), la secuencia codificante de la proteína ORF11 y la secuencia de la región de los promotores.

CGAAATCCAGATCCTTGACCCGCAGTTGCAAACCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACA  
 GAAGCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCCTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGT  
 CAGCACCACCGGAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTCCGATCTCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTG  
 CACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCAATGCCTGACGATGCGTGGAGACCGAAACCT  
 TGCCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCAAGGTTGCCGGGTGACGC  
 ACACCGTGAAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACA<sup>a</sup>TAAGCCTGTTGGTTGGTAAGCT<sup>a</sup>GTA  
 TGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCG  
 CAGTGGCGGTTTT<sup>b</sup>CAT<sup>b</sup>GGCTTGTTA<sup>c</sup>TGACTGTTTTTTTGTACAGT<sup>c</sup>CTATGCCTCGGGCATCCAAGCA  
 GCAAGCGGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGC  
AGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGCCAT

<sup>a</sup>Regiones -10 y -35 del promotor Pc; <sup>b</sup>Codón de inicio del gen *intI1*; <sup>c</sup>Regiones -10 y -35 del promotor P2. Los nucleótidos marcados en fucsia indican el cebador utilizado en este estudio (IntI1-centro) y los nucleótidos subrayados corresponden a la región que codifica para la proteína ORF11.

### 6.6.- CARACTERIZACIÓN DE LA ISLA GENÓMICA DE RESISTENCIA DE *Salmonella* DE TIPO 1 (SGI1).

En aquellas cepas que portaban el gen de resistencia a ampicilina *bla*<sub>PSE-1</sub> se estudió por PCR la presencia y estructura de la región de resistencia de la Isla Genómica típica de *Salmonella* Typhimurium (SGI1).

Tabla 21.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR para el estudio de SGI1.

Cebadores (5' → 3')		Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño de amplicón)
		94°C	3 min	1 ciclo	
A	thd-F: ACACCTTGAGCAGGGCAAAG	94°C	1 min		Targant <i>et al.</i> , 2010b (500 pb)
	int: AGTTCTAAAGGTTTCGTAGTCG	55°C	1 min	30 ciclos	
		72°C	1 min		
		72°C	5 min	1 ciclo	

Tabla 21 (continuación).

Cebadores (5' → 3')		Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño de amplicón)
B	IntI1-centro: CGAAATCCAGATCCTTGACCC aadArev: CAAGAATGTCATTGCGCTGC	94°C	3 min	1 ciclo	Vinué (tesis doctoral), 2010 (981 pb)
		94°C	1 min	30	
		55°C	1 min		
		72°C	1 min		
		72°C	5 min	1 ciclo	
C	sulΔ1-F: AAGGATTCCTGACCCTG floRSGI-R: AAAGGAGCCATCAGCAGCAG	94°C	3 min	1 ciclo	Targant <i>et al.</i> , 2010b (942 pb)
		94°C	1 min	30 ciclos	
		57°C	1 min		
		72°C	1 min		
		72°C	5 min	1 ciclo	
D	floRSGI-F: TTCCTCACCTTCATCCTAC tetR-R: TTGGAACAGACGGCATGG	94°C	3 min	1 ciclo	Targant <i>et al.</i> , 2010b (598 pb)
		94°C	1 min	30 ciclos	
		55°C	1 min		
		72°C	1 min		
		72°C	5 min	1 ciclo	
E	tetR-F: GCCGTCCGATAAGAGAGCA tetG-R: GAAGTTGCGAATGGTCTGCG	94°C	5 min	1 ciclo	Targant <i>et al.</i> , 2010b (1560 pb)
		94°C	1 min	35 ciclos	
		56°C	1 min		
		65°C	8 min		
		72°C	8 min	1 ciclo	
F	groELint-F: TTCTGGTCTTCGTTGATGCC blaPSE-R: CATCATTCGCTCTGCCATT	94°C	5 min	1 ciclo	Targant <i>et al.</i> , 2010b (1338 pb)
		94°C	1 min	35 ciclos	
		55°C	1 min		
		65°C	8 min		
		72°C	8 min	1 ciclo	
G	Sul1-F: TGGTGACGGTGTTTCGGCATT Orf5Q-R: AAGTGTCGACGTGGGTGAAT	94°C	5 min	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 Verdet <i>et al.</i> , 2006 (1411 pb)
		94°C	1 min	35 ciclos	
		55°C	1 min		
		65°C	8 min		
		72°C	8 min	1 ciclo	

Tabla 21 (continuación).

Cebadores (5' → 3')		Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño de amplicón)
		94°C	5 min	1 ciclo	
H	Orf5Q-F: CCGCATATCTGCACAAGCTC IS6100-R: GGTGATCGCTGCACCATAG	94°C	1 min	35 ciclos	Verdet <i>et al.</i> , 2006 (1183 pb)
		55°C	1 min		
		65°C	8 min		
		72°C	8 min	1 ciclo	
		94°C	3 min	1 ciclo	
I	S044-F: TGACGAGCTGAAGCGAATTG Int2SGI-R: AGCAAGTGTGCGTAATTTGG	94°C	1 min	30 ciclos	Targant <i>et al.</i> , 2010b (515 pb)
		55°C	1 min		
		72°C	1 min		
		72°C	5 min	1 ciclo	
		94°C	5 min	1 ciclo	
J	S044-F: TGACGAGCTGAAGCGAATTG yidY-R: ACCAGGGCAAAACTACACAG	94°C	1 min	35 ciclos	Targant <i>et al.</i> , 2010b (4758 pb)
		55°C	1 min		
		65°C	8 min		
		72°C	8 min	1 ciclo	

### 6.7.- ESTUDIO DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Salmonella enterica*

El estudio de genes de virulencia en las cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium se llevó a cabo por PCR. Se amplificaron genes de virulencia contenidos tanto en cromosoma como en plásmidos de virulencia según se indica en las Tabla 22 y Tabla 23.

Los genes de virulencia *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D*, *sopB*, *spvC*, *sodC1*, *sopE1*, *bcfC* y *gipA*, codificantes de distintas funciones de virulencia en las cepas de *S. enterica*, se agruparon según la definición de *virulotipo* (Huehn *et al.*, 2010), estableciendo para cada cepa un perfil de virulencia de acuerdo a estos genes.

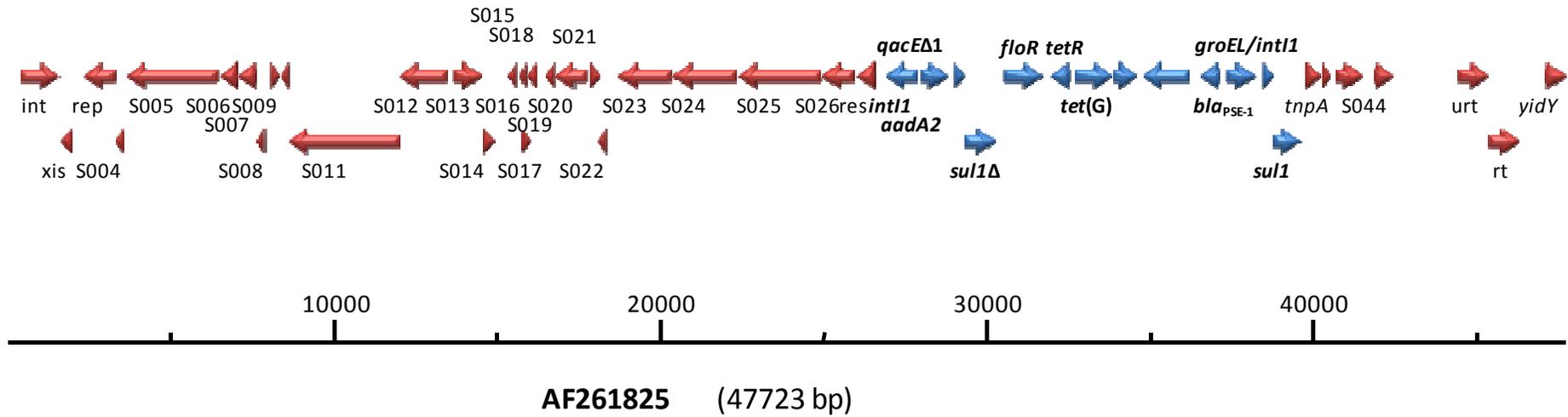


Figura 24.- Estructura clásica de SGI1-A (GenBank número AF261825). En azul se encuentra la región de resistencia.

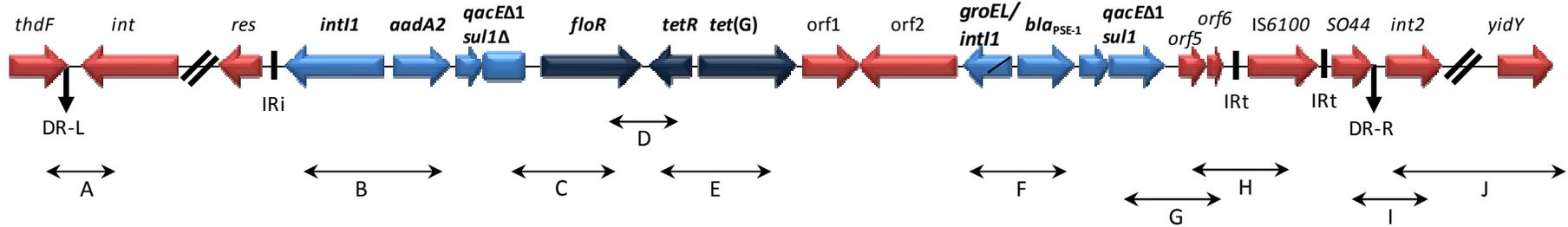


Figura 25.- Esquema de la región de resistencia de SGI1 mapeada por PCR (adaptado de Targant *et al.*, 2010).

Tabla 22.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR para el estudio de genes de virulencia localizados en islas de patogeneidad (SPIs) en *S. enterica*.

<i>Gen</i>	<i>SPI /Localización</i>	<i>Cebadores (5' →3')</i>	<i>Referencia (Tamaño de amplicón)</i>
<i>invE/A</i>	SPI1/Cromosoma	TGCCTACAAGCATGAAATGG/ AAACTGGACCACGGTGACAA	Stone <i>et al.</i> , 1994 (500 pb)
<i>orgA</i>	SPI1/Cromosoma	GATAAGGCGAAATCGTCAAATG/ GTAAGGCCAGTAGCAAAATTG	Soto <i>et al.</i> , 2006 (540 pb)
<i>avrA</i>	SPI1/Cromosoma	CCTGTATTGTTGAGCGTCTGG/ AGAAGAGCTTCGTTGAATGTCC	Huehn <i>et al.</i> , 2010 (422 pb)
<i>ttrC</i>	SPI2/Cromosoma	GTGGGCGGTACAATATTTCTTTT/ TCACGAATAATAATCAGTAGCGC	Soto <i>et al.</i> , 2006 (920 pb)
<i>ssaQ</i>	SPI2/Cromosoma	GAATAGCGAATGAAGAGCGTCC/ CATCGTGTTATCCTCTGTGACG	Soto <i>et al.</i> , 2006 (677 pb)
<i>sugR</i>	SPI3/Cromosoma	GCTCGACAAGCGAGGAGAAC/ CGCTGGTATTGACGCCAGAC	Martínez (tesis doctoral), 2007 (850 pb)
<i>rhuM</i>	SPI3/Cromosoma	TGGAGCGTATCCGCGATATTC/ AACCGGCGATATCCTTCTCAC	Martínez (tesis doctoral), 2007 (546 pb)
<i>rmbA</i>	SPI3/Cromosoma	TTTCCTGACAGCGCAGTACGG/ CCGGTAAACAAGCGGTGCATC	Martínez (tesis doctoral), 2007 (359 pb)
<i>misL</i>	SPI3/Cromosoma	GACGTTGATAGTCTGCCATCCAG/ CAATGCCGCCAGTCTCCGTGC	Soto <i>et al.</i> , 2006 (986 pb)
<i>mgtC</i>	SPI3/Cromosoma	TGACTATCAATGCTCCAGTGAAT/ ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG	Soto <i>et al.</i> , 2006 (655 pb)
<i>spi4R</i>	SPI4/Cromosoma	GATATTTATCAGTCTATAACAGC/ ATTCTCATCCAGATTTGATGTTG	Soto <i>et al.</i> , 2006 (1269 pb)
<i>spi4D</i>	SPI4/Cromosoma	GAATAGAAGACAAAGCGATCATC/ GCTTTGTCCACGCCTTTCATC	Soto <i>et al.</i> , 2006 (1231 pb)

Tabla 22 (continuación).

<i>Gen</i>	<i>SPI /Localización</i>	<i>Cebadores (5' → 3')</i>	<i>Referencia (Tamaño de amplicón)</i>
<i>sopB</i>	SPI5/Cromosoma	GATGTGATTAATGAAGAAATGCC/ GCAAACCATAAAAACTACTCA	Soto <i>et al.</i> , 2006 (1170 pb)
<i>pipA</i>	SPI5/Cromosoma	GATATTCCCGAACATGCACCAAAC/ TAGACCATTCTGGGAGGTGAAGG	Martínez (tesis doctoral), 2007 (575 pb)

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (95°C, 1 min; 60°C, 1 min y 72°C, 2 min) y elongación final (72°C, 5 min).

Tabla 23.- Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR para el estudio de genes de virulencia localizados en cromosoma y plásmidos de virulencia en *S. enterica*.

<i>Gen</i>	<i>Función/ Localización</i>	<i>Cebadores (5' → 3')</i>	<i>T (°C)<sup>1</sup></i>	<i>Referencia (Tamaño de amplicón)</i>
<i>phoP/Q</i>	Regulación transcripción/ Cromosoma	ATGCAAAGCCCGACCATGACG/ GTATCGACCACCACGATGGTT	60	Way <i>et al.</i> , 1993 (229 pb)
<i>stn</i>	Enterotoxina /Cromosoma	TTGTCTCGCTATCACTGGCAACC/ AAACTGGACCACGGTACAA	60	Prager <i>et al.</i> , 1995 (617 pb)
<i>hin/H2</i>	Variación de fase/ Cromosoma	CTAGTGCAAATTGTGACCGCA/ CCCATCGCGCTACTGGTATC	60	Way <i>et al.</i> , 1993 (236 pb)
<i>iroB</i>	Captación de hierro/ Cromosoma	TGCGTATTCTGTTTGTGCGGTCC/ TACGTTCCCACCATTCTTCCC	60	Bäumler <i>et al.</i> , 1997 (606 pb)
<i>himA</i>	Replicación, recombinación y regulación / Cromosoma	CGTGCTAACGCTCGCCTGTAT/ AGAGGTGGACGGGTTGCTGCCGTT	60	Bej <i>et al.</i> , 1994 (122 pb)
<i>agfA</i>	Fimbria agregativa / Cromosoma	TCCGGCCCCGGACTCAACG/ CAGCGCGGCGTTATACCG	60	Doran <i>et al.</i> , 1993 (261 pb)
<i>slyA</i>	Supervivencia en macrófagos/ Cromosoma	GCCAAAAGTGAAGCTACAGGTG/ CGGCAGGTCAGCGTGTCTGTG	60	Guerra <i>et al.</i> , 2000 (700 pb)
<i>sefD</i>	Fimbrias/ Cromosoma	TCAACTATTAAGCACAGAAGC/ TTATAATTCAATTTCTGTCTGC	50	Bäumler <i>et al.</i> , 1997 (374 pb)

Tabla 23 (continuación).

<i>Gen</i>	<i>Función/ Localización</i>	<i>Cebadores (5' → 3')</i>	<i>T (°C)<sup>1</sup></i>	<i>Referencia (Tamaño de amplificación)</i>
<i>sodC1</i>	Resistencia a oxidación/ Cromosoma	CCAGTGGAGCAGGTTTATCG/ GGTGCGCTCATCAGTTGTTC	55	Herrero <i>et al.</i> , 2006 (460 pb)
<i>sopE1</i>	Efactor SPI1/ Cromosoma	CAGACCCGTGAAGCTATACT/ AATGCTGTGGAGTCGGCAT	55	Pasmans <i>et al.</i> , 2003 (347 pb)
<i>sopE2</i>	Efactor SPI1/ Cromosoma	CAGACATGCGAAGCCATATT/ AATTGTTGTGGCGTTGGCAT	55	Martínez (tesis doctoral), 2007 (347 pb)
<i>bcfC</i>	Fimbrias/ Cromosoma	AACAGAGACATTGCCTTCC/ TTCTGATCGCCGCTATTCC	53	Huehn <i>et al.</i> , 2010 (467 pb)
<i>ast</i>	Toxina EAST1/ -	CCATCAACACAGTATAT/ GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	55	Paiva de Sousa y Dubreuil, 2001 (111 pb)
<i>gipA</i>	Ruta Peyer/ Cromosoma	ACGACTGAGCAGGCTGAG/ TTGGAAATGGTGACGGTAGAC	58	Huehn <i>et al.</i> , 2010 (518 pb)
<i>spvC</i>	Invasividad/ plásmido	ACTCCTTGACAACCAAATGCGGA/ TGTCTTCTGCATTTGCCACCATCA	60	Chiu y Ou, 1996 (566 pb)
<i>rck</i>	Resistencia sérica/ plásmido	TCGTTCTGCTCACTGC/ TCATAGCCCAGATCGATG	60	Guerra <i>et al.</i> , 2000 (474 pb)
<i>pefA</i>	Fimbrias/ plásmido	GCACACGCTGCCAATGAA/ CACAGACTTGAAGTCACC	60	Guerra <i>et al.</i> , 2000 (442 pb)
<i>pefB</i>	Fimbrias/ plásmido	CACAGACTTGAAGTCACC/ TGATGCGTGACAGGCGGTTCC	55	Herrero <i>et al.</i> , 2006 (110 pb)
<i>pefC</i>	Fimbrias/ plásmido	AAGAATCAGCAAATGCCCTGTG/ GCGAATTCTAAAGGAGAGCGACGTG	60	Bäumler <i>et al.</i> , 1996 (1403 pb)
<i>pefD</i>	Fimbrias/ plásmido	CTTTAAGGTCAGGCCCAAGG/ TCCGTTTCAGCGACAGTTTCC	55	Herrero <i>et al.</i> , 2006 (403 pb)

<sup>1</sup>T = temperatura de hibridación. Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (95°C, 1 min; T, 1 min y 72°C, 2 min) y elongación final (72°C, 5 min).

## **7- PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Detección e identificación de genes dihidrofolato reductasa (dfr)**

Con el fin de detectar e identificar distintos tipos de genes *dfr* relacionados con la resistencia al trimetoprim, se empleó la metodología propuesta por Navia *et al.* (2003) basado en la técnica de PCR-RFLP. Se realizaron las PCRs empleando cinco pares de cebadores (Dfria, DfrVII, DfrXII, DfrIb y DfrII) con las condiciones propuestas (Tabla 15). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa horizontales. Aquellas muestras que resultaron positivas fueron sometidas a RFLP. Se emplearon las enzimas detalladas en la Tabla 24, siguiendo las indicaciones de los distribuidores. Los patrones de bandas resultantes de la digestión enzimática se visualizaron en geles de agarosa al 2%.

Tabla 24.- Tamaños de los fragmentos obtenidos tras la RFLP de los amplicones de los genes *dfr* obtenidos mediante PCR (Navia *et al.*, 2003).

<i>Cebadores</i>	<i>Enzima</i>	<i>Tamaño de los fragmentos</i>	<i>Gen dfr deducido</i>
Dfria	<i>EcoRI*</i> ( <i>Tsp509I</i> )	236, 163, 42, 33	<i>dfrA1</i>
		455, 19	<i>dfrA5</i>
		356, 62, 33, 23	<i>dfrA15, dfrA15b</i>
		219, 101, 94, 41, 19	<i>dfrA16, dfrA16b</i>
Dfria	<i>MaeIII</i>	265, 183, 26	<i>dfrA15</i>
		448, 26	<i>dfr15b</i>
Dfria	<i>MseI</i>	250, 190, 31, 3	<i>dfrA16</i>
		190, 155, 95, 31, 3	<i>dfrA16b</i>
DfrVII	<i>AluI</i>	268, 206	<i>dfrA7</i>
		216, 206, 52	<i>dfrA17</i>
DfrXII	<i>TaqI</i>	286, 33	<i>dfrA12</i>
		187, 132	<i>dfrA13</i>
DfrIb	<i>AluI</i>	212, 175, 6	<i>dfrA14</i>
		166, 161, 60, 6	<i>dfrA6</i>
DfrII	<i>EcoRI*</i> ( <i>Tsp509I</i> )	78, 63	<i>dfrB1</i>
		119, 22	<i>dfrB2</i>
		141	<i>dfrB3</i>

## **8.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.**

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR se visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Para preparar el gel se utilizó agarosa D-1 (Pronadisa, Conda) en concentraciones 0,8-2,5 % (en función del tamaño de las bandas esperadas) en tampón TBE 1X [TBE 5X: 54 g/L Tris(hidroximetil)aminometano (Panreac); 27,5 g/L ácido bórico (Panreac); 20 ml EDTA 0,5 M, pH 8 (Panreac)].

Se cargaron los pocillos con la mezcla de 10  $\mu$ L de producto de PCR amplificado y 2  $\mu$ L de tampón de carga [preparado como 10 % (m/v) sacarosa, 0,0025 % (m/v) azul de bromofenol, 0,0025 % (m/v) xileno cianol]. En uno de los pocillos del gel se incluyeron 2  $\mu$ L del marcador de tamaño convenido según el tamaño de las bandas esperadas [Hyperladder I (Bioline), Hyperladder II (Bioline), Hyperladder IV (Bioline)]. Se sumergió el gel en tampón TBE 1X en la cubeta de electroforesis y se dejó que el DNA migrara a 130 V/cm durante aproximadamente 40 min (tiempo variable en función del tamaño de los fragmentos).

Se sumergió el gel en una disolución de bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml) durante 20 min. Se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con el captador de imágenes Gel Doc<sup>TM</sup> XR (BioRad).

## **9.- ESTUDIO DE LA RELACIÓN CLONAL: TIPIFICACIÓN MOLECULAR**

### **9.1.- MultiLocus Sequence Typing (MLST)**

La técnica de MLST ha sido desarrollada y diseñada para identificar clones o líneas clonales en poblaciones bacterianas, por lo que se considera un marcador molecular de aplicación en epidemiología global tanto a corto como a largo plazo.

El análisis se basa en la secuenciación nucleotídica de fragmentos internos de genes denominados “housekeeping” que codifican enzimas metabólicas consideradas estables en cada género bacteriano.

Con el fin de optimizar el proceso de secuenciación, el método propone unos cebadores para llevar a cabo la amplificación del DNA (Tabla 25), y otros cebadores “internos” que son los utilizados en la reacción de secuenciación (Tabla 26). Los amplicones obtenidos en *S. enterica* son comparados con la base de datos pública <http://mlst.ucc.ie/dbs/Senterica>. La combinación de los siete alelos de los genes “housekeeping” define una secuencia tipo denominada ST.

Tabla 25.- Cebadores de PCR y condiciones de amplificación de los siete genes “housekeeping” para el tipado por MLST (<http://mlst.ucc.ie/>).

<i>Gen</i>	<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Tamaño amplicón</i>
<i>thrA</i>	F: GTCACGGTGATCGATCCGGT R: CACGATATTGATATTAGCCCG	852 pb
<i>purE</i>	F: ATGTCTTCCCGCAATAATCC R: TCATAGCGTCCCCGCGGATC	510 pb
<i>aroC</i>	F: CCTGGCACCTCGCGCTATAC R: CCACACACGGATCGTGGCG	826 pb
<i>dnaN</i>	F: ATGAAATTTACGTTGAACGTGA R: AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC	833 pb
<i>hemD</i>	F: GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG R: ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA	666 pb
<i>hisD</i>	F: GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC R: CTGAACGGTCATCCGTTTCTG	894 pb
<i>sucA</i>	F: AGCACCGAAGAGAAACGCTG R: GGTGTTGATAACGATACGTAC	643 pb

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 10 min); 34 ciclos (94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min) y elongación final (72°C, 5 min).

Tabla 26.- Cebadores utilizados en la reacción de secuenciación de los siete genes “housekeeping” (<http://mlst.ucc.ie/>).

<i>Gen</i>	<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Tamaño amplicón</i>
<i>thrA</i>	F: ATCCCGGCCGATCACATGAT R: CTCCAGCAGGGGCTCTTTCAG	501 pb
<i>purE</i>	F: CGCATTATTCGGCGCGTGT R: CGCGGATCGGGATTTTCAG	399 pb
<i>aroC</i>	F: GGCACCAGTATTGGCCTGCT R: CATATGCGCCACAATGTGTTG	501 pb
<i>dnaN</i>	F: CCGATTCTCGGTAACCTGCT R: CCATCCACCAGCTTCGAGGT	501 pb
<i>hemD</i>	F: GTGGCCTGGAGTTTTCCACT R: GACCAATAGCCGACAGCGTAG	432 pb
<i>hisD</i>	F: GTCGGTCTGTATATCCCGG R: GGTAATCGCATCCACCAAATC	501 pb
<i>sucA</i>	F: AGCACCGAAGAGAAACGCTG R: GGTGTTGATAACGATACGTAC	643 pb

## 9.2.- Repetitive Extragenic Palindromic PCR (REP-PCR)

La REP-PCR es una técnica en la que se utilizan cebadores diseñados en base a secuencias cromosómicas repetidas. Estas secuencias están presentes en diferentes localizaciones a lo largo del cromosoma bacteriano. Cuando dos de estas secuencias están situadas lo suficientemente cerca, el fragmento de DNA que hay entre ambas es amplificado. Dado que el número y localización de estas secuencias repetidas entre cepas es variable, el número y tamaño de los fragmentos también lo es.

En este trabajo se emplean los cebadores y condiciones de amplificación por PCR que se muestran en la Tabla 27. Los amplicones fueron sometidos a electroforesis durante 2 h a 96 V y se visualizaron en geles de agarosa al 2 %.

Tabla 27.- Cebadores de PCR utilizados en el estudio de la relación clonal y condiciones de amplificación.

<i>Cebadores (secuencia 5' → 3')</i>	<i>Condiciones amplificación</i>	<i>Referencia (Tamaño amplicón)</i>
REP-PCR	94°C 3 min 1 ciclo	
F: IIIGCGCCGICATCAGGC	94°C 1 min	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
R: ACGTCTTATCAGGCCTAC	40°C 1 min 30 ciclos	
I= desoxiinosina	65°C 8 min	
	72°C 15 min 1 ciclo	

### 9.3.- Electroforesis en campos pulsados (PFGE)

En este trabajo, se siguió el protocolo propuesto por R. K. Gautom (1997) brevemente modificado.

**Preparación de los insertos:** a partir de un cultivo puro de 24 h en placa de agar BHI, se realizó una suspensión bacteriana en 3 ml de buffer SE (75 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 8) hasta conseguir una absorbancia de 1,35-1,6 a 610 nm.

Se preparó agarosa (Chromosomal Grade Agarose, BioRad) al 1,5% en buffer TE (10mM Tris/HCl pH8; 1mM EDTA pH8) y se mantuvo a 54°C con agitación. Se mezclaron 0,5 ml de la suspensión bacteriana con 0,5 ml de agarosa y se distribuyó en los moldes. Se dejó solidificar unos minutos en la nevera.

**Lisis bacteriana:** Se añadieron 3 ml del Buffer de lisis (50 mM Tris; 50 mM EDTA; 1% sarcosil; 0,1 mg/ml proteinasa K, pH 8) a cada inserto y se dejó incubar durante 2h en un baño de agua con agitación a 56°C.

**Lavados de los insertos:** tras eliminar el buffer de lisis, los siguientes lavados se realizaron en el baño con agitación a 56°C:

10 ml de agua destilada estéril cada 10 min, tres veces.

10 ml de TE cada 10 min, dos veces.

Lavar una tercera vez con TE a temperatura ambiente.

Los insertos se pueden guardar a 4°C para próximas aplicaciones.

**Digestión enzimática:** se empleó medio inserto por cepa en estudio para cada digestión y cada uno de ellos se digirió con una enzima diferente: *Xba*I y *Spe*I. El volumen final del buffer de digestión fue de 100 µL por tubo, a los que se añadió 40 U de enzima *Xba*I (NewEngland, Biolabs) ó 10 U de enzima *Spe*I (NewEngland, BioLabs), BSA al 0,01 %, el volumen necesario del Buffer 10 X de enzima y agua destilada estéril. Se dejaron incubar durante 6 h a 37°C en ambos casos.

**Preparación del gel de agarosa:** se disolvió agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) al 1% en TBE 0,5X. Se vertió la agarosa fundida en el molde para hacer el gel, preparado previamente con el peine correspondiente y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se rellenaron los pocillos con los insertos dejando el primero y último de los mismos para el marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker de BioLabs, New England) y se sellaron con agarosa a 50°C.

**Electroforesis:** se realizó en una cubeta de electroforesis de campos pulsados CHEF-DR III (BioRad) con 2 L de TBE 0,5X suplementado con tiourea 75 µM. El gradiente de voltaje fue 6 V/cm, y se empleó una rampa lineal pulsada de 2 a 64 seg durante 20 h a 14°C en el caso de la digestión con la enzima *Xba*I y dos rampas lineales pulsadas de 5-45 seg y de 15-45 seg durante 10 h (cada una) a 14°C en el caso de la digestión con la enzima *Spe*I.

**Tinción del gel y visualización:** se tiñó el gel en una solución acuosa de 200 ml de bromuro de etidio (20 µL/ 200 ml, a partir de una disolución 10 mg/ml) durante 10 min. Se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con el captador de imágenes Gel Doc<sup>TM</sup> XR (BioRad). El gel se destiñó en agua miliQ.

**Análisis de los patrones de PFGE:** Los patrones se compararon y clasificaron en indistinguibles, estrechamente relacionados, posiblemente relacionados o diferentes según las directrices propuestas por Tenover *et al.* (1995).

## **10.- SECUENCIACIÓN**

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo en aquellos casos en los que no se dispusiese de una cepa control positiva, en la detección de mutaciones,

caracterización de la región variable de los integrones de clase 1 y estudio del promotor de los casetes génicos o en el estudio de MLST.

Los amplicones procedentes de la PCR fueron secuenciados en ambas direcciones por el servicio de secuenciación del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) con el secuenciador ABI 3130 XL (Applied Biosystems). En aquellos casos en los que el amplicón era demasiado grande, la secuenciación se realizó con los cebadores empleados en la PCR (cebadores exteriores) y posteriormente se diseñaron cebadores internos para secuenciar completamente el fragmento de DNA amplificado. Esta estrategia, denominada “primer-walking” fue llevado a cabo por el servicio de Genome Express (Reino Unido).

### **10.1.-Purificación del producto de PCR**

Se realizó una purificación del producto de PCR siguiendo el protocolo del kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Tras la purificación se visualizaron 5  $\mu$ L del producto de PCR purificado en geles de agarosa, para comprobar si existía la concentración adecuada.

En los casos en que se precisaba purificar el producto de PCR a partir del gel de agarosa, se purificó la muestra mediante el kit QIAquick GEL Extraction (Qiagen). Para la purificación se cargó todo el volumen de muestra y se recortó el gel intentando ajustarse al máximo a la banda para evitar el exceso de agarosa. Tras el proceso de purificación, 5  $\mu$ L del producto de PCR purificado se visualizaron en geles de agarosa, para comprobar si existía la concentración adecuada y si se había obtenido una única banda.

### **10.2.- Análisis de las secuencias**

Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el software BioEdit v7.0.5. Se utilizaron herramientas informáticas para el tratamiento de las secuencias (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>). Las secuencias consenso de los genes estudiados se determinaron mediante la web del EMBL (European Molecular Biology Laboratory) del European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk>) y se compararon con las incluidas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para la traducción aminoacídica se utilizó un programa informático proporcionado por el Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). El análisis de MLST se realizó con la base de datos MLST Database de la Universidad de College Cork (Irlanda) (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) para determinar la secuencia tipo (ST) en las cepas estudiadas.

## 11.- ANÁLISIS PLASMÍDICO

### 11.1.- TIPADO DE PLÁSMIDOS POR “PCR-Based Replicon Typing” (PBRT).

Se llevó a cabo el método de identificación de plásmidos por “PCR-based replicon typing” (PBRT) descrito inicialmente por Carattoli *et al.*, (2005) en el que se desarrolla un método de tipado de plásmidos basado en amplificar por PCR replicones de la mayoría de los grupos de incompatibilidad de plásmidos de enterobacterias. Los componentes y cantidades empleadas para un volumen final de 25  $\mu$ L en cada tubo de reacción se presentan a continuación.

Componentes (distribuidor) <sup>o</sup>	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebador “forward” (Sigma Aldrich)	50 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
Cebador “reverse” (Sigma Aldrich)	50 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
BIOTAQ™ DNA polimerasa (Bioline)	5 U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L	1.25U
Tampón de reacción NH <sub>4</sub> (Bioline)	10 X	2,5 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	50 mM	0,75 $\mu$ L	1,5 mM
dNTPs (Bioline)	10 mM	0,5 $\mu$ L	0,2 mM
DNA	---	5 $\mu$ L	---
Agua miliQ estéril	---	Hasta 25 $\mu$ L	---

<sup>a</sup>En las PCRs múltiples, se añadieron tres parejas de cebadores.

En todas las reacciones se incluyeron un control negativo sin DNA cuyo volumen se ajustó a 25 $\mu$ L con agua miliQ estéril. También se incluyeron los controles positivos para cada grupo de incompatibilidad, proporcionados por la Dra. Alessandra Carattoli (Istituto Superiore di Sanità in Rome, Italia). Las secuencias de los cebadores, las condiciones de amplificación y el tamaño de los fragmentos estudiados se describen en la Tabla 28.

Tabla 28.-Cebadores utilizados en PBRT para el estudio de plásmidos y condiciones de amplificación (Carattoli *et al.*, 2005; García-Fernández *et al.*, 2009; Villa *et al.*, 2010).

Tipo de replicón	Cebadores (5' → 3')	Tamaño amplicón
HI1 <sup>a</sup>	F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R: TGCCGTTTCACCTCGTGAG	471 pb
HI2 <sup>a</sup>	F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCTT	644 pb
I1 <sup>a</sup>	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139 pb
Xb	F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	376 pb
L/Mb	F: GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785 pb

Tabla 28 (continuación).

<i>Tipo de replicón</i>	<i>Cebadores (5' → 3')</i>	<i>Tamaño amplicón</i>
N <sup>b</sup>	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTCAACTCTGCCAAGTTC	559 pb
W <sup>c</sup>	F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242 pb
Y <sup>d</sup>	F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	765 pb
P <sup>d</sup>	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534 pb
FIA <sup>c</sup>	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462 pb
FIB <sup>c</sup>	F: GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702 pb
FIB (new)	F: TCTGTTTTATTCTTTTACTGTCCAC R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	683 pb
FIB (Salmonella)	F: TGCTTTTATTCTTAAACTATCCAC R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	683 pb
FIC <sup>d</sup>	F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262 pb
FII <sub>s</sub> <sup>e</sup>	F: CTGTCGTAAGCTGATGGC R: CTCTGCCACAAACTTCAGC	270 pb
FII (new)	F: CTGATCGTTTAAGGAATTTT R: CACACCATCCTGCACTTA	258-262 pb <sup>f</sup>
FII <sub>s</sub> (Salmonella)	F: CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC	259-260 pb <sup>f</sup>
FII <sub>y</sub> (Yersinia)	F: TGGYAGGGAAGCTGGTTCTG R: GTRAGTCACACCTTCCCGC	227 pb
FII <sub>k</sub> (Klebsiella)	F: TCTTCTTCAATCTTGGCGGA R: GCTTATGTTGCACRGAAGGA	142-148 pb <sup>f</sup>
F <sub>repB</sub> <sup>g</sup>	F: TGATCGTTTAAGGAATTTT R: GAAGATCAGTCACACCATCC	270 pb
A/C <sup>e</sup>	F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465 pb
T <sup>e</sup>	F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750 pb
K	F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160 pb
B/O	F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159 pb
U	F: TCACGACACAAGCGCAAGGG R: TCATGGTACATCTGGGCGC	843 pb
R	F: TCGCTTCATTCTGCTTCAGC R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	251 pb

Tabla 28 (continuación).

Tipo de replicón	Cebadores (5' → 3')	Tamaño amplicón
oricolE	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGCGAAACCCGACAGGACT	187 pb
oricolE <sub>TP</sub>	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGTTTACCGGTGTCATTCC	106 pb

<sup>a</sup>Multiplex 1; <sup>b</sup>Multiplex 2; <sup>c</sup>Multiplex 3; <sup>d</sup>Multiplex 4; <sup>e</sup>Multiplex 5; Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (94°C, 1 min; 60°C, 30 seg y 72°C, 1 min) y elongación final (72°C, 5 min). <sup>f</sup>Tamaño de amplicón variable. <sup>g</sup>La temperatura de hibridación para esta PCR fue de 52°C.

Se llevó a cabo el subtipado de los plásmidos IncF e IncI1 obtenidos mediante plasmid MultiLocus Sequence Typing (pMLST). En el caso de los plásmidos IncF se realizó secuenciando cada amplicón obtenido (Villa *et al.*, 2010) en el esquema de PCRs anterior; mientras que el subtipado del grupo de incompatibilidad IncI1 (García-Fernández *et al.*, 2008) se realizó amplificando y secuenciando una colección de genes adicionales.

Tabla 29.- Cebadores utilizados para tipar por pMLST el plásmido del grupo de incompatibilidad IncI1 (García-Fernández *et al.*, 2008).

Gen	Cebadores (5' → 3')	Tamaño amplicón
<i>ardA</i>	F: ATGTCTGTTGTTGCACCTGC R: TCACCGACGGAACACATGACC	501 pb
<i>trbA-pndC</i> <sup>2</sup>	F: CGACAAATGCTTCCGGGGT R: CGAATCCCTCACCATCCAG	883 pb
<i>sogS</i>	F: TTCCGGGGCGTAGACAATACT R: AACAGTGATATGCCGTCCG	291 pb
<i>pill</i>	F: CCATATGACCATCCAGTGCG R: AACCACTATCTCGCCAGCAG	316 pb

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5min); 30 ciclos (94°C, 30 seg.; 60°C, 30 seg y 72°C, 1 min) y elongación final (72°C, 5 min).

Una vez obtenidas las secuencias para los distintos genes del subtipado de IncI1 o IncF, fueron introducidas en la página web <http://pubmlst.org/plasmid/> que permite conocer el ST para cada grupo Inc; así como comparar nuestros datos con la base de datos que ofrece.

<sup>2</sup> Se diseñaron los cebadores específicos del sistema toxina-antitoxina *pndAC* para el estudio puntual de cepas. *pndAC*-F: ACCGCCGTAAGGCAATGGAG; *pndAC*-R: GCAACAAAGCGGCCGAGAA. Tamaño de amplicón 222 pb.

## 11.2.- Experimentos de conjugación sobre filtro.

A partir de un cultivo puro en placa BHI de las cepas dadoras y receptoras, se realizaron inóculos en tubos de 3ml de BHI. Como cepa receptora se utilizó *E. coli* CSH26 (resistente a rifampicina, libre de plásmidos y lactosa negativa). Tras 24 horas a 37°C se colocó un filtro Millipore (0,45 µm) sobre la placa de BHI y se añadió sobre él: 10 µL de las cepas dadora y 100 µL de la cepa receptora perfectamente homogeneizadas. Se incubó la placa durante 24 h a 37 °C.

Tras el periodo de incubación, se lavó el filtro con 1 ml de BHI (introducir el filtro con unas pinzas en un tubo de BHI y agitar). Se realizaron diluciones seriadas en medio BHI líquido ( $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ) y se sembraron en placas de BHI agar suplementadas con antibiótico. Las placas testadas, según el fenotipo de resistencia que queríamos estudiar, fueron las siguientes:

Para cepas que portaban *qnrS* y *aac(6')-Ib*:

Rifampicina 100 µg/ml.

Tobramicina 8 µg/ml.

Rifampicina 100 µg/ml + tobramicina 8 µg/ml.

Ciprofloxacina 0,25; 0,5; 1 y 2 µg/ml.

Rifampicina 100 µg/ml + ciprofloxacina 0,25/0,5/1/2 µg/ml.

Para cepas que portaban beta-lactamasas de tipo CTX-M:

Rifampicina 100 µg/ml.

Cefotaxima 5 µg/ml.

Rifampicina 100 µg/ml + cefotaxima 5 µg/ml.

Para cepas que portaban beta-lactamasas de tipo SHV:

Rifampicina 100 µg/ml.

Ceftazidima 8 µg/ml.

Rifampicina 100 µg/ml + ceftazidima 8 µg/ml.

Para cepas que portaban beta-lactamasas de tipo AmpC (CMY):

Rifampicina 100 µg/ml.

Cefoxitina 16 µg/ml.

Rifampicina 100 µg/ml + cefoxitina 16 µg/ml.

En las placas suplementadas con rifampicina debía crecer tanto la cepa receptora como los transconjugantes; mientras que en las placas suplementadas con los otros antibióticos deberían crecer las cepas dadoras y los transconjugantes. En las placas suplementadas con dos antibióticos debían crecer tan solo los transconjugantes.

Se incubaron las placas a 37°C durante 24-48 h, se identificaron los transconjugantes en medio TSI (para estar seguros de quedarnos con las cepas de *E. coli*), se tipificaron por REP-PCR y PFGE, y se realizó antibiograma.

### **11.3.- Transformación (electro-transformación).**

La transformación consiste en la transferencia de DNA desnudo directamente a la célula receptora, que previamente debe haber sido inducida a un estado de competencia que le permita captar DNA exógeno. Se utilizó esta técnica, en su variante de electro-transformación para el estudio de plásmidos de interés que no podían ser transferidos (plásmidos movilizables) por el método de conjugación.

El protocolo seguido para la electro-transformación se realizó según las indicaciones del kit ElectroMax DH10B cells, Gibco Invitrogen. El procedimiento fue el siguiente:

Se emplearon las células electrocompetentes comerciales *E. coli* ElectroMax DH10B (Gibco Invitrogen) y se realizó la extracción de DNA plasmídico como se expone en los apartados 11.4, 11.5 o 11.6.

Se pusieron en hielo: 2 µl de la extracción de DNA plasmídico, el medio SOC (Gibco Invitrogen), las células electrocompetentes y las cubetas de electroporación (longitud= 0.1 cm; BioRad). Se mezclaron 20 µl de células electrocompetentes sobre los eppendorf que contenían 2 µl de la extracción de DNA plasmídico. Dicha mezcla se transfirió a la cubeta de electroporación (BioRad), procurando que no quedasen burbujas, se colocó sobre el soporte del electroporador (Gene Pulser Xcell Electroporation System, BioRad).

El pulso de electroporación se realizó bajo las siguientes condiciones: 12,5 kV/cm; 200 ohm; 25 µF.

Se pipetearon 500 µl del medio SOC sobre la cubeta de electroporación, se mezcló y se vertieron de nuevo sobre el eppendorf inicial. Se incubaron los eppendorf durante 1 h a 37°C con agitación 225 rpm.

Se sembraron la dilución directa y una dilución  $10^{-1}$  en placas de LB agar suplementadas con kanamicina (30 g/ml). Se incubaron las placas a 37°C durante 24-48 h y se analizaron las colonias de posibles transformantes.

#### **11.4.- Extracción del DNA plasmídico mediante lisis alcalina (método Kado-Liu modificado).**

Con la finalidad de estudiar más exhaustivamente los plásmidos, se realizó una extracción de plásmidos siguiendo distintos métodos, como a continuación se exponen. Los métodos basados en lisis alcalina aprovechan las diferencias existentes entre el DNA cromómico y el DNA plasmídico, tales como el contenido G+C, las diferencias en tamaño y la densidad de éstos para poder extraerlos separadamente.

Son muchos los métodos que se han descrito para la extracción de DNA plasmídico, entre ellos el protocolo de Kado y Liu (Kado y Liu, 1981) que permite la extracción de plásmidos de gran tamaño (60-300 Kb). En este trabajo se utilizó dicho protocolo modificado, como se describe a continuación:

Se inoculó una colonia de la cepa a extraer en 3 ml de LB líquido suplementado con antibiótico y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se transfirieron 1,5 ml del cultivo a un tubo eppendorf. Se centrifugaron 5 min a 14.000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

Se adicionaron 20 µl de buffer Kado y se resuspendió la mezcla para homogeneizar. [Buffer Kado: 50 mM Tris + 1 mM EDTA pH 8]. Se añadieron 100 µl de la mezcla de lisis (a preparar en el momento) y se voltearon los tubos eppendorf con suavidad. [Mezcla de lisis: 1,04 ml agua destilada + 400 µl SDS 15% + 500 µl Tris 250 mM + 30 µl NaOH 5N]. Se incubó la mezcla en un baño de agua a 58°C durante 27 min.

Se adicionaron 100 µl de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) [Sigma Aldrich] preparada en el momento sobre la mezcla lisada. Se mezcló suavemente por inversión. Observamos la formación de dos fases. Tras centrifugar 30 min a 14.000 rpm, se recuperaron 90 µl de la fase acuosa (fase superior) y se adicionó sobre tubos eppendorf limpios. Se conservó la extracción de DNA plasmídico a 4°C.

En aquellos casos en los que se deseó utilizar la extracción de DNA plasmídico para técnicas de transformación o digestión con enzimas fue necesaria una etapa de purificación, lavado y precipitación con etanol:

Se tomó el volumen completo de extracción de DNA plasmídico, y si era inferior a 100  $\mu$ l se enrasó con agua hasta llegar a ese volumen.

Se añadieron 100  $\mu$ l de fenol:cloroformo:isoamilalcohol 25:24:1 [Phenol:chloroform:isoamylalcohol 25:24:1 saturated with 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, Sigma Aldrich] y se agitó con un vórtex. Se centrifugó 5 min a 13.200 rpm, tras los cuales se transfirió la fase acuosa a tubos eppendorf limpios.

Se añadió un volumen de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugaron los tubos 5 min a 13.200 rpm. Se pasó la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio.

Se añadió una proporción 1/10 v/v de acetato sódico 3 M pH5,2 y tres volúmenes de etanol absoluto. La fase de precipitación se llevó a cabo a -20°C durante 30 min. Se centrifugó 5 min a 13.200 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 150  $\mu$ l de etanol 70%. Se centrifugó 5 min a 13.200 rpm, se deshechó el sobrenadante y se secó el pellet en speed-vac (15 min).

Se hidrató el pellet en un volumen entre 30-100  $\mu$ l con agua destilada.

### **11.5.- Extracción del DNA plasmídico mediante lisis alcalina (método Birnboim-Doly).**

El análisis de plásmidos de pequeño tamaño fue llevado a cabo mediante la extracción de dichos plásmidos por lisis alcalina a través del protocolo de Birnboim-Doly (Birnboim and Doly, 1979), que a continuación se describe. Este protocolo resulta de elección cuando se desea transformar o digerir el DNA plasmídico, ya que no necesita purificación posterior. El procedimiento que se siguió fue:

Se inoculó una colonia de la cepa en estudio en 3 ml de LB líquido suplementado con antibiótico y se incubó durante toda la noche a 37°C. Tras transferir 1,5 ml del cultivo a un tubo eppendorf, se centrifugó 5 min a 14.000 rpm. Se resuspendió el pellet en 100  $\mu$ l de

Solución I y se incubó 5 min en hielo. [Solución I: 25mM Tris-HCl pH 8 + 10 mM EDTA pH 8 + 50 mM glucosa].

Se adicionaron 200 µl de Solución II (solución de lisis) y se mezcló por inversión. Se incubó 5 min en hielo. [Solución II o solución de lisis: 0.2 N NaOH + 1% SDS].

Se añadieron 150 µl de *Solución III* y se mezcló por inversión. Se incubó 15 min en hielo. [*Solución III* o *solución neutralizante*: 3M acetato de sodio pH 5.2].

Se centrifugaron los tubos eppendorf durante 15 min a 14,000 rpm. Se recogió el sobrenadante en tubos eppendorf.

Se añadió un volumen (aproximadamente 450 µl) de fenol:cloroformo:isoamilalcohol 25:24:1 [Phenol:chloroform:isoamylalcohol 25:24:1 saturated with 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, Sigma Aldrich] y se centrifugó 7 min a 14,000 rpm.

Se recogió la fase superior en tubos eppendorf que contenían 3 µl de RNasa (5 mg/ml) [Ribonuclease A from bovine pancreas; Sigma Aldrich] y se incubaron los tubos 15 min a 37°C.

Se adicionó 2 volúmenes (aproximadamente 700 µl) de etanol 100% frío y se mezcló por inversión.

Tras la etapa de precipitación toda la noche a -20°C se centrifugaron las muestras 15 min a 14.000 rpm. Se deshechó el sobrenadante y se adicionó 500 µl de etanol 70%. Se centrifugó la mezcla 15 min a 14,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se secaron los pellet en speed-vac (15 min).

Se hidrató el pellet en 20 µl de TE en aquellos casos en los que solo se pretendía visualizar los plásmidos. Cuando la extracción de DNA plasmídico fue utilizada con fines de digestión, secuenciación o transformación, se hidrató el pellet en 20 µl de agua destilada estéril.

### **11.6. Extracción del DNA plasmídico utilizando el kit "Qiagen".**

La extracción de DNA plasmídico se realizó mediante el empleo del kit "Qiagen plasmid purification midi kit (Qiagen)" que se basa en un lisado de las células, purificado por centrifugación, permitiendo recoger el DNA plasmídico tras precipitación con isopropanol.

Los pasos llevados a cabo fueron los siguientes:

Se inoculó una colonia de la cepa a extraer en 50 ml de caldo BHI durante toda la noche a 37°C.

Se transfirió el contenido a un tubo falcon del mismo volumen y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por vertido y el exceso de medio BHI con una pipeta para posteriormente resuspender el pellet con 4 ml de buffer P1.

Se añadieron 4 ml de buffer de lisis P2 y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min como máximo. Durante este tiempo, se forma una masa blanquecina que contiene los restos de lisis.

Se añadieron 4 ml de buffer de neutralización P3, se mezcló 4-6 veces vertiendo el tubo y se dejó en hielo durante 15 min.

Se centrifugó a 20.000 rpm durante 30 min a 4°C. Paralelamente, se equilibraron las columnas haciendo pasar 4 ml de buffer QBT por la columna. Se vertió el sobrenadante obtenido por las columnas a través de gasas estériles para favorecer el filtrado. Se realizaron dos lavados con 10 ml de buffer QC. Después de filtrar bien, se eluyó el contenido de DNA con 5 ml de buffer QF en tubos falcon de 50 ml.

Se prepararon 6 tubos eppendorf por muestra con 583 µl de isopropanol que se mezclaron después con 833 µl de eluyente para continuar la extracción (cantidades ajustadas según la cantidad de sobrenadante que se recoge y el volumen de los tubos falcon). Se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante con cuidado ya que no se puede visualizar el pellet, se añadieron 339 µl de etanol 70% para eliminar los restos de isopropanol y se centrifugó 15.000 rpm 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó de nuevo el sobrenadante por volteo y se dejó secar a 37°C para eliminar los restos de etanol.

Se añadieron 30 µl de agua miliQ y se fue rehidratando el pellet, transfiriendo el total de líquido de un eppendorf a otro. En el último tubo, se dejó toda la noche para que se resuspenda y al día siguiente se repitió la operación, transfiriendo el contenido desde el último al primer tubo. Se midió la cantidad de DNA plasmídico recogido empleando el NanoDrop.

## **11.7.- Visualización de plásmidos.**

### ***Electroforesis en geles de agarosa horizontales.***

Con el fin de visualizar si la extracción de plásmidos había sido satisfactoria, se preparó un gel de agarosa D-1 (Pronadisa, Conda) de concentración 0,8% en tampón TBE 1X (tal y como se explicó en el Apartado 9). Se cargaron 10 µl de DNA plasmídico mezclados con 3 µl de tampón de carga. Se incluyeron dos marcadores de peso molecular (3 µl): HyperLadder III (500-5000 pb) y LambdaHindIII (564-23130 pb). Se sumergió el gel en tampón TBE 1X en la cubeta de electroforesis y se dejó que el DNA migrara a 50 V/cm durante 20 min y posteriormente a 100 V/cm durante aproximadamente 120-200 min.

Para visualizar las bandas, se sumergió el gel en una disolución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 20 minutos. Se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con un captador de imágenes Gel Doc<sup>TM</sup> XR (BioRad).

### ***Electroforesis en geles de agarosa verticales.***

La visualización de la extracción de DNA plasmídico por el método Kado-Liu se realizó en geles de agarosa verticales, que permiten una mayor resolución en fragmentos de gran tamaño.

Se preparó agarosa 0,9% en TBE 1X (Standard low agarose, BioRad) y se atemperó a 50°C. Con esta agarosa se rellenó el espacio entre los cristales de la cubeta vertical, prestando especial atención a los espacios entre el peine. Tras solidificar el gel, se retiró el peine con cuidado, se rellenaron las cubetas superior e inferior de electroforesis con TBE 1X y se colocaron 25 µl de cada muestra junto con 5 µl de buffer de carga por muestra. Se dejó que el DNA migrara a 50 V/cm durante 20 min y posteriormente a 100 V/cm durante 200-300 min.

Para visualizar las bandas, se sumergió el gel en una disolución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 20 minutos. Se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con un captador de imágenes Gel Doc<sup>TM</sup> XR (BioRad).

### ***Digestión con nucleasa S1 seguido de PFGE (S1-PFGE).***

Mediante esta técnica se llevó a cabo el estudio de plásmidos de las cepas de interés, con el fin de localizar y visualizar el número y tamaño exacto de plásmidos que contenían.

Se prepararon los insertos siguiendo el protocolo propuesto por CDC-PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>) y se digirieron con nucleasa S1 (S1 nuclease 180 U/ $\mu$ l, Takara Bio Inc.), una endonucleasa que aplicada durante un periodo de tiempo limitado, corta las hebras de DNA plasmídico, convirtiendo los plásmidos superenrollados en moléculas lineales capaces de ser visualizados en una electroforesis. La migración posterior en electroforesis de campos pulsados permite medir la talla de los plásmidos (Barton *et al.*, 1995).

#### **Preparación de los insertos según el protocolo CDC-PulseNet.**

**Preparación de los insertos:** a partir de un cultivo puro de 24 h en placa de agar LB, se realizó una suspensión bacteriana en 4 ml de buffer CSB (100 mM Tris-HCl + 100 mM EDTA pH 8) hasta conseguir una absorbancia de  $1,4-1,5 \pm 0,05$  a 610 nm.

Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) al 1% en buffer TE suplementado con SDS 20% a una concentración 5% v/v y se mantuvo a 50°C en un baño de agua. Se mezclaron en tubos eppendorf 0,2 ml de suspensión bacteriana, 15  $\mu$ l de una disolución de proteinasa K (20 mg/ml; Sigma Aldrich) y 0,3 ml de agarosa. Se distribuyó la mezcla en los moldes y se dejó solidificar 20 min en nevera.

**Lisis bacteriana:** se añadieron 5 ml de buffer de lisis CLB (50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM EDTA pH 8 + 1% sarcosil + 0,1 mg/ml proteinasa K) a cada inserto y se dejó incubar 2 h en un baño de agua con agitación a 54°C.

**Lavado de los insertos:** tras eliminar el buffer de lisis CLB, se realizaron los siguientes lavados en el baño de agua con agitación a 54°C:

10 ml de agua destilada estéril cada 10 min, dos veces.

10 ml de TE suplementado con tiourea (75  $\mu$ M) cada 10 min, dos veces.

10 ml de TE suplementado con tiourea (75  $\mu$ M) a temperatura ambiente.

Los insertos preparados de esta manera fueron utilizados para la digestión con enzima S1-nucleasa y electroforesis en campos pulsados (PFGE).

**Digestión del control de tamaño:** Se utilizó como patrón de tamaño de peso molecular la cepa *Salmonella* Braenderup H9812 (Hunter *et al.*, 2005). Para ello, se digirió medio inserto con la enzima *Xba*I. El volumen final de digestión fue de 100  $\mu$ l por tubo, a los que se añadió 40 U de enzima *Xba*I (NewEngland, Biolabs) BSA al 0,01%, el volumen necesario

del Buffer 10 X de enzima y agua destilada estéril. Se dejó incubar durante 6 h a 37°C en ambos casos.

**Etapa de equilibrado:** previa a la etapa de digestión con la enzima endonucleasa S1 se realizó una etapa de equilibrado de los insertos. Se tomó medio inserto por cepa y se incubó 10 min a temperatura ambiente en un volumen de 100 µl de buffer 1 X. Este buffer puede prepararse a partir del buffer comercial 10X que se provee con la enzima (S1 nuclease 180 U/µl, Takara Bio Inc.), o bien en el laboratorio (300 mM acetato de sodio pH 4,6 + 2800 mM NaCl + 10 mM sulfato de zinc).

**Etapa de digestión:** tras la etapa de equilibrado se retiraron los 100 µl de buffer y se sustituyeron por 100 µl de pool de digestión [mezcla de digestión para 18 muestras: 1 µl enzima S1 nucleasa 180 U/µl + 200 µl buffer 10X + 1800 µl agua destilada estéril]. Se incubó a 37°C en baño de agua durante exactamente 45 min.

**Etapa de parada:** tras la digestión se procedió a parar la reacción añadiendo en cada tubo eppendorf 10 µl de EDTA 0,5 M. Se incubó 10 min a temperatura ambiente, tras los cuales se sustituyó este buffer por 100 µl de TE.

**Preparación del gel de agarosa:** Se preparó un gel de agarosa (Agarose D-5, Pronadisa, Conda) al 1% disuelta en TBE 0,5X suplementado con tiourea (75 µM). Se vertió la agarosa en el molde para hacer el gel, preparado previamente con el peine correspondiente y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se rellenaron los pocillos con los insertos, dejando el primero y el último para los marcadores de tamaño comerciales Lambda Ladder PFG Marker (48,5-727,5 Kb) y Low Range PFG Marker (2,03-194,0 Kb) de New England Biolabs y que ayudaron en la determinación del peso molecular de los plásmidos. Se sellaron los pocillos con agarosa atemperada a 50°C.

**Electroforesis:** se realizó en una cubeta de electroforesis de campos pulsados CHEF-DR III (BioRad) con 2 l de TBE 0,5X suplementado con tiourea 75 µM. El gradiente de voltaje utilizado fue 6 V/cm, una rampa lineal pulsada de 2 a 64 seg durante 18 h a 14°C y con un ángulo de 120°.

**Tinción del gel y visualización:** se tiñó el gel en una solución acuosa de 200 ml de bromuro de etidio (10 µl/ 200 ml) durante 10 min. Se visualizó en un transiluminador ultravioleta y se fotografió. El gel se destiñó en agua miliQ.

### 11.8.- Hibridación con sondas de DNA (Southern Blot).

La hibridación por Southern blot se utilizó en este trabajo, siguiendo la metodología de revelado colorimétrico y por autoradiografía, para la detección de genes específicos de DNA celular. En ambos casos se partió de una digestión con enzima S1 nucleasa (Apartado 11.7) para el análisis de plásmidos, de una digestión con la enzima *ICeu-I* (análisis de cromosoma) o bien de geles de agarosa que provenían de electroforesis de extracciones de DNA plasmídico.

La enzima *ICeu-I* se utilizó para estudiar la posible localización cromosómica de nuestros genes de resistencia. Es una endonucleasa cuyo sitio de restricción se encuentra en el 23S ribosomal (Liu *et al.*, 1993). Se preparó un pool para la digestión que contenía Buffer 1X (10 µl), BSA 0,01% (1 µl), 10 U de enzima (2 µl) [*ICeu-I*, 5.000 U/ml, New England Biolabs], y agua hasta completar el volumen. Se colocó en un eppendorf 100 µl de esta mezcla de digestión y medio inserto, y se incubó a 37°C durante 6 h. Las condiciones de electroforesis fueron una rampa lineal pulsada de 50 a 90 seg, durante 20 h a 14°C y 6 V/cm.

El primer paso en el protocolo de hibridación fue la **obtención de la membrana de hibridación** mediante **transferencia Southern**. Una vez terminada la electroforesis, se lavó el gel con agua destilada para eliminar el bromuro de etidio durante 5 min y se procedió a la desnaturalización de las hebras de DNA mediante un método químico. Para ello, se mantuvo en solución desnaturalizante (1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH) durante 15 min, posteriormente en solución neutralizante (0,5 M Tris-HCl + 1,5 M NaCl) durante otros 15 min y se terminó con un lavado con agua durante 5 min. Para el paso de transferencia a una membrana de nitrocelulosa, con el fin de obtener una réplica de la disposición de los fragmentos de DNA en la membrana, se colocó el gel dentro de una bandeja que contenía buffer SSC 20 X (3 M NaCl + 0,3 M Tri-Na citrato pH 7) sobre un soporte duro con papel absorbente (Chromatography paper 3MM CHR Whatman) que sirve de conductor del buffer al gel para que se produzca la transferencia del contenido de DNA a la membrana de nailon (Roche). Sobre la membrana se colocó papel soporte (BioRad Blot Absorbent Filter Paper) y peso para facilitar la transferencia.

#### **Método por quimioluminiscencia.**

**Preparación de la sonda:** Se llevó a cabo la preparación de las sondas marcadas (con un fluorocromo) de los genes de resistencia, virulencia y 16S rDNA a estudiar. Para ello, se

utilizó el Kit (PCR DIG Probe Syntesis Kit, Roche) mediante el empleo de una PCR con nucleótidos marcados con digoxigenina en un volumen final de 50  $\mu$ l, tal y como se observa en la tabla:

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen por tubo</i>
PCR Buffer (vial 3)	5 $\mu$ l
PCR Dig Mix (vial 2)	5 $\mu$ l
Cebador "forward" (10 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Cebador "reverse" (10 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Enzima (vial 1)	0,75 $\mu$ l
DNA	5 $\mu$ l
Agua	24,75 $\mu$ l

La concentración final de DNA recomendada en la reacción fue entre 10-50 ng. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial (95°C, 2 min); 30 ciclos (95°C, 30 seg; 62°C, 30 seg y 72°C, 40 seg) y elongación final (72°C, 7 min). Se emplearon los cebadores descritos para estos genes (Tablas 7-23).

**Prehibridación:** una vez producida la transferencia de DNA, se lavó la membrana con agua para eliminar restos de sales y se fijó el DNA con luz ultravioleta durante 4 min para posteriormente introducirla en tubos de hibridación con 20 ml de solución de prehibridación en el horno de hibridación a 68°C durante 2 h.

La solución de prehibridación contiene:

- SSC 5 X (Invitrogen)
- N-Lauryl sarcosine 0,1% (Sigma)
- SDS 0,02% (BioRad)
- Esperma de salmón 75  $\mu$ g/ml (Invitrogen)
- Block Stock solution 1 X (Roche)

**Hibridación:** una vez preparada la sonda y realizada la prehibridación, se realizó la mezcla de 100  $\mu$ l de solución de prehibridación con 10  $\mu$ l de sonda. Se mantuvo a 100°C durante 10 min, se enfrió en hielo y se añadió al tubo de hibridación durante 20 h, durante las cuales la sonda hibrida con las moléculas de DNA de cadena sencilla de secuencia complementaria.

**Lavados de hibridación:** se realizaron 2 lavados de 5 min con SSC 2 X + SDS 0,1% a 68°C; y posteriormente 2 lavados de 15 min con SSC 0,1 X + SDS 0,1% a 68°C.

**Detección:** este proceso lleva varios pasos:

Lavado: introducimos la membrana en un medio con 50 ml de Washing Buffer 1X (Roche) de 1 a 5 min a temperatura ambiente.

Blocking: incubamos la membrana durante 30 min a temperatura ambiente con 100 ml de Blocking solution 1 X + ácido málico 1 X (Dig Wash and Block Buffer Set, Roche).

Conjugación: añadimos el anticuerpo, anti-digoxigenin-AP (Fab fragments, Roche) para marcar la sonda. Se añadieron 80 ml Blocking + 8 µl del anticuerpo.

Lavado: se lavó dos veces con 100 ml Washing Buffer 1 X (Roche) durante 15 min

Colocamos la membrana sobre un plástico y se le añadieron 20 ml de Detection Buffer 1 X (Roche) durante 3 min, seguido de 20 µl CSPD (Boehringer Mannheim) disuelto en 2 ml de Detection Buffer 1 X. Se dejó 5 min a temperatura ambiente y posteriormente 15 min a 37°C.

Revelado: Se realizaron diferentes exposiciones de 1 a 5 min con placas de rayos X (Amersham Hyperfilm™ECL, GE Healthcare) para obtener las diferentes auto-radiografías que nos permitan visualizar los fragmentos donde hibrida la sonda.

**Lavado de membrana:** Para eliminar la sonda se hicieron dos lavados de 15 min a 37°C con NaOH 0,2 M + SDS 0,1%, seguido de un lavado con SSC 2 X que deja la membrana lista para una nueva hibridación. La membrana puede almacenarse a 4°C.

### ***Método colorimétrico.***

Los pasos a seguir, hasta el punto de preparación de la sonda son los mismos que para el método por quimioluminiscencia.

**Preparación de la sonda:** la sonda se obtuvo en cada caso mediante reacción de PCR convencional (Tablas 3-13) pero utilizando en esta reacción de PCR los dNTP's marcados con digoxigenina (PCR DIG Labelling Mix, Roche).

**Pre-hibridación e hibridación:** una vez producida la transferencia de DNA, se lavó la membrana con agua para eliminar restos de sales y se fijó el DNA con luz ultravioleta durante 4 min para posteriormente introducirla en tubos de hibridación con 20 ml de solución de prehibridación DIG-Easy Hyb Granules (Roche) en el horno de hibridación a 42°C durante 30-

60 min. Tras esta incubación, se hirvió la sonda durante 5-10 min a 100°C y posteriormente se enfrió en hielo durante 10 min. Se adicionó la sonda en el tubo de hibridación y se incubó 20 h.

**Lavados de hibridación:** tras el periodo de incubación, se recuperó la sonda del tubo de hibridación en un falcón (se puede conservar a -20°C y reutilizarse varias veces). Seguidamente se realizaron los siguientes lavados:

2 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con SSC 2X + 0,01% SDS.

2 lavados de 15 minutos a 68°C con SSC 0,1X + 0,01% SDS.

**Detección inmunológica:** todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente:

Lavado: equilibramos la membrana en wash buffer 1X (DIG Wash and Block buffer set, Roche) durante 2 min.

Blocking: incubamos 30 min en 20 ml de blocking solution, preparada a partir de: 10X blocking solution (DIG Wash and Block buffer set, Roche). Teniendo en cuenta que deben separarse 20 ml de esta mezcla para la solución del anticuerpo.

Conjugación: Centrifugar el vial de anticuerpo (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche) durante 5 min a 14.000 rpm (a 4°C si es posible) en su vial original antes de cada uso y pipetear 4 µl de la superficie; que se mezclarán con 20 mL de blocking solution. Eliminar la solución de bloqueo que está en contacto con la membrana e incubar durante 30 min exactos con la solución preparada anteriormente.

Lavado: lavamos dos veces durante 15 min con 50 ml de wash buffer 1X (DIG Wash and Block buffer set, Roche).

Detección: equilibramos la membrana durante 2 min en 20ml de buffer de detección 1X (DIG Wash and Block buffer set, Roche). Seguidamente, se retiró esta solución y se incubó la membrana en 10 ml de solución "color substrate" recién preparado. Se debe preparar en oscuridad, ya que este reactivo es fotosensible: 200 µl de NBT/BCIP stock solution (Roche) con 10 ml de buffer de detección 1X (DIG Wash and Block buffer set, Roche). Después, se colocó la membrana en una bolsa transparente, protegida de la luz, y se añadió la *color substrate solution* por encima de la membrana.

La aparición de color comienza unos pocos minutos después y puede prolongarse hasta 16 horas. La membrana puede exponerse a la luz durante cortos periodos de tiempo

para seguir la aparición de color. Se puede detener la aparición de color eliminando la solución de revelado de la bolsa y añadiendo agua destilada.

Lavado de la membrana: para poder hibridar de nuevo la membrana con otra sonda diferente se eliminó la sonda. Para ello se realizó un lavado breve (aprox. 2 min) en etanol absoluto para quitar el color (las bandas ya hibridadas no eliminarán completamente el color). Posteriormente, se realizaron dos lavados de 20 min a 37°C con la mezcla NaOH 0,2N + 0,1% SDS. Se estabilizó la membrana a temperatura ambiente con dos lavados de 5 min con SSC 2X. Se puede almacenar la membrana a 4°C en TE buffer.

# **Resultados**

*“Si uno no puede explicar lo que ha estado haciendo,  
su trabajo carecerá de valor”*

*Erwin Schrödinger*



## **RESULTADOS**

### **1.- ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *S. enterica* DE DOS HOSPITALES ESPAÑOLES.**

Con la finalidad de analizar los porcentajes y los fenotipos de resistencia a distintos antibióticos en aislados de *S. enterica* de origen clínico, se recogieron un total de 280 aislados procesados en los Laboratorios de Microbiología del Hospital San Pedro de Logroño (HSP, 158 aislados) y Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (HCULB, 122 aislados), durante los períodos septiembre 2007-diciembre 2009 y septiembre 2009-noviembre 2010, respectivamente. Estos aislados fueron seleccionados en el hospital de origen sin tener en cuenta el fenotipo que presentaban con la finalidad de conocer los porcentajes y fenotipos de resistencia a distintos antibióticos más comunes en este género bacteriano en el ámbito clínico.

Todos los aislados recogidos en el HCULB procedían de muestras fecales de individuos enfermos que habían acudido a su centro de salud de atención primaria o bien se encontraban ingresados en el hospital. En el caso del HSP, todos los aislados procedían también de muestras fecales, salvo 6 aislados obtenidos de muestras de orina (4) y de sangre (1).

El serotipado de los aislados se realizó en los hospitales de origen, y en el caso del Hospital San Pedro, en colaboración con el Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III). En la Tabla 30 se reflejan los serotipos encontrados, destacando una mayor variedad en los aislados del HCULB de Zaragoza. Se observó que los serotipos más prevalentes fueron Typhimurium (146 aislados) y Enteritidis (93 aislados).

Se determinaron los niveles de resistencia a 20 antibióticos (detallados en la Tabla 5, del apartado *Material y Métodos*) mediante el método de difusión por disco en agar MH en los 280 aislados procedentes de estos dos hospitales. En la Tabla 31 y Figura 26 se muestran los porcentajes de resistencia detectados, teniendo en cuenta los dos hospitales. Se observaron altos porcentajes de resistencia a sulfamidas, ampicilina, tetraciclina, estreptomina, ácido nalidíxico, cloranfenicol y amoxicilina-ácido clavulánico. Todos los aislados fueron sensibles a cefepime. En ambos hospitales se observaron tendencias similares en cuanto a los porcentajes de resistencia, sin embargo, se observó un mayor porcentaje de

resistencia a estreptomocina en el HCULB (47,5%), frente al 28,5% en HSP; y un porcentaje de resistencia de 36,7% a ácido nalidíxico en el HSP frente a un 18% en el HCULB. Sin embargo, se observaron mayores porcentajes de resistencia a tetraciclina o trimetoprim entre los aislados del HSP en relación a los del HCULB (Tabla 31).

Tabla 30.- Serotipos encontrados entre las cepas estudiadas de los hospitales HSP y HCULB.

Serotipo	Nº aislados	HSP	HCULB
Anatum	1		1
Arizonae <sup>3</sup>	2	1	1
Bovis modificans	1		1
Dublin	1		1
Enteritidis	93	75	18
Infantis	3		3
Lindenbug	1		1
Manhattan	1		1
Mikawashima	4	2	2
Moscow	1		1
Neasden	1		1
Newport	1		1
Nigeria	1		1
Ohio	2		2
Riggil	1		1
Rissen	4		4
Typhi	1	1	
Typhimurium	146	69	77
Virchow	1	1	
Salmonella spp.	14	9	5

<sup>3</sup> S. Arizonae o subespecie IIIa representa una subespecie distinta a S. enterica (subespecie I), pero estos aislados se englobaron en los resultados obtenidos.

Tabla 31.- Porcentaje de resistencia a antibióticos en las cepas analizadas procedentes de los hospitales HSP y HCULB.

Antibiótico	HSP		HCULB		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Ampicilina (AMP)	78	49	71	58	149	53
Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC <sup>I/R</sup> ) <sup>a</sup>	41	26	26	21	67	24
Cefalotina (CF)	12	8	4	3	16	6
Aztreonam (ATM)	1	1	1	1	2	1
Ceftazidima (CAZ)	1	1	0	-	1	0,5
Cefotaxima (CTX)	2	1	0	-	2	1
Cefepime (FEP)	0	-	0	-	0	-
Cefoxitina (FOX)	1	1	0	-	1	0,5
Gentamicina (GEN)	13	8	8	7	21	8
Tobramicina (TOB)	4	3	8	7	12	4
Kanamicina (KAN)	5	3	1	1	6	2
Amikacina (AMK)	4	3	0	-	4	1
Estreptomina (STR)	50	32	59	48	109	39
Ácido nalidíxico (NAL)	58	37	22	18	80	29
Ciprofloxacina (CIP)	1	1	0	-	1	0,5
Tetraciclina (TET)	65	41	71	58	136	49
Cloranfenicol (CHL)	37	23	32	26	69	25
Sulfamidas (SUL)	105	67	85	70	190	68
Trimetoprim (TRM)	10	6	20	16	30	11
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	13	8	20	16	33	12
Fenotipo AmpC	1	1	0	-	1	0,5
Fenotipo BLEE	2	1	0	-	2	1

<sup>a</sup>Resistencia o sensibilidad disminuida a amoxicilina-ácido clavulánico

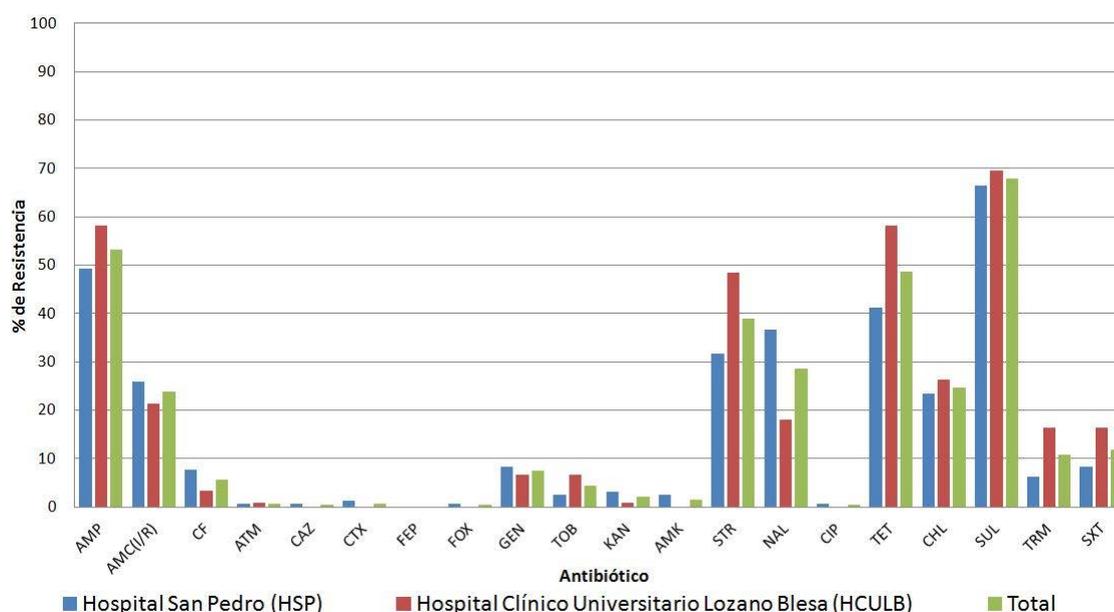


Figura 26.- Porcentajes de resistencia a antibióticos encontrados en las cepas analizadas de los hospitales HSP y HCULB.

Tal y como se observa en la Figura 27, los aislados de *S. Typhimurium* fueron mayoritariamente resistentes a ampicilina; mientras que los aislados de *S. Enteritidis* fueron mayoritariamente sensibles a ampicilina y al resto de antibióticos estudiados, salvo a ácido nalidíxico, donde un 58% de las mismas fueron resistentes.

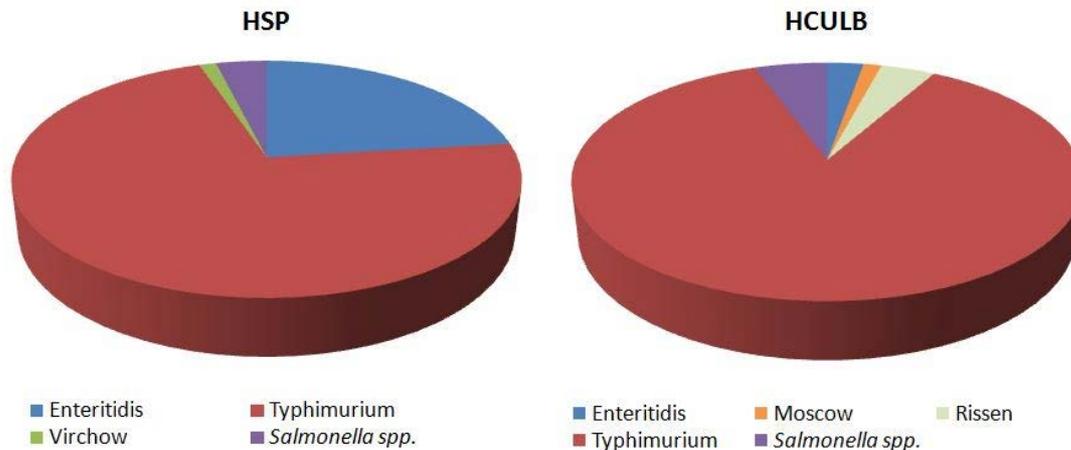


Figura 27.- Serotipos encontrados en los aislados resistentes a ampicilina.

En este estudio se observaron dos aislados (de los serotipos Enteritidis y Virchow) resistentes a cefotaxima y positivos en el test de sinergia de doble disco, por lo que se consideró que mostraban un fenotipo BLEE. Asimismo, se encontró un aislado resistente a cefoxitina (FOX) en el que se detectó un fenotipo característico de los productores de beta-lactamasa de tipo AmpC. Por otra parte, la resistencia a ciprofloxacina tan solo fue observada en un aislado de *S. Typhimurium*.

En la Tabla 32 se muestra el número y porcentaje de las cepas de *Salmonella* que presentan co-resistencia a 8 antibióticos representativos de distintas familias [ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), estreptomina (STR), ácido-nalidíxico (NAL), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CHL), sulfamidas (SUL) y trimetoprim (TRM)]. Treinta-y-seis de los 280 aislados (12,9%) fueron sensibles a los 8 antibióticos elegidos y destacó la variedad de serotipos que cumplían esta condición. Entre los fenotipos más comunes, se encontraron los fenotipos de resistencia NAL y NAL-SUL, en un 11,1% y 7,9% de los aislados, respectivamente, y mayoritariamente en el serotipo Enteritidis. Un total de 144 aislados cumplieron la condición de fenotipo de multirresistencia (resistencia a tres o más familias de antibióticos), que se encontró en aislados de *S. Typhimurium* (88,9% de los aislados multirresistentes) y donde destacaron los fenotipos AMP-STR-TET-SUL (12,5%) y AMP-STR-TET-CHL-SUL (11,4%).

Todos los aislados obtenidos que presentaron resistencia a ampicilina, ciprofloxacina y fenotipos BLEE y/o pAmpC fueron estudiados exhaustivamente y serán abordados en los siguientes apartados de esta tesis.

Tabla 32.- Fenotipos de resistencia a 8 antibióticos (ampicilina, gentamicina, estreptomina, ácido nalidíxico, tetraciclina, cloranfenicol, sulfamidas y trimetoprim) en los 280 aislados analizados.

Fenotipo <sup>a</sup>	n° cepas	HSP		HCULB	
		n°	serotipos	n°	serotipos
Sensible <sup>b</sup>	36	16	Arizonae (1) Enteritidis (6) Mikawashima (2) Typhimurium (3) <i>Salmonella</i> spp. (4)	20	Arizonae (1) Enteritidis (1) Infantis (3) Lindenburg (1) Manhattan (1) Mikawashima (2) Newport (1) Nigeria (1) Ohio (2) Typhimurium (4) <i>Salmonella</i> spp. (3)
AMP	10	7	Enteritidis (7)	3	Enteritidis (1) Moscow (1) <i>Salmonella</i> spp. (1)
GEN	4	4	Enteritidis (4)		
TET	1	1	Enteritidis (1)		
NAL	31	19	Enteritidis (16) Typhimurium (2) <i>Salmonella</i> spp. (1)	12	Enteritidis (10) Riggil (1) Typhimurium (1)
SUL	12	10	Enteritidis (7) Typhi (1) Typhimurium (2)	2	Typhimurium (2)
AMP, NAL	2	2	Enteritidis (2)		
AMP, SUL	6	5	Enteritidis (5)	1	Enteritidis (1)
AMP, TET	2	1	Enteritidis (1)	1	Typhimurium (1)
GEN, NAL	3	3	Enteritidis (3)		
GEN, SUL	3	3	Enteritidis (3)		
STR, SUL	1			1	Typhimurium (1)
STR, TET	1			1	<i>Bovis modificans</i> (1)
TET, SUL	2	1	Enteritidis (1)	1	Typhimurium (1)
NAL, SUL	22	16	Enteritidis (12) Typhimurium (3) <i>Salmonella</i> spp. (1)	6	Dublin (1) Neasden (1) Enteritidis (4)
AMP, STR, SUL	3	1	Typhimurium (1)	2	Typhimurium (2)
AMP, TET, SUL	6	4	Typhimurium (4)	2	Typhimurium (2)
GEN, NAL, SUL	1	1	Enteritidis (1)		
STR, TET, SUL	2	1	Typhimurium (1)	1	Typhimurium (1)
TET, CHL, SUL	1			1	Rissen (1)
TET, SUL, TRM	4	3	Enteritidis (3)	1	Anatum (1)
AMP, GEN, TET, SUL	2			2	Typhimurium (2)
AMP, STR, CHL, SUL	3	3	Typhimurium (3)		
AMP, STR, TET, SUL	35	14	Typhimurium (12) <i>Salmonella</i> spp. (2)	21	Typhimurium (21)
AMP, NAL, TET, SUL	2	2	Virchow (1) Typhimurium (1)		
AMP, TET, CHL, SUL	11	7	Typhimurium (6) <i>Salmonella</i> spp. (1)	4	Typhimurium (4)
GEN, STR, NAL, SUL	1			1	Enteritidis (1)

Fenotipo <sup>a</sup>	n° cepas	HSP		HCULB	
		n°	serotipos	n°	serotipos
<b>STR, TET, SUL, TRM</b>	1	1	Typhimurium (1)		
<b>TET, CHL, SUL, TRM</b>	4			4	Typhimurium (4)
<b>AMP, GEN, CHL, SUL, TRM</b>	2			2	Typhimurium (2)
<b>AMP, STR, TET, CHL, SUL</b>	32	15	Typhimurium (15)	17	Typhimurium (17)
<b>AMP, STR, TET, SUL, TRM</b>	11	1	Enteritidis (1)	10	Rissen (3) Typhimurium (7)
<b>AMP, STR, NAL, CHL, SUL</b>	3	3	Typhimurium (3)		
<b>AMP, STR, NAL, TET, SUL</b>	4	3	Enteritidis (2) Typhimurium (1)	1	<i>Salmonella</i> spp. (1)
<b>AMP, NAL, TET, CHL, SUL</b>	2	2	Typhimurium (2)		
<b>AMP, NAL, TET, SUL, TRM</b>	2	1	Typhimurium (1)	1	Typhimurium (1)
<b>AMP, GEN, STR, TET, CHL, SUL</b>	1			1	Typhimurium (1)
<b>AMP, GEN, STR, CHL, SUL, TRM</b>	1			1	Typhimurium (1)
<b>AMP, STR, NAL, TET, CHL, SUL</b>	5	4	Typhimurium (4)	1	Typhimurium (1)
<b>AMP, STR, TET, CHL, SUL, TRM</b>	1	1	Typhimurium (1)		
<b>GEN, STR, NAL, TET, SUL, TRM</b>	1	1	Typhimurium (1)		
<b>AMP, GEN, STR, TET, CHL, SUL, TRM</b>	2	1	Typhimurium (1)	1	Typhimurium (1)
<b>AMP, STR, NAL, TET, CHL, SUL, TRM</b>	1	1	Typhimurium (1)		

<sup>a</sup>En letra negrita se encuentran marcados los fenotipos de multirresistencia (resistencia a tres o más familias de antibióticos) encontrados. <sup>b</sup>Sensible: aislados sensibles a los 8 antibióticos seleccionados.

## **2.- ANÁLISIS DE *S. enterica* EN MUESTRAS DE PERSONAS SANAS**

Se recogieron 100 muestras fecales de voluntarios sanos (47 hombres y 53 mujeres) para determinar la posible presencia de *S. enterica* en dichas muestras. La edad de los mismos osciló entre 9 días y 89 años ( $\leq 15$  años, 14 muestras; 16-40 años, 51 muestras; 41-60 años, 26 muestras y  $\geq 61$  años, 9 muestras). Ninguno había tomado antibiótico ni había sufrido salmonelosis en los tres meses previos al muestreo. Los datos referentes al contacto con animales fue: gatos (10 voluntarios), perros (10), conejos (4), tortugas (3), aves (1) y varios animales (4).

El análisis de las 100 muestras fecales reveló crecimiento en todos los tubos de agua de peptona tamponada, mientras que tan solo 17 de las mismas mostraron un viraje a color azul claro del medio líquido Vassiliadis Rappaport. Aunque en todos los casos se observó crecimiento en las placas de Hektoen, en siete de los casos se detectó la presencia de colonias negras tanto en las placas de Hektoen como de medio *Shigella-Salmonella*, que podían ser sospechosas de ser *Salmonella*. Las pruebas de identificación bioquímica, confirmaron esas colonias sospechosas como *Proteus* spp. o *Citrobacter* spp. No se encontraron portadores positivos para *Salmonella* spp. entre los voluntarios sanos.



Figura 28.- Medios de cultivo y prueba de identificación bioquímica entre las muestras fecales procedentes de voluntarios sanos.

### **3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *S. enterica* RESISTENTES A AMPICILINA (AMP<sup>R</sup>) PROCEDENTES DE VARIOS HOSPITALES ESPAÑOLES.**

Una vez conocidos los fenotipos de resistencia más frecuentes entre los aislados clínicos de *S. enterica* en dos hospitales españoles, se quiso profundizar en el estudio de los mecanismos de resistencia a ampicilina en *S. enterica*. Para ello se incluyeron tanto los aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> de los dos hospitales citados (HSP y HCULB), como también otros aislados AMP<sup>R</sup> remitidos por otros hospitales. En total se incluyeron 230 aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup>, que procedían de los siguientes hospitales: HCULB (71 aislados), HSP (78 aislados), Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA, 4 aislados), Hospital Royo Villanova de Zaragoza (HRV, 5), Complejo Hospitalario de Pontevedra (CHP, 26) y Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (HGM, 46).

El 97% de los aislados AMP<sup>R</sup> procedían de muestras fecales remitidas por los servicios de atención primaria o de individuos ingresados en el hospital; mientras que el 3% restante provenían de muestras de orina (2 aislados) o sangre (5). El serotipo Typhimurium fue el más frecuentemente detectado entre los aislados AMP<sup>R</sup>, en un 80,4% de los aislados, seguido por *S. Enteritidis*, tan solo detectado en un 9,6% de los casos. Otros serotipos minoritarios entre los aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> fueron: Bredeney (2 aislados), Gnesta (1), Moscow (1), Rissen (3), Thompson (1), Virchow (1) y *Salmonella* spp. (14).

Tras el análisis fenotípico de resistencia a los distintos antibióticos testados, se tomó un aislado por paciente; a menos que varios aislados del mismo paciente mostrasen distinto fenotipo en cuyo caso se tomaron todos, para posteriores estudios. De este modo, se trabajó

con una colección final de 203 aislados de *S. enterica* (de 197 pacientes), donde se encontraron altos porcentajes de resistencia a sulfamidas (SUL, 92,1%), tetraciclina (TET, 83,3%), estreptomycin (STR, 71,4%), cloranfenicol (CHL, 52,2%) y sensibilidad disminuida a amoxicilina-ácido clavulánico (AMC<sup>I/R</sup>, 61,1%) (Figura 29). Todos los aislados fueron sensibles a cefepime y ciprofloxacina. Se encontraron 5 aislados que presentaban un fenotipo BLEE y 4 aislados compatibles con la presencia de una beta-lactamasa AmpC.

A continuación se expondrán los resultados obtenidos en la caracterización genotípica de los mecanismos encontrados para los distintos antibióticos.

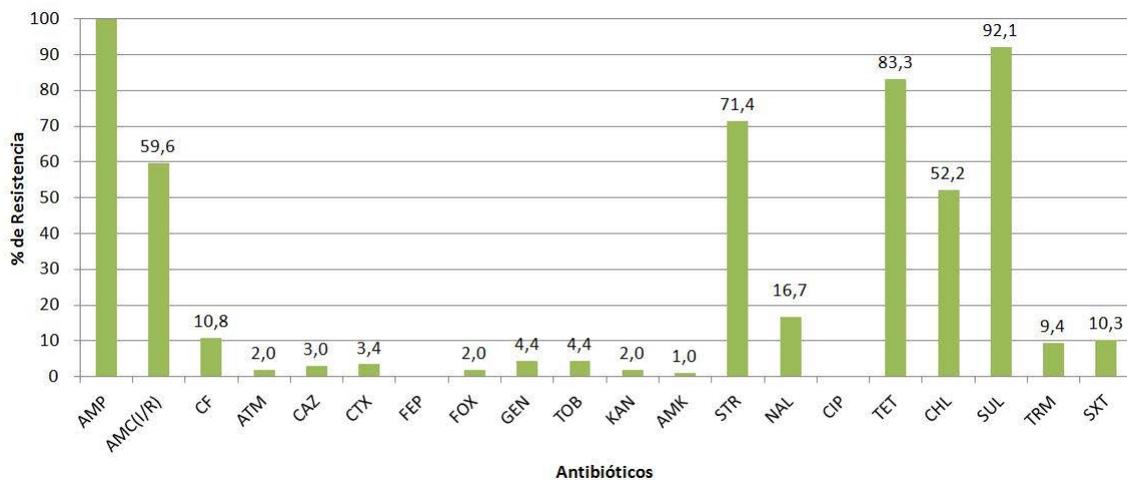


Figura 29.- Porcentajes de resistencia encontrados en los 203 aislados ampicilina-resistentes.

### 3.1.- Resistencia a antibióticos beta-lactámicos.

En este estudio se incluyeron los 203 aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> y se estudiaron por separado aquellos que fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico (AMC<sup>S</sup>) o aquellos que presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a este antibiótico (AMC<sup>I/R</sup>).

#### **Aislados con fenotipo AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>S</sup>.**

Se encontraron un total de 79 aislados con fenotipo AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>S</sup>, y el gen más frecuentemente detectado en dichos aislados fue *bla*<sub>TEM-1b</sub> (63 aislados, 79,7%). Un total de 46 de los aislados *bla*<sub>TEM-1b</sub><sup>-</sup> positivos correspondían al serotipo Typhimurium; aunque éste fue el único grupo donde se encontraron además aislados de serotipo Enteritidis (9 aislados), Moscow (1) y *Salmonella* spp. (7). Cuatro de los 5 aislados con fenotipo BLEE se incluyeron en este grupo, y en ellos se detectaron los siguientes genes codificantes de BLEE: *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (*S. Virchow*), *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> (*S. Enteritidis*), *bla*<sub>CTX-M-15</sub>+*bla*<sub>TEM-1new</sub> (*S. Gnesta*) y *bla*<sub>SHV-12</sub> (*S. Enteritidis*).

Se encontró en el aislado portador del gen  $bla_{CTX-M-15}$ , el gen  $bla_{TEM-1}$  que presentaba una mutación nucleotídica silente diferente a la de las variantes nucleotídicas  $bla_{TEM-1a}$ ,  $bla_{TEM-1b}$  y  $bla_{TEM-1c}$  encontrados en el resto de los aislados del estudio (Figura 31). Los resultados correspondientes a estos aislados se encuentran reflejados en la Tabla 33 y Figura 30.

#### **Aislados con fenotipo AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>I/R</sup>.**

Entre los 124 aislados con fenotipo AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>I/R</sup>, se encontró mayoritariamente el gen  $bla_{PSE-1}$ , en 54 aislados (43,5%), todos ellos pertenecientes al serotipo Typhimurium. Además, se detectaron 37 aislados  $bla_{OXA-1}$ -positivos (29,8%) y 17 aislados  $bla_{TEM-1b}$ -positivos (13,7%), tal y como se refleja en la Tabla 33 y en la Figura 30. Destacaron 8 aislados de *S. Typhimurium* y un aislado que no pudo ser serotipado que albergaron dos genes codificantes de beta-lactamasas simultáneamente. Uno de ellos albergó el gen  $bla_{CTX-M-15}$ , de resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Asimismo, dos aislados de *S. Bredeney* con fenotipo AmpC portaban el gen  $bla_{CMY-2}$ .

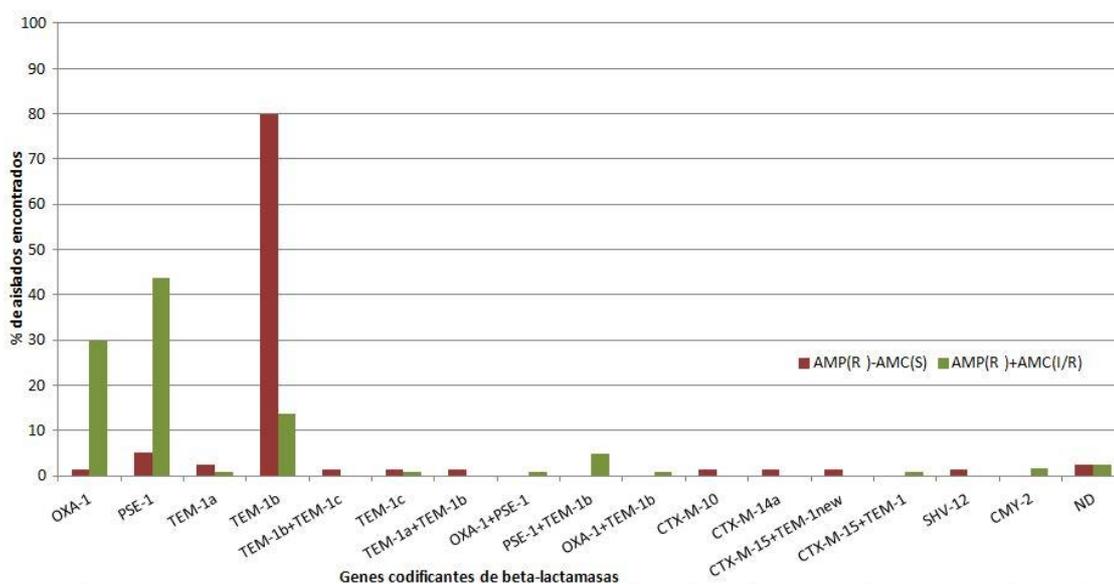


Figura 30.- Porcentaje de aislados portadores de genes codificantes de beta-lactamasas encontradas entre los 203 aislados de *S. enterica* resistentes a ampicilina y sensibles o con sensibilidad disminuida a AMC (AMC<sup>I/R</sup>).

En la Tabla 33 se puede observar los genes codificantes de beta-lactamasas encontradas en el total de aislados AMP<sup>R</sup> en función del serotipo. Entre estos datos destaca el serotipo Typhimurium donde se encontraron los genes, también más frecuentes,  $bla_{OXA-1}$ ,  $bla_{PSE-1}$  y  $bla_{TEM-1b}$ . En la Figura 32 se pueden observar las beta-lactamasas detectadas en los 203 aislados AMP<sup>R</sup> en función de sus serotipos.

```

bla_TEM-1b_ ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCGCTTCCCT 60
bla_TEM-1new_ ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCGCTTCCCT 60
bla_TEM-1a_ ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCGCTTCCCT 60
bla_TEM-1c_ ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCGCTTCCCT 60
*****

bla_TEM-1b_ GTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120
bla_TEM-1new_ GTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120
bla_TEM-1a_ GTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120
bla_TEM-1c_ GTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120
*****

bla_TEM-1b_ CGAGTGGGTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC 180
bla_TEM-1new_ CGAGTGGGTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC 180
bla_TEM-1a_ CGAGTGGGTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC 180
bla_TEM-1c_ CGAGTGGGTACATCGAATCGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC 180
*****

bla_TEM-1b_ GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGCTATGTGGTGGCGGTATTATCC 240
bla_TEM-1new_ GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGCTATGTGGTGGCGGTATTATCC 240
bla_TEM-1a_ GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGCTATGTGGTGGCGGTATTATCC 240
bla_TEM-1c_ GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGCTATGTGGTGGCGGTATTATCC 240
*****

bla_TEM-1b_ CGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAAATGACTTG 300
bla_TEM-1new_ CGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAAATGACTTG 300
bla_TEM-1a_ CGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAAATGACTTG 300
bla_TEM-1c_ CGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAAATGACTTG 300
*****

bla_TEM-1b_ GTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360
bla_TEM-1new_ GTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360
bla_TEM-1a_ GTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360
bla_TEM-1c_ GTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360
*****

bla_TEM-1b_ TGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAATGCTGCGCAACTACTTCTGACAACGATC 420
bla_TEM-1new_ TGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAATGCTGCGCAACTACTTCTGACAACGATC 420
bla_TEM-1a_ TGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAATGCTGCGCAACTACTTCTGACAACGATC 420
bla_TEM-1c_ TGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAATGCTGCGCAACTACTTCTGACAACGATC 420
*****

bla_TEM-1b_ GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT 480
bla_TEM-1new_ GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT 480
bla_TEM-1a_ GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT 480
bla_TEM-1c_ GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT 480
*****

bla_TEM-1b_ GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAACCAAACGACGAGCGTGAACACCAGATG 540
bla_TEM-1new_ GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAACCAAACGACGAGCGTGAACACCAGATG 540
bla_TEM-1a_ GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAACCAAACGACGAGCGTGAACACCAGATG 540
bla_TEM-1c_ GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAACCAAACGACGAGCGTGAACACCAGATG 540
*****

bla_TEM-1b_ CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600
bla_TEM-1new_ CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600
bla_TEM-1a_ CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600
bla_TEM-1c_ CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600
*****

bla_TEM-1b_ TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCGCGC 660
bla_TEM-1new_ TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCGCGC 660
bla_TEM-1a_ TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCGCGC 660
bla_TEM-1c_ TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCGCGC 660
*****

bla_TEM-1b_ TCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720
bla_TEM-1new_ TCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720
bla_TEM-1a_ TCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720
bla_TEM-1c_ TCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720
*****

bla_TEM-1b_ CGCGGTATCATTCGAGCAGTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC 780
bla_TEM-1new_ CGCGGTATCATTCGAGCAGTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC 780
bla_TEM-1a_ CGCGGTATCATTCGAGCAGTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC 780
bla_TEM-1c_ CGCGGTATCATTCGAGCAGTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC 780
*****

bla_TEM-1b_ ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC 840
bla_TEM-1new_ ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC 840
bla_TEM-1a_ ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC 840
bla_TEM-1c_ ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC 840
*****

bla_TEM-1b_ TCACTGATTAAGCATTGGTAA 861
bla_TEM-1new_ TCACTGATTAAGCATTGGTAA 861
bla_TEM-1a_ TCACTGATTAAGCATTGGTAA 861
bla_TEM-1c_ TCACTGATTAAGCATTGGTAA 861
*****

```

Figura 31.- Representación de las distintas variantes de *bla*<sub>TEM-1</sub> encontradas en esta tesis.

Tabla 33.- Genes codificantes de las beta-lactamasas encontrados entre los 203 aislados AMP<sup>R</sup> con/sin sensibilidad disminuida a AMC.

Gen codificante de la beta-lactamasa	N <sup>o</sup>	Aislados AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>S</sup>		Aislados AMP <sup>R</sup> -AMC <sup>I/R</sup>	
		n <sup>o</sup>	Serotipo	n <sup>o</sup>	Serotipo
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	38	1	Typhimurium	37	<i>Salmonella</i> spp. (5), Thompson (1), Typhimurium (31)
<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub>	58	4	Typhimurium	54	Typhimurium
<i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub>	3	2	Typhimurium	1	Typhimurium
<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	80	63	<i>Salmonella</i> spp. (7), Enteritidis (9), Moscow (1), Typhimurium (46)	17	Enteritidis (6), Typhimurium (11)
<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1c</sub>	1	1	Enteritidis		
<i>bla</i> <sub>TEM-1c</sub>	2	1	Typhimurium	1	Typhimurium
<i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	1	1	Typhimurium		
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub>	1			1	Typhimurium
<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	6			6	Typhimurium
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	1			1	Typhimurium
<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>	1	1	Virchow		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	1	1	Enteritidis		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1new</sub>	1	1	Gnesta		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1			1	<i>Salmonella</i> spp.
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	1	1	Enteritidis		
<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	2			2	Bredeney
ND <sup>a</sup>	5	2	Rissen	3	Enteritidis (2), Typhimurium (1)
Total		79		124	

<sup>a</sup>ND: mecanismo de resistencia no detectado.

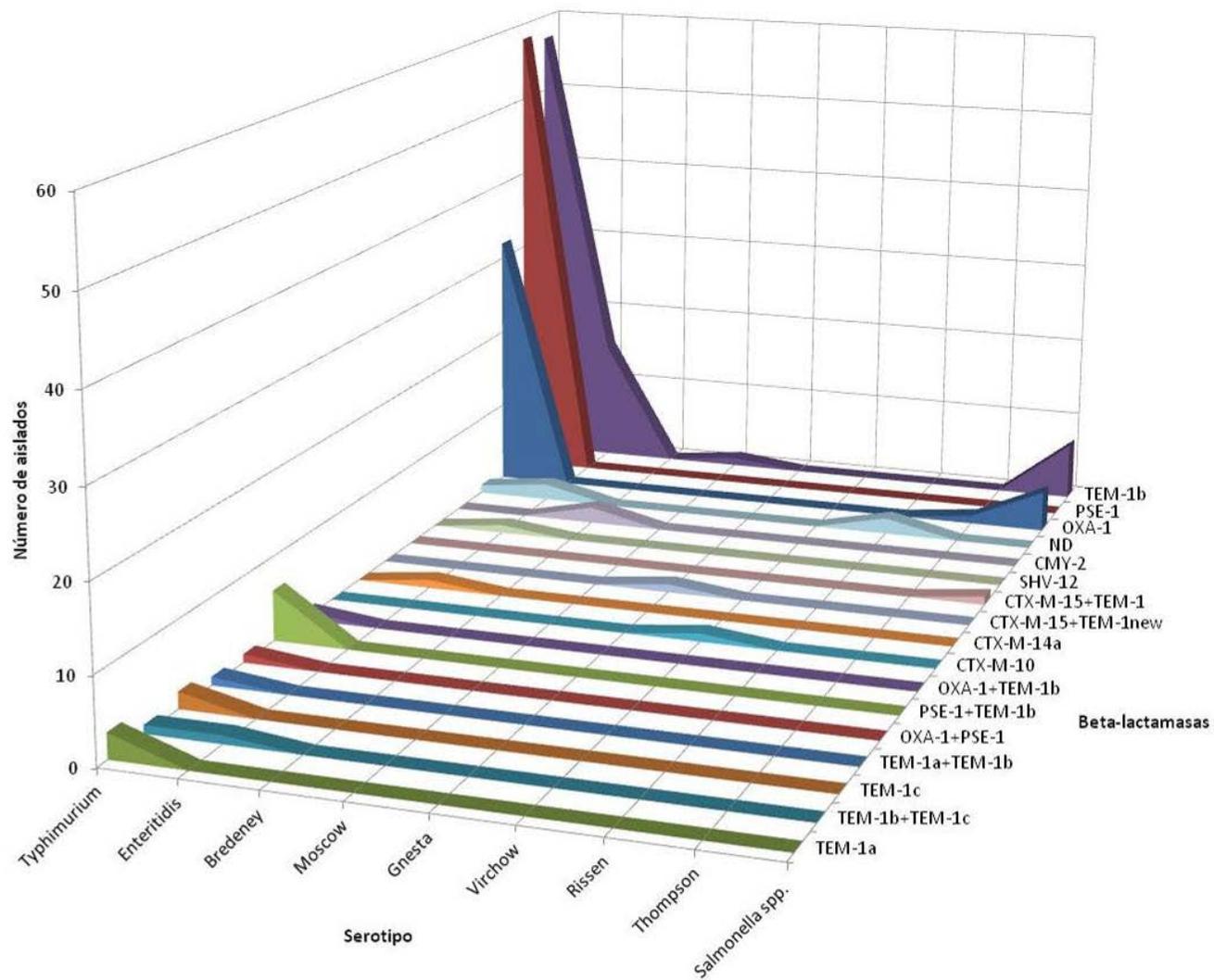


Figura 32.- Beta-lactamasas encontradas en los 203 aislados AMP<sup>R</sup> en función de sus serotipos.  
 [ND: mecanismo de resistencia no-detectado]

### 3.2.- Mecanismos de resistencia a otros antibióticos.

**Resistencia a fluoroquinolonas.** Dado que los mecanismos participantes en la resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas (comúnmente denominados PMQR, Tabla 10) confieren bajos niveles de resistencia a fluoroquinolonas, incluso valores clasificados como sensibles según los puntos de corte del CLSI, en todos los aislados aun siendo sensibles a ciprofloxacina se realizaron las PCRs de detección de los genes PMQR. Sin embargo, ninguno de los aislados fue positivo para las PCRs realizadas.

**Resistencia a tetraciclina.** Se observaron 169 aislados resistentes a tetraciclina, en los que se encontraron mayoritariamente los genes de resistencia *tet(B)* [55,9%] y *tet(G)* [34,1%]; en un 87% y 100% de estos casos asociado al serotipo Typhimurium. Cuatro aislados mostraron más de un gen de resistencia (Tabla 34).

Tabla 34.- Genes *tet* encontrados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a tetraciclina.

Genes	N	%	Serotipo (n° aislados)
<i>tet(A)</i>	12	7,1	Typhimurium (10), Rissen (1), <i>Salmonella</i> spp. (1)
<i>tet(B)</i>	92	54,4	Typhimurium (80), Rissen (1), Virchow (1), <i>Salmonella</i> spp. (10)
<i>tet(G)</i> <sup>a</sup>	57	33,7	Typhimurium (57)
<i>tet(A)+tet(B)</i>	3	1,8	Typhimurium (2), <i>Salmonella</i> spp. (1)
<i>tet(B)+tet(G)</i>	1	0,6	Typhimurium (1)
ND <sup>b</sup>	5	2,9	Enteritidis (3), Typhimurium (1), Thompson (1)
TOTAL	170		

<sup>a</sup>Se encontraron además 8 aislados que albergaban el gen *tet(G)* pero que presentaron sensibilidad disminuida a tetraciclinas.

<sup>b</sup>ND: no detectado.

**Resistencia a cloranfenicol.** Tal y como se muestra en la Tabla 35, los genes más frecuentemente detectados entre los 106 aislados cloranfenicol-resistentes fueron *floR* (63,6%) y *catA* (31,2%).

Tabla 35.- Genes implicados en la resistencia a cloranfenicol encontrados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a cloranfenicol.

Genes	N	%	Serotipo (n° aislados)
<i>catA</i>	32	30,2	Typhimurium (30), <i>Salmonella</i> spp. (2)
<i>cmlA</i>	6	5,7	Typhimurium (6)
<i>floR</i>	64	60,4	Typhimurium (64)
<i>floR+catA</i>	2	1,9	Typhimurium (2)
<i>floR+catB3<sup>a</sup></i>	1	0,9	Thompson (1)
<i>floR+cmlA</i>	1	0,9	Typhimurium (1)
ND <sup>b</sup>	1	0,9	Typhimurium (1)
TOTAL	107		

<sup>a</sup>Se encontró el gen de resistencia a cloranfenicol *catB3* en el estudio y secuenciación de integrones.

<sup>b</sup>ND: no detectado.

**Resistencia a aminoglucósidos.** Entre los 145 aislados resistentes a estreptomina, el gen de resistencia más frecuentemente detectado fue *aadA* (57,6%) y los genes *strA-strB* (29,9%). La resistencia a gentamicina y kanamicina fue detectada en 9 y 4 aislados, respectivamente; aunque tan solo 7 y 3 de ellos albergaron los genes *aac(3)-IV* y *aph(3')-Ia*, respectivamente, tal y como se observa en la Tabla 36.

Tabla 36.- Genes de resistencia detectados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a aminoglucósidos.

	Genes	N	%	Serotipo (n° aislados)
STR <sup>R</sup> (N=145)	<i>aadA</i>	83	57,2	Enteritidis (1), Rissen (2), Typhimurium (78), <i>Salmonella</i> spp. (2)
	<i>aadA+aadA5</i>	2	1,4	Typhimurium (2)
	<i>strA-strB</i>	43	29,6	Typhimurium (37), <i>Salmonella</i> spp. (6)
	<i>aadA+strA-strB</i>	13	9,0	Typhimurium (13)
	<i>aadA5+strA-strB</i>	1	0,7	Typhimurium (1)
	ND <sup>c</sup>	3	2,1	Enteritidis (1), Typhimurium (2)
GEN <sup>R</sup> (N=9)	<i>aac(3)-IV</i>	7	77,8	Typhimurium (7)
	ND <sup>c</sup>	2	22,2	Typhimurium (1), <i>Salmonella</i> spp. (1)
KAN <sup>R</sup> (N=4)	<i>aph(3')-Ia</i>	3	75,0	Typhimurium (3)
	ND <sup>c</sup>	1	25,0	Typhimurium (1)

<sup>a</sup>*aadA* corresponde a las variantes *aadA1* y/o *aadA2*, los cebadores empleados en la PCR amplifican ambas variantes.

<sup>b</sup>Además, se localizó el gen *aadA1* en la región variable de integrones de clase 1 en 21 aislados STR<sup>R</sup>.

<sup>c</sup>ND: no detectado.

**Resistencia a trimetoprim.** Los genes implicados en la resistencia a trimetoprim más frecuentemente detectados fueron *dfrA1* y *dfrA12*, en 7 aislados cada uno (Tabla 37).

Tabla 37.- Genes *dfr* encontrados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a trimetoprim.

<i>Gen</i>	<i>N</i>	%	<i>Serotipo (n° aislados)</i>
<i>dfrA1</i>	7	36,8	Enteritidis (1), Typhimurium (6)
<i>dfrA7</i>	1	5,3	Typhimurium (1)
<i>dfrA12</i>	8	42,1	Rissen (2), Typhimurium (5), <i>Salmonella</i> spp. (1)
<i>dfrA14</i>	3	15,8	Typhimurium (3)
TOTAL	19		

**Resistencia a sulfamidas. Entornos genéticos de *sul2* y *sul3*.** Los genes de resistencia *sul1* y *sul2* fueron los mayoritarios (121 y 91, aislados, respectivamente) entre los 187 aislados resistentes a sulfamidas. Un 18% de los genes *sul* fueron encontrados en combinación (Tabla 38). Se estudiaron los entornos genéticos de *sul1*, *sul2* y *sul3*. Mientras que los resultados para el entorno de *sul1*, relacionado con la presencia de integrones de clase 1, se expondrán en el apartado de integrones; los resultados para entornos de genes *sul2* y *sul3* se exponen a continuación.

Tabla 38.- Genes *sul* detectados entre los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes a sulfamidas.

<i>Genes</i>	<i>N</i>	%	<i>Serotipo (n° aislados)</i>
<i>sul1</i>	86	46,0	Enteritidis (1), Rissen (2), Typhimurium (79), <i>Salmonella</i> spp. (4)
<i>sul2</i>	57	30,5	Enteritidis (2), Virchow (1), Typhimurium (48), <i>Salmonella</i> spp. (6)
<i>sul1+sul2</i>	30	16,0	Thompson (1), Typhimurium (27), <i>Salmonella</i> spp. (2)
<i>sul1+sul3</i>	2	1,1	Typhimurium (2)
<i>sul2+sul3</i>	1	0,5	Typhimurium (1)
<i>sul1+sul2+sul3</i>	3	1,6	Typhimurium (3)
ND <sup>a</sup>	8	4,3	Bredeney (2), Enteritidis (5), Typhimurium (1)
TOTAL	187		

<sup>a</sup>ND: no detectado.

El entorno genético inmediato de *sul2* se determinó en 61 de los 91 aislados *sul2*-positivos (67%), detectando 8 estructuras genéticas diferentes que se muestran en la Figura 33. Se encontró una alta asociación entre el gen *sul2* y los genes de resistencia a estreptomycin *strA-strB*, aunque en 3 aislados se encontraron de manera independiente. La estructura más frecuente fue *repC-sul2-strA-strB-IS26-tnpB*, detectada en 30 aislados (49%), mientras que el gen *strA* se encontró truncado por el gen de resistencia a trimetoprim *dfrA14* en 3 aislados (Figura 33).

El gen *sul3* se encontró en tres entornos distintos, rodeado aguas arriba de la estructura *qacH-IS440* en 5 de los 6 aislados portadores de este gen; mientras que en un aislado, ninguna de las PCRs realizadas en esta región fueron positivas. Aguas abajo del gen

*sul3* se encontró la estructura compuesta por una *orf1* seguida de 257 pb del gen *mef(B)* que codifica una bomba de expulsión activa de macrólidos, que se encontraba truncado por la secuencia de inserción IS26, en 5 de los 6 aislados, tal y como puede observarse en la Figura 34. En uno de los ellos (Se191) no pudieron determinarse los genes aguas abajo del gen *sul3*. Este gen de resistencia puede encontrarse asociado a integrones no clásicos de tipo 1, como ocurrió entre nuestras cepas, donde 4 de los aislados presentaron asociación con este tipo de integrones. Estos resultados serán comentados en el Apartado 3.3.

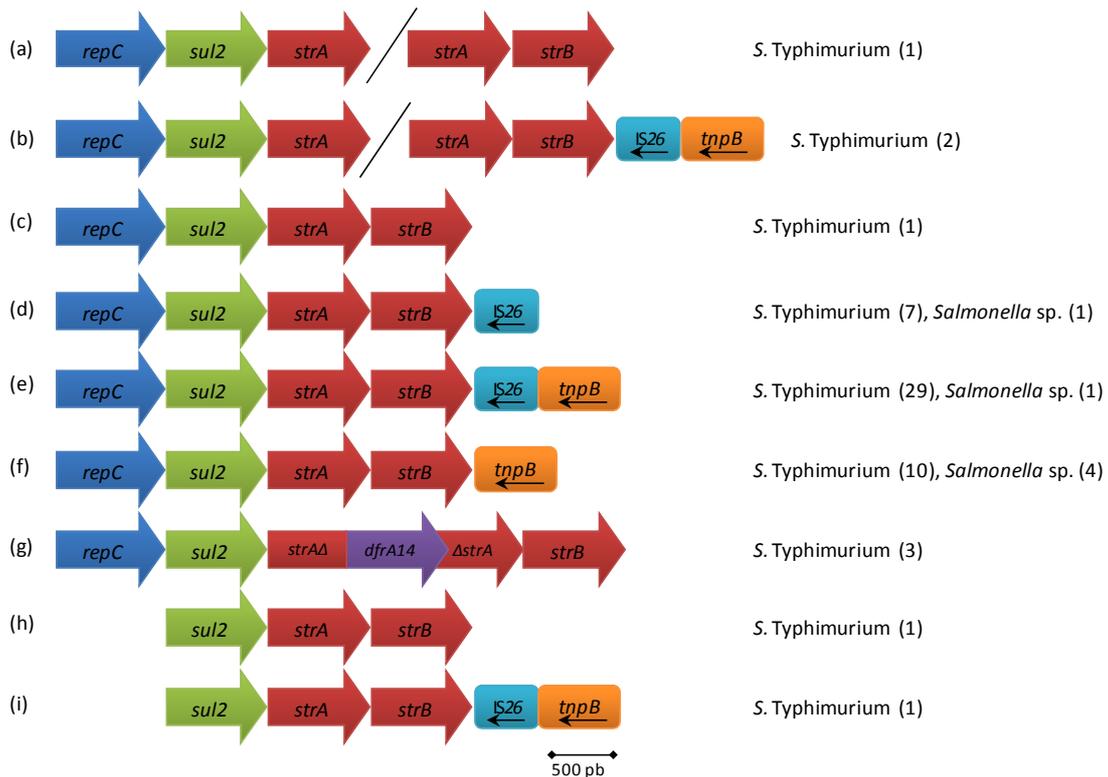


Figura 33.- Estructuras genéticas asociadas al gen *sul2* detectadas en 61 de los aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> *sul2*-positivos.

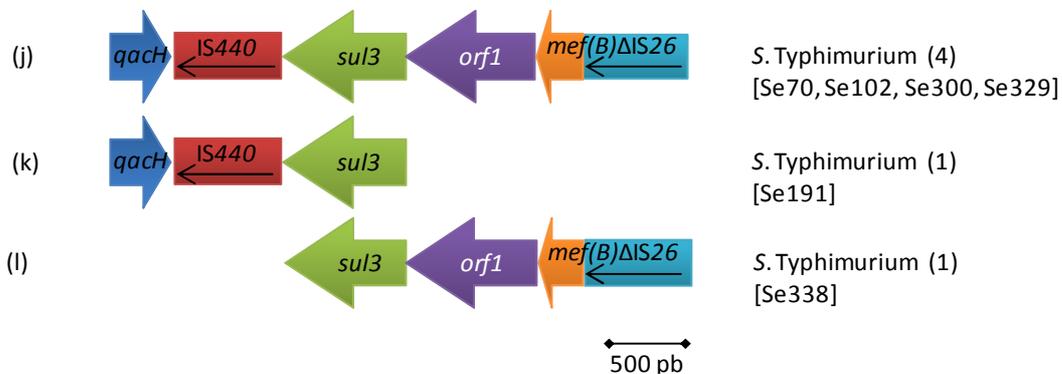


Figura 34.- Estructuras genéticas asociadas al gen *sul3* detectadas en los 6 aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> *sul3*-positivos.

### 3.3- Prevalencia y caracterización de integrones de clase 1, 2 y 3.

Se estudió la presencia de integrasas de tipo 1, 2 y 3 (*intI1*, *intI2*, *intI3*, respectivamente), así como la región 3'-conservada (*qacEΔ1-sul1*) y la región variable de los integrones de clase 1 en los 203 aislados AMP<sup>R</sup>. Ningún aislado amplificó los genes *intI2* o *intI3*; mientras que el gen *intI1* se detectó en 119 de los aislados estudiados, lo que representó un 58,6% del total de aislados. Se detectó un aislado que amplificó la región 3'-CS y una región variable de 180 pb, pero que no presentó el gen *intI1*. La secuenciación del amplicón de 180 pb confirmó la presencia de un "integrón vacío" (Figura 35-12). Un total de 65 de estos aislados portaron dos integrones de clase 1 y dos aislados presentaron tres integrones de clase 1.

Se caracterizaron en total 12 estructuras distintas de integrones por PCR y posterior secuenciación, tal y como se observa en la Figura 35. En aquellos integrones de clase 1 que carecían de la región 3'-CS, se siguió una estrategia denominada "primer walking", como se indicó en Material y Métodos.

Entre los resultados encontrados, destacaron 65 aislados (52,4%) de *S. Typhimurium* portadores de dos integrones de clase 1, que albergaron en sus regiones variables los genes *aadA2* y *bla*<sub>PSE-1</sub> de resistencia a estreptomicina y beta-lactámicos, respectivamente (Figura 35-1). El gen de resistencia a beta-lactámicos *bla*<sub>OXA-1</sub>, detectado en 40 aislados AMP<sup>R</sup>, se encontró asociado al integrón *intI1-bla*<sub>OXA-1</sub>-*aadA1-qacEΔ1-sul1* en 38 de ellos (31,9% del total de integrones detectados) y al integrón *intI1-aac(6')-Ib-cr-bla*<sub>OXA-1</sub>-*catB3-arr3-qacEΔ1-sul1* en otro aislado (Figura 35-2 y 3). Los genes *bla*<sub>PSE-1</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub> se encontraron co-residentes en un aislado de *S. Typhimurium*, aunque tan solo se detectó la estructura de doble integrón que contenía el gen *bla*<sub>PSE-1</sub>.

Los genes de resistencia a trimetoprim *dfrA1*, *dfrA7* y *dfrA12* que se encontraron en 16 aislados fueron localizados en 7 estructuras distintas, 4 de ellas correspondientes a integrones de clase 1 defectivos en su región 3'-CS (Figura 35). Entre los integrones portadores de *dfrA1* (7 aislados), se encontraron las estructuras *intI1+dfrA1* y *intI1+dfrA1+aadA1+qacEΔ1+sul1* y el gen *dfrA7* en la estructura *intI1+dfrA7+qacEΔ1+sul1*. Cuatro de los ocho aislados que presentaron el gen *dfrA12* presentaron un integrón defectivo de la región *qacEΔ1-sul1*, pero que se asociaba en todos los casos con los genes de resistencia a cloranfenicol (*cmIA1*) y estreptomicina (*aadA1*). Además, en tres de ellas se encontró el gen de resistencia a sulfamidas *sul3* asociado a estos integrones, tal y como se expuso en el

apartado 3.2. Se encontró un aislado de *S. Typhimurium* que albergaba un integrón de clase 1 no clásico caracterizado por albergar los genes *estX* (resistencia a estreptotricina) y *psp*, (codificante de una proteína fosfoserin-fosfatasa); además de la estructura *aadA2 + cmlA1 + aadA1 + qacH + IS440 + sul3 + orf1 + mef(B)ΔIS26*.

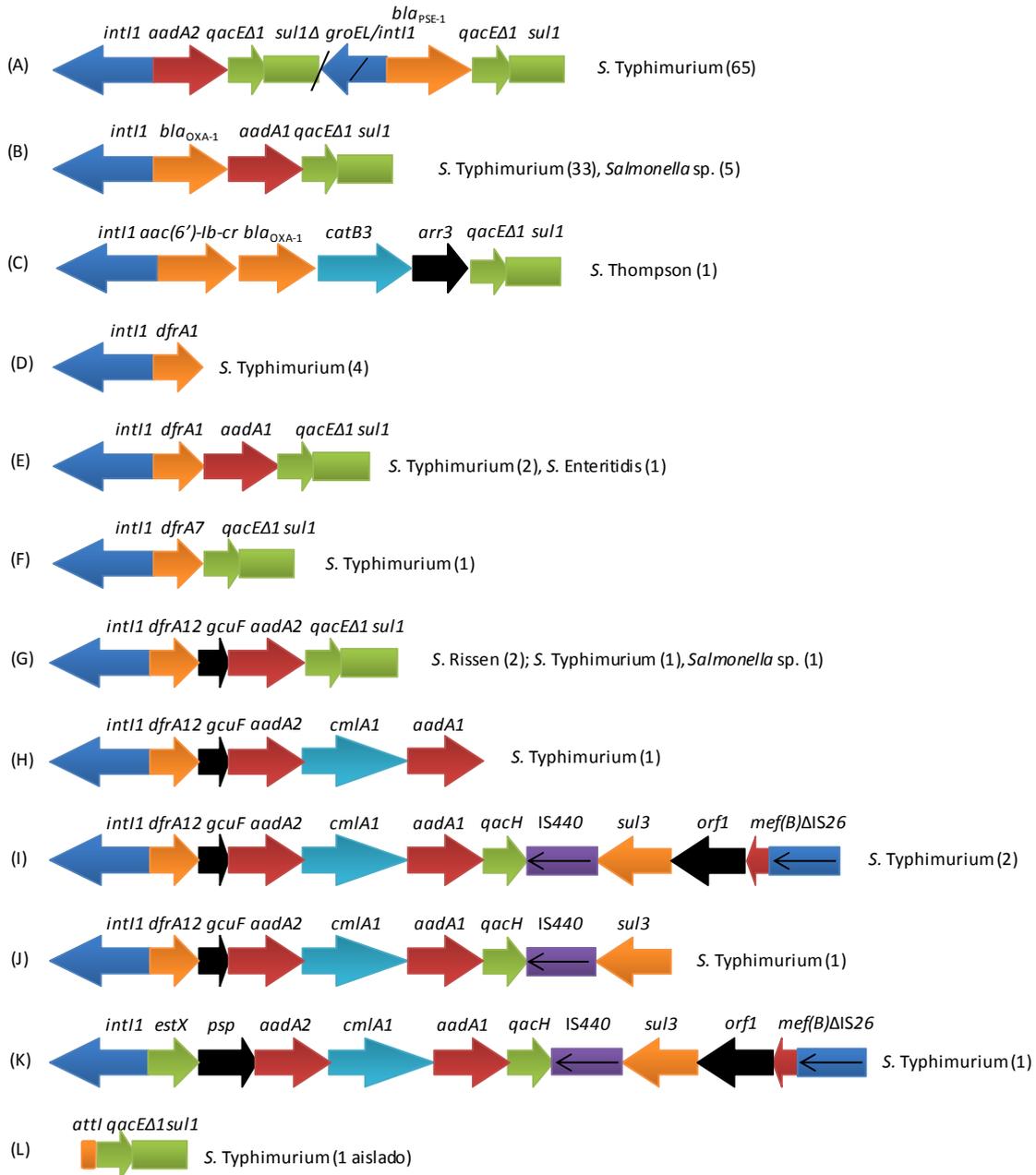


Figura 35.- Estructura genética de los integrones de clase 1 detectados en 119 aislados de *S. enterica* y del integrón vacío detectados en un aislado de *S. enterica* serotipo Typhimurium.

### Caracterización de los promotores del casete génico *bla*<sub>OXA-1</sub> localizado en integrones de clase 1.



Figura 36.- E-test realizado sobre cepas de *S. enterica enterica* que albergaban el gen *bla*<sub>OXA-1</sub>.

Entre los aislados *bla*<sub>OXA-1</sub>-positivos se observaron valores de sensibilidad disminuida a cefepime mediante microdilución y/o E-test (Figura 36). Estos valores, en los rangos de CMI de  $\leq 1$  a  $>8$  mg/L, se observaron por la Dra. C. Seral en el HCULB de Zaragoza. Considerando que el gen *bla*<sub>OXA-1</sub> se había detectado dentro de un integrón de clase 1 en 39 aislados, se seleccionaron 13 de ellos para estudiar la posible implicación de los promotores de

los casetes génicos de los integrones en la expresión de dichos genes y la consiguiente diferencia de sensibilidad. Doce de los 13 aislados seleccionados presentaron la estructura *intI1+bla*<sub>OXA-1</sub>*+aadA1+qacEΔ1+sul1* (Figura 35-B) y el aislado restante portaba el integrón *intI1+aac(6′)-lb-cr+bla*<sub>OXA-1</sub>*+catB3+arr3+qacEΔ1+sul1* (Figura 35-C). Los valores de microdilución a cefepime aportados por los hospitales de origen fueron de  $\leq 1$  mg/L (S) en 10 aislados, 2mg/L (S) en 2 aislados y  $>8$  mg/L (R) en un aislado.

El análisis de promotores reveló que todos los aislados que portaron el integrón *intI1+bla*<sub>OXA-1</sub>*+aadA1+qacEΔ1+sul1* (Figura 35-B), aun mostrando distintos valores de sensibilidad a cefepime, presentaban un promotor débil, PcW, que aumentó su fuerza debido a encontrarse asociado a un segundo promotor P2 en su forma activa, caracterizado por presentar una separación de 17 pb entre la caja -35 y la caja -10 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

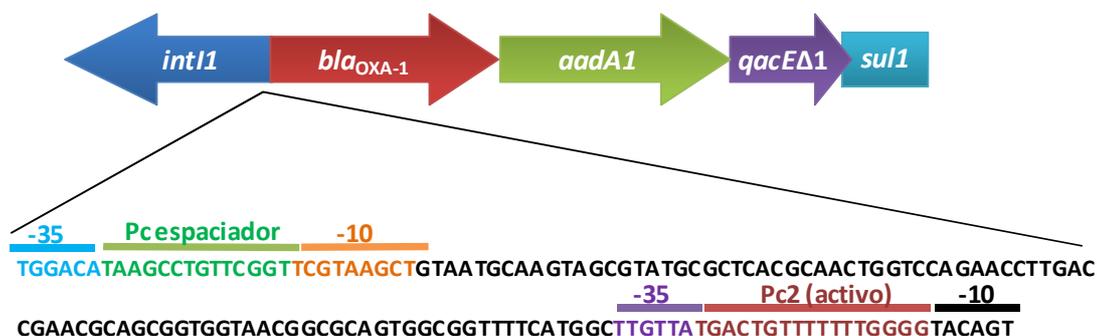


Figura 37.- Estructura del promotor encontrado en el integrón de clase 1 asociado a la presencia del gen *bla*<sub>OXA-1</sub>.

Sin embargo, para el integrón *int11+aac(6')-lb-cr+bla<sub>OXA-1</sub>+catB3+arr3+qacEΔ1+sul1* (Figura 35-C) el promotor de casetes génicos era la variante TGN-10 del promotor débil PcW<sub>TGN-10</sub> (que aumenta en unas 5 veces la eficiencia respecto al promotor PcW) y un promotor P2 inactivo (Figura 38).

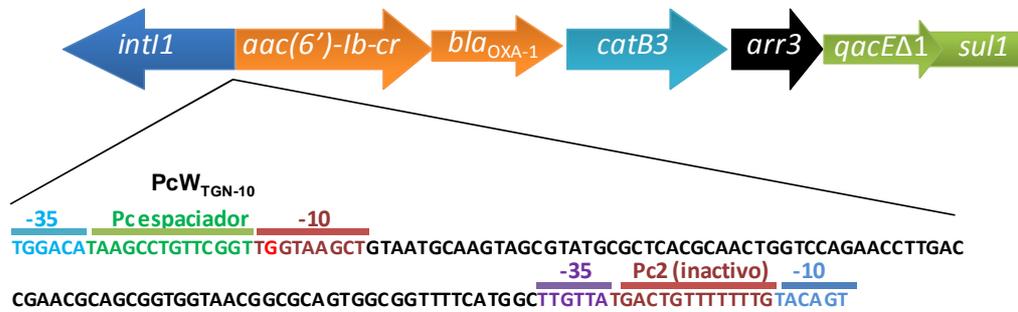


Figura 38.- Estructura del promotor encontrado en el integrón de clase 1 asociado a la presencia de los genes *aac(6')-lb-cr* y *bla<sub>OXA-1</sub>*.

A continuación podemos observar nuestro resultado para todos los integrones de este tipo, donde se amplificó y secuenció parte del gen de integrasa de tipo 1 (*int11*) hasta parte de la secuencia del casete génico *bla<sub>OXA-1</sub>*.

CGAAATCCAGATCCTTGACCCGCAGTTGCAAACCTCACTGATCCGCATGCCCGTTCCATACAGAAGCTG  
 GGCGAACAAACGATGCTCGCCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGTCAGCACCACC  
 GGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCCGATCTCCTGAAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGC  
 CGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCCAATGCCTGACGATGCGTGGAGACCGAAACCTTGCCTCGTTTCGCCAG  
 CCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATG  
 AAGGCACGAACCCAGTGGACA TAAGCCTGTTCCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCAC  
 GCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGGTTA  
 TGACTGTTTTTTTTGGGGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGGTTACGCCGTGGGTGCA  
 TGTGTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCCGCCCTAAAAACAAAAGTTGGGC GAAC  
 CCGGAGCCTCATTAAATTGTTAGCCGTTAAAATTAAGCCCTTTACCAAACCAATACTTATTATGAAAAACA  
 CAATACATATCAACTTCGCTATTTTTTTAATAATTGCAAATATTATCTACAGCAGCGCCAGTGCATCAAC  
 AGATATCTCTACTGTTGCATCTCCATTATTTGAAGGAAGTGAAGGTTGTTTTTTACTTTACGATGCATCC  
 ACAAACGCTGAAATTGCTCAATTCAATAAAGCAAAGTGTGCAACGCAAATGGCACCAGATTCAACTTTCA  
 AGATCGCATTATCACTTATGGCATTGATGCGGAAATAATAGATCAGAAAACCATATTCAAATGGGATAA  
 AACCCCAAAGGAATGGAGATCTGGAACAGCAATCATAACCAAAGACGTGGATGCAATTTCTGTTGTT  
 TGGGTTTCGCAAGAAATAACCCAAAAAATTGGATTAAATAAAATCAAGAATTATCTCAAAGATTTTGATT  
 ATGGAAATCAAGACTTCTCTGGAGATAAAGAAAGAAACAACGGATTAACAGAAGCATGGCTCGAAAGTAG  
 CTTAAAAATTTACCAGAAGAACAATTCATTCCTGCGTAAAAATTATTAATCACAATCTCCCAGTTAAA  
 AACTCAGCCATAGAAAACCATAGAGAACATGTATCTACAAGATCTGGATAATAGTACAAAACCTGTATG  
 GGAAAACCTGGTGCAGGATTCACAGCAAATAGAACCTTACAAAACGGATGGTTTTGAAGGGTTTATTATAAG  
 CAAATCAGGACATAAATATGTTTTTGTGTCCGCACTTACAGGAAACTTGGGGTCAATTTAACATCAAGC  
 ATAAAAGCCAAGAAAAATGCGATCACCATTTCTAAACACACTTAAATTTATAA

**CGAAATCCAGATCCTTGACCC**: cebador IntI1-centro

**TGGACA**: caja -35 del promotor PcW (promotor débil).

**TCGTAAGCT**: caja -10 del promotor PcW (promotor débil).

**TTGTTA**: caja -35 del promotor P2.

**TGACTGTTTTTTGGGG**: secuencia espaciadora en el promotor P2. Mide 17 pb, lo que nos indica que este promotor es activo.

**TACAGT**: caja -10 del promotor P2.

**GTTGGGC**: coresite del casete génico *bla*<sub>OXA-1</sub>

**ATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTGG**: gen codificante de la proteína ORF11-like.

Subrayado: gen *bla*<sub>OXA-1</sub>.

**GATCACCATCTCTAAACACACT**: secuencia reversa-complementaria del cebador OXA1-R:

AGTGTGTTTAGAATGGTGATC

Analizando los resultados con detalle, pudimos observar que las secuencias obtenidas de nuestros aislados presentaban una mutación nucleotídica en la secuencia del gen *orf11*, comparado con la *orf11* registrada en Genbank (número de acceso EF690695), que provocaba un desplazamiento del codon de stop en la proteína ORF11 codificada. Esta mutación provocaba un defecto en el codon de stop de la proteína ORF11, que en nuestro caso, quedaba embebido dentro de la secuencia del casete génico *bla*<sub>OXA-1</sub>.

<b>ORF11</b> (EF690695)	M L R S R A V A L K Q S *
	<b>atg</b> tta cgc agc agg gca gtc gcc cta aaa caa agt <b>tag</b>
<b>ORF11</b> (integrón OXA-1)	M L R S R A V A L K Q S W A N P E P H *
	<b>atg</b> tta cgc agc agg gca gtc gcc cta aaa caa agt <b>tgg</b> gcg aac ccg gag cct cat <b>taa</b>

### 3.4.- Relación entre la resistencia a beta-lactámicos, otros antibióticos y la presencia de integrones.

En la Tabla 39 se muestran los fenotipos de resistencia, genotipo y serotipos encontrados en los 203 aislados AMP<sup>R</sup>. Se encontraron un total de 50 fenotipos distintos entre nuestros aislados, de los cuales 38 correspondieron a fenotipo de multirresistencia.

Los fenotipos de resistencia más numerosos fueron aquellos que agrupaban los antibióticos ampicilina, estreptomina, tetraciclina y sulfamidas, encontrando los fenotipos AMP+STR+TET+SUL, AMP+AMC+TET+CHL+SUL y AMP+AMC+STR+TET+CHL+SUL y AMP+AMC+STR+NAL+TET+CHL+SUL en 32, 16, 52 y 11 aislados, respectivamente. Este

número representa el 54,7% de los aislados AMP<sup>R</sup> y tan solo 6 de éstos no correspondían al serotipo Typhimurium.

Los 32 aislados pertenecientes al fenotipo AMP+STR+TET+SUL, sensibles a AMC, presentaron en todos los casos el gen de resistencia a beta-lactámicos *bla*<sub>TEM-1b</sub>, los genes de resistencia a estreptomicina *strA-strB* contiguos al gen de resistencia a sulfamidas *sul2* y no mostraron integrones de clase 1. Sin embargo, para los fenotipos AMP+AMC+TET+CHL+SUL y AMP+AMC+STR+TET+CHL+SUL, los genes codificantes de beta-lactamasas más frecuentemente encontrados fueron *bla*<sub>OXA-1</sub> y *bla*<sub>PSE-1</sub> que a su vez se encontraban localizados en integrones de tipo 1. La asociación de los genes *bla*<sub>OXA-1</sub>, (*aadA1*, *strA-strB*), *catA*, *tet(B)* y *sul* fue encontrada en 28 aislados; mientras que el gen *bla*<sub>PSE-1</sub> se encontró asociado a los genes *aadA2*, *tet(G)*, *floR* y *sul* en todos los aislados que presentaron la beta-lactamasa PSE-1 (49 aislados).

Revisando la totalidad de fenotipos, es importante resaltar que en 19 aislados que presentaron el fenotipo AMC<sup>I/R</sup>, se encontró el gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, frente a los 68 aislados que siendo sensibles a AMC, portaban también dicha beta-lactamasa. Además, en ninguno de estos casos se encontró el gen de resistencia dentro de integrones.

La presencia de más de un gen codificante para la resistencia a beta-lactámicos se encontró en 12 aislados que albergaron los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>+*bla*<sub>TEM-1</sub> (2 aislados), *bla*<sub>TEM-1a</sub>+*bla*<sub>TEM-1b</sub> (1), *bla*<sub>TEM-1b</sub>+*bla*<sub>TEM-1c</sub> (1), *bla*<sub>OXA-1</sub>+*bla*<sub>TEM-1b</sub> (1), *bla*<sub>PSE-1</sub>+*bla*<sub>TEM-1b</sub> (6), *bla*<sub>PSE-1</sub>+*bla*<sub>OXA-1</sub> (1).

La resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación se observó en 4 y 2 aislados, respectivamente, que albergaron BLEEs y pAmpC. En ninguno de los casos se encontraron integrones de clase 1 que contuviesen estos genes de resistencia, mientras que en uno de los aislados se encontró un integrón de clase 1 (*intI1+dfrA12+gcuF+aadA2+qacED1+sul1*). Se analizaran estos aislados en profundidad en el Apartado 5.

Tabla 39.- Fenotipos y mecanismos de resistencia detectados en 203 aislados AMP<sup>R</sup>.

Fenotipo de resistencia (n° de aislados) <sup>a</sup>	Genotipo de resistencia (n° de aislados)	Serotipos (n° de aislados)	Integrón de clase 1 <sup>b</sup>	Entorno de genes sul <sup>b</sup>
AMP (7)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (7)	Enteritidis (5), Moscow (1), <i>Salmonella</i> spp. (1)	-	-
AMP+AMC (2)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (2)	Enteritidis (2)	-	-
AMP+NAL (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (1)	Enteritidis (1)	-	-
AMP+TET (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>tet</i> (B) (1)	Typhimurium (1)	-	-
AMP+SUL (2)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (1) <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>sul2</i> (1)	Enteritidis (1) Enteritidis (1)	- -	- ND
AMP+AMC+FOX (1)	ND (1)	Enteritidis (1)	-	-
AMP+AMC+NAL (1)	ND (1)	Enteritidis (1)	-	-
AMP+AMC+TET (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (1)	Enteritidis (1)	-	-
AMP+AMC+SUL (2)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (2)	Enteritidis (2)	-	-
<b>AMP+STR+SUL (2)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+sul2</i> (2)	Typhimurium (2)	-	e(2)
<b>AMP+TET+SUL (3)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (2) <i>bla</i> <sub>TEM-1c</sub> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	Typhimurium (3)	- -	ND ND
<b>AMP+AMC+TET+SUL (2)</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> *+ <i>tet</i> (B)+ <i>sul1</i> (1) <i>bla</i> <sub>TEM-1c</sub> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	Typhimurium (2)	B(1) -	- ND
<b>AMP+AMC+SUL+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (1)	Enteritidis (1)	-	-
AMP+ATM+CTX+CAZ (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1new</sub> (1)	Gnesta (1)	-	-
<b>AMP+STR+TET+SUL (32)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (25)	Typhimurium (22), <i>Salmonella</i> spp. (3)	-	b(1), d(4), e(14), f(4), h(1), i(1)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul1+sul2</i> (1)	Typhimurium (1)	-	d(1)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA+strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (4)	Typhimurium (4)	-	e(4)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA+strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul1+sul2</i> (1)	Typhimurium (1)	-	e(1)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA5+strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	Typhimurium (1)	-	a(1)

Fenotipo de resistencia (n° de aislados) <sup>o</sup>	Genotipo de resistencia (n° de aislados)	Serotipos (n° de aislados)	Integrón de clase 1 <sup>b</sup>	Entorno de genes <i>sul</i> <sup>b</sup>
<b>AMP+AMC+NAL+TET+SUL (3)</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> *+ <i>tet</i> (B)+ <i>sul1</i> (2)	Typhimurium (1), <i>Salmonella</i> spp. (1)	B(2)	-
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> *+ <i>tet</i> (B)+ <i>sul1</i> + <i>sul2</i> (1)	<i>Salmonella</i> spp. (1)	B(1)	ND
<b>AMP+AMC+STR+CHL+SUL (6)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (G)*+ <i>floR</i> + <i>sul1</i> (6)	Typhimurium (6)	A(6)	-
<b>AMP+AMC+STR+TET+SUL (8)</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul1</i> (2)	Typhimurium (8)	B(2)	-
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA</i> - <i>strB</i> + <i>tet</i> (A)+ <i>sul2</i> (1)		-	f(1)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA</i> - <i>strB</i> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (4)		-	d(2), e(1), f(1)
	<i>tet</i> (B) (1)		-	-
<b>AMP+AMC+TET+CHL+SUL (16)</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> *+ <i>tet</i> (B)+ <i>catA</i> + <i>sul1</i> (12)	Typhimurium (10), <i>Salmonella</i> spp. (2)	B(12)	-
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> *+ <i>tet</i> (B)+ <i>catA</i> + <i>floR</i> + <i>sul1</i> (1)	Typhimurium (1)	B(1)	-
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> *+ <i>tet</i> (B)+ <i>catA</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> (2)	Typhimurium (2)	B(2)	ND
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>catB3</i> + <i>floR</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>aac</i> (6')-Ib-cr (1)	Thompson (1)	C(1)	ND
<b>AMP+ATM+STR+TET+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA</i> - <i>strB</i> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	Typhimurium (1)	-	d(1)
AMP+ATM+CTX+CAZ+NAL (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub> (1)	Enteritidis (1)	-	-
AMP+CTX+CAZ+FOX+SUL (2)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (2)	Bredeney (2)	-	-
AMP+CTX+NAL+TET+SUL (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	Virchow (1)	-	-
<b>AMP+GEN+TOB+TET+SUL (2)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aac</i> (3)-IV+ <i>tet</i> (A)+ <i>sul1</i> + <i>sul2</i> (2)	Typhimurium (2)	-(1), L(1)	ND(2)
<b>AMP+STR+NAL+TET+SUL (4)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>sul2</i> (2)	Enteritidis (1), Typhimurium (1)	-	ND(2)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA</i> - <i>strB</i> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	<i>Salmonella</i> spp. (1)	-	f(1)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA</i> - <i>strB</i> + <i>tet</i> (A)+ <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	<i>Salmonella</i> spp. (1)	-	e(1)
<b>AMP+STR+TET+CHL+SUL (5)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (G)+ <i>floR</i> + <i>sul1</i> (1)	Typhimurium (5)	A(1)	-
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2</i> + <i>aadA5</i> + <i>tet</i> (G)+ <i>floR</i> + <i>sul1</i> (1)		A(1)	-
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (G)+ <i>floR</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> (1)		A(1)	ND(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> + <i>catA</i> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul1</i> + <i>sul2</i> (1)		B(1)	ND(1)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA</i> - <i>strB</i> + <i>tet</i> (B)+ <i>catA</i> + <i>sul2</i> (1)		-	e(1)
<b>AMP+STR+TET+SUL+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA</i> - <i>strB</i> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	<i>Salmonella</i> spp. (1)	-	f(1)

Fenotipo de resistencia (n° de aislados) <sup>o</sup>	Genotipo de resistencia (n° de aislados)	Serotipos (n° de aislados)	Integrón de clase 1 <sup>b</sup>	Entorno de genes <i>sul</i> <sup>b</sup>
<b>AMP+STR+TET+SUL+TRM+SXT (7)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub> + <i>strA-strB+tet(B)+sul2+dfrA1</i> (2)	Typhimurium (2)	D(2)	e(2)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA1+strA-strB+tet(A)+tet(B)+sul1+sul2+sul3+dfrA1</i> (1)	Typhimurium (1)	E(1)	b(1), l(1)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet(B)+sul2+dfrA1</i> (1)	Typhimurium (1)	D(1)	e(1)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1c</sub> + <i>aadA1+sul1+dfrA1</i> (1)	Enteritidis (1)	E(1)	-
	<i>aadA2+tet(A)+sul1+dfrA12</i> (1)	Rissen (1)	G(1)	-
	<i>aadA2+tet(B)+sul1+dfrA12</i> (1)	Rissen (1)	G(1)	-
<b>AMP+AMC+STR+NAL+TET+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1+tet(B)+sul1</i> (1)	<i>Salmonella</i> spp. (1)	B(1)	-
<b>AMP+AMC+STR+NAL+CHL+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet(G)*+floR+sul1</i> (1)	Typhimurium (1)	A(1)	-
<b>AMP+AMC+STR+TET+CHL+SUL (52)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet(G)+floR+sul1</i> (25)	Typhimurium (52)	A(25)	-
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet(B)+tet(G)+floR+sul1</i> (1)		A(1)	-
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet(G)+floR+sul1 +sul2</i> (8)		A(8)	ND(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1+tet(B)+catA+sul1</i> (6)		B(6)	-
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1+tet(B)+catA+sul1+sul2</i> (1)		B(1)	ND(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1+strA-strB+tet(B)+catA+sul1+sul2</i> (3)		B(3)	f(3)
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet(B)+cmlA1+sul2</i> (1)		-	f(1)
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA1+strA-strB+tet(B)+catA+sul1+sul2</i> (1)		B(1)	f(1)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA2+tet(G)+floR+sul1</i> (3)		A(3)	-
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA2+tet(G)+floR+sul1+sul2</i> (1)		A(1)	ND(1)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA2+aadA5+tet(G)+floR+sul1</i> (1)		A(1)	-
<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA2+strA-strB+tet(G)+floR+sul1 +sul2</i> (1)	A(1)	f(1)		
<b>AMP+AMC+NAL+TET+CHL+SUL (2)</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1*+tet(B)+catA+sul1</i> (2)	Typhimurium (2)	B(2)	-
<b>AMP+AMC+TET+SUL+TRM+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strAΔ-dfrA14-ΔstrA-strB+tet(A)+sul2</i> (1)	Typhimurium (1)	-	g(1)
<b>AMP+ATM+CTX+CAZ+NAL+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> (1)	Enteritidis (1)	-	-
<b>AMP+STR+TET+CHL+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet(B)+sul1+sul2</i> (1)	Typhimurium (1)	-	e(1)
<b>AMP+GEN+TOB+AMK+NAL+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>sul1</i> (1)	Typhimurium (1)	-	-
<b>AMP+AMC+STR+NAL+TET+CHL+SUL (11)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet(G)+floR+sul1</i> (9)	Typhimurium (9)	A(9)	-
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>tet(B)+floR+catA+sul1</i> (1)	Typhimurium (1)	B(1)	-
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>tet(B)+catA+sul1</i> (1)	Typhimurium (1)	B(1)	-
<b>AMP+AMC+STR+TET+SUL+TRM+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub> + <i>strA-strB+tet(B)+sul2+dfrA1</i> (1)	Typhimurium (1)	D(1)	e(1)

Fenotipo de resistencia (n° de aislados) <sup>a</sup>	Genotipo de resistencia (n° de aislados)	Serotipos (n° de aislados)	Integrón de clase 1 <sup>b</sup>	Entorno de genes <i>sul</i> <sup>b</sup>
<b>AMP+AMC+KAN+STR+TET+CHL+SUL (2)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aph</i> (3')-Ia+ <i>aadA2+tet</i> (G)+ <i>floR+sul1</i> (1) <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA2+tet</i> (G)+ <i>floR+sul1</i> (1)	Typhimurium (2)	A(1) A(1)	- -
<b>AMP+AMC+NAL+TET+SUL+TRM+SXT (2)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strAΔ-dfrA14-ΔstrA-strB+tet</i> (A)+ <i>sul2</i> (1) <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strAΔ-dfrA14-ΔstrA-strB+tet</i> (A)+ <i>sul1+sul2</i> (1)	Typhimurium (2)	- -	g(1) g(1)
<b>AMP+KAN+AMK+STR+NAL+CHL+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet</i> (G)*+ <i>floR+sul1+sul2</i> (1)	Typhimurium (1)	A(1)	ND(1)
<b>AMP+AMC+GEN+TOB+STR+TET+CHL+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aac</i> (3)-IV+ <i>aadA2+tet</i> (G)+ <i>floR+sul1</i> (1)	Typhimurium (1)	A(1)	-
<b>AMP+AMC+TOB+STR+NAL+TET+CHL+SUL (1)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet</i> (G)+ <i>floR+sul1</i> (1)	Typhimurium (1)	A(1)	-
<b>AMP+AMC+STR+TET+CHL+SUL+TRM+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA1+aadA2+strA-strB+tet</i> (A)+ <i>cmlA1+sul1+sul2+sul3+dfrA12</i> (1)	Typhimurium (1)	J(1)	c,k(1)
<b>AMP+GEN+TOB+STR+CHL+SUL+TRM+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aac</i> (3)-IV+ <i>aadA1+aadA2+cmlA1+sul1+sul3+dfrA12</i> (1)	Typhimurium (1)	G(1)	j(1)
<b>AMP+AMC+STR+NAL+TET+CHL+SUL+TRM+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA1+aadA2+tet</i> (G)+ <i>floR+cmlA1+sul1+dfrA12</i> (1)	Typhimurium (1)	A(1), H(1)	-
<b>AMP+GEN+TOB+STR+TET+CHL+SUL+TRM+SXT (2)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aac</i> (3)-IV+ <i>aadA1+aadA2+tet</i> (A)+ <i>cmlA1+sul1+sul2+sul3+dfrA12</i> (1) <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aac</i> (3)-IV+ <i>aadA1+aadA2+tet</i> (A)+ <i>tet</i> (B)+ <i>cmlA1+sul1+sul3+dfrA1</i> (1)	Typhimurium (1) Typhimurium (1)	I(1) E(1), K(1)	j(1) j(1)
<b>AMP+KAN+STR+NAL+TET+CHL+SUL+TRM+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet</i> (A)+ <i>catA+sul1+sul2+dfrA7</i> (1)	Typhimurium (1)	F(1)	e(1)
<b>AMP+AMC+GEN+TOB+STR+TET+CHL+SUL+TRM+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aac</i> (3)-IV+ <i>aadA2+tet</i> (A)+ <i>cmlA+sul1+sul2+sul3+dfrA12</i> (1)	Typhimurium (1)	I(1)	j(1)
<b>AMP+ATM+CTX+CAZ+GEN+STR+TET+SUL+TRM+SXT (1)</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA+tet</i> (A)+ <i>sul1+sul2+dfrA12</i> (1)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>enterica</i> grupo C (1)	G(1)	ND(1)

<sup>a</sup>En negrita se encuentran indicados aquellos aislados que presentaron fenotipo de multiresistencia (resistencia a tres o más familias de antibióticos). <sup>b</sup>Estructuras de los integrones (A-L) y de los genes *sul* (a-l) según las Figura 33, Figura 34 y Figura 35. \*Aislados que presentaron el gen de resistencia (*aadA* o *tet*(G), implicados en la resistencia a estreptomicina o tetraciclinas, respectivamente) pero cuyo fenotipo fue intermedio para ese antibiótico.

#### **4.- CARACTERIZACIÓN DE CEPAS *bla*<sub>PSE-1</sub>-POSITIVAS.**

A partir de los 203 aislados AMP<sup>R</sup>, otro de los objetivos que se plantearon en esta tesis fue caracterizar los 65 aislados portadores del gen *bla*<sub>PSE-1</sub>, con la finalidad de estudiar su diversidad clonal mediante PFGE y su tipado molecular mediante MLST, de detectar y caracterizar la Isla Genómica de resistencia de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1) y así como detectar los diversos factores de virulencia presentes tanto en cromosoma como en elementos genéticos móviles.

Los 65 aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos procedían de muestras fecales, salvo dos de muestras de sangre de pacientes de cuatro hospitales españoles dispersos geográficamente: HCULB (13 aislados), CHP (14 aislados), HSP (19 aislados) y HGM (19 aislados).

Todos los aislados pertenecían al serotipo Typhimurium, 64 de ellos a la variante bifásica (4,12:i:1,2) del mismo, y uno de ellos a la variante monofásica (4,12:i:-). Un total de 52 de los 65 aislados fueron fagotipados en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid), obteniendo los siguientes fagotipos: DT104 (3 aislados), DT104B (12), DT104L (14), DT193 (1), U302 (13), U310 (2), DT12 (1) y no-tipables (6).

El 87,7% (n= 57) de los aislados presentaron el fenotipo de pentarresistencia AMP-CHL-STR-SUL-TET, que se correspondía con la presencia de los genes *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*, respectivamente. Además se encontró el gen *tet(G)* en 8 aislados AMP-CHL-STR-SUL-TET-resistentes que mostraron sensibilidad disminuida a tetraciclina.

El gen *bla*<sub>PSE-1</sub> se detectó como casete génico en una estructura de integrón complejo (Figura 35-A) encontrado en los 65 aislados estudiados. Adicionalmente, el integrón *intI1-dfrA12-gcuF-aadA2-cmlA1-aadA1* se observó en un único aislado. Siete aislados presentaron además el gen *bla*<sub>TEM-1b</sub> (6 aislados) o *bla*<sub>OXA-1</sub> (1). La corresponsencia a ácido nalidíxico se detectó en 13 aislados pentarresistentes, y la corresponsencia a kanamicina y a gentamicina y tobramicina en 3 y un aislado, respectivamente, de los 57 AMP-CHL-STR-SUL-TET-resistentes (Tabla 40).

Tabla 40.- Fenotipos y mecanismos de resistencia detectados en los 65 aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos.

Fenotipo de resistencia (nº de aislados)	Genotipo de resistencia (nº de aislados)	Integrón de clase 1 <sup>a</sup>
AMP+AMC+CHL+STR+SUL (6)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> * (6)	A (6)
AMP+CHL+STR+SUL+TET (3)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>aadA5</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
AMP+CHL+STR+SUL+TET+NAL(1)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> * (1)	A (1)
AMP+AMC+CHL+STR+SUL+TET (40)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> (25)	A (25)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(B)</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>tet(G)</i> (8)	A (8)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> (3)	A (3)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>aadA5</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>strA</i> - <i>strB</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
AMP+AMC+CHL+STR+SUL+TET+NAL (9)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> (9)	A(9)
AMP+AMC+CHL+STR+SUL+TET+KAN (2)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> + <i>aph(3')</i> - <i>la</i> (1)	A (1)
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
AMP+CHL+STR+SUL+TET+NAL+AMK+KAN (1)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>tet(G)</i> * (1)	A (1)
AMP+AMC+CHL+STR+SUL+TET+GEN+TOB (1)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> + <i>aac(3)</i> -IV (1)	A (1)
AMP+AMC+CHL+STR+SUL+TET+NAL+TOB (1)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> (1)	A (1)
AMP+AMC+CHL+STR+SUL+TET+NAL+TRM+SXT (1)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>cmlA1</i> + <i>aadA1</i> + <i>aadA2</i> + <i>sul1</i> + <i>tet(G)</i> + <i>dfrA12</i> (1)	A(1),H(1)

\*Aislados que presentaron el gen de resistencia a tetraciclinas *tet(G)* pero cuyo fenotipo fue intermedio para este antibiótico. <sup>3</sup>Estructuras de los integrones (A-L) según la Figura 35.

#### 4.1.- Estudio de la diversidad clonal y tipado molecular de los aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos.

Se determinó la relación clonal entre los aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos mediante PFGE tras digestión con las enzimas *Xba*I y *Spe*I. El análisis visual se utilizó para clasificar los aislados, sin considerar diferencias menores en tamaño o intensidad de las bandas y se asignaron los patrones según su orden de aparición.

Se observó una alta clonalidad entre nuestras cepas, pese a pertenecer a hospitales geográficamente distantes. Se encontraron 8 patrones mediante PFGE-*Xba*I (X1a, X1b, X1c, X1d, X1e, X1f, X1g, X2; Figura 39-A), con fragmentos de DNA estimados entre 48,5 y 485 Kb, aproximadamente; mientras que la digestión con la enzima *Spe*I mostró 12 patrones (S1a, S1b,

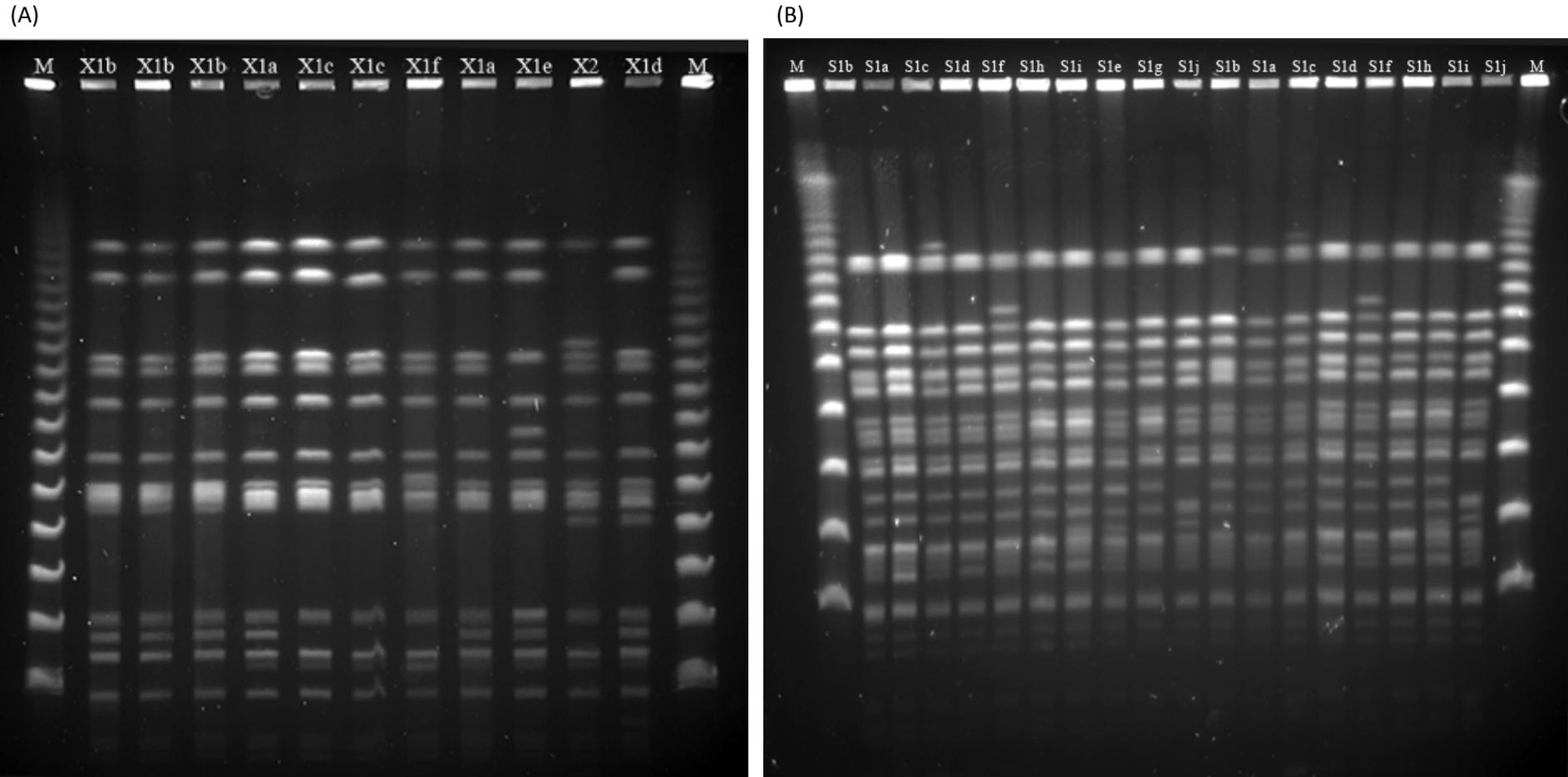


Figura 39.- Patrones de PFGE representativos encontrados en las cepas *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivas. M: marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs).

(A): patrones PFGE-*Xba*I. (B): patrones PFGE-*Spe*I.

S1c, S1d, S1e, S1f, S1g, S1h, S1i, S1j, S1k, S1l) con fragmentos comprendidos entre 48,5 y 727,5 Kb (Figura 39-B), en comparación con el marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Los patrones mostraban entre 1 y 4 bandas de diferencia con respecto al primer patrón de cada digestión (X1a y S1a para PFGE-*Xba*I y PFGE-*Spe*I, respectivamente). Se clasificaron según el criterio establecido por Tenover *et al.*, 1995, de manera que las cepas cuyos patrones diferían en menos de tres bandas fueron consideradas como clonalmente relacionadas. Cuando se combinaron los resultados obtenidos en la digestión con ambas enzimas (Figura 40), se observaron 21 combinaciones, siendo las más frecuentes X1a-S1a (19 cepas, 29%) y X1a-S1d (13 cepas, 20%).

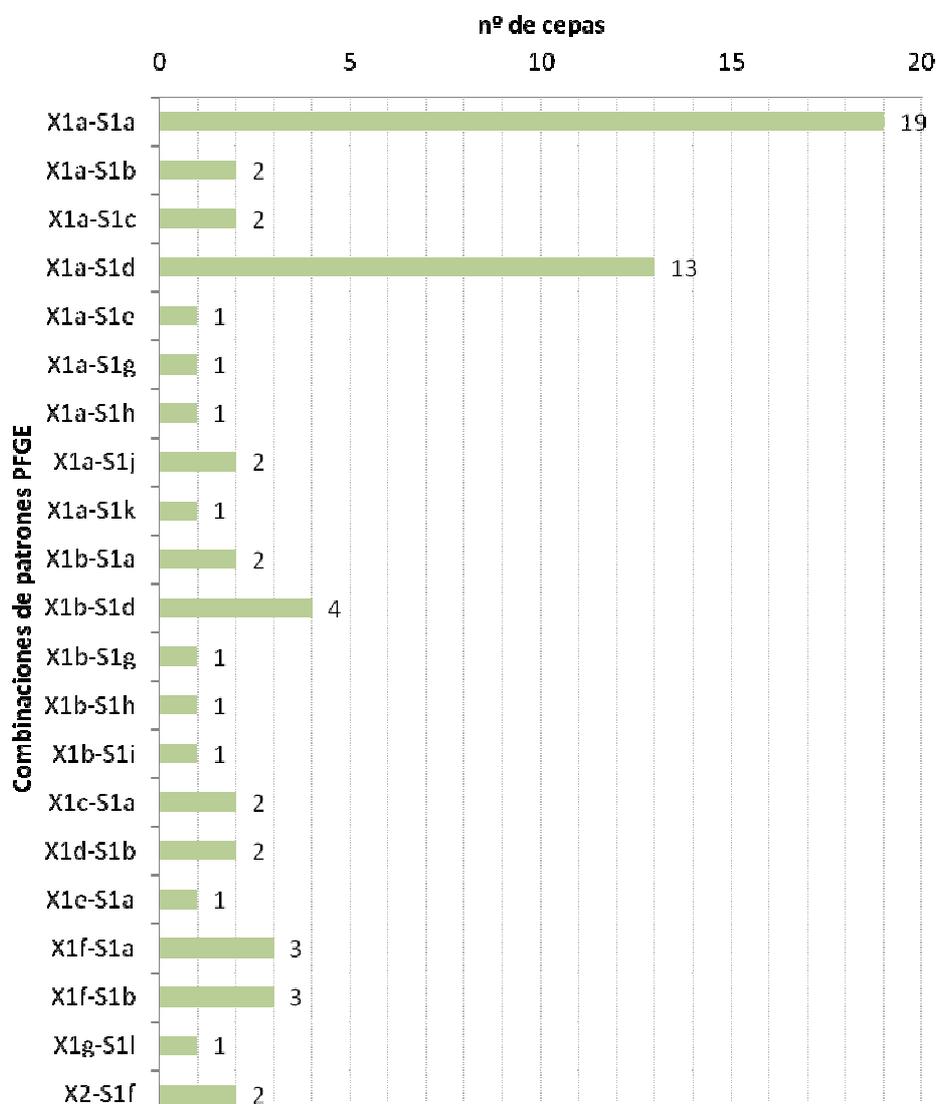


Figura 40.- Combinación de patrones de PFGE y número de cepas encontrados entre las cepas *bla*<sub>PSE-1</sub><sup>-</sup> positivas.

Un total de 21 cepas, una por cada combinación de patrones, fueron tipadas mediante la técnica de MLST. Todas nuestras cepas pertenecieron a la secuencia tipo ST19, con la combinación alélica *aroC10*, *dnaN7*, *hemD12*, *hisD9*, *purE5*, *sucA9* y *thrA2*. Esta secuencia tipo es el ST central en el Complejo Clonal al que pertenece, CC1, donde se agrupan la mayor parte de *S. Typhimurium* analizadas hasta el momento con esta técnica.

#### 4.2.- Detección y caracterización de la Isla Genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1).

Todas las cepas *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivas mostraron un integrón complejo In104, formado a su vez por dos integrones de clase 1. La región variable detectada por PCR del primer integrón, cuyo tamaño fue de 1 Kb, albergó el casete génico de resistencia a estreptomicina *aadA2*; mientras que la del segundo integrón, de 1,2 Kb, albergó el casete génico de resistencia a ampicilina *bla*<sub>PSE-1</sub>. La presencia de estos dos integrones, que constituyen el núcleo de resistencia de la Isla Genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1), constituía un indicio de la presencia de esta isla entre nuestras cepas.

Por ello, en las 65 cepas *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivas se estudió la presencia de la SGI1 mediante el mapeo por PCR, tal y como se ha descrito en el Apartado 6.6 de Material y Métodos (Figura 25). Todas las PCRs fueron positivas tanto para las regiones de anclaje al cromosoma, denominadas DR-L y DR-R, como para las regiones de resistencia que contenían los genes *intI1-aadA2*, *sul1-floR-tetR-tet(G)*, *groEL-intI1-bla*<sub>PSE-1</sub> y *qacEΔ1-sul1-orf5-orf6-IS6100* (Figura 25). El tamaño teórico esperado para la región *orf5-orf6-IS6100* era 1183 pb, sin embargo, en la cepa de *S. Typhimurium* W313 se observó un amplicón de aproximadamente 320 pb en el gel de agarosa. Tras la secuenciación de este producto de PCR, se observó que la cepa W313 presentaba una deleción parcial del gen *orf5* y una deleción total del gen *orf6* por el elemento *IS6100* (Figura 41). Esta variación, nunca antes descrita, se incluyó en GenBank con el número de acceso JF775513.1 (Anexo I).

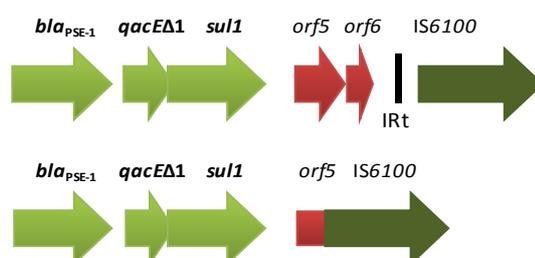


Figura 41.- Región de la SGI1 donde se observó una deleción. En la parte superior se encuentra la región estándar de SGI1 (GenBank no. AF261825) y en la parte inferior la región correspondiente a *S. Typhimurium* W313 con la deleción en la región *orf5-orf6-IS6100*.

#### 4.3.- Detección de factores de virulencia en cepas de *S. Typhimurium* *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivas.

Las 65 cepas portadoras del gen de resistencia *bla*<sub>PSE-1</sub> amplificaron todos los genes contenidos en las islas de patogenicidad (SPIs): SPI1 (*invE/A*, *orgA*, *avrA*), SPI2 (*ttrC*, *ssaQ*), SPI3 (*sugR*, *rhuM*, *rmbA*, *misL*, *mgtC*), SPI4 (*spi4R*, *spi4D*) y SPI5 (*sopB*, *pipA*); así mismo fueron positivas para los genes localizados en cromosoma: *phoP/Q*, *hin/H2*, *iroB*, *sodC1*, *sopE2* y *bcfC*. Sin embargo, todas las cepas fueron negativas para el gen *gipA* (Tabla 41). Los genes cromosómicos *slyA* y *sopE1* tan solo fueron detectados en 60 (92,3%) y 1 (1,5%) cepa, respectivamente. Los genes *spvC*, *rck*, *pef(A)*, *pef(B)*, *pef(C)* y *pef(D)* fueron detectados en 58 (89,2%) de las cepas estudiadas, mientras que los genes *stn*, *himA*, *agfA*, *sefD* y *ast* fueron negativos en todas ellas (Tabla 41).

En función de la presencia o ausencia de los genes *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D*, *sopB*, *gipA*, *sodC1*, *sopE1*, *bcfC* y *spvC*, representantes de las distintas islas de patogenicidad, genes cromosómicos y genes plasmídicos de virulencia, testados por PCR, se encontraron tres patrones de virulencia denominados virulotipos. El 90% de las cepas estudiadas correspondieron al virulotipo A (*avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D*, *sopB*, *sodC1*, *bcfC* y *spvC*); mientras que los virulotipos B (*avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D*, *sopB*, *sodC1* y *bcfC*) y C (*avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D*, *sopB*, *sodC1*, *sopE1* y *bcfC*) se detectaron en 6 y 1 cepa, respectivamente. Los virulotipos A y B fueron subdivididos en dos diferentes subtipos (A1-A2 y B1-B2), en función de la presencia o ausencia del gen cromosómico *slyA* (Tabla 41).

Tabla 41.- Factores de virulencia detectados en las 65 cepas de *S. Typhimurium bla<sub>PSE-1</sub>*-positivas analizadas.

<i>Genes contenidos en las islas de patogenicidad de Salmonella (SPIs)</i>	<i>Genes codificados en cromosoma</i>	<i>Genes codificados en plásmido</i>	<i>Número de cepas</i>	<i>%</i>	<i>Patrón de virulencia (virulotipo)<sup>a</sup></i>
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4R, spi4D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, bcfC, slyA</i>	<i>spvC, rck, pef(A-D)</i>	55	85%	A1
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4R, spi4D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, bcfC</i>	<i>spvC, rck, pef(A-D)</i>	3	5%	A2
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4R, spi4D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, bcfC, slyA</i>	No detectados	4	6%	B1
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4R, spi4D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, bcfC</i>	No detectados	2	3%	B2
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4R, spi4D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE1, sopE2, bcfC, slyA</i>	No detectados	1	2%	C

<sup>a</sup>Los genes que determinan el patrón de virulencia (virulotipo) están marcados en letra negrita.

Virulotipo A: *avrA, ssaQ, mgtC, spi4D, sopB, sodC1, spvC, bcfC*.

Virulotipo B: *avrA, ssaQ, mgtC, spi4D, sopB, sodC1, bcfC*.

Virulotipo C: *avrA, ssaQ, mgtC, spi4D, sopB, sodC1, sopE1, bcfC*.

## **5.- CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *S. enterica* PORTADORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEEs) O DE BETA-LACTAMASAS DE TIPO AmpC (AmpC).**

Se seleccionaron los 5 y 2 aislados de *S. enterica* con fenotipos BLEE y AmpC, respectivamente, de entre los 203 aislados AMP<sup>R</sup> analizados a lo largo de esta tesis. A esos 7 aislados se sumaron 4 más con fenotipo BLEE remitidos por el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) para su estudio. Estos 11 aislados de *S. enterica* con fenotipo BLEE o AmpC se seleccionaron con el fin de caracterizar los elementos genéticos móviles, tales como secuencias de inserción o plásmidos, implicados en la movilización de los genes codificantes de beta-lactamasas; así como de evaluar la estabilidad temporal de dichos fenotipos y elementos en ausencia de presión selectiva de antibióticos.

Todos los aislados procedían de muestras fecales de distintos pacientes de tres hospitales españoles: Hospital San Pedro de Logroño (HSP, 2 aislados), Complejo Hospitalario de Pontevedra (CHP, 4 aislados) y Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA, 5 aislados), durante el período 2003-2009 (Tabla 42).

Tabla 42.- Cepas de *S. enterica* con fenotipo BLEE o AmpC incluidas en este estudio.

<i>Cepa</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Año de aislamiento</i>	<i>Hospital</i>	<i>Serotipo</i>	<i>Perfil PFGE</i>	<i>ST</i>
C516*	BLEE	2003	CHP	Virchow	P1a	ST16
C650*	BLEE	2004	CHP	Virchow	P1a	ST16
W19	BLEE	2008	HSP	Virchow	P1b	ST16
C683*	BLEE	2004	CHP	Virchow	P1b	ST16
W192	BLEE	2009	HSP	Enteritidis	P2	ST11
C1221	BLEE	2007	HUCA	Enteritidis	P2	ST11
C1220	BLEE	2005	HUCA	<i>S. enterica</i> grupo C	P3	ST599
C1189	BLEE	2007	CHP	Gnesta	P4	ST1587
C493*	BLEE	2003	HUCA	Livingstone	P5	ST457
C1218	AmpC	2004	HUCA	Bredeney	P6	ST306
C1219	AmpC	2004	HUCA	Bredeney	P6	ST306

\*Estas cepas fueron incluidas en este apartado del estudio procedentes del HUCA.

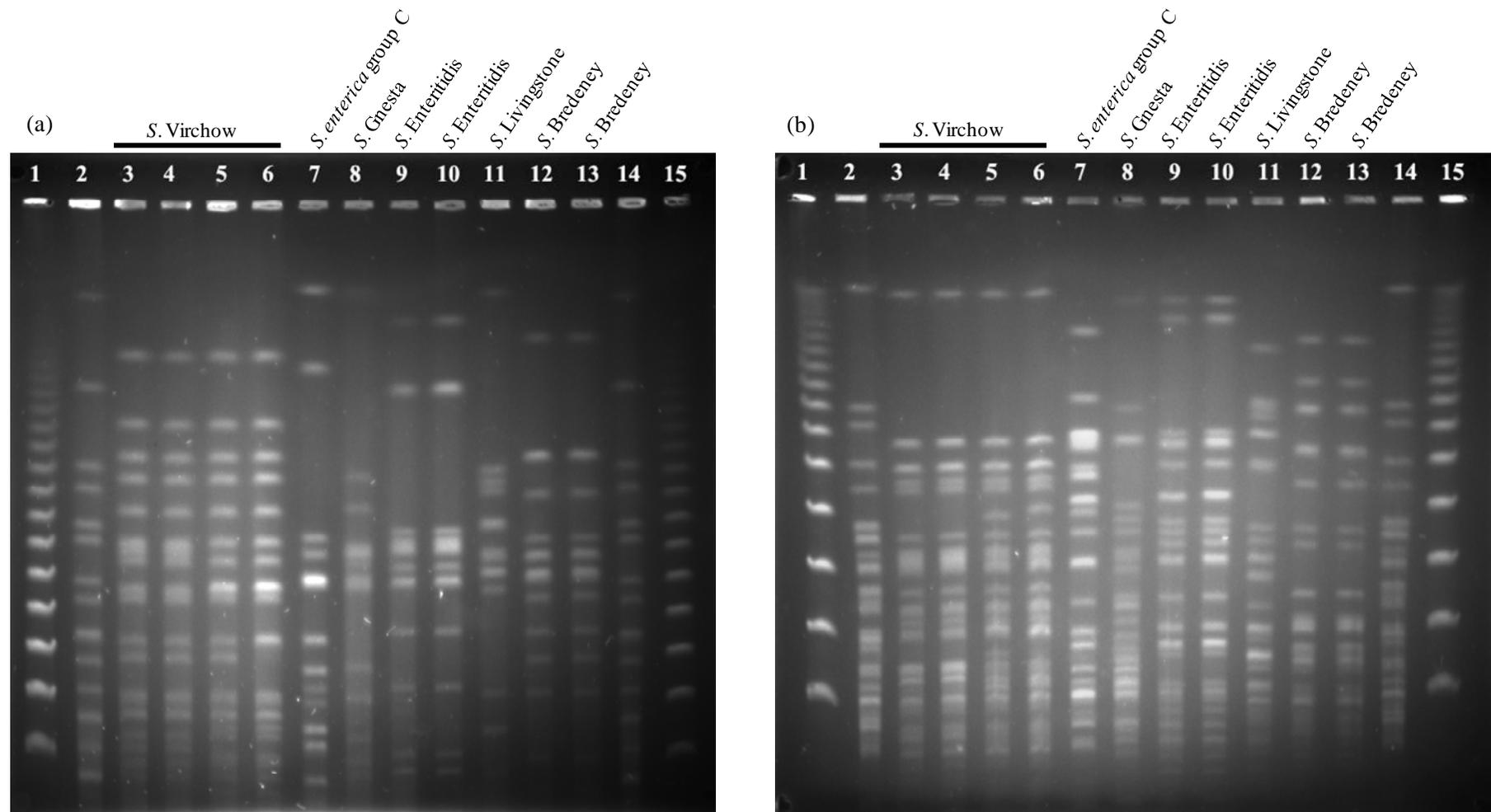


Figura 42.- Patrones de PFGE encontrados en los aislados de *S. enterica* con fenotipo ESBL/AmpC. (a): patrones PFGE-*Xba*I. (b): patrones PFGE-*Spe*I. En ambas figuras, carril 1: marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs); carriles 2 y 14: digestión *Xba*I de la cepa de *S. enterica* serotipo Braenderup H9812, utilizada como control de tamaño estándar. Carril 3: cepa W19; carril 4: C683; carril 5: C516; carril 6: C650; carril 7: C1220; carril 8: C1189; carril 9: C1221; carril 10: W192; carril 11: C493; carril 12: C1218 y carril 13: C1219.

Tabla 43.- Serotipo, fenotipo y genotipo de resistencia para las cepas de *S. enterica* estudiadas.

Cepa	Serotipo	Valores de CMI (mg/L)					Beta-lactamasa	Fenotipo a otros antibióticos no-beta-lactámicos	Otros genes de resistencia	Integrón de clase 1
		AMP	CTX	CAZ	ATM	FOX				
C516	Virchow	≥512	16	4	4	8	CTX-M-9+TEM-1b	NAL, KAN, STR, TET, SUL, TRM, SXT	<i>aph(3')-I, aadA2, strA-strB, tet(A), sul1, sul2, dfrA16</i>	+
C650	Virchow	≥512	16	4	4	8	CTX-M-9+TEM-1b	NAL, KAN, STR, TET, SUL, TRM, SXT	<i>aph(3')-I, aadA2, strA-strB, tet(A), sul1, sul2, dfrA16</i>	+
W19	Virchow	≥512	64	4	4	8	CTX-M-10	NAL, TET, SUL	<i>sul2, tet(B)</i>	-
C683	Virchow	≥512	32	4	4	8	CTX-M-10	NAL, SUL	<i>sul2</i>	-
W192	Enteritidis	512	128	32	16	8	CTX-M-14a	NAL	-	-
C1220	<i>Salmonella enterica</i> grupo C	≥512	≥256	≥256	≥64	8	CTX-M-15+TEM-1b*	GEN, STR, TET, SUL, TRM, SXT	<i>aadA, tet(A), sul1, sul2, dfrA12</i>	+
C1189	Gnesta	≥512	≥256	≥256	≥64	8	CTX-M-15+TEM-1new	-	-	-
C493	Livingstone	≥512	64	32	16	4	SHV-2	STR, TET, SUL	<i>aadA1, tet(A), sul1</i>	+
C1221	Enteritidis	≥512	64	≥256	≥64	8	SHV-12	NAL, SUL	-	-
C1218	Bredeney	≥512	32	128	8	64	CMY-2	SUL	-	-
C1219	Bredeney	≥512	32	256	8	64	CMY-2	SUL	-	-

\*Se detectó una nueva variante del gen *bla*<sub>TEM-1</sub> que mostró una mutación nucleotídica silente (T→C) en la posición 735, de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Sutcliffe, 1978.

### 5.1.- Relación clonal y tipado molecular de las cepas portadoras de BLEE o AmpC.

Las 11 cepas (4 Virchow, 2 Enteritidis, 2 Bredeney, 1 Gnesta, 1 Livingstone, 1 *S. enterica* grupo C) se agruparon en 6 patrones de PFGE distintos (P1-P6) de manera que las cepas no relacionadas clonalmente eran las pertenecientes a distintos serotipos (Figura 42; Tabla 42). En el serotipo Virchow se observaron dos subgrupos (P1a y P1b), que diferían entre ellos una banda en el patrón de PFGE-*Xba*I y en más de 3 bandas en el patrón de PFGE-*Spe*I.

El estudio mediante la técnica de MLST reveló 6 secuencias tipo (ST) distintas (ST11, ST16, ST306, ST457, ST599 y ST1587), que también agruparon a las cepas según serotipo, tal y como se observa en la Tabla 42. Se detectó una secuencia tipo nueva (ST1587) en la cepa de *S. Gnesta* debido a la presencia de un alelo nuevo del gen *thrA* (*thrA428*). En la base de datos <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>, se asignó y se incluyó la nueva combinación alélica (*aroC173, dnaN349, hemD43, hisD128, purE61, sucA58, thrA428*) como ST1587.

### 5.2.- Fenotipo y genotipo de las cepas BLEE o AmpC-positivas.

Se testó la sensibilidad a 20 antibióticos por difusión en agar y se confirmó el fenotipo BLEE mediante el test de doble disco (Jarlier *et al.*, 1988) y el fenotipo AmpC mediante el ensanchamiento del halo del disco de cefoxitina en presencia de cloxacilina (Tan *et al.*, 2009). Se determinó la CMI de los antibióticos beta-lactámicos ampicilina (AMP), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), aztreonam (ATM) y cefoxitina (FOX), tal y como se ha expuesto en el apartado de Material y Métodos. La interpretación de CMI se llevó a cabo siguiendo los puntos de corte propuestos tanto por CLSI (2012) como por EUCAST (2013). Asimismo, se determinaron los genes *bla* implicados en dicha resistencia.

En la Tabla 43 se muestran los fenotipos y genotipos de resistencia a distintos antibióticos detectados en las 11 cepas portadoras de BLEE o AmpC. Estas 11 cepas presentaban resistencia a AMP (CMI  $\geq$  512 mg/L) y CTX (rango  $\geq$  256-16 mg/L); mientras que la CMI de CAZ, ATM y FOX variaron en función del tipo de gen codificante de beta-lactamasa que portaban (nº cepas): *bla*<sub>CTX-M-9</sub> + *bla*<sub>TEM-1</sub> (2), *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (2), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> + *bla*<sub>TEM-1</sub> (2), *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> (1), *bla*<sub>SHV-2</sub> (1), *bla*<sub>SHV-12</sub> (1) y *bla*<sub>CMY-2</sub> (2).

Así, los mayores niveles de CMI de CTX ( $\geq$  512 mg/L), CAZ ( $\geq$  256 mg/L) y ATM ( $\geq$  64 mg/L) se detectaron en las dos cepas portadoras de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> + *bla*<sub>TEM-1</sub>; mientras que los menores valores a dichos antibióticos (16-64; 4 y 4, respectivamente) se observaron en las cepas que albergaban los genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> + *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-10</sub>. Analizando las cepas

portadoras de beta-lactamasas de tipo SHV, se observó que SHV-12 presentaba mayor capacidad hidrolítica frente a la CAZ y el ATM (valores de CMI  $\geq 256$  y  $\geq 64$  mg/L) que la beta-lactamasa SHV-2.

Las dos únicas cepas resistentes a FOX (CMI 64 mg/L) fueron las cepas con fenotipo AmpC, que a su vez mostraron resistencia a CTX y CAZ (32 y 128-256 mg/L, respectivamente).

### 5.3.- Entornos genéticos de los genes codificantes de beta-lactamasas.

Respecto a la resistencia a antibióticos no beta-lactámicos se observó mediante antibiograma que aquellas cepas portadoras de *bla*<sub>CTX-M-9</sub>+*bla*<sub>TEM-1b</sub> eran resistentes a ácido nalidíxico, kanamicina, estreptomina, tetraciclina, sulfamidas, trimetoprim y trimetoprim-sulfametoxazol. Estas cepas albergaron los genes *aph*(3')-I (resistencia a kanamicina), *aadA2* y *strA-strB* (estreptomina), *tet*(A) (tetraciclina), *sul1* y *sul2* (sulfamidas) y *dfrA16* (trimetoprim). Además, el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> fue encontrado en estas dos cepas dentro de un integrón complejo In60 (Figura 43-A), asociado a los genes de resistencia a trimetoprim, estreptomina y sulfamidas.

El gen *bla*<sub>CTX-M-10</sub>, detectado en dos cepas de *S. Virchow*, presentaba en ambos casos aguas arriba una transposasa (Tn1000-like), tres *orf* (*orf2*, *orf3*, *orf4*) y una DNA invertasa; mientras que aguas abajo del gen se encontró *orf7* en ambas cepas, pero tan solo una de ellas presentó también *orf8* y la secuencia de inserción IS4321 (Figura 43-B,C). Éste es el entorno habitual presentado por la bibliografía (Oliver *et al.*, 2005) y que se encuentra relacionado con una movilización por fagos.

En las cepas que presentaron las beta-lactamasas CTX-M-14a (cepa W192) y CTX-M-15 (cepas C1189 y C1220) se encontró en todos los casos la secuencia de inserción *ISEcp1* aguas abajo del gen *bla*, mientras que aguas arriba se encontró la secuencia de inserción IS903 para la cepa W192 (Figura 43-D) y *orf477* para las cepas C1189 y C1220 (Figura 43-E). En el caso de la cepa C1220, se encontró también un integrón de clase 1 que albergaba los genes *dfrA12*, *aadA2* y *sul1*, confiriendo resistencia a trimetoprim, estreptomina y sulfamidas (Figura 43-G).

En las cepas portadoras de genes *bla*<sub>SHV</sub> se encontró únicamente un integrón de clase 1 que albergaba el gen *aadA2* en su región variable (Figura 43-H) en la cepa de *S. Livingstone* portadora de SHV-2. Además esta cepa mostró el gen de resistencia a tetraciclinas *tet*(A).

El gen codificante de la beta-lactamasa de tipo AmpC plasmídica, CMY-2, flanqueado por los elementos *ISEcp1* y los genes *blc* y *sugE*, fue detectado en dos cepas de serotipo Bredeney, pero en ambos casos no se observaron ni otras resistencias ni integrones asociados (Figura 43- F).

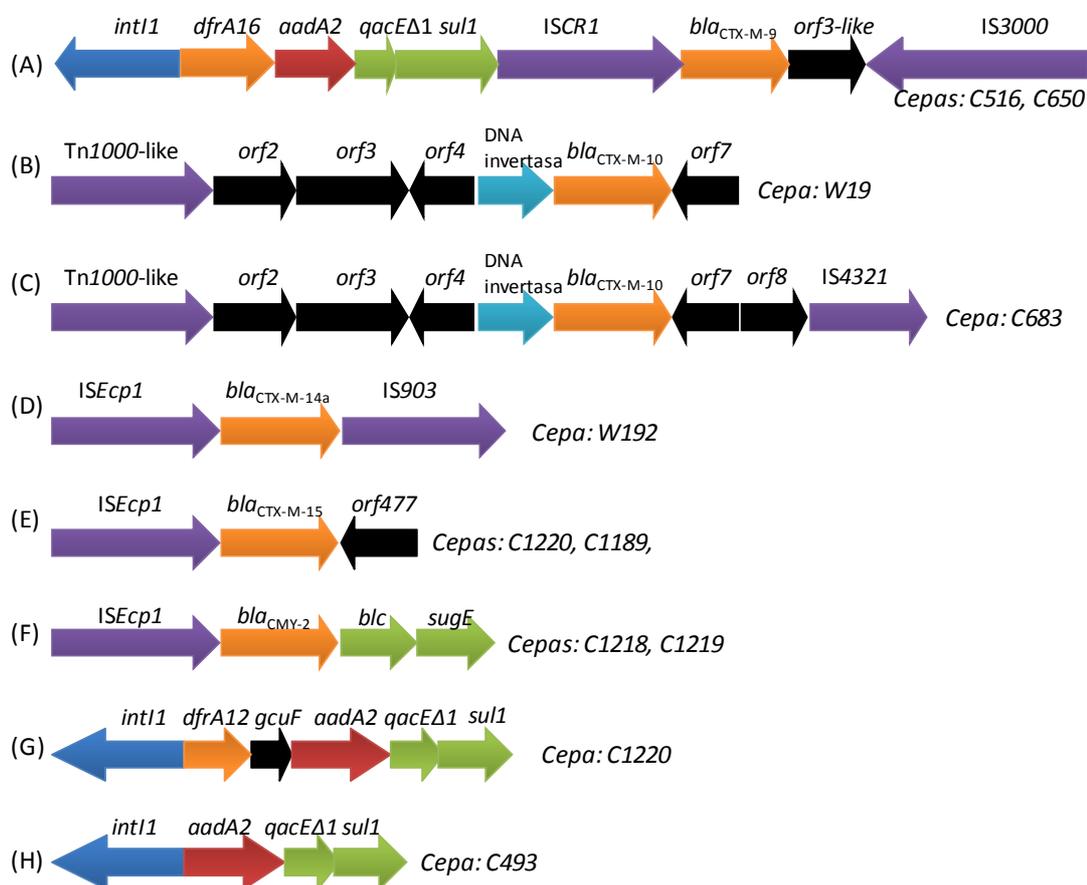


Figura 43.- Entornos genéticos de los genes *bla* detectados entre las cepas de *S. enterica* con fenotipo BLEE o AmpC estudiadas y casetes genéticos incluidos en integrones de clase 1 entre ellas.

### 5.3.- Experimentos de conjugación y estabilidad de los fenotipos BLEE y AmpC.

Para determinar la facilidad de diseminación de los genes *bla* asociados a los fenotipos BLEE y AmpC, se realizaron experimentos de conjugación de las 11 cepas estudiadas con la cepa de *E. coli* CSH26 como receptora. La resistencia a beta-lactámicos se transfirió en ocho de las once cepas de *S. enterica* analizadas, con frecuencias de conjugación en el rango entre  $10^{-3}$  y  $10^{-8}$  transconjugantes por célula dadora. De las placas suplementadas con doble antibiótico (RIF y CTX, CAZ o FOX, según se buscaran transconjugantes CTX-M, SHV o CMY, respectivamente), se seleccionaron 10 colonias por dador y se realizó la prueba bioquímica de

TSI y la técnica REP-PCR para confirmar la presencia de transconjugantes. Se realizó un antibiograma completo a 20 antibióticos, se testó la presencia de los fenotipos BLEE y AmpC mediante el test de doble disco y la prueba cefoxitina-cloxacilina, respectivamente. Se seleccionó un transconjugante por cepa dadora y se confirmó la presencia del gen *bla* de estudio por PCR, para continuar con los ensayos posteriores de caracterización plasmídica.

Los 8 transconjugantes seleccionados mostraron el mismo perfil de resistencia a todos los antibióticos (excepto para la resistencia a ácido nalidíxico), así como el mismo genotipo que las 8 cepas parentales (Tabla 44).

Por otra parte, otro objetivo que nos planteamos en este apartado de la tesis, fue estudiar la estabilidad del fenotipo BLEE o AmpC en las 11 cepas de *S. enterica* estudiadas. Para ello se realizaron pases consecutivos en medio BHI agar en ausencia de antibiótico de las 11 cepas durante un período de 100 días, tal y como se expone en el Apartado 4.5. de Material y Métodos. Los resultados de este experimento están reflejados en la Tabla 44, donde se han omitido aquellas cepas que no presentaron variación durante todo este experimento.

Entre las once cepas testadas, tres de ellas perdieron el fenotipo BLEE y una cepa el fenotipo AmpC. La primera en hacerlo fue la cepa C1221, portadora de la beta-lactamasa SHV-12, donde se observó que al quinto día (Figura 44) ya no presentaba el fenotipo BLEE, aunque mantenía la resistencia a ácido nalidíxico y sulfamidas. Seguidamente, las cepas C493, C1219 y W192 perdieron los genes codificantes de las beta-lactamasas SHV-2, CMY-2 y CTX-M-14a los días 11, 49 y 72 del experimento, respectivamente. Tanto en el caso de la cepa LP-C493-11 como la cepa LP-W192-72 conservaron la resistencia a antibióticos no beta-lactámicos; sin embargo, la cepa LP-C1219-49 perdió conjuntamente la resistencia a sulfamidas.

Entre el resto de cepas que mantuvieron el fenotipo de resistencia a beta-lactámicos, tres de ellas mostraron variación en su fenotipo-genotipo al testarlas al final del experimento (día 100) (Tabla 44). La cepa W19, portadora del gen *bla*<sub>CTX-M-10</sub>, perdió a lo largo del experimento la resistencia a tetraciclina, asociada a la pérdida del gen *tet(B)*. La cepa LP-C1220-100, sensible a trimetoprim y cotrimoxazol, carecía del integrón de clase 1 que albergaba el gen *dfrA12* en su región variable y que había sido detectado en la cepa parental C1220 (Figura 45-H). Curiosamente, la cepa LP-C650-100, sensible a trimetoprim, cotrimoxazol, tetraciclina y sulfamidas, carecía del gen *tet(A)* y había perdido parcialmente el

integrón In60. El gen *int11* y el gen de resistencia a trimetoprim *dfrA16* estaban deletados; mientras que el resto de la estructura del integrón se mantenía intacta (Figura 45-B). A pesar de la delección del gen de la integrasa y de los promotores asociados, la secuencia de inserción *ISCR1* se detectó aguas arriba del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, provista de sus promotores y permitió la expresión del fenotipo BLEE en la cepa LP-C650-100.

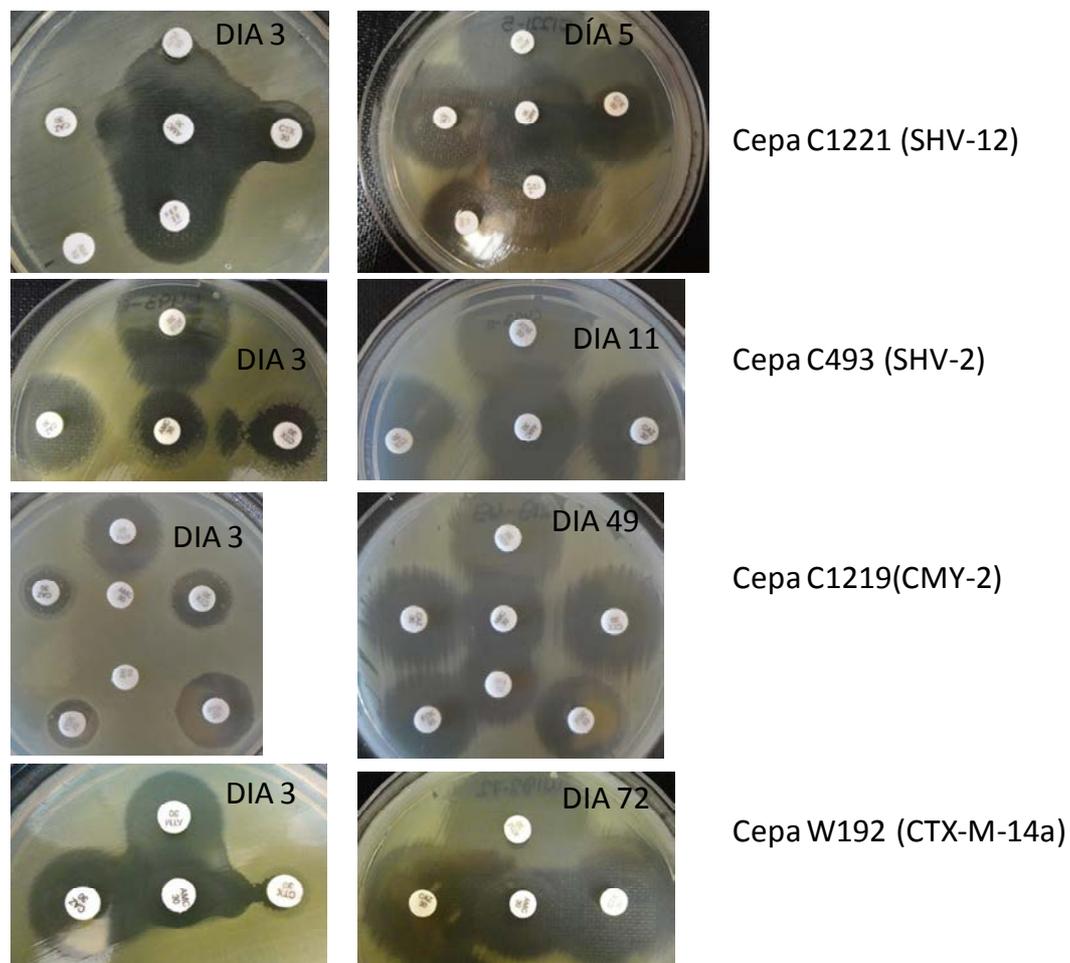


Figura 44.- Antibiogramas mostrados por las cepas inicial y final en aquellas cepas que perdieron el fenotipo BLEE o AmpC.

En el apartado siguiente se expondrán más a fondo los resultados obtenidos del análisis de todas estas cepas.

Tabla 44.- Fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos; así como entornos genéticos de los genes codificantes de las beta-lactamasas de estudio e integrones en las cepas dadoras de *S. enterica*, transconjugantes y cepas derivadas del experimento de estabilidad genética (LP).

<i>Cepa</i> <sup>1</sup>	<i>Fenotipo de resistencia</i> <sup>2</sup>	<i>Otros genes de resistencia</i>	<i>Entorno genético de beta-lactamasa o integrón de clase 1</i> <sup>3</sup>
<b>C516</b>	AMP, CTX, NAL, KAN, STR, TET, SUL, TRM, SXT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph(3')</i> -I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A
Tc-C516	AMP, CTX, ----, KAN, STR, TET, SUL, TRM, SXT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph(3')</i> -I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A
<b>C650</b>	AMP, CTX, NAL, KAN, STR, TET, SUL, TRM, SXT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph(3')</i> -I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A
Tc-C650	AMP, CTX, ----, KAN, STR, TET, SUL, TRM, SXT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph(3')</i> -I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A
LP-C650-100	AMP, CTX, NAL, KAN, STR, ----, ----, ----, ----	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph(3')</i> -I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , ----, <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , ----	B
<b>W19</b>	AMP, CTX, NAL, TET, SUL	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	C
Tc-W19	AMP, CTX, ----, TET, SUL	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	C
LP-W19-100	AMP, CTX, NAL, ----, SUL	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> , <i>sul2</i> , ----	C
<b>C683</b>	AMP, CTX, NAL, SUL	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> , <i>sul2</i>	D
W192	AMP, CTX, CAZ, ATM, NAL	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	E
Tc-W192	AMP, CTX, CAZ, ATM, ----	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	E
LP-W192-72	AMP, CTX, CAZ, ATM, NAL	----	----
<b>C1220</b>	AMP, CTX, CAZ, ATM, GEN, STR, TET, SUL, TRM, SXT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aadA</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i>	F, H
LP-C1220-100	AMP, CTX, CAZ, ATM, ----, STR, TET, SUL, ---, ---	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aadA</i> , <i>tet(A)</i> , ----, <i>sul2</i> , ----	F
<b>C1189</b>	AMP, CTX, CAZ, ATM	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	F
Tc-C1189	AMP, CTX, CAZ, ATM	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	F
<b>C493</b>	AMP, CTX, CAZ, ATM, STR, TET, SUL	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub> , <i>aadA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i>	I
Tc-C493	AMP, CTX, CAZ, ATM, STR, TET, SUL	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub> , <i>aadA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i>	I
LP-C493-11	----, ----, ----, ----, STR, TET, SUL	----, <i>aadA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i>	I
<b>C1221</b>	AMP, CTX, CAZ, ATM, NAL, SUL	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	-
LP-C1221-5	----, ----, ----, ----, NAL, SUL	----	-
<b>C1218</b>	AMP, CTX, CAZ, ATM, FOX, SUL	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	G
Tc-C1218	AMP, CTX, CAZ, ATM, FOX, SUL	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	G
<b>C1219</b>	AMP, CTX, CAZ, ATM <sup>1</sup> , FOX, SUL	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	G
Tc-C1219	AMP, CTX, CAZ, ATM <sup>1</sup> , FOX, SUL	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	G
LP-C1219-49	----	----	----

<sup>1</sup>Las cepas dadoras se han indicado en letra negrita. Tc: transconjugante; LP: cepa que proviene del experimento de estabilidad genética (-número: día en el que el fenotipo varió; -100: último día del experimento). ----: el gen/fenotipo no se encontró. <sup>2</sup>Para las cepas parentales se determinaron los valores de CMI para AMP, CTX, CAZ y FOX (Tabla 43, página 168). <sup>3</sup>Referido a la Figura 45.

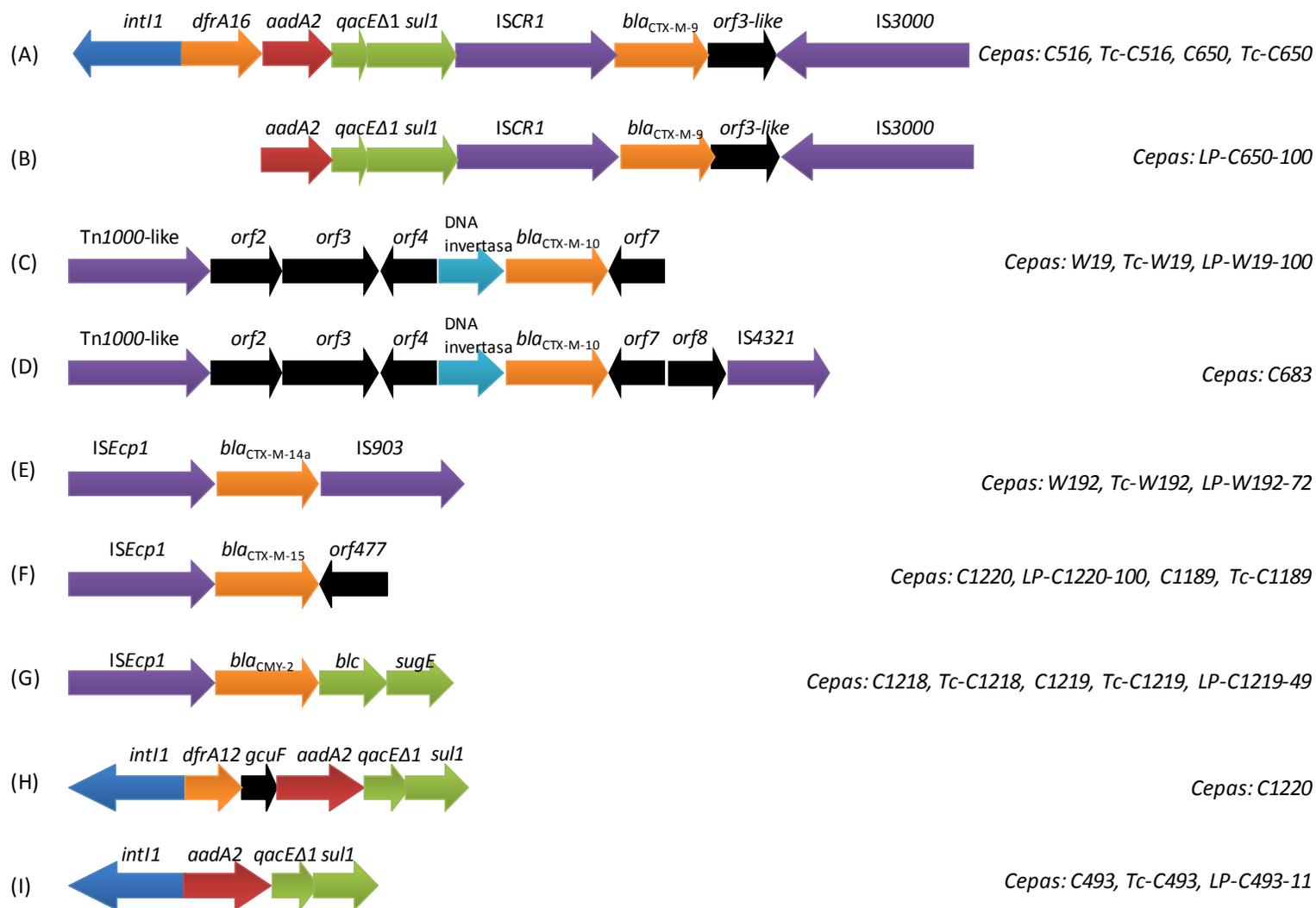


Figura 45.- Entornos genéticos de los genes *bla* detectados entre las cepas de *S. enterica* con fenotipo BLEE o AmpC estudiadas y casetes génicos incluidos en integrones de clase 1 entre nuestras cepas.

#### 5.4.- Caracterización de los plásmidos portadores de los genes codificantes de las enzimas BLEEs y AmpC.

Se realizó la caracterización de plásmidos portadores de los genes codificantes de enzimas BLEE y AmpC en las 11 cepas parentales, en sus transconjugantes (TC) y en las cepas obtenidas en el experimento de estabilidad (LP) (Material y Métodos Apartados 4.1-4.5). Esta parte del trabajo se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Beatriz Guerra (Federal Institute for Risk Assessment, BfR, Berlín) y con la Dra. Rosario Rodicio (Universidad de Oviedo).

Se realizó la tipificación de los plásmidos por el método PBRT (Material y Métodos Apartado 11.1), para conocer a qué grupo de incompatibilidad pertenecían. Se extrajeron los plásmidos portadores de genes *bla*<sub>BLEE</sub> y *bla*<sub>AmpC</sub> mediante los métodos de Birnboim-Doly y extracción de Kado-Liu (Figura 46).

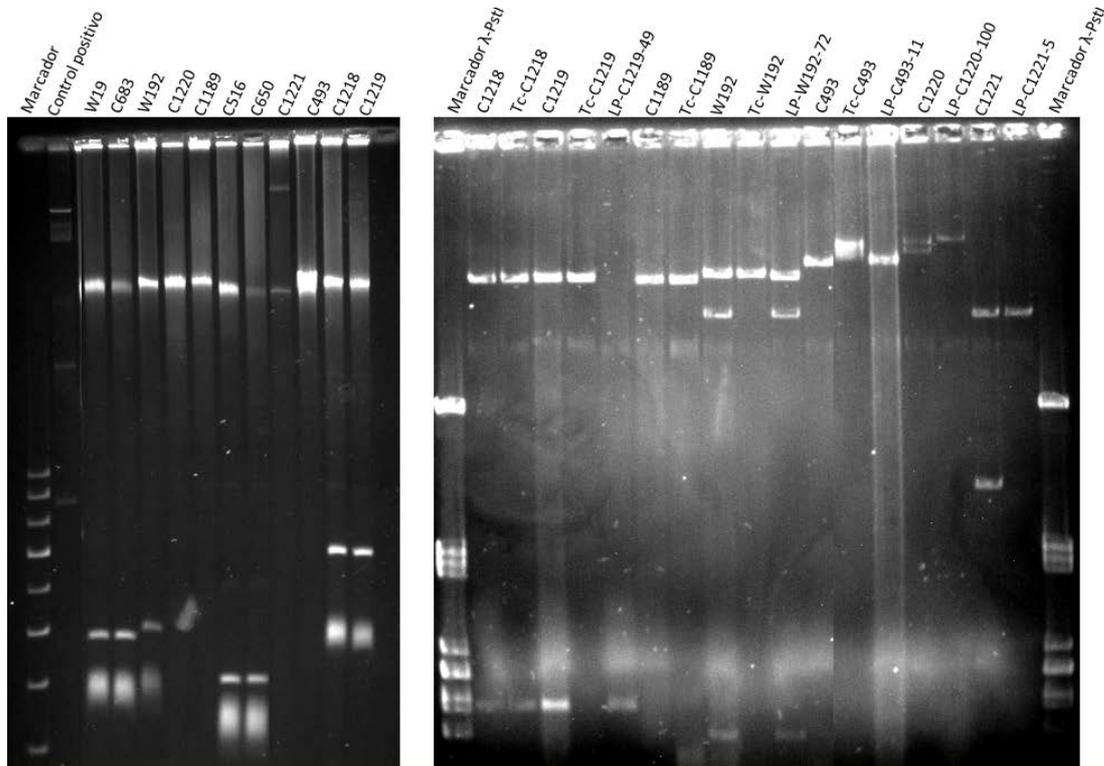


Figura 46.- Geles de agarosa para la visualización de plásmidos tras la extracción de Birnboim-Doly (izquierda) y de Kado-Liu (derecha).

Además, para conocer el tamaño del plásmido se realizó la digestión con la endonucleasa S1 seguido de electroforesis en campos pulsados, S1-PFGE (Figura 47).

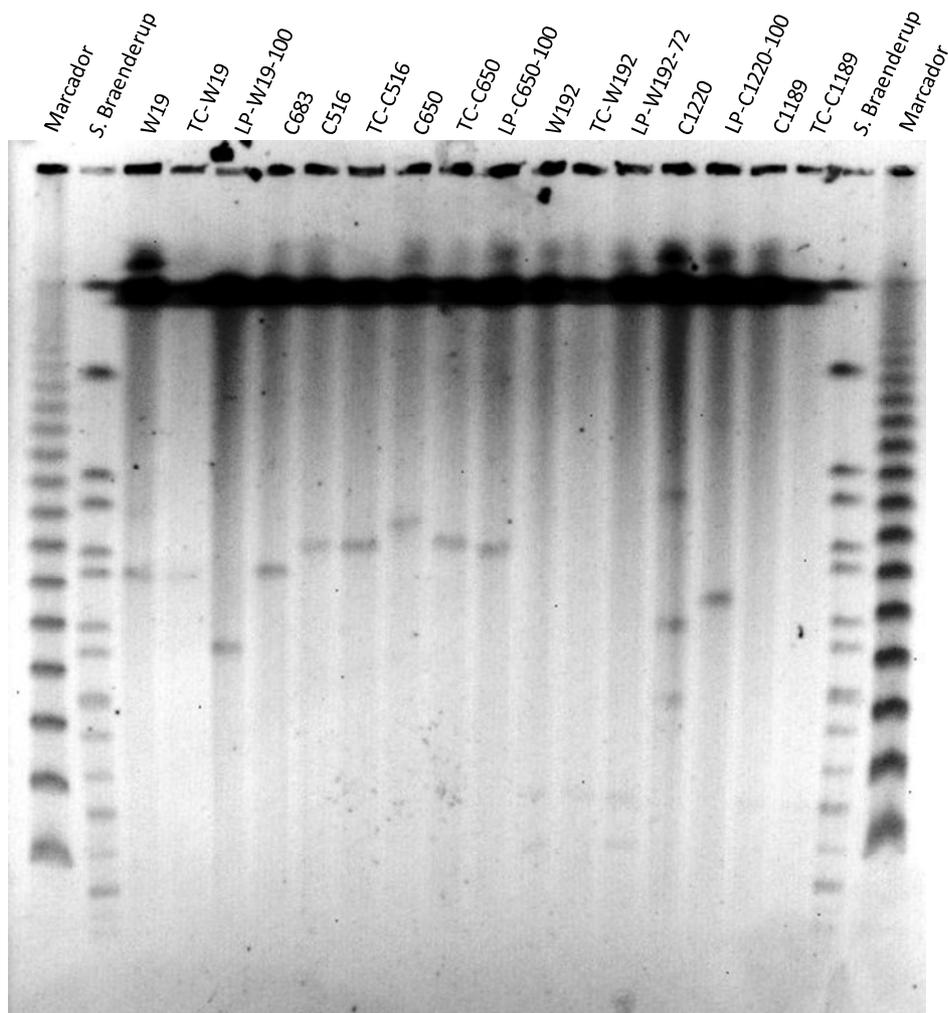


Figura 47.- Gel de agarosa S1-PFGE de las cepas de *S. enterica* portadoras de genes BLEEs o AmpC.

Se transfirieron estos gels a membranas de nitrocelulosa y se realizaron hibridaciones con las sondas específicas para la detección de los genes de resistencia más relevantes (*bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-10</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *dfrA12* y *dfrA16*), detección de integrones (*intI1*), tipado molecular de los plásmidos (IncI1, IncFII, IncFIB, IncA/C) y localización del plásmido de virulencia (*spvC*).

En la Tabla 45, se observan todos los resultados obtenidos tras estos experimentos. Los genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>TEM-1b</sub> y el integrón In60 de las cepas de *S. Virchow* C516 y C650 se encontraron co-existentes en plásmidos transferibles, pero no tipables, de 337 y 369 kb, respectivamente. El transconjugante Tc-C516 mantuvo el mismo fenotipo, genotipo y perfil plasmídico que la cepa parental; mientras que el transconjugante Tc-C650 mostró un plásmido de menor tamaño (349 kb vs 369 kb) que albergaba los mismos genes que su cepa parental. Como se ha comentado en el apartado anterior, la cepa LP-C650-100 perdió los

Tabla 45.- Localización de los genes *bla* y caracterización de los plásmidos portadores de éstos en las cepas de *S. enterica* y derivadas.

Cepa <sup>1</sup>	Genotipo	Entorno genes <i>bla</i> <sub>BLEE</sub> / <i>bla</i> <sub>AmpC</sub> <sup>2</sup> e integrones <sup>2</sup>	Nº plásmidos	Plásmidos detectados e hibridación S1-PFGE		
				Tamaño plásmido (kb)	Replicón (ST) <sup>3</sup>	Genes detectados
<b>C516</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A	1	337	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>int11</i>
Tc-C516	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A	1	337	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>int11</i>
<b>C650</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A	1	369	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>int11</i>
Tc-C650	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A	1	349	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>int11</i>
LP-C650-100	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , ---, <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , ---	B	1	340,8	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>
<b>W19</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	C	1	307	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>
Tc-W19	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	C	1	307	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>
LP-W19-100	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> , <i>sul2</i>	C	1	211	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>
<b>C683</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> , <i>sul2</i>	D	1	307	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>
<b>W192</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	E	2	95	Incl1 (ST80)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>
				60	IncFII(ST1)+IncFIB(ST22)	<i>spvC</i> <sup>4</sup>
Tc-W192	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	E	1	95	Incl1 (ST80)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>
LP-W192-72	----	E	2	95	Incl1 (ST80)	-
				60	IncFII(ST1)+IncFIB(ST22)	<i>spvC</i> <sup>4</sup>
<b>C1220</b> <sup>5</sup>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aadA</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i>	F, H	1	417	IncA/C	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>int11</i>
LP-C1220-100 <sup>5</sup>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>aadA</i> , <i>tet</i> (A), ----, <i>sul2</i> , ----	F	1	277	IncA/C	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>

Cepa <sup>1</sup>	Genotipo	Entorno genes <i>bla</i> <sub>BLEE</sub> / <i>bla</i> <sub>AmpC</sub> e integrones <sup>2</sup>	Nº plásmidos	Plásmidos detectados e hibridación S1-PFGE		
				Tamaño plásmido (kb)	Replicón (ST) <sup>3</sup>	Genes detectados
<b>C1189</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1new</sub>	F	1	87	Incl1(ST68, CC31)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1new</sub>
Tc-C1189	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1new</sub>	F	1	87	Incl1(ST68, CC31)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1new</sub>
<b>C493</b>	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub> , aadA1, tet(A), sul1	I	1	115	Incl1(ST27, CC26)	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub> , <i>int11</i>
Tc-C493	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub> , aadA1, tet(A), sul1	I	1	178	Incl1(ST27, CC26)	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub> , <i>int11</i>
LP-C493-11	----, aadA1, tet(A), sul1	I	1	99	Incl1(ST27, CC26)	<i>int11</i>
<b>C1221</b>	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	-	2	60	IncFII(ST1)+IncFIB(ST22)	<i>spvC</i> <sup>4</sup>
LP-C1221-5	----	-	1	10	Incl1 (NT) <sup>5</sup>	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>
				60	IncFII(ST1)+IncFIB(ST22)	<i>spvC</i> <sup>4</sup>
<b>C1218</b>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	G	1	87	Incl1(ST18)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>
Tc-C1218	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	G	1	87	Incl1(ST18)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>
<b>C1219</b>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	G	1	87	Incl1(ST2, CC2)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>
Tc-C1219	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	G	1	87	Incl1(ST2, CC2)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>
LP-C1219-49	----	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>Las cepas dadoras se han indicado en letra negrita. Tc: transconjugante; LP: cepa que proviene del experimento de estabilidad genética (-número: día en el que el fenotipo varió; -100: último día del experimento). ----: el gen/fenotipo no se encontró. <sup>2</sup>Referido a la Figura 45. <sup>3</sup>NT: no tipable. <sup>4</sup>La sonda *spvC* hibridó en ese plásmido, confirmando que se trata del plásmido de virulencia de *S. Enteritidis*, pSEV. <sup>5</sup>La sonda CTX-M-15\* hibridó también en el cromosoma (*ICeuI*-PFGE). <sup>6</sup>El plásmido Incl1 fue no tipable (NT), porque carecía de los genes necesarios para realizar el pMLST.

genes *int11* y *dfrA16*, lo cual se reflejó en la detección de un plásmido de menor tamaño (341 kb vs 369 kb).

Las cepas de *S. Virchow* que albergaban el gen *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (W19 y C683) mostraron un plásmido no tipable a 308 kb, que se transfirió por conjugación en la cepa W19. La cepa LP-W19-100 mostró un plásmido de menor tamaño que la parental (211 kb), debido seguramente a la pérdida del gen *tet(B)*, entre otros elementos no identificados.

Se detectaron dos plásmidos en la cepa de *S. Enteritidis* CTX-M-14-positiva (W192). La sonda de virulencia *spvC* hibridó en el plásmido de menor tamaño (60 kb) que era un multirreplicón IncFII(ST1)+IncFIB(ST22) no conjugativo, por lo que se trataba del plásmido de virulencia típico de *S. Enteritidis*, denominado en la literatura como pSEV. El otro plásmido de 95 kb era un IncI1 (ST80) que portaba el gen *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> y que fue transferido por conjugación. Aunque la cepa parental perdió su fenotipo BLEE tras 72 días, no se detectó variación en el tamaño del plásmido portador, ni se perdió el plásmido de virulencia pSEV en la cepa LP-W192-72.

Los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>TEM-1new</sub> se detectaron co-localizados en un plásmido conjugativo IncI1 (ST68) de 87 kb en la cepa *S. Gnesta* C1189 y su transconjugante TC-C1189. Sin embargo, en la cepa C1220 se detectaron los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>TEM-1b</sub> se detectaron, junto con el integrón portador del gen *dfrA12*, en un plásmido IncA/C de 417 kb que no conjugó en las condiciones experimentadas. Además de la localización plasmídica, se observó una segunda copia del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en el cromosoma de la cepa C1220 (identificada en los experimentos de hibridación sobre los resultados de *ICeul*-PFGE) (Figura 48). Curiosamente, tras analizar la cepa LP-C1220-100, se observó que además de perder el integrón, había perdido la copia plasmídica del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>; mientras que se mantenía la copia cromosómica. El plásmido detectado en LP-C1220-100 se redujo a 277 kb en el que solo hibridaron las sondas de IncI1 y *bla*<sub>TEM-1b</sub>.

Respecto a las cepas portadoras de genes *bla*<sub>SHV</sub>, los experimentos de hibridación demostraron que la cepa de *S. Livingstone* C493 poseía un plásmido IncI1 (ST27, CC26) de 115 kb que albergaba el gen *bla*<sub>SHV-2</sub>, así como el integrón de clase 1 *int11-aadA1-qacEΔ1-sul1* (Tabla 45 y Figura 45-I). Los experimentos de conjugación fueron satisfactorios y aunque los transconjugantes obtenidos portaban los mismos genes de resistencia, poseían tamaños de plásmido mayores al de la cepa parental, posiblemente debido a una integración con plásmidos de menor tamaño. Tras 11 días de pases en ausencia de antibiótico, no se detectó

el fenotipo BLEE en la cepa LP-C493-11 y su plásmido estaba reducido a 99 kb, asociado a la pérdida del gen *bla*<sub>SHV-2</sub>.

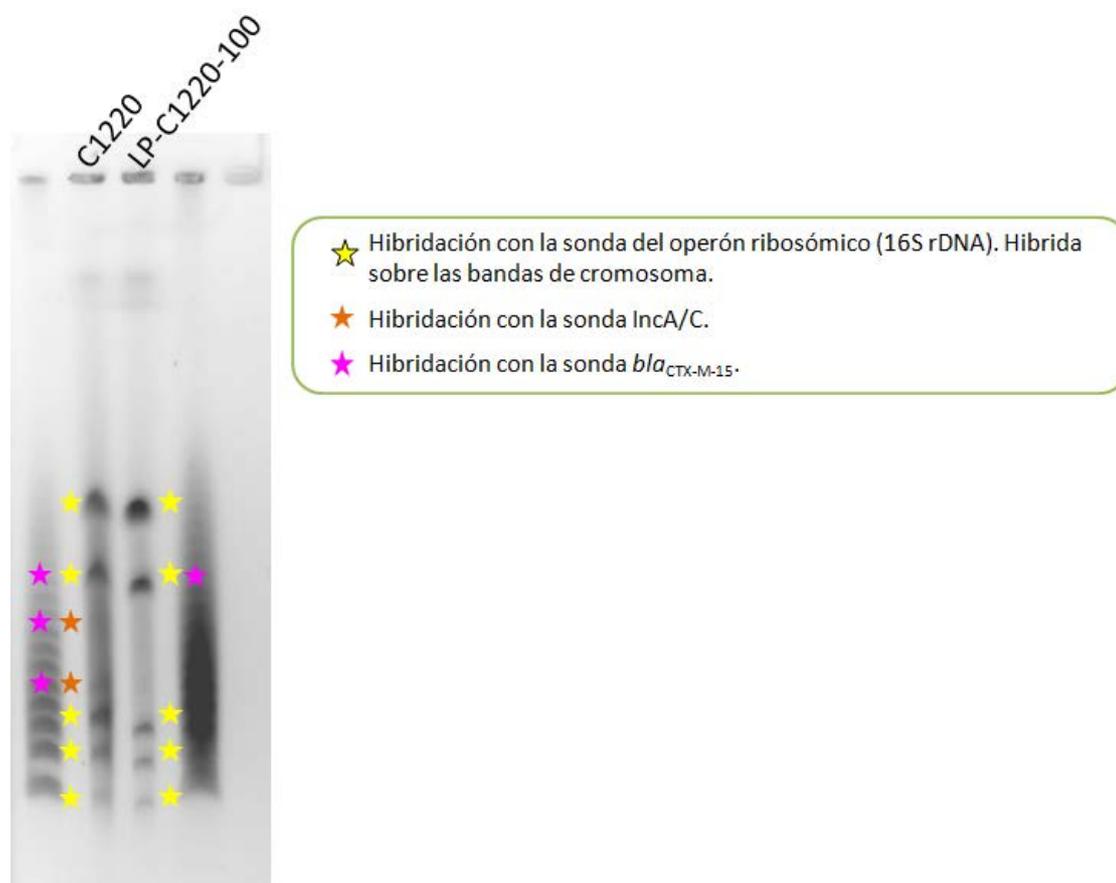


Figura 48.- Gel de agarosa I-Ceu-I-PFGE de las cepas C1220 y LP-C1220-100, con las anotaciones de hibridación de las sondas IncA/C, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y 16S rDNA estudiadas.

En el caso de la cepa C1221, portadora del gen *bla*<sub>SHV-12</sub>, resultó sorprendente comprobar que el plásmido portador de este gen pertenecía al grupo de incompatibilidad Inc11, pero su tamaño era de tan solo 10 kb. No se pudo realizar el subtipado de dicho plásmido, puesto que no se encontraron ninguno de los genes característicos de la estructura básica de los plásmidos de tipo Inc11 y que son utilizados en la técnica de pMLST (*ardA*, *trbA-pndC*, *sogS*, *pill*). Aunque se diseñaron cebadores específicos para la detección del sistema toxina-antitoxina *pndAC* (Material y Métodos, apartado 11.1), no se obtuvieron resultados positivos. Esta es quizás la razón de que tras cinco días en ausencia de antibiótico, este plásmido se perdiese fácilmente, perdiendo a su vez el fenotipo BLEE en la cepa. La cepa parental, que también portaba el plásmido de virulencia pSEV de 59 kb, no conjugó ninguno de los dos plásmidos.

La cepa de *S. Bredeney* C1219 albergaba el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> en un plásmido de tipo IncI1 (ST2, CC2) de 87 kb que fue transferido por conjugación y también que se perdió completamente tras 49 días sin presión selectiva (Tabla 45). En este caso se detectó el sistema *pndAC*, al igual que el resto de genes utilizados en el subtipado pMLST. La segunda cepa de *S. Bredeney* de nuestra colección presentaba el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> en un plásmido IncI1 (ST18) de 87 kb, fue transferido por conjugación; pero no se perdió durante los 100 días que duró el experimento de estabilidad.

## **6.- CASO CLÍNICO: ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA *IN VIVO* DEL GEN *aac(6')*-Ib-cr Y MUTACIONES EN *GyrA* EN UNA CEPA CLÍNICA *QnrS1*-POSITIVA DE *S. enterica* SEROTIPO Typhimurium DT104B.**

Entre los 364 aislados de *S. enterica* estudiados en esta tesis destacó la detección de un único aislado (Se20) que presentaba resistencia a ciprofloxacina, uno de los antibióticos utilizados en casos de sepsis por *S. enterica* en pacientes adultos. Esta cepa despertó nuestro interés debido a que fue la única cepa resistente a ciprofloxacina, así como a que se había recogido otro aislado (Se6) procedente del mismo paciente unos días antes y que no presentaba este patrón de resistencia. Ambos aislados, procedentes de muestras fecales, se procesaron en el Laboratorio de Microbiología del Hospital San Pedro y correspondían a dos *S. enterica* serotipo Typhimurium (4,5,12:i:1,2) fagotipo DT104B de un paciente de muy elevada edad hospitalizado debido a una gastroenteritis aguda en septiembre de 2008. El primer aislado (Se6) fue previo al tratamiento antibiótico; mientras que el segundo aislado (Se20) fue obtenido tras el tratamiento con ciprofloxacina, que el paciente recibió durante 7 días.

### **6.1.- Estudio de la sensibilidad a antibióticos.**

Tanto el estudio por antibiograma como la determinación de la CMI nos permitieron observar que ambos aislados eran resistentes a estreptomina, tetraciclina y sulfamidas. Además, el aislado Se6 mostraba sensibilidad disminuida a ácido nalidíxico (valor de CMI, 16 mg/L); mientras que el aislado Se20 mostraba resistencia a este antibiótico, a las fluoroquinolonas ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, ofloxacina; a los aminoglucósidos tobramicina y kanamicina, así como a trimetoprim y trimetoprim-sulfametoxazol

Tabla 46.- Valores de CMI y halos de inhibición frente a distintos antibióticos observados en los aislados de *S. Typhimurium* Se6 y Se20.

	Se6 <sup>a</sup>				Se20 <sup>a</sup>			
	CMI (mg/L) <sup>b</sup>		Antibiograma (mm halo) <sup>b</sup>		CMI (mg/L) <sup>b</sup>		Antibiograma (mm halo) <sup>b</sup>	
Ác.nalidíxico	16	S/NA	17	I/NA	> 512	R/NA	≤ 6	R/NA
Ciprofloxacina	0,5 <sup>c</sup>	S/S	26	S/S	8	R/R	13	R/R
Norfloxacina	2	S/R	26	S/S	32	R/R	13	I/I
Levofloxacina	1	S/R	-	-	8	R/R	-	-
Ofloxacina	2	S/R	-	-	16	R/R	-	-
Gentamicina	2	S/S	23	S/S	2	S/S	23	S/S
Amikacina	4	S/S	24	S/S	16	S/I	18	S/S
Tobramicina	1	S/S	20	S/S	32	R/R	10	R/R
Kanamicina	4	S/NA	24	S/NA	128	R/NA	12	R/NA
Estreptomicina	> 512	NA/NA	≤ 6	R/NA	> 512	NA/NA	≤ 6	R/NA
Ampicilina <sup>c</sup>	≤ 8	S/S	24	S/S	≤ 8	S/S	24	S/S
Piperacilina <sup>c</sup>	≤ 16	S/S	-	-	≤ 16	S/S	-	-
Pip/Tazo <sup>c</sup>	≤ 16	S/S	-	-	≤ 16	S/S	-	-
Ticarcilina <sup>c</sup>	≤ 16	S/S	-	-	≤ 16	S/S	-	-
Amox/clav <sup>c</sup>	≤ 8/4	S/S	28	S/S	≤ 8/4	S/S	28	S/S
Cefalotina <sup>c</sup>	≤ 8	S/NA	22	S/NA	≤ 8	S/NA	22	S/NA
Cefazolina <sup>c</sup>	≤ 4	S/NA	26	S/NA	≤ 4	S/NA	26	S/NA
Cefepima <sup>c</sup>	≤ 1	S/S	-	-	≤ 1	S/S	-	-
Cefoxitina <sup>c</sup>	≤ 8	S/NA	26	S/S	≤ 8	S/NA	26	S/S
Ceftazidima <sup>c</sup>	≤ 1	S/S	26	S/-	≤ 1	S/S	26	S/-
Cefta/clav <sup>c</sup>	≤ 0.5	NA/NA	-	-	≤ 0.5	NA/NA	-	-
Ceftriaxona	-	-	32	S/S	-	-	32	S/S
Imipenem <sup>c</sup>	≤ 2	S/S	30	S/S	≤ 2	S/S	30	S/S
Tetraciclina	-	-	≤ 6	R/NA	-	-	≤ 6	R/NA
Tigeciclina	-	-	22	NA/S	-	-	24	NA/S
Cloranfenicol	-	-	24	S/S	-	-	24	S/S
Trimetoprim	1	S/S	-	-	> 128	R/R	-	-
Cotrimoxazol <sup>c</sup>	≤ 2/38	S/S	21	S/S	> 4/76	R/R	≤ 6	R/R
Sulfamidas	-	-	≤ 6	R/NA	-	-	≤ 6	R/NA
Rifampicina	-	-	16	NA/NA	-	-	16	NA/NA
Ácido fusídico	-	-	≤ 6	NA/NA	-	-	≤ 6	NA/NA
Fosfomicina <sup>c</sup>	≤ 16	S/S	28	S/NA	≤ 16	S/S	30	S/NA
Nitrofurantoína <sup>c</sup>	≤ 32	S/S	-	-	≤ 32	S/S	-	-

<sup>a</sup>R: resistente; S: sensible; I: resistencia intermedia. <sup>b</sup>Puntos de corte determinados según CLSI (2012)/EUCAST (2013); NA: no aplicable; -: no testado según criterio EUCAST. <sup>c</sup>De acuerdo a las *normas de experto* proporcionadas por EUCAST, para valores de CMI >0.06 mg/L para CIP, deberían informarse como resistentes todas las fluoroquinolonas testadas. <sup>c</sup>CMI determinada mediante el sistema automático MicroScan proporcionado por el Laboratorio de Microbiología del Hospital San Pedro.

(cotrimoxazol). En la Tabla 46 se observan estos valores y en sombreado se encuentran resaltados los antibióticos para los que se observó una variación entre ambos aislados.

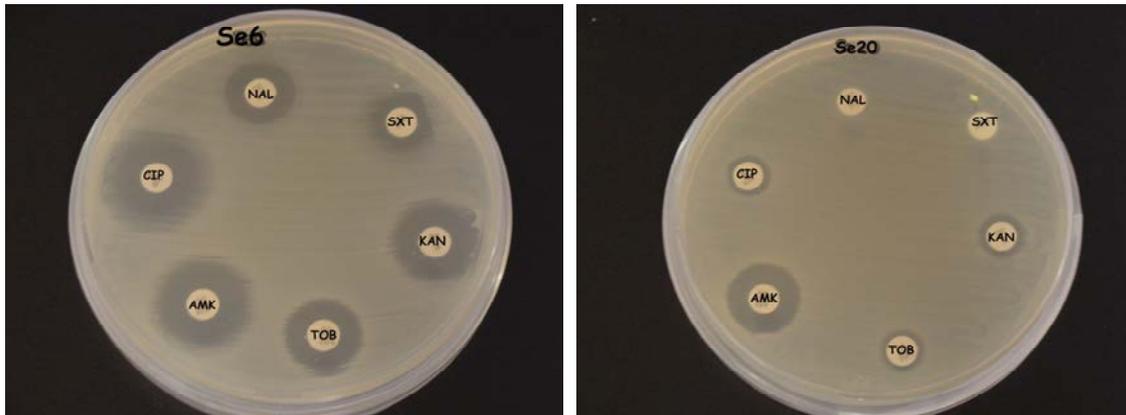


Figura 49.-Comparativa entre el fenotipo de resistencia a distintos antibióticos en ambos aislados. Se6: aislado previo al tratamiento antibiótico. Se20: aislado posterior al tratamiento con ciprofloxacina.

## 6.2.- Estudio de la relación clonal: tipificación molecular.

Con el fin de determinar si ambos aislados pertenecían a un mismo clon o tipo molecular, se realizaron estudios de PFGE y MLST. Tras amplificar, secuenciar y analizar en ambos sentidos las secuencias de los siete genes housekeeping del MLST de los aislados Se6 y Se20, se determinó que ambos aislados pertenecían a la secuencia tipo ST36 (*thrA21*, *purE5*, *aroC18*, *dnaN14*, *hemD12*, *hisD9* y *sucA18*). Esta secuencia tipo, anteriormente descrita como un singletón, fue incorporada en febrero de 2012 en el complejo clonal CC138. El ST36 difiere en cuatro alelos de la secuencia tipo ST19 (*thrA2*, *purE5*, *aroC10*, *dnaN7*, *hemD12*, *hisD9* y *sucA9*), la más frecuente en *S. Typhimurium* y que define el complejo clonal CC1. Dentro del ST36, existen 43 cepas de *Salmonella* en la base de datos (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>), todas ellas son *S. Typhimurium* con origen en Europa o Asia y procedentes de muestras de humanos o reptiles.

Se utilizó PFGE tras digestión con las enzimas *XbaI* y *SpeI*, con lo que se observó un patrón de bandas indistinguible entre ambos aislados (Figura 50). Según los criterios establecidos por Tenover *et al.* (1995), ambas cepas están clonalmente relacionadas.

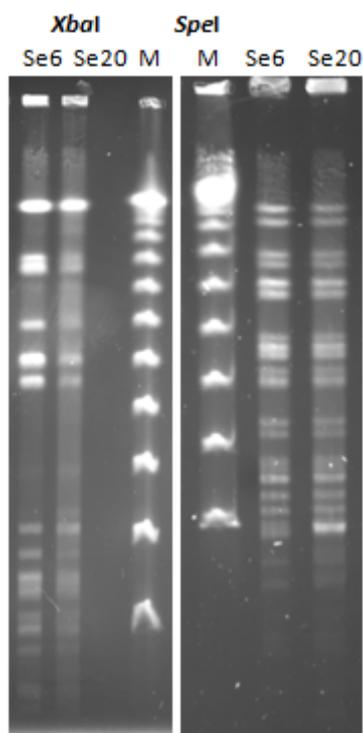


Figura 50.- Perfiles obtenidos tras PFGE con las enzimas *XbaI* y *SpeI*.

### 6.3.- Mecanismos de resistencia.

Para la cepa Se6 se observaron unos valores de CMI de ácido nalidíxico y ciprofloxacina de 16 mg/L y 0,5 mg/L, respectivamente. La cepa Se20, sin embargo, mostró unos valores de CMI de ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina y ofloxacina de >512, 8, 32, 8 y 16 mg/L, respectivamente (Tabla 47). Dada la diferencia fenotípica entre ambas cepas, se estudiaron por PCR y secuenciación los mecanismos implicados en la resistencia a quinolonas/fluoroquinolonas (mutaciones en *gyrA* y *parC* y la detección de los genes *aac(6')-Ib-cr*, *qnr* y *qepA*). Tal y como se observa en la Tabla 47, ambas cepas presentaron el gen *qnrS1*; mientras que la cepa Se20 mostró además el gen *aac(6')-Ib-cr* y la mutación Ser83Tyr en la proteína GyrA.





trataba de cepas de *E. coli* (y no de *Salmonella*), se determinó su fenotipo de resistencia a antibióticos mediante el método de difusión en agar y CMI, y se estudió la relación clonal entre los transconjugantes, las cepas dadoras y la receptora mediante REP-PCR y PFGE (*Xba*I, *Spe*I).

Con estas pruebas se comprobó que sólo se obtuvieron transconjugantes de la cepa Se20 que fueron aislados en las placas de BHI agar suplementadas con rifampicina (100 µg/mL) y ciprofloxacina (0,5 µg/mL). Se seleccionaron dos transconjugantes caracterizados por presentar distinto fenotipo de resistencia (Tabla 48) y se denominaron TCSe20B y TCSe20L.

Se observó el mismo valor de CMI o fenotipo de resistencia a rifampicina, estreptomycinina y tetraciclina, tanto en los transconjugantes como en la cepa receptora. El transconjugante TCSe20B mostraba los mismos valores de resistencia que la cepa Se20 para los antibióticos amikacina, tobramicina, kanamicina y gentamicina, mientras que el transconjugante TCSe20L presentó sensibilidad a los mismos.

Tabla 48.- Valores de CMI y fenotipos de resistencia a distintos antibióticos obtenidos para las cepas receptora (CSH26), dadoras (Se6 y Se20) y transconjugantes (TCSe20B y TCSe20L).

Antibióticos	CMI (mg/L) detectadas en las cepas estudiadas <sup>a</sup>				
	Se6	Se20	TCSe20B	TCSe20L	CSH26
Ácido nalidíxico	16 (S/NA)	>512 (R/NA)	16 (S/NA)	16 (S/NA)	4 (S/NA)
Ciprofloxacina	0,5 (S/S)	8 (R/R)	2 (I/R)	1 (S/I)	0,015 (S/S)
Norfloxacina	2 (S/R)	32 (R/R)	16 (R/R)	2 (S/R)	0,125 (S/S)
Ofloxacina	2 (S/R)	16 (R/R)	2 (S/R)	2 (S/R)	0,125 (S/S)
Levofloxacina	1 (S/R)	8 (R/R)	2 (S/R)	2 (S/R)	0,06 (S/S)
Amikacina	4 (S/S)	16 (R/I)	16 (R/I)	4 (S/S)	1 (S/S)
Tobramicina	1 (S/S)	32 (R/R)	32 (R/R)	1 (S/S)	0,5 (S/S)
Gentamicina	2 (S/S)	2 (S/S)	0,5 (S/S)	0,5 (S/S)	0,5 (S/S)
Kanamicina	4 (S/NA)	128 (R/NA)	128 (R/NA)	4 (S/NA)	2 (S/NA)
Estreptomycinina	>512 (NA/NA)	>512 (NA/NA)	8 (NA/NA)	8 (NA/NA)	8 (NA/NA)
Tetraciclina <sup>b</sup>	R	R	S	S	S
Rifampicina <sup>b</sup>	16	16	≤6	≤6	≤6
Trimetoprim	1 (S/S)	>128 (R/R)	>128 (R/R)	>128 (R/R)	0,5 (S/S)
Sulfamidas <sup>b</sup>	R	R	R	R	S
Cotrimoxazol <sup>b</sup>	S	R	R	R	S

<sup>a</sup>Valores interpretados según el criterio CLSI(2012)/EUCAST (2013); NA: no aplicable por el criterio establecido. <sup>b</sup>Fenotipos de resistencia obtenidos mediante difusión en agar. R: resistente, S: sensible, I: resistencia intermedia.

Se estudiaron por PCR y secuenciación los mecanismos de resistencia a quinolonas (mutaciones en *gyrA* y *parC*, genes *aac(6')*-Ib-cr, *qnr* y *qepA*), tetraciclinas [*tet(A)*-(E), *tet(G)*], sulfamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), aminoglucósidos (*aadA*, *aadA5*, *strA-strB*, *aph(3')*-Ia, *aph(3')*-IIa, *rmtB* y *armA*), trimetoprim (genes *dfrA*), así como la presencia y la caracterización de

integrones de clase 1 en los transconjugantes obtenidos. Se detectó el gen de resistencia *qnrS1* en ambos transconjugantes, aunque tan solo el transconjugante TCSe20B presentó además el gen *aac(6')-Ib-cr*. El entorno descrito para el gen *qnrS1* en estas cepas fue idéntico al descrito en la cepa dadora Se20. Ambos transconjugantes presentaron la estructura completa del integrón encontrado en la cepa Se20 (*int11 + dfrA17 + aadA5*), así como el gen de resistencia a sulfamidas *sul2*, aunque no se detectó asociado a los genes *strA-strB*.

Tabla 49.-Genes encontrados por PCR y secuenciación en las cepas Se6, Se20 y en los transconjugantes obtenidos a partir de la cepa Se20.

	<i>Fenotipo de resistencia</i>	<i>Resistencia quinolonas</i>	<i>Otros mecanismos de resistencia</i>	<i>Integrón</i>
Se6	STR, TET, SUL	<i>qnrS1</i>	<i>tet(A), strA-strB, sul2</i>	-
Se20	NAL, CIP, NOR, OFL, LEV, TOB, KAN, STR, TET, SXT, SUL, TRM	<i>qnrS1, aac(6')-Ib-cr, Ser83Tyr (GyrA)</i>	<i>tet(A), strA-strB, sul2</i>	<i>int11 + dfrA17 + aadA5</i>
TCSe20B	CIP <sup>1</sup> , NOR, TOB, KAN, SXT, SUL, TRM	<i>qnrS1, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>sul2</i>	<i>int11 + dfrA17 + aadA5</i>
TCSe20L	SXT, SUL, TRM	<i>qnrS1</i>	<i>sul2</i>	<i>int11 + dfrA17 + aadA5</i>

### 6.5.- Estudio plasmídico.

Una vez que se demostró que algunos de los determinantes de resistencia estudiados por PCR eran transferibles por conjugación, otro de los objetivos planteados fue comprobar si se localizaban en plásmidos y caracterizarlos. Para ello realizamos en primer lugar el tipado de plásmidos en las cepas de *Salmonella* Se6 y Se20; así como en los transconjugantes TCSe20B y TCSe20L, mediante la técnica denominada PBRT según la metodología especificada en el apartado de Material y Métodos.

Mientras que la cepa Se6 tan sólo mostró la presencia del plásmido de tipo *colE<sub>TP</sub>*; las cepas Se20, TCSe20B y TCSe20L, resultaron positivas para los plásmidos del grupo de incompatibilidad *Incl1* y *colE<sub>TP</sub>*. Se realizó el tipado molecular por pMLST del plásmido de tipo *Incl1* y se comprobó que pertenecía a la secuencia tipo ST3 (*Incl1-ST3*).

La PCR con los cebadores *oricoE<sub>TP</sub>* y *qnrS* proporcionó un amplicón de 2751 pb lo que indicaba la colinearidad del gen *qnrS1* con el origen de replicación *colE<sub>TP</sub>*.

Para confirmar la localización plasmídica de los determinantes de resistencia estudiados previamente por PCR, se realizó una S1-PFGE (Figura 54) y posteriormente se realizó una hibridación por Southern blot con las sondas de los genes *qnrS1*, *aac(6′)-Ib-cr*, *int11*, *aadA5*, *sul2*, *strB*, *tet(A)* y para los orígenes de replicación del plásmido de tipo IncI1 y ColE1.

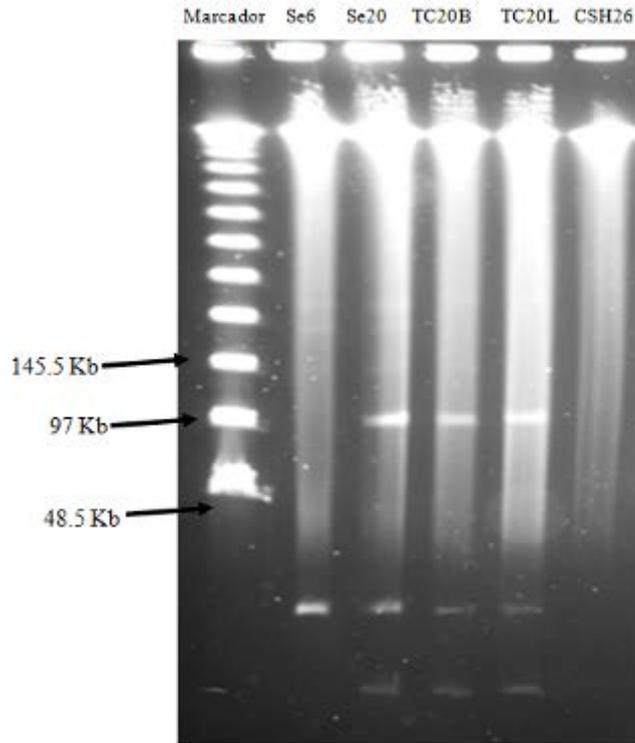


Figura 54.- Patrón de digestión S1-PFGE de las cepas estudiadas y de la cepa receptora CSH26. Marcador: Lambda Ladder PFG Marker.

En la Figura 54 se muestra el número y tamaño de los plásmidos determinados mediante comparación con los marcadores de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (48,5-727,5 Kb) y Low Range PFG Marker (2,03-194,0 Kb). Se detectaron tres plásmidos en la cepa Se6, uno de ellos tipado como  $colE_{Tp}$  de 9 kb y otros dos tipables. En la cepa Se20 se detectaron cinco plásmidos de 194; 97; 9; 8 y 6 Kb, respectivamente. Tres de éstos pertenecían a los grupos de incompatibilidad IncI1,  $ColE_{Tp}$  y ColE-like. Ambos transconjugantes, TCSe20B y TCSe20L presentaron en ambos casos tres plásmidos de 97; 9 y 6 Kb (Tabla 50).

Tabla 50.- Tipo, número y tamaño de los plásmidos detectados en las cepas Se6, Se20 y los transconjugantes.

Tamaño plásmido	Grupo Inc	Sondas que hibridaron en los plásmidos detectados en las cepas			
		Se6	Se20	TcSe20B	TcSe20L
194 Kb	NT	<i>tet(A), sul2, strB</i>	<i>tet(A), sul2, strB</i>	ND	ND
97 Kb	Incl1 (ST3)	ND	<i>aadA5, int11, sul2</i>	<i>aadA5, int11, sul2</i>	<i>aadA5, int11, sul2</i>
9 Kb	ColE <sub>TP</sub>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>
8 Kb	NT	<i>tet(A), sul2, strB</i>	<i>tet(A), sul2, strB</i>	ND	ND
6 Kb	ColE1-like	ND	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	-

NT: plásmidos no tipables. ND: plásmidos no detectados. -: ninguna de las sondas que se probaron hibridó en estos plásmidos.

Entre los resultados obtenidos (Tabla 50, Figura 55) destaca la presencia de los genes *tet(A)*, *sul2* y *strB* en dos localizaciones plasmídicas para las cepas Se6 y Se20. Las sondas hibridaron sobre el plásmido de aproximadamente 8 Kb en los dos casos; pero además se identificó otra banda de hibridación correspondiente a un plásmido de aprox. 194 Kb.

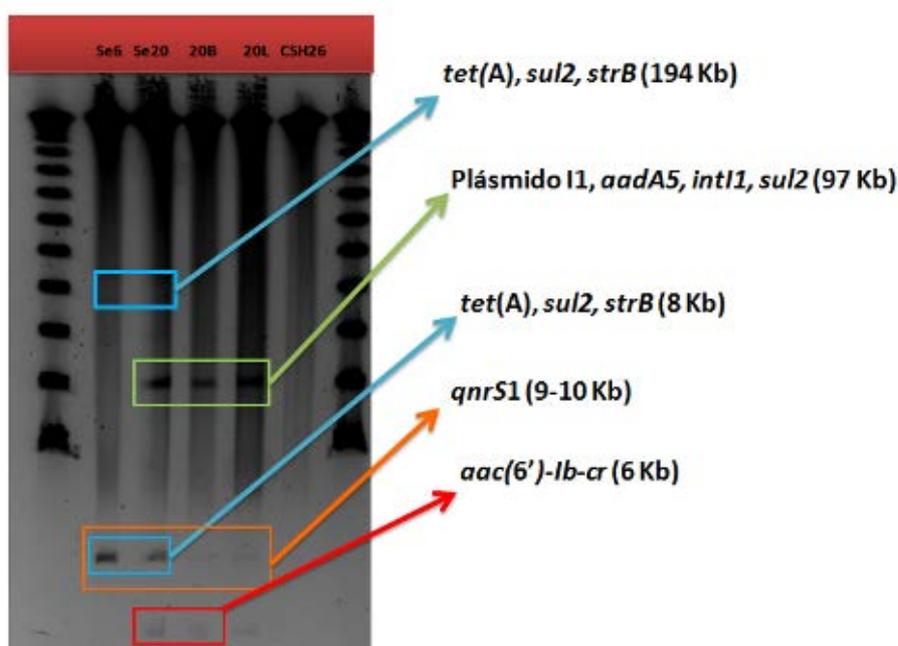


Figura 55.- Representación gráfica de la localización donde hibridan las sondas específicas para cada gen.

El gen de resistencia *aac(6′)-Ib-cr* se localizó en las cepas Se20 y TCSe20B en el plásmido de la familia ColE1 detectado a aproximadamente a la altura de 6 Kb; mientras que la banda observada a esa altura para la cepa TCSe20L fue negativa, tal y como se esperaba. El gen *qnrS1* fue localizado en las cuatro cepas en el plásmido de 9 Kb, tipado como *colE<sub>TP</sub>*. Los genes *aadA5*, *int11* y *sul2*, los dos primeros indicadores de la presencia de integrón, fueron localizados en el plásmido IncI1 de 97 Kb para la cepa Se20 y los transconjugantes.

#### **6.6.- Secuenciación completa del plásmido portador del gen *aac(6′)-Ib-cr*.**

Tras el estudio de plásmidos de las cepas Se6 y Se20, llamó la atención el plásmido de pequeño tamaño (aprox. 6 kb) en la cepa Se20 que albergaba el gen *aac(6′)-Ib-cr* que confiere resistencia a aminoglucósidos y sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas, por lo que se decidió estudiar en mayor profundidad este plásmido. Este trabajo se realizó parcialmente en la estancia doctoral que llevé a cabo bajo la supervisión de la Dra. Beatriz Guerra (Federal Institute for Risk Assessment, BfR, Berlín).

Tras la extracción del DNA plasmídico por el método Birnboim-Doly fue transformado por electroporación en la cepa receptora *E. coli* ElectroMax DH10B cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los posibles transformantes se sembraron en placas de Luria-Bertani agar suplementadas con kanamicina (30 mg/L) y se determinaron las CMI de antibióticos aminoglucósidos, ácido nalidíxico y fluoroquinolonas en la cepa parental Se20, en su transformante (TF-Se20) y en la cepa receptora *E. coli* ElectroMax DH10B (Tabla 51). Se analizó la presencia del gen de la acetilasa mediante PCR e hibridación.

Los valores de CMI de la cepa transformante TF-Se20 a tobramicina, kanamicina, ciprofloxacina y norfloxacina se incrementaron en 16, >32, >2 y 4 veces, respectivamente, comparados con la cepa receptora *E. coli* DH10B; mientras que no existían variaciones para los valores de MIC de gentamicina, ácido nalidíxico, levofloxacina y ofloxacina. Esta cepa transformante mostraba los mismos valores de CMI que la cepa parental Se20 para los antibióticos tobramicina y kanamicina, resistencia aportada por la acetilasa detectada; mientras que la carencia de la mutación en *GyrA* y la ausencia del gen *qnrS1* se reflejaban en los menores valores de resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina y ofloxacina detectados en la cepa TF-Se20.

Tabla 51.- Valores de CMI (mg/L) para aminoglucósidos, quinolonas y fluoroquinolonas en las cepas de *S. Typhimurium* Se20, la cepa transformante TF-Se20 y la cepa receptora *E. coli* ElectroMax DH10B.

Antibiótico	Valores de CMI (mg/L)		
	Se20 <sup>1</sup>	TF-Se20	<i>E. coli</i> ElectroMax DH10B
Ácido nalidíxico	>512	2	2
Gentamicina	1	1	1
Tobramicina	32	32	2
Kanamicina	128	128	≤4
Ciprofloxacina	8	0,016	≤0,008
Levofloxacina	8	0,016	0,016
Norfloxacina	32	0,125	0,03
Ofloxacina	16	0,016	0,016

<sup>1</sup>La cepa dadora Se20 contenía la mutación Ser83→Tyr en GyrA y los genes *qnrS1* y *aac(6′)-Ib-cr*.

Se realizó la extracción del contenido plasmídico de la cepa transformante TF-Se20 mediante el kit comercial QIAfilter Plasmid Purification (Qiagen, Hilden, Germany). Esta preparación purificada se utilizó para su secuenciación completa en los servicios de secuenciación de Qiagen y Cogenics mediante la técnica de “walking-primer” empleando cebadores específicos diseñados a partir del gen de la acetilasa. La comparación y el análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando los programas BLAST, blastn y blastp, disponibles en la página web de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el programa Open Reading Frame Finder (ORF Finder) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), el programa de traducción de secuencias Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) y el software Clone Manager 9 (Sci-Ed Software). Las secuencias se alinearon y compararon con los datos disponibles en GenBank utilizando el programa ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)).

La secuencia completa del plásmido (5931 pb), que se denominó como pMdT1, fue depositada en GenBank con el número de acceso JX457478 (Anexo I). A continuación se detallará el análisis realizado sobre la secuencia del plásmido portador del gen de la acetilasa. La máxima identidad que obtuvimos al comparar la secuencia de este plásmido con la base de datos de GenBank fue de un 97% frente al plásmido colicigénico, carente del gen *aac(6′)-Ib-cr*, pBERT (GenBank AF025795) procedente de *S. Berta*, aunque tan solo se comparaba y coincidía un 52% de pMdT1.

El análisis bioinformático mostró que la secuencia del plásmido pMdT1 poseía un contenido G+C de un 51%, ligeramente inferior al 52% descrito para el genoma de *S. enterica*, y 8 marcos de lectura abiertos (ORFs) que se exponen a continuación (Tabla 53 y la Figura 56).

**Región de resistencia.** Mediante el programa ORF Finder se localizó una ORF entre los nucleótidos 4172-4849 que codificaba una proteína de 225 aminoácidos. Esta proteína mostró

un dominio de acetiltransferasa (GNAT) entre los aminoácidos 51-208 y poseía un 99% de identidad (considerando los últimos 184 aminoácidos) con el gen *aac(6′)-Ib-cr*, que justifica el fenotipo detectado para la cepa TF-Se20. La proteína N-acetiltransferasa codificada en la secuencia del plásmido pMdT1 fue denominada AAC(6′)-Ib-cr4, puesto que no solo mostró las mutaciones Trp128→Arg y Asp205→Tyr, análogas a las mutaciones Trp102→Arg y Asp179→Tyr de la variante AAC(6′)-Ib-cr, sino que mostró la mutación aminoacídica Asn5→Thr.

En la secuencia pMdT1, el gen *aac(6′)-Ib-cr4* se encontró embebido en una estructura clásica de casete génico con el lugar *attC* de recombinación aguas abajo del gen; pero no se detectó integrasa o *attI* u otros casetes génicos en el resto de la secuencia del plásmido. Sin embargo se encontró un RBS aguas arriba del gen *aac(6′)-Ib-cr4* que podría indicar un lugar de inicio de traducción. Además, el programa ORF Finder predijo un extremo N-terminal extendido para la proteína AAC(6′)-Ib-cr4, por lo que la proteína encontrada en el plásmido pMdT1 comprendería 225 aminoácidos, en vez de 184 aminoácidos que es lo habitualmente descrito. En cualquier caso, la enzima AAC(6′)-Ib-cr4 era activa en la cepa TF-Se20, tal y como demuestran los valores de CMI (Tabla 51, Figura 57).

**Región de movilización.** Se detectaron los genes de movilización *mobA*, *mobB*, *mobC* y *mobD* entre los nucleótidos 53 y 1865 de la secuencia del pMdT1. Las proteínas codificadas por estos genes son necesarias para la transferencia horizontal de los plásmidos movilizables durante la conjugación bacteriana. En la Tabla 52 se muestran los resultados realizados para la región *mob* del plásmido pMdT1, que resultó muy similar a la región de plásmidos de tipo ColE1, especialmente para aquellas cepas de *S. Typhimurium*.

Tabla 52.- Comparación de las proteínas de movilización del plásmido pMdT1 con aquellas presentes en plásmidos de tipo ColE1 representativos.

Plásmido	Nº acceso GenBank	Cepa	Porcentaje de identidad			
			MobA	MobD	MobB	MobC
pMdT1	JX457478	<i>S. Typhimurium</i>	100	100	100	100
pK	AY079200	<i>S. Enteritidis</i>	96	97	98	99
pRK10	EU697813	<i>S. marcescens</i> ACE2	94	95	95	95
pHLR25	HE652087	<i>S. Typhimurium</i>	93	100	93	95
pQnrS1-cp17s	JN393220	<i>S. Typhimurium</i>	93	100	93	95
pTPqnrS-1a	AM746977	<i>S. Typhimurium</i>	93	100	93	94
pEC278	AY589571	<i>E. coli</i>	93	94	93	94
pSW200	L42525	<i>E. stewartii</i>	92	97	93	97

Tabla 53.- Detalle de las regiones y genes detectados en la secuencia del plásmido pMdT1.

<i>Región</i>	<i>Longitud (pb)</i>	<i>Longitud (aminoácidos)</i>	<i>Gen/elemento</i>	<i>Sentido</i>	<i>Función</i>	
53	1603	1551	519	<i>mobA</i>	Complementario	Movilización
160	375	216	71	<i>mobD</i>	Complementario	Movilización
379	864	486	161	<i>mobB</i>	Complementario	Movilización
1542	1865	324	107	<i>mobC</i>	Complementario	Movilización
1911	2191	281		<i>bom</i> (basis of mobility)		Movilización
1978	2041	63		<i>oriT</i>		origen de transferencia
2033				<i>nic</i> site		Sitio de ruptura de hebras
2488				<i>oriV</i>		Origen de replicación
2489	2841	353		RNAlI	Complementario	Zona replicación
2661	2666	6		-35 RNAI		Promotor replicación
2696	2803	108		RNAI		Zona replicación
2685	2690	6		-10 RNA I		Promotor replicación
2813	2818	6		-10 RNA II		Promotor replicación
2836	2841	6		-35 RNA II		Promotor replicación
3076	3471	396	131	<i>orf1</i>	Complementario	Desconocida
3745	4133	389	122	<i>orf2</i>		Posible regulador transcripcional
4172	4849	678	225	<i>aac</i> (6')-Ib-cr4		Gen de resistencia
5341	5892	552	183	<i>orf3</i>		Factor de estimulación de macrófagos

La región de movilidad *mob*, se detectó precedida por una región denominada *bom* (basis of mobility) requerida para la movilidad del plásmido y localizada entre los nucleótidos 1911 y 2191. Se definió el origen de transferencia, *oriT*, dentro de esta región (nucleótidos 1978-2041) y el sitio de ruptura de las hebras (*nic-cleavage*) en el nucleótido 2033, por comparación con otros plásmidos similares (pRK10, EU697813).

**Región de replicación.** La región de 354 pb, comprendida entre los nucleótidos 2488 y 2841, mostró una identidad superior al 75% con los plásmidos de tipo ColE1 pHW15 y pSGI15 (AM167518 y FN428572, respectivamente). Este tipo de plásmidos se caracterizan por presentar dos RNAs (RNAI y RNAII) que se solapan parcialmente y que se transcriben a partir de un origen vegetativo de replicación (*oriV*). Esta región de RNA es necesaria no solo para la replicación (por un mecanismo de tipo theta independiente del propio plásmido y dependiente completamente de las proteínas aportadas por el hospedador), sino para la regulación del número de copias. En el caso del plásmido pMdT1, el origen de replicación *oriV* se localizó en la posición 2488, así como los segmentos RNAI y RNAII correspondieron a las regiones de 108 y 354 nucleótidos mostradas en la Tabla 53 y Figura 56-57). Los promotores -10 y -35 de las secuencias RNAI y RNAII se encontraban altamente conservados en comparación con aquellas regiones de los plásmidos pHW15 y pSGI15, con los que se comparó esta región de la secuencia.

**Genes accesorios.** Fuera de las regiones anteriormente comentadas, quedaban 2412 pb de la secuencia del plásmido pMdT1, donde se determinaron tres ORFs. No se observó similitud con ninguna secuencia de la base de datos GenBank cuando se comparó la secuencia *orf1* (nt 3076-3471, 131 aminoácidos). La proteína ORF2 (122 aminoácidos) mostraba según el software Phyre2 una estructura secundaria similar a los reguladores transcripcionales de tipo CopG; mientras que la proteína ORF3 (183 aminoácidos) era idéntica a proteínas de estimulación de macrófagos previamente detectadas en *S. Heidelberg* y *E. coli* (nos. de acceso GenBank: EIC34781 y EIL42560).

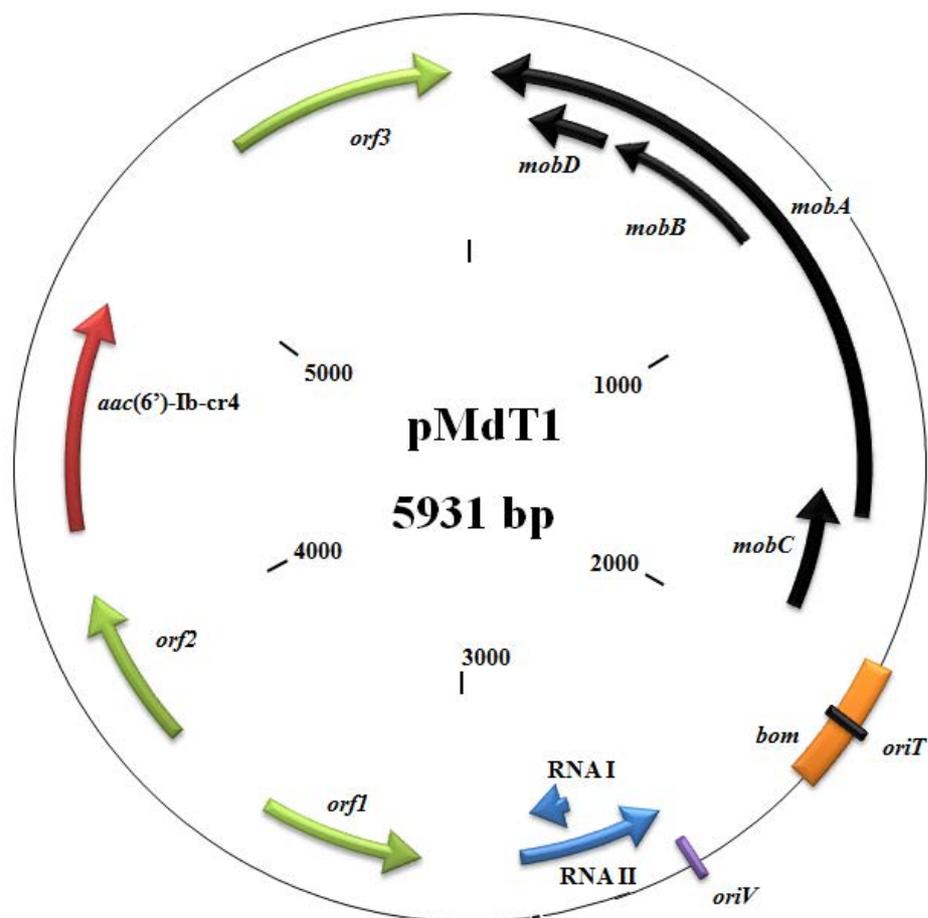


Figura 56.- Representación circular del plásmido pMdT1 detectado en la cepa Se20.

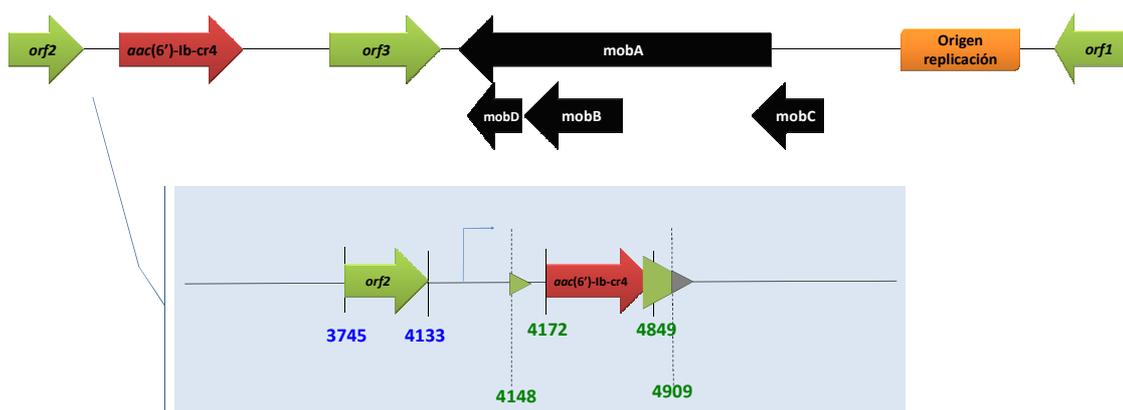
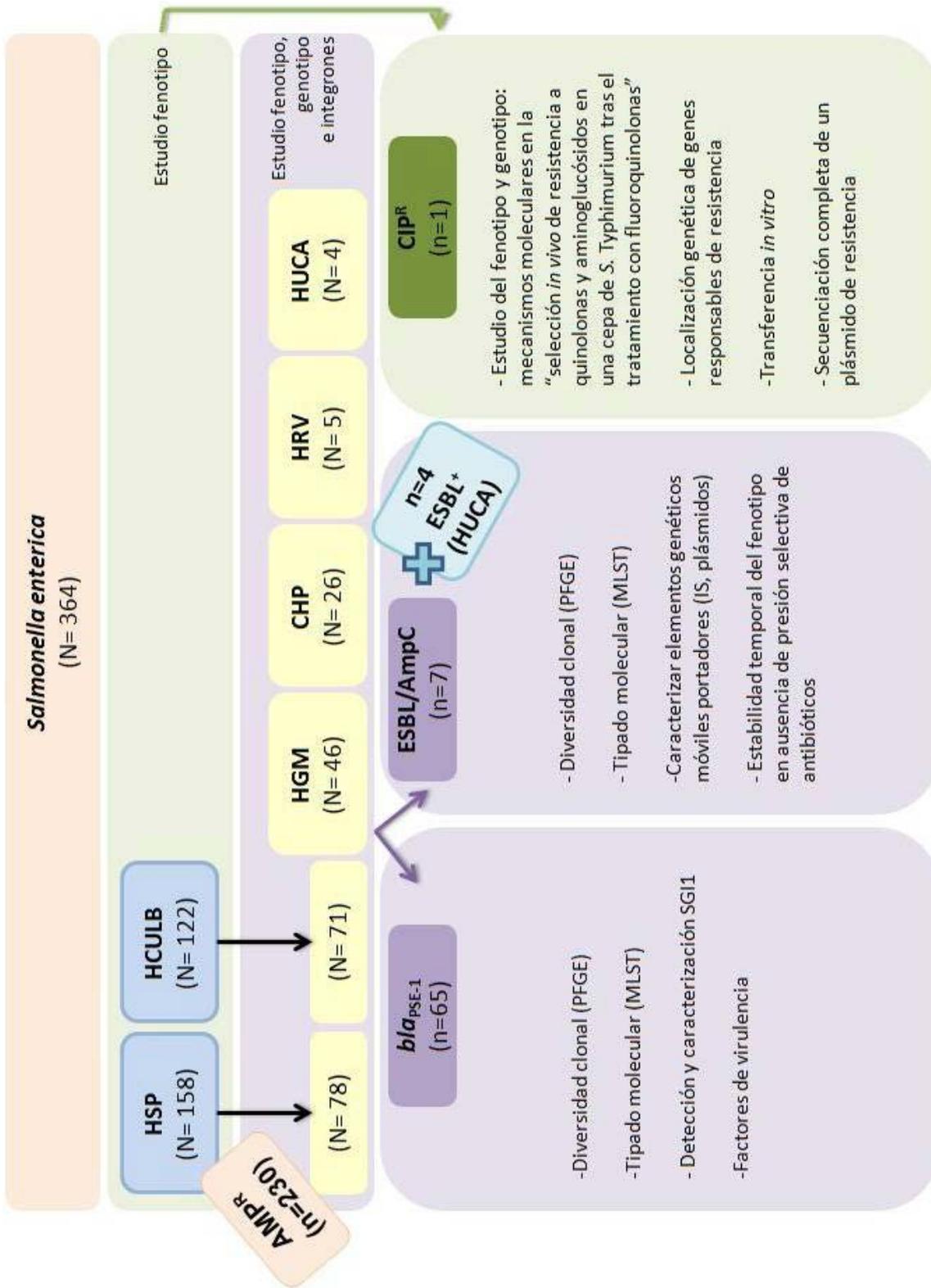


Figura 57.- Representación lineal del plásmido pMdT1, en la que se detalla la región del gen de resistencia *aac(6')*-Ib-cr4.

## Resumen gráfico:





# **Discusión**

*“Un científico debe tomarse La libertad de plantear cualquier cuestión, de  
dudar de cualquier afirmación, de corregir errores”*

*Julius Robert Oppenheimer*



## **DISCUSIÓN**

Las infecciones gastrointestinales constituyen un gran problema de salud pública mundial y entre los microorganismos implicados, *Salmonella* es uno de los patógenos zoonóticos más frecuentes en toxiinfecciones alimentarias en humanos (ISCIII, 2011). Los serotipos de *S. enterica*, Enteritidis y Typhimurium, son los más prevalentes en el ámbito clínico, representando más del 80% del total de aislados obtenidos (ISCIII, 2011; Hendriksen *et al.*, 2011). Estas salmonelosis no tifoideas cursan como una gastroenteritis autolimitada de manera que el tratamiento antibiótico solo es requerido en casos graves, en pacientes inmunodeprimidos, con factores de riesgo o en edades extremas de la vida. Sin embargo, desde hace varias décadas asistimos a un grave problema de índole mundial, tanto en medicina humana como en veterinaria, debido al alarmante incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos. La presión selectiva ejercida por factores externos, como el mal uso e incluso abuso de los antibióticos en medicina humana, veterinaria o agricultura, junto a los diversos mecanismos de resistencia y transferencia genética que poseen las bacterias, contribuyen considerablemente a esta situación. En el caso de las especies de *Salmonella* no tifoidea, en los años 1980s, eran organismos mayoritariamente “sensibles”, en los 1990s comenzó a observarse un incremento en la resistencia a ampicilina, cloranfenicol, y cotrimoxazol; y en los últimos años se está detectando una emergencia de aislados clínicos resistentes a cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas, lo que supone graves limitaciones terapéuticas.

Este problema es un importante motivo de preocupación en salud pública y son muchos los esfuerzos que deben hacerse para controlar y lograr una contención de dicha resistencia y diseminación. Por ello, el desarrollo de esta tesis ha aportado resultados importantes en la vigilancia de la resistencia a antibióticos en el género *Salmonella* en distintos hospitales españoles, i) ha permitido evaluar la prevalencia de aislados de *Salmonella* portadores de mecanismos emergentes de resistencia a ampicilina y amoxicilina-ácido clavulánico; cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas (BLEEs, cefalosporinasas plasmídicas o PMQR); ii) ha permitido determinar los elementos genéticos implicados en su transferencia o su mantenimiento en el genoma bacteriano; y iii) ha aportado resultados de virulencia y de las posibles diseminaciones clonales entre aislados seleccionados.

El **primer objetivo** abordado en esta tesis fue el análisis del **fenotipo de resistencia a antibióticos en cepas de *S. enterica* de dos hospitales españoles (HSP y HCULB)**. El análisis de

los 280 aislados obtenidos mostró que en 278 de los casos se trataba de *S. enterica* subespecie *enterica* (subesp. I), mientras que dos aislados correspondían a *S. enterica* subesp. *arizonae* (subesp. IIIa). Cuando se comparan los datos de serotipo proporcionados por los hospitales de origen se observa que los serotipos mayoritarios son *S. Typhimurium* (146 aislados, 52,1%) y *S. Enteritidis* (93 aislados, 33,2%). Estudios recientes (ECDC, 2012b; Hendriksen *et al.*, 2011) apoyan que éstos son los dos serotipos más frecuentemente encontrados en casos de salmonelosis en humanos en Europa, siendo la prevalencia de *S. Enteritidis* mayor que la de *S. Typhimurium* (45% frente 22%, respectivamente). Sin embargo, los últimos informes nacionales muestran datos similares en la frecuencia de ambos serotipos, en torno a un 25% de los totales aislados (ISCIII, 2011). Todos los trabajos anteriormente mencionados (ECDC, 2012; Hendriksen *et al.*, 2011; ISCIII, 2009; ISCIII, 2011) describen una tendencia en la disminución de casos totales de salmonelosis, apuntando a que la causa más probable es la efectividad en las medidas de minimización de la prevalencia de *Salmonella* spp. en las explotaciones avícolas, llevadas a cabo por los países miembros de la Unión Europea durante los últimos años. Dado que la infección por *S. Enteritidis* suele estar asociada al consumo de ovo-productos, parece lógico pensar que la disminución provocada por estas medidas de control afecte directamente al serotipo *Enteritidis*; permaneciendo el serotipo *Typhimurium*, asociado al consumo de productos cárnicos no avícolas, invariante durante este tiempo. Sin embargo, los datos aportados por organismos de América del Norte indican una situación contraria a la que se observa en los países de la UE, con un fuerte incremento del serotipo *Enteritidis* asociado a consumo de ovo-productos (Chai *et al.*, 2012). El resto de aislados estudiados en esta tesis pertenecían a serotipos variados, pero minoritarios tanto en nuestro trabajo como en los referenciados.

El estudio del fenotipo de resistencia mostró altos porcentajes de resistencia a sulfamidas (68%), ampicilina (53%), tetraciclina (49%) y estreptomina (37%) entre los aislados procedentes de los dos hospitales. Hay que destacar que la resistencia a estos antibióticos fue mayoritariamente detectada en el serotipo *S. Typhimurium*, donde por ejemplo el 81,5% de los aislados analizados presentaron resistencia a ampicilina, frente al 21,5% de los aislados de *S. Enteritidis*. Estos datos están en consonancia con los estudios europeos que subrayan altos porcentajes de resistencia para estos antibióticos. Sin embargo, aquellos utilizados en medicina humana, como son las cefalosporinas de tercera generación y ciprofloxacina, se mantienen en bajos niveles en el caso de aislamientos clínicos (rango 1-7%), como en nuestros aislados (0,4%), pero emergen en aislados de algunos tipos de animales, como es el caso de aves o cerdos (ECDC, 2012a; Meakins *et al.*, 2008; Soler *et al.*, 2006).

El 51,4% de los aislados estudiados presentaron fenotipo de multirresistencia (resistencia a tres o más familias de antibióticos), destacando que el 88% de los mismos correspondían al serotipo *S. Typhimurium*. Los fenotipos de multirresistencia más comúnmente encontrados fueron los que relacionaron los antibióticos anteriormente mencionados: AMP-STR-TET-SUL (12%) y AMP-STR-TET-CHL-SUL (11%). Por otra parte, hay que destacar que, al igual que en trabajos previos ((ECDC, 2012a; Meakins *et al.*, 2008; Soler *et al.*, 2006), el serotipo Enteritidis no presentó resistencia a un gran número de antibióticos, siendo multirresistentes únicamente el 6% de los mismos, aunque la resistencia a ácido nalidíxico, se manifestó preferentemente en este serotipo (*S. Enteritidis*, 54 aislados; *S. Typhimurium*, 22 aislados; otros serotipos, 7 aislados).

Tras el estudio de los 280 aislados procedentes de estos dos hospitales españoles se seleccionaron aquellos aislados que presentaban **resistencia a ampicilina** (AMP<sup>R</sup>, 129 aislados), que se unieron a 74 aislados AMP<sup>R</sup> procedentes de otros 4 hospitales españoles. Pudimos observar que el 80% de los aislados AMP<sup>R</sup> correspondían al serotipo *Typhimurium*, mientras que *Enteritidis* solo fue detectado en el 10% de éstos. Asimismo, la resistencia a ampicilina se encontró estrechamente relacionada con la resistencia a sulfamidas (92%), tetraciclina (93%) y estreptomicina (72%); y en menor medida con cloranfenicol (52%). Se observó sensibilidad disminuida a amoxicilina-ácido clavulánico en el 60% de estos aislados AMP<sup>R</sup>.

Cuando analizamos la presencia de genes codificantes de beta-lactamasas encontradas, pudimos distinguir dos grupos: aquellos aislados AMP<sup>R</sup> sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico (AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>S</sup>, 79 aislados) que albergaban la mayor parte de los aislados *bla*<sub>TEM-1</sub>-positivos (86% de los aislados AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>S</sup> uno o varios genes codificantes de este tipo de beta-lactamasa) y los aislados AMP<sup>R</sup> resistentes o con sensibilidad disminuida a amoxicilina-ácido clavulánico (AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>I/R</sup>, 124 aislados) que portaban principalmente los genes *bla*<sub>PSE-1</sub> (49%) y *bla*<sub>OXA-1</sub> (31%). La producción de la beta-lactamasa TEM-1 no es suficiente para provocar un fenotipo AMC<sup>I/R</sup> (Güerri *et al.*, 2004; Llanes *et al.*, 1999; Poirel *et al.*, 1999), de hecho en *E. coli* dicho fenotipo se ha relacionado con la producción de beta-lactamasas de tipo TEM resistentes a los inhibidores (IRT), hiperproducción de la beta-lactamasa TEM-1, producción de enzimas complejas mutantes TEM (complex-mutant TEM, CMT), entre otras causas (Martín *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2012; Therrien & Levesque, 2000; Waltner-Toews *et al.*, 2011). En 19 de nuestros aislados AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>I/R</sup>, TEM-1 fue la única beta-lactamasa detectada, no encontrándose ninguna de tipo IRT ni CMT tras el análisis de las

secuencias, por lo que se precisan futuros estudios de otros mecanismos que pudieran justificar dicho fenotipo en esos aislados.

La detección simultánea de más de un gen codificante de beta-lactamasas fue relativamente infrecuente (en 12 aislados, nueve de los cuales presentaron sensibilidad disminuida a amoxicilina-ácido clavulánico), comparada con estudios previos realizados en *S. enterica* (Biendo *et al.*, 2005; Güerri *et al.*, 2004).

El fenotipo de pentarresistencia AMP-CHL-STR-SUL-TET (ACSSuT) fue detectado en 78 de los 203 aislados AMP<sup>R</sup> (38%), todos ellos Typhimurium, y alguno de los cuales fue adicionalmente resistente a ácido nalidíxico, amoxicilina-ácido clavulánico, kanamicina, gentamicina, tobramicina o trimetoprim.

El fenotipo ACSSuT se asoció a tres perfiles genotípicos generales:

(i) La asociación entre los genes *bla*<sub>TEM-1b</sub>, *cmlA1/catA*, *aadA/strA-strB*, *sul*, y *tet(A)/tet(B)* que se detectó en 8 aislados *S. Typhimurium*.

Este genotipo ha sido previamente descrito en aislados de *S. Typhimurium*, donde los genes *bla*<sub>TEM</sub> y *tet(A)* se han encontrado en los transposones Tn3 y Tn1721, a su vez asociados a plásmidos de grupos IncI1 o IncHI1 (Hradecka *et al.*, 2008). Por otra parte, la combinación de genes *bla*<sub>TEM-1-strA-strB-sul2-tet(A/B)</sub> ha sido previamente referida formando parte de dos regiones de resistencia adyacentes, de 8671 y 14587 pb, respectivamente, localizados en el cromosoma de cepas de *S. Typhimurium* variante monofásica (Hauser *et al.*, 2010; Hopkins *et al.*, 2010; Lucarelli *et al.*, 2010; Lucarelli *et al.*, 2012).

En nuestro estudio destaca además que 5 de los 8 aislados presentaban co-resistencia a trimetoprim asociada a la presencia de los genes *dfrA1*, *dfrA7* o *dfrA12*. Así, esta asociación genética de hexarresistencia (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *cmlA1/catA*, *aadA1-strAB*, *sul* y *dfrA1/dfrA7/dfrA12*) se ha descrito en nuestro estudio y en una gran variabilidad de combinaciones formando parte de plásmidos de virulencia-resistencia tanto de *S. Typhimurium* como *S. Enteritidis* diseminados en distintas localizaciones geográficas, como África Sub-Sahariana, España o Reino Unido (Herrero *et al.*, 2008a; Kingsley *et al.*, 2009; Rodicio *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2012; Villa & Carattoli, 2005).

(ii) El perfil genético de *bla*<sub>OXA-1</sub> y *aadA1* (localizados como casetes genéticos en un integrón de clase 1), *catA*, *sul*, y *tet(B)* observado en 14 aislados.

Esta asociación fenotipo-genotipo se ha descrito en estudios previos (Antunes *et al.*, 2004; Güerri *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2012; Lindstedt *et al.*, 2003; Pérez-Moreno *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2008; Weill *et al.*, 2006), algunos de los cuáles enfatizan la cotransferencia del gen *bla*<sub>OXA-1</sub> junto con el resto de genes de resistencia movilizados gracias a plásmidos encontrados en aislados de *S. Typhimurium*, tanto de origen humano, como de animales destinados al consumo (Antunes *et al.*, 2004; Lindstedt *et al.*, 2003). Algunos de estos plásmidos han sido descritos en la literatura como plásmidos híbridos virulencia-resistencia. Estos plásmidos derivan del plásmido pSLT de virulencia de *S. Typhimurium*, mediante la adquisición de un fragmento de DNA de aproximadamente 48 kb que alberga la isla de resistencia donde se encuentran los genes *bla*<sub>OXA-1</sub>, *catA1*, *aadA1*, *sul1* y *tet(B)*. Tanto estos plásmidos, como variantes de los mismos, han sido detectados por primera vez en nuestro país y posteriormente en otros países europeos (Herrero *et al.*, 2008a; Herrero *et al.*, 2008b; Herrero *et al.*, 2009; Mendoza *et al.*, 2009; Rodicio *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2008).

(iii) En 65 aislados de *S. Typhimurium* (fagotipo DT104 o relacionados) se observó la asociación de los genes *bla*<sub>PSE-1</sub> y *aadA2*, localizados dentro de dos integrones de clase 1, y los genes *floR*, *sul* y *tet(G)*, que a su vez se detectaron en la estructura genética característica de la **Isla Genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1)**.

El fenotipo de ACSSuT suele asociarse a la presencia de la **SGI1** (Mulvey *et al.*, 2006; Targant *et al.*, 2010b) en las cepas del serotipo Typhimurium, fagotipo DT104 o asociados, aunque también se ha descrito en otros serotipos (Beutlich *et al.*, 2011; Kiss *et al.*, 2012). Se han publicado diversas variantes de esta isla genómica, relacionadas con la presencia de genes de resistencia alternativos a los asociados con el fenotipo de pentaresistencia (Beutlich *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2012; Kiss *et al.*, 2012; Levings *et al.*, 2007; Mulvey *et al.*, 2006; Targant *et al.*, 2010a; Vo *et al.*, 2010); sin embargo, entre nuestros aislados la única variación que observamos respecto a la estructura de SGI1 típica fue una delección en la región *orf5-orf6-IS6100* en uno de los aislados estudiados. Esta región no codificante de resistencias, posee intacta la secuencia de inserción *IS6100*, descrita como un lugar de potencial recombinación dentro de la estructura SGI1 y responsable de mediar transposiciones intramoleculares para dar lugar a nuevas variantes (Boyd *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2012; Levings *et al.*, 2007; Targant *et al.*, 2010a).

Analizando la **relación clonal de estos 65 aislados portadores de la beta-lactamasa *bla*<sub>PSE-1</sub>** se observó, que a pesar de tratarse de aislados de *S. Typhimurium* procedentes de cuatro hospitales españoles geográficamente distantes, la relación clonal entre ellos era muy

estrecha. Hay estudios que aseguran un alto nivel de recombinación y por tanto una baja clonalidad entre subespecies de *Salmonella*, incluso dentro del propio serotipo Typhimurium, basándose en las secuencias tipo (ST) recogidas en la base de datos de MLST y en el gran número de fagotipos que han sido descritos (Lan *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios más recientes (Achtman *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 2011; Litrup *et al.*, 2010) indican que tanto las técnicas utilizadas en la determinación de brotes epidémicos (PFGE o MLVA), como en especial la técnica MLST, pueden ser útiles para agrupar los aislados acorde a su serotipo y estudiar su relación. Pese a que el método de PFGE es considerado el método de elección para el tipado de brotes de *Salmonella*, el hecho de que los aislados pertenecientes al mismo serotipo se agrupen en perfiles electroforéticos similares ha sido previamente descrito en algunos trabajos (Cooke *et al.*, 2008; Rivoal *et al.*, 2009; Torpdahl *et al.*, 2005). En el caso de nuestro estudio, los 65 aislados no sólo pertenecieron a la secuencia tipo mayoritaria dentro del serotipo Typhimurium, ST19 (complejo clonal CC1) y presentaron perfiles de PFGE estrechamente relacionados, tras la digestión con dos enzimas distintas, sino que además se agruparon únicamente en tres virulotipos al estudiar los factores de virulencia que portaban.

Estudios llevados a cabo con muestras de origen animal y humano, procedentes de distintas localizaciones europeas, y representativos de los cinco serotipos mayoritarios implicados en salmonelosis humanas (Huehn *et al.*, 2010) demostraron que la mayoría de los perfiles de virulencia obtenidos son característicos de cada serotipo, siendo el serotipo Typhimurium el que contenía mayores variaciones. En nuestro caso, tres virulotipos fueron encontrados para este serotipo, frente a los seis perfiles descritos previamente, tomando como referencia la presencia/ausencia de los diez genes de virulencia característicos (Huehn *et al.*, 2010). El virulotipo mayoritario encontrado en las cepas de esta tesis (A, 90%), correspondía con el virulotipo mayoritario encontrado en otros estudios (Beutlich *et al.*, 2011; Huehn *et al.*, 2010); mientras que los virulotipos B (9% en nuestro estudio) y C (2%) fueron encontrados también en menor medida en todos los trabajos.

Las variaciones encontradas dentro del mismo serotipo se relacionan con aquellos genes de virulencia codificados por profagos, fimbrias o contenidos en el plásmido de virulencia y que pueden contribuir a la adaptación de *Salmonella* a distintos nichos ecológicos. Ejemplos de este tipo de genes son *gipA* y *sodC1*, codificados en profagos; *bcfC*, codificante de fimbrias; o *spvC*, *rck* y el operón *pef(A-D)*, característicos de los plásmidos de virulencia. Ninguno de nuestros aislados presentó el gen *gipA*, en contraste con lo encontrado en otros estudios, donde este gen de virulencia estuvo presente en el 43% de los aislados de *S.*

Typhimurium analizados (Huehn *et al.*, 2010). Sin embargo, en el trabajo de Litrup *et al.*, 2010 tampoco detectan *gipA* debido a que dicho gen estaba truncado. Acorde con este estudio, todos nuestros aislados fueron portadores de los genes *sodC1* y *bcfC*. El 90% de nuestros aislados portaron el plásmido de virulencia, mientras que en estudios europeos se detectó en menor proporción (Huehn *et al.*, 2010; Wannaprasat *et al.*, 2011). El gen *sopE1*, codificante de una proteína efectora, ha sido descrito anteriormente en serotipos altamente adaptados al hospedador, tales como *S. Typhi*, y en algunos casos en *S. enterica* subesp. I, pero es menos frecuente en *S. Typhimurium* (4.5%)(Ehrbar & Hardt, 2005; Huehn *et al.*, 2010; Litrup *et al.*, 2010; Miold *et al.*, 2001; Prager *et al.*, 2000; Streckel *et al.*, 2004). En nuestro estudio tan solo fue encontrado en un aislado (2%).

En contraste con todos estos genes de enorme variabilidad, aquellos localizados en islotes cromosómicos, tales como los genes reguladores *phoP/Q* o *slyA* o aquellos codificantes de proteínas efectoras como *sopE2*; así como las islas de patogenicidad (SPIs 1-5), involucradas en la invasión celular y la interacción entre *Salmonella* y la célula hospedadora, se encontraban bastante conservados (Bugarel *et al.*, 2011; Huehn *et al.*, 2010; Litrup *et al.*, 2010; Wannaprasat *et al.*, 2011).

Nuestros resultados indican que aquellas cepas de *S. Typhimurium* positivas para el clúster de resistencia SGI1 portan además varios determinantes de virulencia codificados tanto en islas de patogenicidad, profagos o plásmido de virulencia. Aunque la relación entre los determinantes de resistencia y virulencia no está perfectamente elucidada, hay estudios que apuestan por la co-existencia de resistencia y virulencia (Beceiro *et al.*, 2012), mientras que otros trabajos, llevados a cabo con cepas de *S. Typhimurium* altamente resistentes a fluoroquinolonas, han mostrado que esta alta resistencia es concurrente con la pérdida o represión de factores de virulencia (Fábrega *et al.*, 2009). Lo que sí parece más preocupante es la incorporación de determinantes de resistencia en plásmidos de virulencia, presentes solo en algunos serotipos de *Salmonella*, o la incorporación de determinantes de virulencia en plásmidos de resistencia. Sin embargo, la presencia de genes de virulencia por sí mismos no garantiza la patogenicidad de una cepa (Fluit, 2005; Rychlik *et al.*, 2006).

En esta tesis se determinó la presencia de integrones entre los aislados AMP<sup>R</sup>, encontrándose integrones de clase 1 en un 58,6% de los 203 aislados, mientras que no se detectaron integrones de clase 2 ó 3. Pese a la variabilidad de organizaciones genéticas detectadas (12 estructuras distintas), 65 *S. Typhimurium* de nuestros aislados presentaron dos integrones de clase 1, con regiones variables de 1000 y 1200 pb, que albergaron los genes

*aadA1* y *bla*<sub>PSE-1</sub>, respectivamente, característicos de la SGI1, como previamente se ha discutido. Todos estos resultados están en consonancia con los encontrados en diversos estudios de prevalencia de beta-lactamasas e integrones en cepas de *S. enterica* de origen tanto humano como animal (Benacer *et al.*, 2010; Biendo *et al.*, 2005; Güerri *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2012; Miko *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008; Weill *et al.*, 2006).

El gen *bla*<sub>OXA-1</sub> detectado en 40 aislados AMP<sup>R</sup> se localizó en forma de casete génico en las estructuras *intI1-bla*<sub>OXA-1</sub>-*aadA1-qacEΔ1-sul1* y *intI1-aac(6′)-Ib-cr-bla*<sub>OXA-1</sub>-*catB3-arr3-qacEΔ1-sul1*. El promotor responsable de la expresión de la estructura *bla*<sub>OXA-1</sub>-*aadA1* fue de tipo PcW con el P2 funcional, resultado en concordancia con estudios previos (Boyle *et al.*, 2011; Lindstedt *et al.*, 2003; Tosini *et al.*, 1998; Vinué *et al.*, 2011).

El integrón, denominado In37, que contenía los genes *aac(6′)-Ib-cr-bla*<sub>OXA-1</sub>-*catB3-arr3* en su región variable de 3300 pb, había sido previamente descrito en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* (Pérez-Moreno *et al.*, 2011; Pérez-Moreno *et al.*, 2012; Quiroga *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2012a). Este integrón se suele encontrar como un integrón complejo que contiene el elemento ISCR1, duplicidad de la región 3′-conservada y genes *qnr*. Nuestro estudio representa la primera evidencia de este integrón en una cepa de *S. enterica* serotipo Thompson, en la que además no se encontraron los elementos mencionados anteriormente en su entorno más próximo. Los integrones In37 registrados en GenBank con números AJ971343 y AY259086 presentan promotores de los casetes génicos de tipo híbrido 1, PcH1 (TGGACA-N<sub>14</sub>-TCGTAAACT) con el promotor P2 inactivo; mientras que en nuestro caso, y al igual que el integrón descrito en GenBank con número GU906294, se encontró el promotor PcW con dos mutaciones nucleotídicas que lo transformaban en su variante PcW<sub>TGN-10</sub> (TGGACA-N<sub>14</sub>-TGGTAAGCT) con mayor fortaleza de expresión que PcW.

Los genes codificantes de la beta-lactamasa TEM-1, que fue la más frecuentemente detectada entre los aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> en nuestro estudio, no se encontró en ningún caso formando parte de la región variable de integrones de clase 1. Sin embargo, entre nuestros aislados *bla*<sub>TEM-1</sub> positivos resistentes a trimetoprim, destacó la presencia de elementos portadores de genes dihidrofolato reductasa (*dfrA*) en 16 aislados. Entre ellos, se encontraron tres aislados que contenían el gen *dfrA14* truncando el gen de resistencia a estreptomicina *strA*, provocando un fenotipo de sensibilidad a este antibiótico. Esta estructura ha sido anteriormente descrita en aislados de *E. coli* de diversos orígenes (Anantham & Hall, 2012; Partridge *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011; Vinué *et al.*, 2010). Siete aislados presentaron el gen de resistencia *dfrA1*, en dos tipos distintos de integrones de clase

1. Varios son los artículos que indican que los integrones portadores de la región variable *dfrA1-aadA1* son bastante frecuentes entre los géneros *E. coli* y *S. enterica* (Hsu *et al.*, 2012; Krauland *et al.*, 2009; Miko *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2011; Soufi *et al.*, 2012), mientras que en nuestro caso también encontramos en cuatro aislados el gen *dfrA1* en un integrón (*intI1-dfrA1*) deficiente en su región 3'-conservada.

Se detectaron diversas estructuras de integrón de clase 1 portadores del gen *dfrA12* entre nuestros aislados AMP<sup>R</sup>. La estructura *intI1-dfrA12-gcuF-aadA2-qacEΔ1-sul1* se encontró en 4 aislados; y las estructuras no-clásicas relacionadas con los genes de resistencia *cmlA1* y *sul3* en otros 4 aislados. Estas organizaciones se han descrito previamente en cepas de *S. enterica* y *E. coli* de origen humano, animal y medioambiental (Antunes *et al.*, 2005; Sáenz *et al.*, 2010). Las estructuras *estX-psp-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-IS440-sul3-orf1-mef(B)Δ-IS26* y *qacH-IS440-sul3-orf1-mef(B)Δ-IS26* en diversas combinaciones, previamente descritas (Antunes *et al.*, 2007; Soufi *et al.*, 2011; Sáenz *et al.*, 2010; Vinué *et al.*, 2010), se detectaron en nuestro estudio en siete aislados, todos ellos pertenecientes al serotipo Typhimurium.

La presencia de **beta-lactamasas de tipo BLEE o AmpC** ha sido ampliamente descrita en enterobacterias tales como *E. coli* o *Klebsiella* (Cantón *et al.*, 2012; Coque *et al.*, 2008a). Sin embargo, la prevalencia de este tipo de beta-lactamasas es muy baja en *Salmonella*, con porcentajes de aproximadamente 0.2-7% (ECDC, 2012a; Meakins *et al.*, 2008; Pardos de la Gándara *et al.*, 2011), pero que compromete la eficacia del tratamiento con cefalosporinas de tercera generación en aquellos casos que lo requieren. A lo largo de esta tesis se analizaron 11 aislados clínicos caracterizados por mostrar un fenotipo BLEE (8 aislados) o con fenotipo AmpC (2 aislados), asociados a la presencia de los siguientes genes codificantes de beta-lactamasas: *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (serotipo Virchow, 2 aislados), *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (Virchow, 2), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (Enteritidis, 1), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Gnesta and *S. enterica* group C, 2), *bla*<sub>SHV-2</sub> (Livingstone, 1), *bla*<sub>SHV-12</sub> (Enteritidis, 1) y *bla*<sub>CMY-2</sub> (Bredeney, 2). Es importante destacar la diversidad de familias de beta-lactamasas que hemos observado, incluso dentro del mismo serotipo, y a pesar del bajo número de aislados estudiados; aunque hay otros trabajos españoles que también observaron esta variabilidad (González-Sanz *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009). Por otra parte, algunos autores apuntan a los serotipos Typhimurium y Enteritidis como los más comunes asociados a la presencia de BLEEs en infecciones en humanos (Arlet *et al.*, 2006), sin embargo tanto en nuestro estudio como en otros, se evidencia una variedad de serotipos de *S. enterica* implicados en la resistencia a beta-lactámicos que incluye también a los serotipos como Virchow, Bredeney, Livingstone o Gnesta, entre otros (Carattoli, 2009; González-Sanz *et al.*,

2009; Herrera-León *et al.*, 2010; Hopkins *et al.*, 2006; Pardos de la Gándara *et al.*, 2011; Riaño *et al.*, 2009).

La familia de beta-lactamasas más diseminada entre aislados de *S. enterica* tanto de origen humano como animal es la familia CTX-M (Arlet *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2012; Coque *et al.*, 2008a; González-Sanz *et al.*, 2009; Pardos de la Gándara *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2009), que en nuestro estudio estuvo representada por las beta-lactamasas CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14 y CTX-M-15, detectadas en siete de las nueve cepas productoras de BLEEs analizadas.

Aunque recientemente se ha observado la beta-lactamasa CTX-M-9 por primera vez en el serotipo Bovismorbificans (Antunes *et al.*, 2012); frecuentemente se describe asociada al serotipo Virchow fagotipo 19 (García *et al.*, 2007; González-Sanz *et al.*, 2009; Herrera-León *et al.*, 2010; Riaño *et al.*, 2009; Weill *et al.*, 2004). El estudio llevado a cabo por Herrera-León *et al.* (2010) pone de manifiesto que en España existe una dispersión clonal de cepas de *S. Virchow* PT19 portadoras de las beta-lactamasas CTX-M-9 y TEM-1, muy similares por PFGE y que muestran un fenotipo de multirresistencia. La localización del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> en su entorno de integrón complejo In60 en plásmidos conjugativos de alto peso molecular (250-350 kb) de tipo IncHI2 en *Salmonella* apoyan esa dispersión (García *et al.*, 2007; Herrera-León *et al.*, 2010; Novais *et al.*, 2006). Entre los resultados obtenidos en esta tesis, se confirma la presencia de dos aislados de *S. Virchow* multirresistentes, clonalmente relacionados, portadores de CTX-M-9 y TEM-1 y en los que el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> se localizó dentro de la estructura del integrón In60 en plásmidos grandes (335 y 370 kb), que sin embargo no pudieron ser tipificados por la técnica utilizada.

La beta-lactamasa CTX-M-10, cuya primera descripción fue en España en 2001, se ha encontrado en el área mediterránea en aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* y *S. enterica* serotipo Virchow (Cantón *et al.*, 2012; Cartelle *et al.*, 2006; Coque *et al.*, 2002; González-Sanz *et al.*, 2009; Leavitt *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2001). El entorno genético descrito para *bla*<sub>CTX-M-10</sub> comprende 12 kb donde se encuentran tres transposasas, un gen codificante de una DNA invertasa y varios genes *orf* cuya homología radica en un origen de fagos (Oliver *et al.*, 2005). En nuestros dos aislados *bla*<sub>CTX-M-10</sub><sup>+</sup> positivos, procedentes de hospitales geográficamente distantes, ambos con el serotipo Virchow e indistinguibles por las técnicas de tipificación PFGE y MLST, se encontró el entorno relacionado con fagos pero en dos variantes incompletas. Aunque existe poca información sobre la implicación de fagos en la diseminación de genes de resistencia, estudios recientes demuestran su alta prevalencia e

importante implicación en la transferencia de estos genes, incluso BLEEs, en distintos nichos ecológicos (Colomer-Lluch *et al.*, 2011; Muniesa *et al.*, 2004).

Las enzimas CTX-M-14 y CTX-M-15, destacan entre las más diseminadas entre enterobacterias tanto en humanos como en animales (Cantón *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2010). El gen de resistencia *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> fue identificado en uno de nuestros aislados de *S. Enteritidis*; mientras que la combinación de genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> – *bla*<sub>TEM-1</sub> se encontró en dos aislados de *S. enterica*, uno de ellos perteneciente al serotipo Gnesta y el otro perteneciente al serogrupo C. Tal y como ha sido descrito en estudios previos (Eckert *et al.*, 2006; Vinué *et al.*, 2008), el entorno genético detectado en nuestros aislados comprende un elemento *ISEcp1* aguas arriba de los genes *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Esta secuencia de inserción está frecuentemente asociada a los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, porta las regiones promotoras -35 y -10 y media la expresión y la movilización de este tipo de genes. Por otra parte, aguas abajo del gen *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> se encuentra la secuencia de inserción *IS903*; mientras que para el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se ha encontrado el gen *orf477* (Eckert *et al.*, 2006).

Relativo a los plásmidos portadores de estos genes *bla*<sub>CTX-M-14</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, cabe destacar que aunque el gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se ha detectado en una gran variedad de plásmidos, algunos pertenecientes a los grupos IncK, IncFII o IncI1 en distintos serotipos de *Salmonella* (Carattoli, 2009; González-Sanz *et al.*, 2009; Hopkins *et al.*, 2006), en esta tesis se describe por primera vez la localización del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> en un plásmido de tipo IncI1-ST80, de 95 kb y que fue transferido por conjugación de la cepa dadora *S. Enteritidis* a la receptora *E. coli* CSH26.

La combinación de genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> – *bla*<sub>TEM-1</sub> había sido previamente relacionada con la coexistencia de la estructura *ISEcp1*- *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y el transposón Tn3 portador del gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, en plásmidos especialmente de tipo IncFII (Carattoli, 2009; Coque *et al.*, 2008b). Sin embargo, en esta tesis se encontraron los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>TEM-1</sub> en un aislado de *S. enterica* grupo C y otro aislado de *S. Gnesta* localizados en plásmidos IncA/C [420 kb] y IncI1-ST68 (CC31)[85 kb], respectivamente. Hay que destacar que plásmidos de tipo IncI1-ST68 (CC31) con tamaños entre 75 y 90 kb portadores de este gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fueron detectados por primera vez en cepas de *E. coli* procedentes de ganado en Francia (Madec *et al.*, 2012). En uno de nuestros aislados se observó que además de la localización plasmídica, el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se encontró en cromosoma. Esta capacidad de integrarse en cromosoma, sugiere una posible integración plasmídica o evento de transposición en el cromosoma mediado por la secuencia de inserción *ISEcp1*, localizada aguas arriba del gen de resistencia, lo que puede contribuir a la persistencia de esta beta-lactamasa (Coque *et al.*, 2008b; Fabre *et al.*, 2009).

Los genes codificantes de las beta-lactamasas de tipo SHV han sido localizados en plásmidos en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* o *S. marcescens*, así como en algunos serotipos de *S. enterica* (Arlet *et al.*, 2006; Carattoli, 2009; Chiaretto *et al.*, 2008; González-Sanz *et al.*, 2009). En nuestro estudio encontramos dos aislados de *S. Livingstone* y *S. Enteritidis* portadores de las beta-lactamasas SHV-2 y SHV-12, respectivamente. El gen *bla*<sub>SHV-2</sub> se observó en un plásmido conjugativo de 115 kb perteneciente al grupo IncI1-ST27 (CC26), y en la literatura se ha descrito asociado con plásmidos grandes (125-155 kb) pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncFIB, IncY, IncK e IncI1 (Dierikx *et al.*, 2010; González-Sanz *et al.*, 2009). Por otra parte, el gen *bla*<sub>SHV-12</sub> ha sido encontrado en un rango mayor de tamaño de plásmido (40-110 kb) y asociado a una amplia diversidad de grupos de incompatibilidad (Carattoli, 2009; González-Sanz *et al.*, 2009), mientras que en nuestro caso resulta de interés destacar, que este gen se detectó en un plásmido no conjugativo de tan solo 10 kb, que pertenecía al grupo de incompatibilidad IncI1. El tipo de IncI1 no pudo ser determinado puesto que tan solo amplificaba el gen *repl*, y carecía de los genes codificantes de los sistemas toxina antitoxina (*pndAC*), así como aquellos relacionados con la DNA primasa, sistemas de restricción-modificación y funciones implicadas en la transferencia plasmídica, característicos de los plásmidos IncI1 (Johnson *et al.*, 2011).

Dos de nuestros aislados pertenecientes al serotipo Bredeney ST306 y que mostraron altos valores de CMI para cefoxitina y ceftazidima, albergaron el gen *bla*<sub>CMY-2</sub>, codificante de una beta-lactamasa de tipo AmpC. Este gen, incluido en el entorno *ISEcp1-bla*<sub>CMY-2</sub>-*blc-sugE*, es el más diseminado entre aislados de *S. enterica*, detectándose en más de 32 serotipos distintos de *S. enterica*, tales como Agona, Ajiobo, Anatum, Heidelberg, Newport o Typhimurium (Arlet *et al.*, 2006; Folster *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2009). El serotipo Bredeney ha sido relacionado con esta enzima, tanto en aislados clínicos en nuestro país (González-Sanz *et al.*, 2009), como en aislados animales en Reino Unido (Arlet *et al.*, 2006; Hopkins *et al.*, 2006; Liébana *et al.*, 2004). Los plásmidos IncA/C han sido tradicionalmente relacionados con la diseminación de *bla*<sub>CMY-2</sub> (Call *et al.*, 2010; Carattoli, 2009; Folster *et al.*, 2011; Hopkins *et al.*, 2006), sin embargo en nuestro caso, ambos aislados mostraron un plásmido conjugativo de 85 kb perteneciente al grupo de incompatibilidad IncI1. Uno de ellos fue subtipado como ST18 y el otro como ST2-CC2. Los plásmidos de tipo IncI1-ST2 portadores de *bla*<sub>CMY-2</sub> han sido previamente descritos tanto en *E. coli* como en *S. enterica* de diversos orígenes (Folster *et al.*, 2011; García-Fernández *et al.*, 2008; González-Sanz *et al.*, 2009; Mataseje *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009); mientras que los plásmidos de tipo IncI1-ST18 tan solo han sido encontrados en aislados de *E. coli* (Mataseje *et al.*, 2010). Por tanto, en esta

tesis se describe por primera vez la localización del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> en un plásmido conjugativo de tipo IncI1-ST18 en un aislado de *S. Bredeney*.

La adquisición de un fenotipo de resistencia, no solo debido a mutaciones en las dianas sino también a mecanismos de transmisión horizontal, lleva implicado un coste biológico para la bacteria (Andersson & Hughes, 2010; Dahlberg & Chao, 2003). Se han realizado numerosos estudios tanto a nivel individual como comunitario para comprobar la reversibilidad de la resistencia en ausencia de presión antibiótica (Sousa *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012); sin embargo, los mecanismos de evolución compensatoria, las mutaciones libres de coste y la co-selección de marcadores de resistencia en presencia de antibiótico suponen un impedimento para la reversibilidad de aquellos fenotipos de resistencia que se han impuesto en las poblaciones bacterianas (Andersson, 2006; Andersson & Hughes, 2010; Hughes & Andersson, 2012; Martínez, 2011). En nuestro caso, cuando realizamos los experimentos de estabilidad del fenotipo BLEE/AmpC observamos la pérdida dicho fenotipo en cuatro de los 11 aislados tras pases sucesivos en ausencia de presión antibiótica. Es importante destacar que el 45% de los aislados analizados perdieron parcialmente el contenido plasmídico (genes de resistencia a beta-lactámicos *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> o *bla*<sub>CTX-M</sub>, así como otros genes de resistencia a tetraciclinas, sulfamidas o trimetoprim) o perdieron el plásmido completo portador del gen *bla*<sub>BLEE/AmpC</sub>. La pérdida total o parcial de plásmidos de resistencia ha sido observada en diversos estudios (Brown *et al.*, 1991; Subbiah *et al.*, 2011), y en el caso de la pérdida parcial podría estar a la obtención de plásmidos energéticamente más favorables para la célula ((Brown *et al.*, 1991; Subbiah *et al.*, 2011).

El mantenimiento de los plásmidos a lo largo de las generaciones bacterianas está determinado por la combinación del coste energético que la bacteria tiene que asumir para la replicación, transcripción y traducción de dichos plásmidos, la segregación correcta llevada a cabo por los sistemas de partición, y la persistencia de éste debido a los mecanismos de muerte post-segregacional cuando la célula hija no ha heredado la copia correspondiente (Martínez, 2011; Subbiah *et al.*, 2011). En nuestro estudio, un aislado de *S. Enteritidis* perdió el fenotipo BLEE tras 5 días de pases consecutivos en ausencia de presión antibiótica y se asoció a la pérdida completa del plásmido IncI1 de 10 kb que portaba el gen *bla*<sub>SHV-12</sub>. La ausencia de los genes *pndAC*, codificantes de un sistema toxina-antitoxina, así como de otros genes del esqueleto plasmídico, *a priori* altamente conservado en los plásmidos de tipo IncI1 (Johnson *et al.*, 2011; Sampei *et al.*, 2010), puede explicar la facilidad con la que este plásmido fue eliminado. También se observó la pérdida de plásmido IncI1 portador del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> en

un aislado de *S. Bredeney* tras 49 días de pases en ausencia de antibiótico; sin embargo, en este caso no se encontró deficiencia en el esqueleto del mismo, por lo que su pérdida pudo ser debida a pequeñas deleciones o mutaciones en genes relevantes para su mantenimiento, un fallo en el sistema de herencia vertical o quizás, a un alto coste energético impuesto en el hospedador (De Gelder *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2009; Subbiah *et al.*, 2011). Aunque por otra parte, los genes *bla*<sub>AmpC</sub> en *Salmonella* suelen encontrarse en plásmidos asociados al represor de su propia expresión o a elementos que compensan el coste biológico asociado a la expresión del gen (Hossain *et al.*, 2004). A todo lo anterior se suma el hecho de que este tipo de beta-lactamasas alteran la fisiología de *Salmonella*, disminuyendo su virulencia y por tanto la probabilidad de diseminación de esta beta-lactamasa (Morosini *et al.*, 2000).

Los sistemas de mantenimiento de plásmidos, junto con las ventajas adaptativas que confieren al hospedador (genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia, etc.), son las principales razones del éxito de este tipo de plásmidos (Carattoli, 2011). Pese a que podamos pensar que la disminución de la presión antibiótica puede reducir el número de bacterias resistentes, parcialmente debido a la pérdida de plásmidos (Andersson & Hughes, 2010), estudios recientes demuestran que existen plásmidos, tales como el plásmido pCT-IncK portador del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, que imponen un bajo coste energético a su hospedador, de manera que resulta un plásmido con una alta persistencia y mantenimiento a lo largo de generaciones bacterianas (Cottell *et al.*, 2012). Las mutaciones compensatorias, tanto en el propio plásmido como en el cromosoma del hospedador, o la adquisición de otros elementos compensatorios pueden disminuir el coste biológico que supone la adquisición de resistencia sin implicar la pérdida de estos mecanismos (Andersson & Levin, 1999; Andersson & Hughes, 2010; Martínez *et al.*, 2011). Estas afirmaciones podrían explicar el hecho de que en 9 de los 11 aislados con fenotipo BLEE/AmpC se mantuvieran los plásmidos portadores de los genes *bla* tras 100 días de pases consecutivos en ausencia de antibiótico aunque sufrieran variaciones en su contenido genético.

Las fluoroquinolonas son antibióticos también empleados como tratamiento alternativo para las infecciones por *Salmonella* invasivas en pacientes adultos. A pesar de que la utilización intensiva de este tipo de antibióticos en clínica y medicina veterinaria están provocando la emergencia de bacterias resistentes a los mismos, la resistencia a fluoroquinolonas resulta todavía infrecuente en la especie *S. enterica* (ECDC, 2012a), quizás debido a que supone un alto coste energético para la bacteria según apuntan estudios previos (Giraud *et al.*, 2003; O'Regan *et al.*, 2010).

De hecho, entre la colección de 364 aislados analizados en esta tesis doctoral, se detectó un único aislado resistente a ciprofloxacina (0,3%). Este aislado Se20 procedía del mismo paciente del que previamente se había obtenido el aislado Se6 sensible a ciprofloxacina, por lo que se estudiaron ambos en esta tesis como un caso clínico. Ambos aislados eran *S. Typhimurium* fagotipo DT104B, pero no presentaron ni la SGI1 cromosómica que suele asociarse a este serotipo-fagotipo (Mulvey et al., 2006), ni resistencia a ningún antibiótico beta-lactámico.

Los datos obtenidos tanto por PFGE como por MLST indicaron que ambas cepas se encontraban clonalmente relacionadas y pertenecían a la secuencia tipo ST36. Esta secuencia tipo, que en un principio fue considerada como un singletón (Lan *et al.*, 2009), actualmente está definida en la base de datos de MLST de *Salmonella* (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>, última consulta el 7 de febrero de 2013) como parte del complejo clonal CC138. La secuencia tipo ST36 agrupa 43 aislados, recogidos en Europa y Asia, todos ellos pertenecientes al serotipo Typhimurium y procedentes de muestras de humanos o de reptiles. Sin embargo, ni el ST36 ni el CC138 son los más frecuentes en este serotipo. El serotipo Typhimurium se encuentra frecuentemente asociado al complejo clonal CC1, que engloba los aislados del ST19, que difiere del ST36 detectado en nuestro estudio en cuatro alelos (*aroC*, *dnaN*, *sucA* y *thrA*) del ST36 (Achtman *et al.*, 2012).

El estudio fenotípico mostró que el primer aislado (Se6) presentaba sensibilidad disminuida a ácido nalidíxico (16 µg/mL) y ciprofloxacina (0,5 µg/mL) y resistencia a estreptomicina, tetraciclina, sulfamidas y ácido fusídico; mientras que el segundo (Se20), obtenido tras el tratamiento de 7 días con ciprofloxacina, mostraba resistencia adicional a ácido nalidíxico (>512 µg/mL), ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, ofloxacina (8-32 µg/mL), amikacina (16 µg/mL), tobramicina (32 µg/mL), kanamicina (128 µg/mL), trimetoprim y trimetoprim/sulfametoxazol. Los valores de CMI de quinolonas y fluoroquinolonas se asociaron con la presencia de *qnrS1* en ambas cepas, y adicionalmente en el caso de la cepa Se20 a la detección del gen *aac(6′)-Ib-cr4* y a la mutación Ser83Tyr en su proteína Gyra.

Los mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas (TMQR) (como QnrS1 y AAC(6′)-Ib-cr, entre otros), confieren un bajo nivel de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas, incluso por debajo de los puntos de corte que han sido tradicionalmente considerados como resistencia clínica. Por ello, tanto el comité europeo EUCAST, como el americano CLSI han determinado disminuir los puntos de corte para las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina y ofloxacina, especialmente en el caso de *Salmonella* Typhi y aislados

extraintestinales de *Salmonella* con el fin de prevenir fallos terapéuticos. Actualmente, se debate la conveniencia de hacer extensible esta recomendación a cualquier aislado de *Salmonella* spp. con la finalidad de evitar la selección de mecanismos de resistencia de alto nivel o acumulación de los mismos (Humphries *et al.*, 2012; Leclercq *et al.*, 2011).

La adición de mecanismos, tanto cromosómicos como transferibles, son los que favorecen los altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas. La presencia de TMQR supone un paso adicional en la disminución de sensibilidad a quinolonas y contribuye a un nivel más alto de resistencia, lo que puede ayudar a la selección de una cepa resistente (Poirel *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2012b; Strahilevitz *et al.*, 2009). En este trabajo, la presencia de la mutación Ser83Tyr en la proteína GyrA detectada en la cepa Se20 justifica en parte el incremento de resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina con respecto a la cepa Se6. La diana primaria para mutaciones en bacterias Gram negativas es la proteína GyrA, donde pueden encontrarse mutaciones, que adquiridas de manera sucesiva, confieren un incremento gradual en el nivel de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas. Se ha demostrado que una sola mutación en GyrA proporciona un alto nivel de resistencia a ácido nalidíxico; mientras que para obtener niveles mayores de resistencia a fluoroquinolonas se precisan mutaciones adicionales en GyrA y/o ParC (Ruiz, 2003; Sáenz *et al.*, 2003) y/o la detección de TMQR.

La presencia de la proteína AAC(6')-Ib-cr (o la variante AAC(6')-Ib-cr4 en el caso de esta tesis), además de justificar la adquisición de resistencia a los aminoglucósidos amikacina, tobramicina y kanamicina, disminuye la sensibilidad a ciprofloxacina y norfloxacina; pero no afecta a ácido nalidíxico, levofloxacina ni ofloxacina. Este hecho es especialmente notable si comparamos la cepa Se6 (que no posee la enzima acetilasa -cr) con el transconjugante TCSe20B (que posee la enzima acetilasa -cr). La cepa TCSe20B posee unos valores de resistencia a ciprofloxacina y norfloxacina de 2 µg/mL y de 16 µg/mL, respectivamente; es decir, 2 y 8 veces superiores a los de la cepa Se6, respectivamente para ambos antibióticos. Sin embargo, si comparamos los valores de CMI para el ácido nalidíxico, levofloxacina y ofloxacina de la cepa TCSe20B y de la cepa Se6 vemos que permanecen invariables (16, 1, 2 µg/mL). La adquisición de este mecanismo ayuda a explicar la tan común asociación entre resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas en enterobacterias (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2012; Ramírez & Tolmasky, 2010; Ruiz *et al.*, 2012b).

Las proteínas QnrS se encuentran más frecuentemente asociadas a *S. enterica* que las proteínas QnrA o QnrB (Cattoir & Nordmann, 2009; Poirel *et al.*, 2012). Además la asociación entre genes *qnrS* y cefalosporinasas movilizadas en un mismo plásmido no se han encontrado

en este género bacteriano (Cattoir & Nordmann, 2009). Este hecho fue coincidente con nuestras cepas, dado que en nuestro caso, ni las cepas fueron resistentes a antibióticos beta-lactámicos, ni encontramos posibles genes *bla* silentes.

La presencia del gen *qnrS1*, detectado tanto en las cepas Se6 y Se20, como en los transconjugantes TCSe20B y TCSe20L, disminuye la sensibilidad de quinolonas y fluoroquinolonas. De hecho, estudios previos en *E. coli* (Nordmann & Poirel, 2005; Strahilevitz *et al.*, 2009) mostraron que la sola presencia de un gen de tipo *qnr* incrementa las CMI de ácido nalidíxico 16-125 veces y de fluoroquinolonas 20 veces cuando se compara con una cepa salvaje. Así, cabe destacar que la transferencia horizontal del gen *qnrS1* del aislado Se20 produjo un incremento en la CMI de ácido nalidíxico y ciprofloxacina respecto a la de la cepa *E. coli* receptora en 4 y 67 veces, respectivamente, como se observa en los resultados de TCSe20L, valores comparables a su vez con los obtenidos para Se6 (que tan sólo poseía este gen como mecanismo plasmídico de resistencia a quinolonas). Por otra parte, el transconjugante TCSe20B presentó los genes *qnrS1* y *aac(6')-Ib-cr*, observándose un incremento de CMI de ácido nalidíxico, ciprofloxacina, kanamicina y tobramicina de 4, 133, 64 y 64 veces, respectivamente, con respecto a la cepa receptora. Aunque la cepa dadora Se20 poseía ambos genes de resistencia a quinolonas, los valores de CMI para ácido nalidíxico y fluoroquinolonas fueron mayores que los presentados para la cepa TCSe20B, puesto que además de estos genes mediados por plásmidos, poseía la mutación Ser83Tyr en la proteína GyrA. Con este estudio hemos corroborado que existe un efecto aditivo de estos mecanismos de resistencia, tanto aquellos denominados tradicionalmente como transferibles como los cromosómicos, en el fenómeno de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas (Cattoir & Nordmann, 2009; Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2012b; Strahilevitz *et al.*, 2009).

En nuestro estudio no se detectaron integrones en la cepa Se6; mientras que en la cepa Se20 así como en ambos transconjugantes, se detectó la presencia de un integrón de tipo 1 que portaba en su región variable los genes *dfrA17* y *aadA5* implicados en la resistencia a trimetoprim y estreptomina, respectivamente. Este integrón poseía intacta la secuencia del gen *intI1*, sin embargo, no se encontró la región 3' conservada (genes *qacEΔ1* + *sul1*). Existen varias referencias que indican que la carencia de la región 3'-CS no es frecuente, aunque se han descrito diferentes estructuras genéticas (Antunes *et al.*, 2007; Sunde *et al.*, 2008; Sáenz *et al.*, 2010). En un estudio previo realizado por nuestro grupo con aislados del Hospital San Pedro de Logroño (el mismo hospital del que se aislaron las cepas Se6 y Se20 del

caso clínico), se observó que de un total de 44 cepas de *E. coli* integrón positivas, 12 presentaron la estructura *dfrA17+aadA5* en su región variable de integrón de clase 1, pero tan solo una de ellas resultó defectiva para los genes *qacEΔ1 + sul1* (Vinué *et al.*, 2010).

El promotor de tipo Pc localizado en la secuencia codificante de *intl1* e implicado en la transcripción de los casetes génicos *dfrA17+aadA5*, fue el promotor de tipo Pc híbrido 1 (PcH1). Se caracteriza por presentar las secuencias TGGACA y TAAACT en las posiciones -35 y -10 de los hexámeros. La fuerza de este promotor está descrita en la bibliografía como débil en la expresión de los casetes génicos, pero también con una alta eficiencia para favorecer la reorganización de los mismos en función de la presión antibiótica del medio (Jové *et al.*, 2010; Vinué *et al.*, 2011).

El estudio de los mecanismos de resistencia implicados en la resistencia a tetraciclinas, estreptomicina y sulfamidas desveló la presencia de los genes *tet(A)*, *strA-strB* y *sul2* en las cepas Se6 y Se20; mientras que los transconjugantes fueron negativos para los genes *tet(A)* y *strA-strB*, lo que explica su sensibilidad a tetraciclinas y estreptomicina. El estudio genético del entorno para el gen *sul2* mostró que estaba flanqueado por los genes *repC* y *strA-strB* en el caso de las cepas Se6 y Se20, lo que demuestra la fuerte asociación entre el gen *sul2* y *strA-strB*, como se ha presentado en la bibliografía (Bean *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011; Vinué *et al.*, 2010). Sin embargo, no se observó esta asociación en los transconjugantes obtenidos TCSe20B y TCSe20L. Este hecho nos hizo pensar que podría existir más de una copia del gen *sul2* en la cepa dadora, y por lo menos una de ellas localizada en un plásmido conjugativo que se había transferido, lo que se confirmó mediante las técnicas de PBRT, PFGE-S1 y Southern-hibridación.

Se observó la presencia de un plásmido de tipo ColE<sub>TP</sub>, que albergaba el gen *qnrS1* en todas las cepas y cuyo tamaño era aproximadamente de 9 Kb. Los genes *qnrS1*, relacionados en un entorno genético inmediato con la secuencia de inserción *ISEcl2* y transposones de tipo Tn3 (Poirel *et al.*, 2012), se encuentran frecuentemente localizados en plásmidos pequeños y movilizables que son derivados de plásmidos ColE (García-Fernández *et al.*, 2009; Kehrenberg *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2008). En nuestro caso, el estudio del entorno genético del gen *qnrS1* encontrado en todas las cepas estudiadas, desveló la presencia de la secuencia parcial de *ISEcl2* (que contenía *orfB* y *orfA* truncada), tal y como había sido descrito en los plásmidos pS3-1 y pS5-1 (Poirel *et al.*, 2007) y de los genes de movilización plasmídica *mobA*, *mobB* y *mobC* río arriba de dicho gen, descritos previamente para los plásmidos pTPqnrS-1a, pST728/06-2 y pS5-1 (Kehrenberg *et al.*, 2007; Wu *et al.*,

2008). A diferencia de los trabajos previamente descritos, nuestras cepas no presentaban resistencia a beta-lactámicos, lo que justificó que no se encontraran ni el gen *bla*<sub>LAP-1</sub> ni el transposón Tn3 portador del gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, acompañando a la secuencia parcial de *ISEcI2*. Río abajo del gen *qnrS1* se encontraron genes hasta ahora con función desconocida orientados tal y como se ha descrito para el plásmido pS5-1 (Poirel *et al.*, 2007). Los plásmidos del tipo ColE<sub>TP</sub>, como el que se ha encontrado en este estudio, presentan un origen de replicación *oriV*, con una homología variable (en nuestro caso 74%) con otras variantes de plásmido de tipo ColE, pero es 100% idéntico al plásmido pTPqnrS-1a, descrito en la bibliografía por su relación con los genes de tipo *qnrS* (García-Fernández *et al.*, 2009; Kehrenberg *et al.*, 2007). En las cuatro cepas analizadas se logró comprobar la colinearidad entre *oricolE<sub>TP</sub>* y *qnrS1* (García-Fernández *et al.*, 2009). Estos resultados indican la localización del gen *qnrS1* en un plásmido de tipo pTPqnrS-1a que son no conjugativos pero pueden estar movilizados por otros plásmidos co-residentes.

Adicionalmente, las cepas Se6 y Se20 presentaron en ambos casos dos plásmidos no tipables de 194 y 8 Kb donde hibridaron las sondas de los genes *tet(A)*, *sul2* y *strB*, pero se observó que ninguno de ellos se había transferido por conjugación. Por otro lado, la diferencia entre la cepa inicial Se6 y la cepa post-tratamiento Se20 fue la presencia de un plásmido pequeño de tipo ColE1 que contenía el gen *aac(6′)-Ib-cr4*, y de otro plásmido de tipo IncI1 que contenía el integrón de clase 1 (*intI1+dfrA17+aadA5*) y el gen *sul2* no asociado a *strA-strB*. Estos dos plásmidos podían haber sido transferidos a la cepa Se6 desde otra bacteria intestinal, posiblemente una *E. coli* comensal, durante el tratamiento antibiótico. No pudimos comprobar esta posibilidad ante la dificultad de obtener otra muestra fecal del paciente. Sin embargo, tampoco hay que descartar la posibilidad de que coexistieran ambas cepas Se6 y Se20 en el intestino del paciente y que tras el tratamiento antibiótico se seleccionara la cepa resistente.

De todas formas, los experimentos de conjugación realizados en este trabajo de investigación han demostrado que el plásmido de tipo IncI1 ha sido transferido desde la cepa Se20 a una cepa receptora *E. coli*, y que este plásmido puede participar en la movilización de ColE<sub>TP</sub>-*qnrS1* e incluso del plásmido que contenía el gen *aac(6′)-Ib-cr4*, como se ha demostrado en el transconjugante TCSe20B.

Una vez analizado el experimento de transferencia con la cepa Se20 como dadora y los resultados obtenidos, podríamos concluir que tanto el gen *aac(6′)-Ib-cr4* como el gen *qnrS1* están localizados en plásmidos movilizables pero no conjugativos. Estos plásmidos

necesitarían la presencia de otro plásmido conjugativo (que en este trabajo parece ser el plásmido Inc11) para poder transferirse de una bacteria a otra. Por tanto, en la cepa Se6, en la que los experimentos de conjugación no fueron satisfactorios, quizás no exista un plásmido conjugativo que pueda “ayudar” al no conjugativo en su movilización.

En resumen, el caso clínico analizado en esta tesis es la primera descripción en la literatura internacional de una selección *in vivo* del gen *aac(6′)-Ib-cr4* y la sustitución Ser83Tyr de la proteína GyrA en una cepa de *S. Typhimurium* DT104B positiva para el gen *qnrS1* tras el tratamiento de la infección con ciprofloxacina durante 7 días. Además, se ha demostrado la transferencia *in vitro* de los genes *qnrS1* y *aac(6′)-Ib-cr4* mediados por plásmidos, aunque no se ha observado una asociación física entre los genes *qnrS1* y *aac(6′)-Ib-cr4*, como ha sido previamente descrito (Park *et al.*, 2006; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

La presencia de genes *qnr* puede ser crítica en la emergencia *in vivo* de mutantes con niveles de sensibilidad reducida a quinolonas; tal y como se ha descrito tanto en un caso de selección *in vivo* de mutaciones en GyrA y ParC tras el tratamiento con norfloxacina (Poirel *et al.*, 2006), como en el caso que se presenta en este trabajo. La selección de estas cepas mutantes resistentes a quinolonas durante el tratamiento antibiótico es de gran relevancia clínica y pueden ser responsables de fallos terapéuticos. Por otro lado, el hecho de que estos genes tengan localización plasmídica en distintos entornos genéticos puede facilitar su diseminación rápida incluso entre bacterias de otros géneros bacterianos lo cual tiene una gran trascendencia clínica y epidemiológica.

Tras el estudio del caso clínico de resistencia *in vivo* donde se caracterizaron los plásmidos implicados en la diseminación de la resistencia, se estudió mediante **secuenciación el plásmido** movilizable de pequeño tamaño que albergaba el gen de resistencia a aminoglucósidos, *aac(6′)-Ib-cr*, contenido en la cepa post-tratamiento Se20.

Tras el experimento de electrotransformación sobre una cepa de *E. coli* receptora, se secuenció completamente el plásmido denominado pMdT1 de 5931 pb que fue incluido en GenBank bajo el número de acceso JX457478. La comparación de la secuencia completa con la base de datos reveló que la máxima identidad (97%) desplegada correspondía con el plásmido de tipo ColE carente del gen *aac(6′)-Ib-cr* de *S. Berta* denominado pBERT (número de acceso GenBank AF025795); aunque solo el 52% de pMdT1 era comparable con pBERT.

En cualquier plásmido pueden definirse dos grandes zonas: un esqueleto plasmídico (backbone) y una región de adaptación. En el caso del plásmido pMdT1, la región de adaptación comprende una ORF de 225 aminoácidos que mostraba en el análisis un dominio de N-acetiltransferasa y que poseía un 99% de identidad con la proteína de 184 aminoácidos AAC(6′)-Ib-cr. La proteína N-acetiltransferasa codificada en el plásmido pMdT1 [denominada AAC(6′)-Ib-cr4] no solo mostraba las mutaciones descritas previamente para la variante “-cr”: Trp102Arg y Asp179Tyr (Robicsek *et al.*, 2006; Strahilevitz *et al.*, 2009); sino que además poseía una mutación adicional (Asn5Thr) detectada previamente en otras variantes de este tipo de proteínas (X98393 y GQ293500). Sin embargo, hasta el momento no se había descrito ninguna variante de acetilasa que contuviese las tres mutaciones simultáneamente.

El gen de resistencia *aac(6′)-Ib-cr* ha sido frecuentemente encontrado como casete génico formando parte de integrones de clase 1 (Partridge *et al.*, 2009; Robicsek *et al.*, 2006); en nuestro caso el análisis de la secuencia reveló que se encontraba embebido en su estructura clásica de casete génico con el lugar de recombinación *attC* conservado pero no se encontraron ni gen codificante de integrasa (la sonda *intI1* no hibridó en el plásmido de 6 kb) ni de *attI*, ni incluso de otros casetes génicos en el resto del plásmido. El análisis de las regiones adyacentes reveló un buen sitio de unión al ribosoma (RBS) aguas arriba del codón de inicio propuesto por ORF Finder, lo que apoyaba que la proteína detectada tuviese un extremo N-terminal más largo, siendo de 225 aminoácidos en vez de los 184 aminoácidos comúnmente aceptados. Algunos estudios (Casin *et al.*, 1998; Partridge *et al.*, 2009) han indicado que existe variabilidad en cuanto a la longitud de este extremo N-terminal en estas proteínas, sin implicar variaciones en su eficiencia. Sea como fuere, los experimentos de fenotipo demostraron que tanto la cepa post-tratamiento Se20 como la cepa transformante obtenida, TFSe20, mostraban el fenotipo de resistencia a aminoglucósidos y sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas compatible con la presencia de la enzima acetiltransferasa AAC(6′)-Ib-cr.

Además de esta ORF reconocida, el análisis de la secuencia reveló tres ORF adicionales, una de las cuales (denominada ORF1) no mostró similitud con ninguna descripción previa. ORF2 y ORF3, de 122 y 183 aminoácidos, respectivamente, no contenían dominios conservados; aunque en el caso de ORF3 su secuencia fue idéntica a un factor de estimulación de macrófagos previamente detectado en *S. Heidelberg* y *E. coli* (números de acceso: EIC34781 y EIL42560, respectivamente). El análisis con Phyre2 mostró que ORF2

poseía una estructura secundaria de tipo CopG, similar a algunos reguladores transcripcionales.

Centrándonos en el esqueleto conservado del plásmido, se observan los genes de movilidad *mobA*, *mobB*, *mobC* y *mobD*, detectados entre los nucleótidos 53 y 1865. Tal y como ha sido previamente descrito (Francia *et al.*, 2004; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; Smillie *et al.*, 2010), las proteínas Mob son requeridas para la movilización horizontal del plásmido durante el proceso de conjugación bacteriana. La región *mob* del plásmido pMdT1 mostró alta similitud con las regiones de movilización de otros plásmidos de tipo ColE1, tales como los plásmidos pK (AY079200) de *S. Enteritidis* o los plásmidos pHLR25 (HE652087), pQnrS1-cp17s (JN393220) y pTP*qnrS*-1a (AM746977) de *S. Typhimurium*. Precediendo a la región de movilidad se encuentra una región denominada *bom* (basis of mobility), localizada entre los nucleótidos 1911 y 2191 del plásmido pMdT1, requerida para la movilidad plasmídica y similar en un 87 y 79%, respectivamente, a la región *bom* de los plásmidos pSW200 y pRK10 (L42525 y EU697813). Dentro de esta región y comparando con los plásmidos pRK10 (EU697813) y la familia MOB<sub>HEN</sub> (Francia *et al.*, 2004) se encontraba el origen de transferencia *oriT* y el sitio de ruptura de las hebras (*nic*-cleavage site).

La región de replicación del plásmido pMdT1 comprende 254 pb, entre los nucleótidos 2488 y 2841, mostrando una identidad del 78 y 75% con la región de replicación de los plásmidos de tipo ColE1: pHW15 (AM167518) y *qnrB19*-pSGI15 (FN428572). En esta región se encontraron altamente conservados dos regiones de RNA solapantes, denominadas RNAI y RNAII, que son transcritas a partir de un origen de replicación, *oriV*, y necesarias no solo para la replicación, sino para el control del número de copias del plásmido (Hammerl *et al.*, 2010; Rozhon *et al.*, 2006).

El plásmido pMdT1 de tipo ColE1, descrito en esta tesis, es el plásmido de resistencia de tipo ColE1, portador de un gen *aac(6')-Ib-cr4* más pequeño descrito hasta el momento. Este plásmido es fácilmente transferible y movilizable, tal y como se ha podido comprobar tanto *in vitro* como *in vivo*. Las cepas portadoras de este plásmido no solo serán resistentes a tobramicina y kanamicina, sino que además mostrarán sensibilidad disminuida a ciprofloxacina y norfloxacina.

# **Conclusiones**

*“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Los rayos fronterizos del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre un infinito mundo de misterio”*

*Gregorio Marañón*



## **CONCLUSIONES**

1. Los serotipos mayoritarios detectados en los aislados de *S. enterica* en los hospitales analizados han sido Typhimurium (52%) y Enteritidis (33%), estando el serotipo Typhimurium altamente asociado con los fenotipos de multirresistencia.
2. Se ha observado bajos porcentajes de resistencia a ciprofloxacina o cefalosporinas de tercera generación entre los aislados clínicos estudiados.
3. El gen  $bla_{TEM-1}$  fue el más prevalente entre los aislados  $AMP^R$ - $AMC^S$ , mientras que los genes  $bla_{PSE-1}$  y  $bla_{OXA-1}$  lo fueron entre los aislados  $AMP^R$ - $AMC^{I/R}$ .
4. El fenotipo de pentarresistencia ACSSuT o derivados se ha detectado en el 42% de los aislados  $AMP^R$ , asociados a tres genotipos generales ligados a los genes  $bla_{TEM-1}$ ,  $bla_{OXA-1}$  y  $bla_{PSE-1}$ .
5. Se han detectado 12 estructuras distintas de integrones de clase 1 entre los aislados  $AMP^R$ , cinco de las cuales carentes de su región 3'-conservada, y tres de ellas asociadas al gen *sul3*. La estructura mayoritaria fue el doble integrón  $aadA2/bla_{PSE-1}$  (65 aislados), seguida de la estructura  $bla_{OXA-1}+aadA1$  (38 aislados). En un aislado de *S. Thompson* se ha detectado el integrón In37 con la estructura  $int1+aac(6')-lb-cr+bla_{OXA-1}+catB3+arr3+qac\Delta 1+sul1$  y el promotor inusual de tipo  $PcW_{TGN-10}$ .
6. Todas las cepas de *S. Typhimurium*  $bla_{PSE-1}$ -positivas presentaron pulsotipos indistinguibles o altamente relacionados y fueron adscritas a la secuencia tipo ST19 (Complejo Clonal CC1). El gen  $bla_{PSE-1}$  se localizó en la estructura de SGI1, detectándose una nueva variante (GenBank JF775513).
7. Las cepas *S. Typhimurium*  $bla_{PSE-1}$ -positivas se agruparon en tres perfiles de virulencia. Todas las cepas presentaron los genes de localización en islas de patogenicidad (SPI 1-5) y los genes relacionados con profagos; mientras que la presencia del plásmido de virulencia fue variable (90%).
8. El fenotipo BLEE o AmpC es muy infrecuente en los hospitales analizados (<1%), asociado a serotipos inusuales (Virchow, Gnesta, Livingstone y Bredeney) y con una alta diversidad genotípica ( $bla_{CTX-M-9}$ ,  $bla_{CTX-M-10}$ ,  $bla_{CTX-M-14a}$ ,  $bla_{CTX-M-15}$ ,  $bla_{SHV-2}$ ,  $bla_{SHV-12}$  y  $bla_{CMY-2}$ ).

9. Los genes *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub> se han localizado en plásmidos de tipo IncI1 (10-115 kb) y los genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-10</sub> en plásmidos no tipables de muy alto peso molecular (307-370 kb). El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se ha detectado en plásmidos IncI1 (87 kb) y IncA/C (417 kb), así como en una localización cromosómica.
10. Se observó la pérdida de los genes *bla*<sub>BLEE</sub> o *bla*<sub>AmpC</sub> *in vitro* o el plásmido completo que los albergaba en 4 de 11 aislados tras sucesivos pases en ausencia de presión selectiva antibiótica. En tres cepas adicionales se evidenció la pérdida de otros genes de resistencia o integrones.
11. La cepa que albergaba el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en localización cromosómica y plasmídica perdió la copia plasmídica en ausencia de presión antibiótica selectiva.
12. En una cepa de *S. Enteritidis* SHV-12-positiva se observó la pérdida del plásmido IncI1 de 10 kb tras 4 días de pases sucesivos en medio sin antibiótico, probablemente asociado a la ausencia de sistemas de mantenimiento.
13. El caso clínico presentado es la primera descripción de selección *in vivo* del gen *aac*(6')-Ib-cr4 y la mutación Ser83Tyr en la proteína GyrA en una cepa de *S. Typhimurium* DT104 *qnrS1*-positiva tras el tratamiento antibiótico de 7 días con ciprofloxacina. Se transfirieron por conjugación los genes *aac*(6')-Ib-cr4 y *qnrS1*, junto con los determinantes de resistencia a sulfamidas, trimetoprim y estreptomycin y el integrón de clase 1.
14. El gen *qnrS1* se localizó en un plásmido de tipo ColE<sub>Tp</sub>, asociado a los genes de movilización plasmídica (*mobA*, *mobB*, *mobC*), la secuencia parcial *ISEc12* y un gen incompleto relacionado con el transposón Tn5058.
15. El nuevo plásmido pMdt1 de tipo ColE caracterizado en esta tesis (GenBank JX457478) es el más pequeño descrito (6kb) que porta la nueva variante *aac*(6')-Ib-cr4. Este plásmido transferible contiene los elementos de movilización que pueden permitirle una fácil diseminación.

## **CONCLUSIONS**

1. Serotypes Typhimurium (52%) and Enteritidis (33%) have been the main ones detected among *S. enterica* isolates from the analyzed hospitals, being serotype Typhimurium highly associated with multi-resistance phenotypes.
2. Low percentages of resistance to ciprofloxacin or third-generation cephalosporins antibiotics have been observed among clinical studied isolates.
3. The *bla*<sub>TEM-1</sub> gene was the most prevalent among AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>S</sup> isolates, whereas *bla*<sub>PSE-1</sub> and *bla*<sub>OXA-1</sub> genes were among AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>I/R</sup> ones.
4. The ACSSuT penta-resistance or derived phenotypes have been detected in the 42% of the AMP<sup>R</sup> isolates, associated to three general genotypes and linked to the *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *bla*<sub>PSE-1</sub> genes.
5. A total of 12 different class 1 integron structures have been detected, five of them lacking the 3'-conserved region, and three of them linked to the *sul3* gene. The integrons *aadA2/bla*<sub>PSE-1</sub> (65 isolates) and the *bla*<sub>OXA-1</sub>+*aadA1* (38 isolates) have been the major structures. One *S. Thompson* isolate harbored the In37 integron with the *intI1+aac(6')-Ib-cr+bla*<sub>OXA-1</sub>+*catB3+arr3+qacEΔ1+sul1* structure and the unusual promoter PcW<sub>TGN-10</sub>.
6. All *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive *S. Typhimurium* strains showed indistinguishable or closely related pulsotypes and were assigned to the sequence type ST19 (Clonal Complex CC1). The *bla*<sub>PSE-1</sub> gene was located inside the SGI1 structure, and a new variant was detected in this study (GenBank JF775513).
7. The *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive *S. Typhimurium* strains were grouped into three virulence profiles. All strains showed the pathogenicity islands (SPI 1-5) locating genes and prophage-related genes; while a slight variability was observed in the presence of the virulence plasmid (90%).
8. The ESBL or AmpC phenotype is very uncommon in the analyzed hospitals (<1%), associated to unusual serotypes ((Virchow, Gnesta, Livingstone and Bredeney) and with a high genotypic diversity (*bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-10</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes).

9. The *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes have been located on IncI1 plasmids (10-115 kb), and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> and *bla*<sub>CTX-M-10</sub> genes in large non-typeable plasmids (307-370 kb). The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene has been detected in IncI1 (87 kb) and IncA/C (417 kb) plasmids, as well as in a chromosomal location.
10. The *in vitro* loss of *bla*<sub>BLEE</sub> or *bla*<sub>AmpC</sub> genes or complete carrying-plasmids was observed in 4 of the 11 isolates after serial passages under free-antibiotic selection pressure. In three additional isolates the loss of other resistance genes or integrons was observed.
11. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-positive isolate, harboring both chromosomal and plasmid location of the gene, lost the plasmidic copy under free-antibiotic selection pressure.
12. In a SHV-12-positive *S. Enteritidis* strain the loss of the 10 kb-IncI1 plasmid was observed after 4 days of passages in antibiotic-free medium, probably due to the absence of maintenance systems.
13. The case report presented in this thesis is the first description of *in vivo* selection of the *aac(6')-Ib-cr4* gene and the Ser83Tyr GyrA substitution in a *qnrS1*-positive *S. Typhimurium* DT104B after 7 days of antibiotic treatment with ciprofloxacin. The *aac(6')-Ib-cr4* and *qnrS1* genes, and also sulphonamides, trimethoprim and streptomycin resistance determinants and the class 1 integron, were transferred by conjugation.
14. The *qnrS1* gene was located in a ColE<sub>Tp</sub> plasmid, associated with the mobilization genes (*mobA*, *mobB*, *mobC*), the *ISEcI2* partial sequence and an incomplete gene related with the Tn5058 transposon.
15. The pMdT1 plasmid, characterized in this thesis, is the smallest (6 kb) ColE1-like resistance plasmid that harbors the new variant *acc(6')-Ib-cr4* described so far (GenBank JX457478). This transferable plasmid contains mobilizable elements that could enable it to disseminate further.

## ***Bibliografía***



## **BIBLIOGRAFÍA**

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S.** 2012. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *Plos Pathogens* **8**, e1002776.
- Ahmed, A. M., Hussein, A. I., Shimamoto, T.** 2007. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. *J Antimicrob Chemother* **59**, 184-190.
- Alekshun, M. N., Levy, S. B.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**, 1037-1050.
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F.** 2012. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS One* **7**, e40438.
- Alós, J. I.** 2003. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**, 261-267; quiz 268, 272.
- Ambler, R. P.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**, 321-331.
- Anantham, S., Hall, R. M.** 2012. pCERC1, a small, globally disseminated plasmid carrying the dfrA14 cassette in the strA gene of the sul2-strA-strB gene cluster. *Microb Drug Resist* **18**, 364-371.
- Andersson, D. I., Levin, B. R.** 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **2**, 489-493.
- Andersson, D. I.** 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* **9**, 461-465.
- Andersson, D. I., Hughes, D.** 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* **8**, 260-271.
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., Peixe, L.** 2004. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella* Typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **54**, 429-434.
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., Peixe, L.** 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 836-839.
- Antunes, P., Machado, J., Peixe, L.** 2007. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1545-1548.

- Antunes, P., Mourao, J., Alves, T., Campos, J., Novais, C., Novais, A., Peixe, L.** 2013. *Salmonella enterica* serotype Bovismorbificans, a new host for CTX-M-9. *Int J Antimicrob Agents* **41**, 91-93.
- Arlet, G., Barrett, T. J., Butaye, P., Cloeckart, A., Mulvey, M. R., White, D. G.** 2006. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect* **8**, 1945-1954.
- Baquero, F., Álvarez-Ortega, C., Martínez, J. L.** 2009. Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environmental Microbiology Reports* **1**, 469-476.
- Baquero, F., Garau, J.** 2010. Prudent use of antimicrobial agents: revisiting concepts and estimating perspectives in a global world. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **28**, 487-488.
- Barton, B.M., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J.** 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* **10**, 235-240.
- Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E. J., Clifton-Hadley, F. A., Stallwood, A. D., Davies, R. H., Liebana, E.** 2005. *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1319-1322.
- Bäumler, A.J., Heffron, F., Reissbrodt, R.** 1997. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *J Clin Microbiol* **35**, 1224-1230.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Bowe, F.A., Kusters, J.G., Hoffmann, S., Heffron, F.** 1996. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun* **64**, 61-68.
- Bean, D. C., Livermore, D. M., Hall, L. M.** 2009. Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1088-1093.
- Beceiro, A., Tomás, M., Bou, G.** 2012. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *Enferm Infecc Microbiol Clin* **30**, 492-499.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Boyce, M.J., Atlas, R.M.,** 1994. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. *Appl Environ Microbiol* **60**, 368-373.
- Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Caniça, M. M., Vedel, G., Névoz, P., Krishnamoorthy, R., Paul, G.** 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol. Lett.* **120**, 75-80.
- Bell, R. L., González-Escalona, N., Stones, R., Brown, E. W.** 2011. Phylogenetic evaluation of the 'Typhimurium' complex of *Salmonella* strains using a seven-gene multi-locus sequence analysis. *Infect Genet Evol* **11**, 83-91.

- Benacer, D., Thong, K. L., Watanabe, H., Puthucheary, S. D.** 2010. Characterization of drug resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes and PFGE. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 1042-1052.
- Bennett, P. M.** 2004. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol* **266**, 71-113.
- Bennett, P. M.** 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* **153**, S347-357.
- Berens, C., Hillen, W.** 2003. Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape *TetR* for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* **270**, 3109-3121.
- Beutlich, J., Jahn, S., Malorny, B., Hauser, E., Hühn, S., Schroeter, A., Rodicio, M.R., Appel, B., Threlfall, J., Mevius, D., Helmuth, R., Guerra, B.** 2011. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. *Appl Environ Microbiol* **77**, 5655-5664.
- Biendo, M., Laurans, G., Thomas, D., Canarelli, B., Hamdad-Daoudi, F., Rousseau, F., Castelain, S., Eb, F.** 2005. Molecular characterisation and mechanisms of resistance of multidrug-resistant human *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium isolated in Amiens (France). *Int J Antimicrob Agents* **26**, 219-229.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1-14.
- Boyd, D., Peters, G. A., Cloeckert, A., Boumedine, K. S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., Mulvey, M. R.** 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serotipo Agona. *J Bacteriol* **183**, 5725-5732.
- Boyd, D., Cloeckert, A., Chaslus-Dancla, E., Mulvey, M. R.** 2002. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serotipos Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1714-1722.
- Boyle, F., Healy, G., Hale, J., Kariuki, S., Cormican, M., Morris, D.** 2011. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase phenotype from OXA-1 expression in *Salmonella* Typhimurium strains from Africa and Ireland. *Diagn Microbiol Infect Dis* **70**, 549-553.
- Briñas, L.** 2005. Tesis Doctoral: Caracterización genética de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* de origen animal, humano y alimentario. Universidad de La Rioja.
- Brizio, A., Vasco, S., Gonçalves, A. R., Lito, L. M., Cristino, J. M., Salgado, M. J., Duarte, A.** 2006. Survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolates from a

- Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene. *Int J Antimicrob Agents* **28**, 320-324.
- Brown, D. J., Threlfall, E. J., Rowe, B.** 1991. Instability of multiple drug resistance plasmids in *Salmonella* Typhimurium isolated from poultry. *Epidemiol Infect* **106**, 247-257.
- Buckley, M.** 2009. Antibiotic Resistance: an ecological perspective on an old problem. Edited by A. A. o. Microbiology. Washington DC, USA: American Society for Microbiology.
- Bugarel, M., Granier, S. A., Weill, F. X., Fach, P., Brisabois, A.** 2011. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *BMC Microbiol* **11**, 151.
- Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1211-1233.
- Bush, K., Jacoby, G. A.** 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 969-976.
- Call, D. R., Singer, R. S., Meng, D., Broschat, S.L., Orfe, L.H., Anderson, J.M., Herndon, D.R., Kappmeyer, L.S., Daniels, J.B., Besser, T.E.** 2010. *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 590-596.
- Calvo, J., Martínez-Martínez, L.** 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**, 44-52.
- Cambray, G., Guerout, A. M., Mazel, D.** 2010. Integrons. *Annu Rev Genet* **44**, 141-166.
- Cambray, G., Sánchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, E., Da Re, S., González-Zorn, B., Ploy, M.C., Barbé, J., Mazel, D., Erill, I.** 2011. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptative trait of chromosomal and mobile integrons. *Mobile DNA* **2**, 1-15.
- Campos, J., Pérez-Vázquez, M., Oteo, J.** 2010. Las estrategias internacionales y las campañas para promover el uso prudente de los antibióticos en los profesionales y los usuarios. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **28**, 50-54.
- Cantón, R., González-Alba, J. M., Galán, J. C.** 2012. CTX-M Enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol* **3**, 110.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., Threlfall, E. J.** 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**, 219-228.
- Carattoli, A.** 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2227-2238.
- Carattoli, A.** 2011. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol* **301**, 654-658.

- Cartelle, M., Canle, D., Llarena, F. J., Molina, F., Villanueva, R., Bou, G.** 2006. Characterisation of the first CTX-M-10-producing isolate of *Salmonella enterica* serotype *Virchow*. *Clin Microbiol Infect* **12**, 285-287.
- Casin, I., Bordón, F., Bertin, P., Coutrot, A., Podglajen, I., Brasseur, R., Collatz, E.** 1998. Aminoglycoside 6<sup>1</sup>-N-acetyltransferase variants of the Ib type with altered substrate profile in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 209-215.
- Cattoir, V., Poirel, L., Mazel, D., Soussy, C. J., Nordmann, P.** 2007a. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated *QnrS*-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2650-2651.
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.J., Nordmann, P.** 2007b. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* **60**, 394-397.
- Cattoir, V., Nordmann, P.** 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* **16**, 1028-1046.
- Chai, S. J., White, P. L., Lathrop, S. L., Solghan, S. M., Medus, C., McGlinchey, B. M., Tobin-D'Angelo, M., Marcus, R., Mahon, B. E.** 2012. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: increasing incidence of domestically acquired infections. *Clin Infect Dis* **54**, 488-497.
- Chapman, J. S., Georgopapadakou, N. H.** 1988. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 438-442.
- Chiaretto, G., Zavagnin, P., Bettini, F., Mancin, M., Minorello, C., Saccardin, C., Ricci, A.** 2008. Extended spectrum beta-lactamase SHV-12-producing *Salmonella* from poultry. *Vet Microbiol* **128**, 406-413.
- Chiu, C.H., Ou, J.T.** 1996. Rapid identification of *Salmonella* serotypes in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* **34**, 2619-2622.
- Chopra, I.** 1994. Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 637-640.
- Chopra, I., Roberts, M.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 232-260.
- Chu, C., Chiu, C. H.** 2006. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. *Microbes Infect* **8**, 1931-1936.
- Chu, C., Doublet, B., Lee, Y. L., Cloeckert, A., Chiou, C. S., Chen, S. W., Lin, C. W., Chiu, C. H.** 2012. *Salmonella* genomic island 1-J variants associated with change in the antibiotic resistance gene cluster in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *Virchow* isolated from humans, Taiwan, 2004–2006. *Clin Microbiol Infect* **18**, 47-53.

- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eighteenth informational supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Cohen, S. P., McMurry, L. M., Hooper, D. C., Wolfson, J. S., Levy, S. B.** 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (*Mar*) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to *OmpF* reduction. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 1318-1325.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M.** 2011. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* **6**, e17549.
- Cooke, F. J., Brown, D. J., Fookes, M. Pickard, D., Ivens, A., Wain, J., Roberts, M., Kingsley, R.A., Thomson, N.R., Dougan, G.** 2008. Characterization of the genomes of a diverse collection of *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium definitive phage type 104. *J Bacteriol* **190**, 8155-8162.
- Coque, T. M., Oliver, A., Pérez-Díaz, J. C., Baquero, F., Cantón, R.** 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 500-510.
- Coque, T. M., Baquero, F., Cantón, R.** 2008a. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* **13**.
- Coque, T. M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., Nordmann, P.** 2008b. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* **14**, 195-200.
- Corral, J. L., Perea, E. J.** 1992. *Salmonella*. Barcelona: Ed. Dogma.
- Cottell, J. L., Webber, M. A., Piddock, L. J. V.** 2012. Persistence of transferable extended-spectrum-beta-lactamase resistance in the absence of antibiotic pressure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 4703-4706.
- Curiao, T., Machado, E., Peixe, L., Cantón, R., Baquero, F., Coque, T.** 2008. Diversity of *sul* genes (*sul1*, *sul2* and *sul3*) among human clinical Enterobacteriaceae isolates recovered during the last two decades in Spain (1988-2006). *18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain*.
- Dahlberg, C., Chao, L.** 2003. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics* **165**, 1641-1649.
- Darwin, K. H., Miller, V. L.** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* **12**, 405-428.
- De Gelder, L., Williams, J. J., Ponciano, J. M., Sota, M., Top, E. M.** 2008. Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. *Genetics* **178**.

- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., Díaz-Orejas, R.** 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 434-464.
- del Solar, G., Espinosa, M.** 2000. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* **37**, 492-500.
- Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H., Mevius, D.** 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol* **145**, 273-278.
- Dmowski, M.** 2009. Perfect Inheritance. *Academia, the magazine of the Polish Academy of Sciences* **2**, 8-11.
- Doran, J.L., Collinson, S.K., Burian, J., Sarlos, G., Todd, E.C., Munro, C.K., Kay, C.M., Banser, P.A., Peterkin, P.I., Kay, W.W.,** 1993. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin aggregative fimbriae. *J Clin Microbiol* **31**, 2263-2273.
- Douard, G., Praud, K., Cloeckaert, A., Doublet, B.** 2010. The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in *trans* by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *PLoS One* **5**, e15302.
- Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M. R., Cloeckaert, A.** 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol Microbiol* **55**, 1911-1924.
- Doublet, B., Golding, G. R., Mulvey, M. R., Cloeckaert, A.** 2008. Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. *PLoS One* **3**, e2060.
- Drawz, S. M., Bonomo, R. A.** 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* **23**, 160-201.
- Díaz, M. A., Hernández-Bello, J. R., Rodríguez-Baño, J., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Blanco, J., Pascual, A.** 2010. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol* **48**, 2840-2845.
- Eckert, C., Gautier, V., Arlet, G.** 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother* **57**, 14-23.
- Eckert, C., Gautier, V., Saladin-Allard, M., Hidri, N., Verdet, C., Ould-Hocine, Z., Barnaud, G., Delisle, F., Rossier, A., Lambert, T., Philippon, A., Arlet, G.** 2004. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1249-1255.
- Ehrbar, K., Hardt, W. D.** 2005. Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serotipo Typhimurium. *Infect Genet Evol* **5**, 1-9.
- Ellington, M. J., Woodford, N.** 2006. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? *J Antimicrob Chemother* **57**, 1026-1029.

- Engelberg-Kulka, H., Glaser, G.** 1999. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* **53**, 43-70.
- Errecalde, J. O.** 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Edited by F. P. y. S. Animal. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** 2010. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** 2012a. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal* **10**, 2598-2831.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** 2012b. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* **10**, 2597-3039.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, 2013. <http://www.eucast.org>.
- European Food Safety Authority (EFSA).** 2010. Scientific opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "Salmonella Typhimurium-like" strains. *EFSA Journal* **8**, 1826-1874.
- Fabre, L., Delauné, A., Espié, E., Nygard, K., Pardos, M., Polomack, L., Guesnier, F., Galimand, M., Lassen, J., Weill, F.X.** 2009. Chromosomal integration of the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>* in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1808-1816.
- Feng, Y., Liu, J., Li, Y. G., Cao, F. L., Johnston, R. N., Zhou, J., Liu, G. R., Liu, S. L.** 2012. Inheritance of the *Salmonella* virulence plasmids: mostly vertical and rarely horizontal. *Infect Genet Evol* **12**, 1058-1063.
- Fernández-López, R., Garcillán-Barcia, M., Revilla, C., Lázaro, M., Vielva, L., de la Cruz, F.** 2006. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 942-966.
- Fluit, A. C.** 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**, 1-11.
- Folster, J. P., Pecic, G., McCullough, A., Rickert, R., Whichard, J. M.** 2011. Characterization of *bla<sub>CMY</sub>*-encoding plasmids among *Salmonella* isolated in the United States in 2007. *Foodborne Pathog Dis* **8**, 1289-1294.
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., de la Cruz, F.** 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 79-100.

- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A.** 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**, 722-732.
- Fábrega, A., du Merle, L., Le Bouguéneq, C., Jiménez de Anta, M. T., Vila, J.** 2009. Repression of invasion genes and decreased invasion in a high-level fluoroquinolone-resistant *Salmonella* Typhimurium mutant. *PLoS One* **4**, e8029.
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., de la Cruz, F.** 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 657-687.
- Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A., de la Cruz, F.** 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 936-956.
- García, A., Navarro, F., Miró, E., Villa, L., Mirelis, B., Coll, P., Carattoli, A.** 2007. Acquisition and diffusion of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **271**, 71-77.
- García-Fernández, A., Chiaretto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., Carattoli, A.** 2008. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* **61**, 1229-1233.
- García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., Carattoli, A.** 2009. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* **63**, 274-281.
- García-Fernández, A., Carattoli, A.** 2010. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **65**, 1155-1161.
- García-Fernández, A., Villa, L., Moodley, A., Hasman, H., Miriagou, V., Guardabassi, L., Carattoli, A.** 2011. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J Antimicrob Chemother* **66**, 1987-1991.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G.** 2004. Taxonomic outline of Prokariotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 79-122. Editado por Springer-Verlag. New York.
- Gautom, R.K.** 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* **35**, 2977-2980.
- Gerdes, K., Christensen, S. K., Lobner-Olesen, A.** 2005. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**, 371-382.
- Giraud, E., Cloeckert, A., Baucheron, S., Mouline, C., Chaslus-Dancla, E.** 2003. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium. *J Med Microbiol* **52**, 697-703.

- Giraud, E., Baucheron, S., Cloeckaert, A.** 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect* **8**, 1937-1944.
- Giske, C.G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D.L., Cantón, R., Walsh, T. R.** 2009. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* **63**, 1-4.
- Gledel, J.** 1995. En *Microbiología Alimentaria*, pp. 52-66. Editado por J. F. M. y J. Z. C.M. Bourgeois. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Godwin, D., Slater, J.H.** 1979. The influence of the growth environment on the stability of a drug resistance plasmid in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* **111**, 201-210.
- González-Sanz, R., Herrera-León, S., de la Fuente, M., Arroyo, M., Echeita, M.A.** 2009. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC-type beta-lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *J Antimicrob Chemother* **64**, 1181-1186.
- Griggs, D.J., Gensberg, K., Piddock, L.J.** 1996. Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1009-1013.
- Grimont, F., Weill, F.X.** 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serotipos. <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referenc-et-centres-collaborateurs-de-l-oms>: WHO-Institute Pasteur.
- Groisman, E. A.** 1998. The ins and outs of virulence gene expression: Mg<sup>2+</sup> as a regulatory signal. *Bioessays* **20**, 96-101.
- Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J.M., Olsen, J.E., Dalsgaard, A.** 2000. Distribution and *in-vitro* transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol* **49**,929-936.
- Guerra, B., Laconcha, I., Soto, S.M., González-Hevia, M.A., Mendoza, M.C.** 2000. Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol Lett* **190**, 341-347.
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R., Mendoza, M.C.** 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2977-2981.
- Guerra, B., Junker, E., Helmuth, R.** 2004. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2712-2715.
- Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F., Rocha, E.P.** 2011. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet* **7**, e1002222.

- Guérin, E., Cambray, G., Sánchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., González-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.C., Mazel, D.** 2009. The SOS response controls integron recombination. *Science* **324**, 1034.
- Guérin, E., Jové, T., Tabesse, A., Mazel, D., Ploy, M.C.** 2011. High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons. *J Bacteriol* **193**, 5675-5682.
- Güerri, M.L.** 2002. Tesis doctoral: Estudio de la resistencia a antibióticos beta-lactámicos en aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium. Universidad Complutense de Madrid.
- Güerri, M.L., Aladueña, A., Echeita, A., Rotger, R.** 2004. Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. *Int J Antimicrob Agents* **24**, 327-333.
- Hammerl, J.A., Beutlich, J., Hertwig, S., Mevius, D., Threlfall, E.J., Helmuth, R., Guerra, B.** 2010. pSGI15, a small ColE-like *qnrB19* plasmid of a *Salmonella enterica* serotipo. In *J Antimicrob Chemother*, pp. 173-175. England.
- Hauser, E., Tietze, E., Helmuth, R., Junker, E., Blank, K., Prager, R., Rabsch, W., Appel, B., Fruth, A., Malorny, B.** 2010. Pork contaminated with *Salmonella enterica* serotipo 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4601-4610.
- Hawkey, P.M.** 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother* **51**, 29-35.
- Hayes, F.** 2003. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* **301**, 1496-1499.
- Hendriksen, R.S., Vieira, A.R., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D.M., Jensen, A.B., Wegener, H. C., Aarestrup, F.M.** 2011. Global monitoring of *Salmonella* serotipo distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* **8**, 887-900.
- Hensel, M.** 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**, 95-102.
- Herrera-León, S., González-Sanz, R., Rodríguez, I., Rodicio, M.R., Echeita, M.A.** 2010. Spread of a multiresistant CTX-M-9-producing *Salmonella enterica* serotype Virchow phage type 19 in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**, 901-905.
- Herrero, A., Rodicio, R., González-Hevia, M.A., Mendoza, M.C.** 2006. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *J Antimicrob Chemother* **57**, 39-45.
- Herrero, A., Mendoza, M.C., Rodicio, R., Rodicio, M.R.** 2008a. Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4514-4517.

- Herrero, A., Rodicio, M. R., Echeita, M.A., Mendoza, M.C. 2008b. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): a new multidrug-resistant group endemic in Spain. *Int J Med Microbiol* **298**, 253-261.
- Herrero, A., Mendoza, M.C., Threlfall, E.J., Rodicio, M.R. 2009. Detection of *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**, 1087-1093.
- Hopkins, K.L., Liébana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E.J., Carattoli, A. 2006. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3203-3206.
- Hopkins, K.L., Kirchner, M., Guerra, B., Granier, S.A., Lucarelli, C., Porrero, M.C., Jakubczak, A., Threlfall, E.J., Mevius, D.J. 2010. Multiresistant *Salmonella enterica* serotipo 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill* **15**, 19580.
- Hossain, A., Reisbig, M.D., Hanson, N.D. 2004. Plasmid-encoded functions compensate for the biological cost of AmpC overexpression in a clinical isolate of *Salmonella* Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* **53**, 964-970.
- Hradecka, H., Karasova, D., Rychlik, I. 2008. Characterization of *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium conjugative plasmids transferring resistance to antibiotics and their interaction with the virulence plasmid. In *J Antimicrob Chemother*, pp. 938-941. England.
- Hsu, Y.M., Tang, C.Y., Lin, H., Chen, Y.H., Chen, Y.L., Su, Y.H., Chen, D.S., Lin, J.H., Chang, C.C. 2012. Comparative study of class 1 integron, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various *Salmonella* serotipos from humans and animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*.
- Huehn, S., La Ragione, R.M., Anjum, M., Saunders, M., Woodward, M.J., Bunge, C., Helmuth, R., Hauser, E., Guerra, B., Beutlich, J., Brisabois, A., Peters, T., Svensson, L., Madajczak, G., Litrup, E., Imre, A., Herrera-León, S., Mevius, D., Newell, D.G., Malorny, B. 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serotipos relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog Dis* **7**, 523-535.
- Hughes, D., Andersson, D.I. 2012. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol*.
- Humphries, R.M., Fang, F.C., Aarestrup, F.M. & Hindler, J.A. 2012. In vitro susceptibility testing of fluoroquinolone activity against *Salmonella*: recent changes to CLSI standards. *Clin Infect Dis* **55**, 1107-1113.
- Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Van Duyne, M.S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T., Ribot, E. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol* **43**, 1045-1050.

- Ibarra, J. A., Steele-Mortimer, O. 2009. *Salmonella*: the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol* **11**, 1579-1586.
- Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) 2009. Infecciones por *Salmonella* no tifoidea de origen humano en España. Sistema de información Microbiológica. Años 2000-2008. *Boletín epidemiológico semanal* **17**, 193-204.
- Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) 2011. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. España. Año 2010. *Boletín epidemiológico semanal* **19**, 100-116.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., Wang, M. 2008. *qnr* Gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2297-2299.
- Jacoby, G.A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **22**, 161-182.
- Jacoby, G.A., Griffin, C.M., Hooper, D.C. 2011. *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* Alleles. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4979-4984.
- Johnson, T.J., Shepard, S.M., Rivet, B., Danzeisen, J.L., Carattoli, A. 2011. Comparative genomics and phylogeny of the Inc11 plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid* **66**, 144-151.
- Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M.C. 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet* **6**, e1000793.
- Kado, C.I., Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* **145**: 1365-73.
- Kanjilal, S.D., Dutta, A., Mondal, R.K., Chakravorti, S. 2006. Uncomplicated falciparum malaria complicated with *Salmonella* septicaemia: cause not coincidence. *J Indian Med Assoc* **104**: 646-648.
- Kehrenberg, C., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., Schwarz, S. 2007. Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1*-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193. *J Antimicrob Chemother* **60**, 903-905.
- Kelly, B.G., Vespermann, A., Bolton, D.J. 2009. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* **47**, 951-968.
- Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E.C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. 2009. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3582-3584.
- Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Thomson, N.R. Kariuki, S., Holt, K.E., Gordon, M.A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M.E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C.A., Heyderman, R.S., Dougan, G. 2009. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Res* **19**, 2279-2287.

- Kiss, J., Nagy, B., Olsz, F. 2012. Stability, entrapment and variant formation of *Salmonella* genomic island 1. *PLoS One* **7**, e32497.
- Kong, K.F., Schneper, L., Mathee, K. 2010. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* **118**, 1-36.
- Krauland, M.G., Marsh, J.W., Paterson, D.L., Harrison, L.H. 2009. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis* **15**, 388-396.
- Kües, U., Stahl, U. 1989. Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **53**, 491-516.
- Lan, R., Reeves, P.R., Octavia, S. 2009. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol* **9**, 996-1005.
- Lartigue, M.F., Poirel, L., Nordmann, P. 2004. Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol Lett* **234**, 201-207.
- Leavitt, A., Chmelnitsky, I., Colodner, R., Ofek, I., Carmeli, Y., Navon-Venezia, S. 2009. Ertapenem resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* **47**, 969-974.
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D. F. Giske, C.G., Heisig, P., Macgowan, A.P., Mouton, J.W., Nordmann, P., Rodloff, A.C., Rossolini, G.M., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Winstanley, T.G., Kahlmeter, G. 2011. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*.
- Lee, C.A., Babic, A., Grossman, A.D. 2010. Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. *Mol Microbiol* **75**, 268-279.
- Lepiae, R., Hebrant, A., Wodak, S. J., Toussaint, A. 2004. ACLAME: A CLAssification of Mobile genetic Elements. *Nucleic Acids Res* **32**, D45-49.
- Lepiae, R., Lima-Mendez, G., Toussaint, A. 2006. A first global analysis of plasmid encoded proteins in the ACLAME database. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 980-994.
- Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage, R.P. 1962. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* **91**, 1063-1065.
- Lévesque, C., Roy, P.H. 1993. PCR analysis of integrons, pp. 590-594. D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Levings, R.S., Partridge, S.R., Djordjevic, S.P., Hall, R.M. 2007. SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serotipo Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 317-323.
- Lindstedt, B.A., Heir, E., Nygard, I., Kapperud, G. 2003. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J Med Microbiol* **52**, 141-149.

- Litrup, E., Torpdahl, M., Malorny, B., Huehn, S., Christensen, H., Nielsen, E.M.** 2010. Association between phylogeny, virulence potential and serotipos of *Salmonella enterica*. *Infect Genet Evol* **10**, 1132-1139.
- Liébana, E., Gibbs, M., Clouting, C. Barker, L., Clifton-Hadley, F.A., Pleydell, E., Abdalhamid, B., Hanson, N.D., Martin, L., Poppe, C., Davies, R.H.** 2004. Characterization of beta-lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains from food-producing animals in the United Kingdom. *Microb Drug Resist* **10**, 1-9.
- Liu, J., Keelan, P., Bennett, P.M., Enne, V.I.** 2009. Characterization of a novel macrolide efflux gene, *mef(B)*, found linked to *sul3* in porcine *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **63**, 423-426.
- Llanes, C., Kirchgessner, V. Plesiat, P.** 1999. Propagation of TEM- and PSE-type beta-lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2430-2436.
- Llosa, M., Gomis-Ruth, F.X., Coll, M., de la Cruz, F.** 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**, 1-8.
- Lucarelli, C., Dionisi, A.M., Torpdahl, M., Villa, L., Graziani, C., Hopkins, K., Threlfall, J., Caprioli, A., Luzzi, I.** 2010. Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. *J Clin Microbiol* **48**, 2103-2109.
- Lucarelli, C., Dionisi, A.M., Filetici, E., Owczarek, S., Luzzi, I., Villa, L.** 2012. Nucleotide sequence of the chromosomal region conferring multidrug resistance (R-type ASSuT) in *Salmonella* Typhimurium and monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. *J Antimicrob Chemother* **67**, 111-114.
- Ly, K. T., Casanova, J.E.** 2007. Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cell Microbiol* **9**, 2103-2111.
- Ma, L., Lin, C.J., Chen, J.H., Fung, C.P., Chang, F.Y., Lai, Y.K., Lin, J.C., Siu, L.K.** 2009. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 104-111.
- Madec, J. Y., Poirel, L., Saras, E., Gourguechon, A., Girlich, D., Nordmann, P., Haenni, M.** 2012. Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother* **67**, 578-581.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J.** 1998. *Brock, Biología de los Microorganismos*, 8ª Edición. Madrid: Prentice Hall Iberia.
- Madsen, L., Aarestrup, F.M., Olsen, J.E.** 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. *Vet Microbiol* **75**, 73-82.

- Malik, H.S., Henikoff, S.** 2009. Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* **138**, 1067-1082.
- Malorny, B., Hauser, E., Dieckmann, R.** 2011. New approaches in subspecies-level *Salmonella* classification. En *Salmonella: From Genome to Function*, pp. 1-23. Editado por S. Porwollik. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., Finlay, B.B.** 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* **2**, 145-156.
- Martín, O., Valverde, A., Morosini, M.I., Rodríguez-Domínguez, M., Rodríguez-Baños, M., Coque, T.M., Cantón, R., del Campo, R.** 2010. Population analysis and epidemiological features of inhibitor-resistant-TEM-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from both community and hospital settings in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol* **48**, 2368-2372.
- Martínez, J.L.** 2011. Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Front Microbiol* **2**, 265.
- Martínez Álvarez, N.** 2007. Tesis Doctoral: Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Universidad de Oviedo.
- Martínez, J.L., Baquero, F., Andersson, D.I.** 2011. Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr Opin Pharmacol* **11**, 439-445.
- Martínez, J.L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernández, Á., Linares, J.F., Martínez-Solano, L., Sánchez, M.B.** 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* **33**, 44-65.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**, 797-799.
- Martínez-Martínez, L., Eliecer Cano, M., Manuel Rodríguez-Martínez, J., Calvo, J., Pascual, A.** 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* **6**, 685-711.
- Martínez-Martínez, L., Ruiz de Alegría, C.** 2009. *Escherichia coli* resistente a gentamicina y sensible a amikacina. En *Atlas del Antibiograma*, pp. 141-143. Editado por J. I. Alós, R. Cantón, L. Martínez-Martínez & J. Vila: Biomérieux University.
- Marín, M., Gudiol, F.** 2003. Beta-Lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**, 42-55.
- Mata, C., Miró, E., Mirelis, B., Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F., Coll, P., Navarro, F.** 2010. *In vivo* transmission of a plasmid coharbouring *bla* and *qnrB* genes between *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett* **308**, 24-28.
- Mataseje, L.F., Baudry, P.J., Zhanel, G.G., Morck, D.W., Read, R.R., Louie, M., Mulvey, M. R.** 2010. Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* **67**, 387-391.

- Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J.** 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3214-3221.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J.** 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1568-1574.
- McGhie, E.J., Brawn, L.C., Hume, P.J., Humphreys, D., Koronakis, V.** 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* **12**, 117-124.
- Meakins, S., Fisher, I.S.T., Berghold, C. Gerner-Smidt, P., Tschäpe, H., Cormican, M., Luzzi, I., Schneider, F., Wannett, W., Coia, J., Echeita, A., Threlfall, E.J.** 2008. Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: A report from the Enter-net international surveillance network. *Microbial Drug Resistance* **14**.
- Mella, S.M., Acuña, G., Muñoz, M., Pérez, C., Labarca, J., González, G., Bello, H., Domínguez, M., Zemelman, R.** 2000. Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Revista Chilena de Infectología* **17**, 53-66.
- Mendoza, M.C., Herrero, A., Rodicio, M. R.** 2009. Evolutionary engineering in *Salmonella*: emergence of hybrid virulence-resistance plasmids in non-typhoid serotypes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**, 37-43.
- Michael, G.B., Butaye, P., Cloeckert, A., Schwarz, S.** 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. In *Microbes Infect*, pp. 1898-1914. France.
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R.** 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serotypes of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chemother* **56**, 1025-1033.
- Miriagou, V., Carattoli, A., Fanning, S.** 2006. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect* **8**, 1923-1930.
- Miold, S., Rabsch, W., Tschäpe, H., Hardt, W. D.** 2001. Transfer of the *Salmonella* type III effector *sopE* between unrelated phage families. *J Mol Biol* **312**, 7-16.
- Moller-Jensen, J., Gerdes, K.** 2007. Plasmid segregation: spatial awareness at the molecular level. *J Cell Biol* **179**, 813-815.
- Morosini, M.I., Ayala, J.A., Baquero, F., Martínez, J.L., Blázquez, J.** 2000. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3137-3143.
- Morosini, M.I., Loza, E., del Campo, R., Almaraz, F., Baquero, F., Cantón, R.** 2003. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Spain: activities of garenoxacin against clinical isolates including strains with altered topoisomerases. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2692-2695.

- Mossel, D., Moreno, B., Struijk, C. 2002. En *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B., Cloeckert, A. 2006. The genetics of *Salmonella* Genomic Island 1. *Microbes Infect* **8**, 1915-1922.
- Muniesa, M., García, A., Miró, E., Mirelis, B., Prats, G., Jofre, J., Navarro, F. 2004. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg Infect Dis* **10**, 1134-1137.
- Navia, M.M., Ruiz, J., Sánchez-Céspedes, J., Vila, J. 2003. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis* **46**, 295-298.
- Ng, L.K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G.A., Johnson, W. 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serotipo Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 3018-3021.
- Nordmann, P., Poirel, L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* **56**, 463-469.
- Novais, A., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galán, J.C., Peixe, L., Carattoli, A., Baquero, F., Coque, T.M. 2006. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from *Tn402* located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2741-2750.
- Nugent, R., Back, E., Beith, A. 2010. The race against drug resistance. En *When medicine fail, a global push to fight drug resistance*. Editado por C. f. G. D. s. D. R. W. Group: Center for Global Development's Drug Resistance Working Group.
- O'Regan, E., Quinn, T., Frye, J.G., Pagès, J.M., Porwollik, S., Fedorka-Cray, P.J., McClelland, M., Fanning, S. 2010. Fitness costs and stability of a high-level ciprofloxacin resistance phenotype in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: reduced infectivity associated with decreased expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 367-374.
- Oliver, A., Pérez-Díaz, J.C., Coque, T.M., Baquero, F., Cantón, R. 2001. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 616-620.
- Oliver, A., Coque, T.M., Alonso, D., Valverde, A., Baquero, F., Cantón, R. 2005. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1567-1571.
- Ortega, A., Oteo, J., Aranzamendi-Zaldumbide, M., Bartolomé, R.M., Bou, G., Cercenado, E., Conejo, M.C., González-López, J.J., Marín, M., Martínez-Martínez, L., Merino, M., Navarro, F., Oliver, A., Pascual, A., Rivera, A., Rodríguez-Baño, J., Weber, I., Aracil, B., Campos, J. 2012. Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 3576-3581.
- Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M.M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., Rossolini, G.M. 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-

- lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* **41**, 4264-4269.
- Paiva de Sousa, C., Dubreuil, J.D.**, 2001. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* **291**, 15-20.
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Riccobono, E., Fernández, C., Mantella, A., Magnelli, D., Mannini, D., Strohmeyer, M., Bartalesi, F., Rodríguez, H., Gotuzzo, E., Rossolini, G.M.** 2012. Quinolone resistance in absence of selective pressure: the experience of a very remote community in the Amazon forest. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1790.
- Pardos de la Gándara, M., Seral, C., Castillo García, J., Rubio Calvo, C., Weill, F.X.** 2011. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella enterica* isolates in Saragossa, Spain (2001-2008). *Microb Drug Resist* **17**, 207-213.
- Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D., Hooper, D.C.** 2006. Prevalence in the United States of *aac(6')*-*lb-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3953-3955.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 757-784.
- Partridge, S.R.** 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **35**, 820-855.
- Pasmans, F., Van Immerseel, F., Heyndrickx, M., Martel, A., Godard, C., Wildemauwe, C., Ducatelle, R., Haesebrouck, F.**, 2003. Host adaptation of pigeon isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium variant Copenhagen phage type 99 is associated with enhanced macrophage cytotoxicity. *Infect Immun* **71**, 6068-6074.
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**, 657-686.
- Pérez-Pérez, F.J., Hanson, N.D.** 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **40**, 2153-2162
- Perreten, V., Boerlin, P.** 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1169-1172.
- Petersen, A., Aarestrup, F.M., Olsen, J.E.** 2009. The *in vitro* fitness cost of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* varies with the growth conditions. *Fems Microbiology Letters* **299**.
- Petska, J. J., Witt, M. F.** 1985. An overview of immune function. *Food Technology* **39**, 83-90.
- Pires, S.M., de Knecht, L., Hald, T.** 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Editado por DTU National Food Institute & European Food Safety Authority (EFSA).

- Pitout, J.D., Thomson, K.S., Hanson, N.D., Ehrhardt, A.F., Moland, E.S., Sanders, C.C. 1998. Beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1350-1354.
- Poirel, L., Guibert, M., Bellais, S., Naas, T., Nordmann, P. 1999. Integron- and carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 from French patients. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1098-1104.
- Poirel, L., Rodríguez-Martínez, J.M., Mammeri, H., Liard, A., Nordmann, P. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrA*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3523-3525.
- Poirel, L., Pitout, J.D., Calvo, L., Rodríguez-Martínez, J.M., Church, D., Nordmann, P. 2006. *In vivo* selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1525-1527.
- Poirel, L., Cattoir, V., Soares, A., Soussy, C.J., Nordmann, P. 2007. Novel Ambler class A beta-lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrS1*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 631-637.
- Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P. 2012. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol* **3**, 24.
- Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**, 12-26.
- Prager, R., Fruth, A., Tschäpe, H. 1995. *Salmonella* enterotoxin (*stn*) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Immunol Med Microbiol* **12**, 47-50.
- Prager, R., Miroid, S., Tietze, E., Strutz, U., Knüppel, B., Rabsch, W., Hardt, W. D., Tschäpe, H. 2000. Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **290**, 605-617.
- Pérez-Moreno, M.O., Centelles-Serrano, M.J., Cortell-Ortolá, M., Ruiz, J., Llovet-Lombarte, M.I., Jardí-Baiges, A.M., Fort-Gallifa, I. 2009. 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* **34**, 381-383.
- Pérez-Moreno, M.O., Centelles-Serrano, M.J., Cortell-Ortolá, M., Fort-Gallifa, I., Ruiz, J., Llovet-Lombarte, M.I., Picó-Plana, E., Jardí-Baiges, A.M. 2011. Molecular epidemiology and resistance mechanisms involved in reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a chronic care centre. *Int J Antimicrob Agents* **37**, 462-466.
- Pérez-Moreno, M.O., Estepa, V., Sáenz, Y., Cortell-Ortolá, M., Fort-Gallifa, I., Ruiz, J., Torres, C. 2012. Intrahospitalary dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying

*bla*<sub>DHA-1</sub> and *qnrB4* genes within a novel complex class 1 integron. *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**, 210-211.

**Quiroga, M.P., Andrés, P., Petroni, A., Soler-Bistué, A.J., Guerriero, L., Vargas, L.J., Zorreguieta, A., Tokumoto, M., Quiroga, C., Tolmasky, M.E., Galas, M., Centrón, D.** 2007. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6<sup>1</sup>)-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with *ISCR1* in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4466-4470.

**Rabsch, W., Truepschuch, S., Windhorst, D., Gerlach, R.G.** 2011. Typing phages and prophages of *Salmonella*. En *Salmonella: From Genome to Function*, pp. 25-47. Editado por S. Porwollik. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

**Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Tukel, C., Akcelik, M., Bäumlér, A. J.** 2006. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* **74**, 19-27.

**Ramírez, M.S., Tolmasky, M.E.** 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* **13**, 151-171.

**Riaño, I., García-Campello, M., Sáenz, Y., Álvarez, P., Vinué, L., Lantero, M., Moreno, M. A., Zarazaga, M., Torres, C.** 2009. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clin Microbiol Infect* **15**, 292-295.

**Rivoal, K., Protais, J., Quéquiner, S., Boscher, E., Chidaine, B., Rose, V., Gautier, M., Baron, F., Grosset, N., Ermel, G., Salvat, G.** 2009. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs. *Int J Food Microbiol* **129**, 180-186.

**Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guédon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J.I., Smith, C.J., Summers, A.O., Tsuda, M., Berg, D.E.** 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* **60**, 167-173.

**Roberts, M.C.** 2002. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol Biotechnol* **20**, 261-283.

**Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K., Hooper, D.C.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* **12**, 83-88.

**Rodicio, M.R., Herrero, A., Rodríguez, I., García, P., Montero, I., Beutlich, J., Rodicio, R., Guerra, B., Mendoza, M.C.** 2011. Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoidal serotypes of *Salmonella enterica*. *Rev Med Microbiol* **22**, 55-65.

**Rodríguez, I., Rodicio, M.R., Herrera-León, S., Echeita, A., Mendoza, M.C.** 2008. Class 1 integrons in multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002 and 2004. *Int J Antimicrob Agents* **32**, 158-164.

- Rodríguez, I., Barownick, W., Helmuth, R., Mendoza, M. C., Rodicio, M.R., Schroeter, A., Guerra, B. 2009. Extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. *J Antimicrob Chemother* **64**, 301-309.
- Rodríguez, I., Guerra, B., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R. 2011. pUO-SeVR1 is an emergent virulence-resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis. *J Antimicrob Chemother* **66**, 218-220.
- Rodríguez, I., Rodicio, M.R., Guerra, B., Hopkins, K.L. 2012. Potential international spread of multidrug-resistant invasive *Salmonella enterica* serotipo enteritidis. *Emerg Infect Dis* **18**, 1173-1176.
- Rodríguez-Martínez, J.M. 2005. Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **23**, 25-31.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Cano, M.E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., Pascual, A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* **17**, 149-182.
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., Mazel, D. 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 652-657.
- Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D. 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol* **4**, 565-569.
- Rozhon, W.M., Petutschnig, E.K., Jonak, C. 2006. Isolation and characterization of pHW15, a small cryptic plasmid from *Rahnella*. *Plasmid* **56**, 202-215.
- Ruiz E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., Torres, C. 2012a. *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother* **67**, 886-897.
- Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* **51**, 1109-1117.
- Ruiz, J., Pons, M.J., Gomes, C. 2012b. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents* **40**, 196-203.
- Rychlik, I., Gregorova, D., Hradecka, H. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* **112**, 1-10.
- Sáenz, Y. 2004. Tesis Doctoral: Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* no patógenas de alimentos y de la microflora de humanos y animales. Universidad de La Rioja.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3996-4001.

- Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C. 2010. Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol* **144**, 493-497.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. 2003. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* **51**, 1001-1005.
- Saladin, M., Cao, V.T., Lambert, T., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., Arlet, G. 2002. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 161-168.
- Sánchez, M.B., Martínez, J.L. 2010. *SmQnr* contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 580-581.
- Sampei, G., Furuya, N., Tachibana, K., Saitou, Y., Suzuki, T., Mizobuchi, K., Komano, T. 2010. Complete genome sequence of the incompatibility group I1 plasmid R64. *Plasmid* **64**, 92-103.
- Schlumberger, M.C., Hardt, W.D. 2006. *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol* **9**, 46-54.
- Schmidt, H., Hensel, M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**, 14-56.
- Schultsz, C., Geerlings, S. 2012. Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*: changing landscape and implications for therapy. *Drugs* **72**, 1-16.
- Schumacher, M.A. 2007. Structural biology of plasmid segregation proteins. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 103-109.
- Sengupta, M., Austin, S. 2011. Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect Immun* **79**, 2502-2509.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* **57**, 138-163.
- Shaw, W.V. 1984. Bacterial resistance to chloramphenicol. *Br Med Bull* **40**, 36-41.
- Skold, O. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* **32**, 261-273.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P., de la Cruz, F. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 434-452.
- Soler, P., González-Sanz, R., Bleda, M.J., Hernández, G., Echeita, A., Usera, M.A. 2006. Antimicrobial resistance in non-typhoidal *Salmonella* from human sources, Spain, 2001-2003. *J Antimicrob Chemother* **58**, 310-314.

- Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbassi, M. S., Ruiz, E., Zarazaga, M., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C. 2011. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *Int J Food Microbiol* **144**, 497-502.
- Soufi, L., Sáenz, Y., de Toro, M., Abbassi, M.S., Rojo-Bezarez, B., Vinué, L., Bouchami, O., Touati, A., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C. 2012. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella enterica* recovered from poultry meat in Tunisia and identification of new genetic traits. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**, 10-16.
- Sousa, A., Magalhaes, S., Gordo, I. 2012. Cost of antibiotic resistance and the geometry of adaptation. *Mol Biol Evol* **29**, 1417-1428.
- Soto, S.M., Rodríguez, I., Rodicio, M.R., Vila, J., Mendoza, M.C. 2006. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *J Med Microbiol* **55**, 365-373.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.C. 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol* **3**, 119.
- Stapleton, P.D., Shannon, K.P., French, G.L. 1999. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1206-1210.
- Steward, C.D., Rasheed, J.K., Hubert, S.K., Biddle, J.W., Raney, P.M., Anderson, G.J., Williams, P.P., Brittain, K.L., Oliver, A., McGowan, J.E. Jr. Tenover, F.C. 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection methods. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2864-2872.
- Stone, G.G., Oberst, R.D., Hays, M.P., McVey, S., Chengappa, M. 1994. Detection of *Salmonella* serotipos from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J Clin Microbiol* **32**, 1742-1749.
- Stokes, H.W., Hall, R.M. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* **3**, 1669-1683.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* **22**, 664-689.
- Streckel, W., Wolff, A.C., Prager, R., Tietze, E., Tschäpe, H. 2004. Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1, and AvrA differ with systemic, enteric, and epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Mol Nutr Food Res* **48**, 496-503.
- Subbiah, M., Top, E.M., Shah, D.H., Call, D.R. 2011. Selection pressure required for long-term persistence of *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive IncA/C plasmids. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4486-4493.
- Sun, L., Kleyn, E.Y., Laxminarayan, R. 2012. Seasonality and temporal correlation between community antibiotic use and resistance in the United States. *Clinical Infectious Diseases* **55**, 687-694.

- Sunde, M., Norström, M.** 2006. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J Antimicrob Chemother* **58**, 741-747.
- Sunde, M., Solheim, H., Slette-meas, J.S.** 2008. Genetic linkage between class 1 integrons with the *dfrA12-orfF-aadA2* cassette array and *sul3* in *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **130**, 422-425.
- Suárez, C., Gudiol, F.** 2009. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **27**, 116-129.
- Tan, T.Y., Ng, L.S., He, J., Koh, T.H., Hsu, L.Y.** 2009. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 146-149.
- Targant, H., Doublet, B., Aarestrup, F.M., Cloeckert, A., Madec, J.Y.** 2010a. IS6100-mediated genetic rearrangement within the complex class 1 integron *In104* of the *Salmonella* Genomic Island 1. *J Antimicrob Chemother* **65**, 1543-1545.
- Targant, H., Ponsin, C., Brunet, C., Doublet, B., Cloeckert, A., Madec, J.Y., Meunier, D.** 2010b. Characterization of resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from diseased cattle in France (2002 to 2007). *Foodborne Pathog Dis* **7**, 419-425.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**, 2233-2239.
- Therrien, C., Levesque, R.C.** 2000. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 251-262.
- Theuretzbacher, U.** 2011. Resistance drives antibacterial drug development. *Current Opinion in Pharmacology* **11**, 433-438.
- Thomas, C.M.** 2000. Paradigms of plasmid organization. *Mol Microbiol* **37**, 485-491.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., Euzéby, J.P.** 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 521-524.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R.** 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 296-316.
- Toleman, M.A., Walsh, T.R.** 2011. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **35**.
- Torpdahl, M., Skov, M.N., Sandvang, D., Baggesen, D.L.** 2005. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods* **63**, 173-184.

- Torres, C., Moreno, M.Á., Zarazaga, M.** 2010. Prudent use of antimicrobial agents: not just for humans. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **28**, 669-671.
- Tosini, F., Visca, P., Luzzi, I., Dionisi, A.M., Pezzella, C., Petrucca, A., Carattoli, A.** 1998. Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3053-3058.
- Valverde, A., Cantón, R., Garcillán-Barcia, M.P., Novais, A., Galán, J.C., Alvarado, A., de la Cruz, F., Baquero, F., Coque, T.M.** 2009. Spread of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 5204-5212.
- van Asten, A.J., van Dijk, J.E.** 2005. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**, 251-259.
- van de Klundert, J.A., Vliegenthart, J.S.** 1993. Nomenclature of aminoglycoside resistance genes: a comment. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 927-928.
- van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.** 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* **2**, 203.
- Velasco, C., Rodríguez-Martínez, J.M., Briales, A., Díaz de Alba, P., Calvo, J., Pascual, A.** 2010. *Smaqr*, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* **65**, 239-242.
- Verdet, C., Benzerara, Y., Gautier, V., Adam, O., Ould-Hocine, Z., Arlet, G.** 2006. 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* **50**, 607-617.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R.**, 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**, 6823-6831.
- Vicente, D., Pérez-Trallero, E.** 2010. Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **28**, 122-130.
- Villa, L., Carattoli, A.** 2005. Integrons and transposons on the *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium virulence plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1194-1197.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., Carattoli, A.** 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* **65**, 2518-2529.
- Vinué, L.** 2010. Tesis Doctoral: Prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas y comensales de *Escherichia coli*. Universidad de La Rioja.
- Vinué, L., Lantero, M., Sáenz, Y., Somalo, S., de Diego, I., Pérez, F., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Torres, C.** 2008. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. *J Med Microbiol* **57**, 916-920.

- Vinué, L., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Olarte, I., Undabeitia, E., Somalo, S., Zarazaga, M., Torres, C. 2010. Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 492-496.
- Vinué, L., Jové, T., Torres, C., Ploy, M. C. 2011. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int J Antimicrob Agents* **38**, 526-529.
- Vo, A. T., van Duijkeren, E., Gaastra, W., Fluit, A.C. 2010. Antimicrobial resistance, class 1 integrons, and genomic island 1 in *Salmonella* isolates from Vietnam. *PLoS One* **5**, e9440.
- Wagner, A. 2006. Cooperation is fleeting in the world of transposable elements. *PLoS Comput Biol* **2**, e162.
- Waltner-Toews, R.I., Paterson, D.L., Qureshi, Z.A., Sidjabat, H.E., Adams-Haduch, J.M., Shutt, K.A., Jones, M., Tian, G.B., Pasculle, A.W., Doi, Y. 2011. Clinical characteristics of bloodstream infections due to ampicillin-sulbactam-resistant, non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and the role of TEM-1 hyperproduction. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 495-501.
- Wang, H., Dzik-Fox, J.L., Chen, M., Levy, S.B. 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1515-1521.
- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., Zhang, H., Wang, C., Liu, L., Xu, X., Wang, L., Shen, X. 2008. Presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infect Dis* **22**, 68.
- Wang, M., Jacoby, G.A., Mills, D.M. & Hooper, D.C. 2009. SOS regulation of *qnrB* expression. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 821-823.
- Wannaprasat, W., Padungtod, P., Chuanchuen, R. 2011. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *Int J Antimicrob Agents* **37**, 457-461.
- Way, J.S., Josephson, K.L., Pillai, S.D., Abbaszadegan, M., Gerba, C.P., Pepper, I.L. 1993. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1473-1479.
- Wei, Q., Jiang, X., Yang, Z., Chen, N., Chen, X., Li, G., Lu, Y. 2009. *dfrA27*, a new integron-associated trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **63**, 405-406.
- Weill, F. X., Lailier, R., Praud, K., Kerouanton, A., Fabre, L., Brisabois, A., Grimont, P. A., Cloeckaert, A. 2004. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol* **42**, 5767-5773.

- Weill, F.X., Guesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demartin, M., Polomack, L., Grimont, P.A.** 2006. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *J Clin Microbiol* **44**, 700-708.
- White, P.A., Mclver, C.J., Rawlinson W.D.** 2001. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2658-2661.
- Wozniak, R. A., Waldor, M.K.** 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* **8**, 552-563.
- Wu, J.J., Ko, W.C., Chiou, C.S., Chen, H.M., Wang, L.R., Yan, J.J.** 2008. Emergence of Qnr determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* **62**, 1269-1272.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Arakawa, Y.** 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1564-1566.
- Yim, G., Huimi Wang, H., Davies, J.** 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of Biological Sciences* **362**, 1195-1200.
- Yue, M., Rankin, S.C., Blanchet, R.T., Nulton, J.D., Edwards, R.A., Schifferli, D.M.** 2012. Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro- and microevolution. *PLoS One* **7**, e38596.

#### PÁGINAS WEB

- <http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html>
- <http://mlst.ucc.ie/dbs/Senterica>
- <http://data.euro.who.int/hfadb/>
- <http://www.lahey.org/qnrStudies>
- <http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMessenger.htm>
- <http://www.ebi.ac.uk>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.expasy.org/tools/dna.html>
- <http://pubmlst.org/plasmid/>
- <http://www.cdc.gov/pulsenet/>

***Anexos***



***Anexo I: Secuencias  
incluidas en Genbank***

## Anexo I: Secuencias incluidas en el Genbank

LOCUS W313 3045 bp DNA linear 31-MAR-2011  
DEFINITION Salmonella enterica serotipo Typhimurium W313 class 1 integron,  
partial cds.  
ACCESSION  
VERSION  
KEYWORDS .  
SOURCE Salmonella enterica subsp. enterica serotipo Typhimurium  
ORGANISM Salmonella enterica subsp. enterica serotipo Typhimurium  
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
Enterobacteriaceae; Salmonella.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 3045)  
AUTHORS de Toro,M., Saenz,Y., Cercenado,E., Rojo-Bezares,B.,  
Garcia-Campello,M., Undabeitia,E. and Torres,C.  
TITLE Characterization of class 1 integrons in Salmonella typhimurium  
strains  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 3045)  
AUTHORS de Toro,M., Saenz,Y., Cercenado,E., Rojo-Bezares,B.,  
Garcia-Campello,M., Undabeitia,E. and Torres,C.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (31-MAR-2011) Area Bioquímica y Biología Molecular,  
Universidad de La Rioja, Madre de Dios, 51, Logrono, La Rioja  
26006, Spain

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..3045  
/organism="Salmonella enterica subsp. enterica serotipo  
Typhimurium"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="W313"  
/serotipo="serotipo Typhimurium"  
/isolation\_source="human faecal sample"  
/sub\_species="enterica"  
/country="Spain"  
repeat\_region <1..>3045  
/mobile\_element="integron:class 1 integron"  
misc\_recomb 1..62  
/note="attI1 recombination site"  
misc\_recomb 56..62  
/note="core site"  
misc\_feature 57..1100  
/note="blaPSE-1 gene cassette"  
gene 126..992  
/gene="blaPSE-1"  
CDS 126..992  
/gene="blaPSE-1"  
/note="confers resistance to ampicillin"  
/codon\_start=1  
/product="PSE-1/CARB-2 beta-lactamase"  
/translation="MKFLLAFSLLIPSVVFASSSKFQQVEQDVKAIEVSLSARIGVSV  
LDTQNGEYWDYNGNQRFPLTSTFKTIACAKLLYDAEQGKVNPNSTVEIKKADLVTYSP  
VIEKQVGQAITLDDACFATMTSDNTAANIILSAVGGPKGVTDFLRQIGDKETRLDRI  
EPDLNEGKLGDLRDTTTPKAIASLTLNKFLFGSALSEMNQKLESWMVNNQVTGNLLRS  
VLPAGWNIADRSAGGFGARSITAVVWSEHQAPIIVSIYLAQTQASMAERNDAIVKIG  
HSIFDVYTSQSR"  
misc\_recomb 1100..1106  
/note="core site"  
misc\_feature 1101..>1556  
/note="qacEdelta1 gene cassette"  
gene 1151..1556  
/gene="qacEdelta1"  
-35\_signal 1151..1156  
/gene="qacEdelta1"  
-10\_signal 1175..1180  
/gene="qacEdelta1"  
RBS 1198..1201  
/gene="qacEdelta1"  
CDS 1209..1556  
/gene="qacEdelta1"  
/note="disrupted by sull gene"  
/codon\_start=1  
/product="quaternary ammonium compounds resistance  
protein"

```

/translation="MKGWLFLVIAIVGEVIATSALKSSEGFTKLAPSAVVIIGYGI AF
YFLSLVLKSI PVGVAYAVWSGLGVVITAI AWLLHGQKLD AWG FVGMGLIIA AFLLAR
SPSWKSLRRPTPW"
gene      1550..2389
          /gene="sull"
CDS       1550..2389
          /gene="sull"
          /note="confers sulphonamide resistance"
          /codon_start=1
          /product="Sull dihydropteroate synthase"
/translation="MVTVFGILNLTEDSFFDESRRLLDPAGAVTAAIEMLRVGSDVVDV
GPAASHDPARPVSPA DEIRRIAPLLDALSDQMHRV SIDSFQPETQRYALKRGVGYLND
IQGFPPALYPDIAEAD CRLVVMHSAQRDGIATRTGH LRPEDALDEIVRFFEARVSAL
RRSGVAADRLILD PGMGFLLSPAPETSLHVLSNLQKLSALGLPLLVSVSRKSF LGAT
VGLPVKDLGPASLAAELHAIGNGADYVRTHAPGDLRSAITFSETLAKFRSRDARDRGL
DHA"
gene      2517..>2603
          /gene="orf5"
CDS       2517..>2603
          /gene="orf5"
          /note="disrupted by IS6100 element"
          /codon_start=1
          /product="unknown, similar to puromycin
N-acetyltransferase protein"
/translation="MDSEPPNVRVACSGDIDEVVRLMHDA AA"
repeat_region 2604..>3045
          /mobile_element="insertion sequence:IS6100"
repeat_region 2604..2617
          /note="left inverted repeat"
          /rpt_type=inverted
gene      2635..>3045
          /gene="tnpA6100"
CDS       2635..>3045
          /gene="tnpA6100"
          /codon_start=1
          /product="TnpA, transposase of IS6100"
          /translation="MLGGDWTDTGMTDFKWRHFQGDVILWAVRWYCRYPI SYRDLEEM
LAERGISVDHTTIYRWVQCYAPEMEKRLRWFWRRGFDPSWRLDETYVVKVRGKWTYLYR
AVDKRGDTIDFYLSPTRSAKAAKRFLGKALRGLKH"
BASE COUNT      700 a      755 c      838 g      752 t

```

ORIGIN

```

1  tgatgttatg  gagcagcaac  gatgttacgc  agcagggcag  tcgccctaaa  acaaagttag
61  ccatattatg  gagcctcatg  cttttatata  aaatgtgtga  caatcaaaat  tatggggtta
121 cttacatgaa  gtttttattg  gcattttcgc  ttttaatacc  atccgtgggt  ttgcaagta
181 gttcaaaagt  tcagcaagtt  gaacaagacg  ttaaggcaat  tgaagtttct  ctttctgctc
241 gataggtgt  ttccgttctt  gatactcaaa  atggagaata  ttgggattac  aatggcaatc
301 agcgcttccc  gttacaagat  acttttaaaa  caatagcttg  cgctaaatta  ctatatgatg
361 ctgagcaag  aaaagttaat  cccaatagta  cagtcgagat  taagaagca  gatcttgatg
421 cctattcccc  tgtaatagaa  aagcaagtag  ggcaggcaat  cacactcgat  gatcgtgct
481 tcgcaactat  gactacaagt  gataaactg  cggcaaatat  catcctaagt  gctgtaggtg
541 gccccaaagg  gttactgat  tttttaagac  aaattgggga  caaagagact  cgtctagacc
601 gtattgagcc  tgatttaaat  gaaggaagc  tcgggtgatt  gagggatagc  acaactccta
661 aggcaatagc  cagtactttg  aataaatttt  tatttggttc  cgcgctatct  gaaatgaacc
721 agaaaaaatt  agagtcttgg  atggtgaaca  atcaagtcac  tggaatatta  ctacgttcag
781 tattgcgccc  gggatggaac  attgcggatc  gctcagggtg  tggcggatgt  ggtgctcggg
841 gtattacagc  agttgtgtgg  agtgagcatc  aagcccaat  tattgtgagc  atctatctag
901 ctcaaacaca  ggcttcaatg  gcagagcgaa  atgatcgcat  tgtaaaaatt  ggtcattcaa
961 tttttgacgt  ttatacatca  cagtcgcgct  gataaggcta  acaaggccat  caagttgacg
1021 gcttttccgt  cgcttgtttt  gtggtttaac  gctacgctac  cacaaaaaaa  tcaactccaa
1081 agccgcaact  tatggcggcg  ttagatgcac  taagcacata  attgctcaca  gccaaactat
1141 cagggtcaagt  ctgcttttat  tatttttaag  cgtgcataat  aagccctaca  caaattggga
1201 gatatatcat  gaaaggctgg  ctttttcttg  ttatcgcaat  agttggcgaa  gtaatcgcaa
1261 catccgcaat  aaaatctagc  gaggccttta  ctaagcttgc  cccttcgccc  gttgtcataa
1321 tcggttatgg  catcgcat  tattttcttt  ctctggttct  gaaatccatc  cctgtcggtg
1381 ttgcttatgc  agtctggtcg  ggactcggcg  tcgtcataat  tacagccatt  gcctgggtgc
1441 ttcattgggca  aaagcttgat  gcgtggggct  ttgtaggtat  ggggctcata  attgctgctt
1501 ttttgctcgc  ccatcccca  tcgtggaagt  cgctcgggag  gccgacgcca  tggtagcgtt
1561 gttcggcatt  ctgaatctca  ccgaggactc  cttcttcgat  gagagccggc  ggctagaccc
1621 cgcggcgct  gtcaccgctg  cgatcgaaat  gctcgcagtc  ggatcagacg  tcgtggatgt
1681 cggaccggcc  gccagccatc  cggacgcgag  gctgtatcgc  ccggccgatg  agatcagacg
1741 tattgcgccc  ccttagacg  ccctgtccga  tcagatgcac  cgtgtttcaa  tcgacgctt
1801 ccaaccggaa  acccagcgt  atgcgctcaa  gcgcggcgtg  ggctacctga  acgatatcca
1861 aggatttct  gaccctgctc  tctatcccga  tattgctgag  gcggactgca  ggctgggtgt
1921 tatgcactca  gcgcagcggg  atggcatcgc  caccgcacc  ggtcacttc  gaccogaaga
1981 cgcgctcgc  gagattgtgc  ggttcttcga  ggcgcgggtt  tccgcttgc  gacggagcgg
2041 ggtcgtgccc  gaccggctca  tcctcgatcc  ggggatggga  tttttcttga  gcccccgcacc

```

2101 ggaaacatcg ctgcacgtgc tgtcgaacct tcaaaagctg aagtcggcgt tggggcttcc  
2161 gctattggtc tcggtgtcgc ggaaatcctt cttgggcgcc accggttgcc ttctgtaaa  
2221 ggatctgggt ccagcagacc ttgcggcgga acttcacgcy atcggcaatg gcgctgacta  
2281 cgtccgcacc cacgcgcctg gagatctgcy aagcgcacac accttctcgg aaacctcgc  
2341 gaaatctcgc agtcgcgacg ccagagaccg agggttagat catgcctagc attcaccttc  
2401 cggccgcccg ctacgggacc ctggtcaggc tccgcgaagg tgggcgcaga catgctgggc  
2461 tcgtcaggat caaactgcac tatgagcgcy cggttcatac cgcgccaggy gagcgaatgy  
2521 acagcagagga gcctccgaac gttcgggtcgy cctgctcggg tgatatcgac gaggttgtyc  
2581 ggctgatgca cgacgctcgy gcgggctcgy ttgcaaaaat cgtgaagctt gagcatgctt  
2641 ggcggagatt ggacgggagc aacgatgacg gatttcaagt ggcgccattt ccagggtgat  
2701 gtgatcctgt ggcgggtcgy ctggtattgt cgtatccga tcagctatcy cgacctgag  
2761 gaaatgctgy cggaacgcgy catttcggtc gaccatacga cgatctatcy ctgggtccag  
2821 tgctacgccc cggagatgga gaagcgcctg cgtcgttctt ggcggcgtgy ctttgatccg  
2881 agctggcgcc tggatgaaac ctacgtcaag gtgcggggca agtggacctt cctgtaccgy  
2941 gcagtcgaca agcggggcga cacgatcgat ttctacctgt cgcgaccgc gagcgcgaag  
3001 gcagcgaagc ggttctcggg caaggccctg cgaggcctga agcac

//

LOCUS pMdT1 5931 bp DNA circular 30-JUL-2012

DEFINITION Salmonella enterica subsp. enterica serotipo Typhimurium plasmid pMdT1 harbouring the aac(6')-Ib-cr gene, complete sequence.

ACCESSION VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Salmonella enterica subsp. enterica serotipo Typhimurium

ORGANISM Salmonella enterica subsp. enterica serotipo Typhimurium Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5931)

AUTHORS de Toro, M., Rodriguez, I., Rojo-Bezares, B., Helmuth, R., Torres, C., Guerra, B. and Saenz, Y.

TITLE pMdT, the smallest ColE1-like plasmid mobilizing a new fluoroquinolone resistance aac(6')-Ib-cr gene

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 5931)

AUTHORS de Toro, M., Rodriguez, I., Rojo-Bezares, B., Helmuth, R., Torres, C., Guerra, B. and Saenz, Y.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-AUG-2012) Area de Microbiologia Molecular, Centro de Investigacion Biomedica de La Rioja (CIBIR), Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..5931

/organism="Salmonella enterica subsp. enterica serotipo Typhimurium"

/mol\_type="genomic DNA"

/strain="Se20"

/serotipo="Typhimurium"

/isolation\_source="faecal sample"

/host="Homo sapiens"

/sub\_species="enterica"

/plasmid="pMdT"

/country="Spain"

gene complement(53..1603)

/gene="mobA"

CDS complement(53..1603)

/gene="mobA"

/codon\_start=1

/product="mobilization protein MobA"

/translation="MPDSSGCGMPCWKRVQTMIVKFHPRGRGGGAGVPDYLLGKDRQR DGATV LQ GK PEEVRELIDASPYAKKYTSGVLSFAEKDLPPGQREKLMASFERVLMPLGDKDQYSV LWVEHQDKGRLELNFLIPNME LLTGRRLQPYDRADRPRIDAWQTI VNGRLGLHDPNAPENRRAL VTPSALPKTKQEAQA ITRGLLALASSGELKTRQDVTEALESAGFEVVRTTKSSIS IADPDGGRN IRLKGAIYEQSFNAGKGLRAEIESAAA EYRRDAESRIQRAREVCQSGTERKREENQRRHPRPRPE AVLSHEPAHERHGAYGQPDVADHRPGVYTADS IGRKHS MVAGAADRQLHDHPGAEHAGHAVRE EQRRALDLRRAETPLREGE PGSGTVRRGFELDDTGG EIAHDGAGKTV AERIRAATAGLLEKAGR VGERLRGMADDVWSYATGERGAERARHGLEQAGAEFERAAAPVVTRLNVIEAHREQERAAQHQA LELERSQRQRTYNGPSL"

gene complement(160..375)

/gene="mobD"

CDS complement(160..375)

/gene="mobD"

/codon\_start=1

/product="mobilization protein MobD"

/translation="MTELEKQLLSALEQLQDYSKRLDEWENAF AEWRTMSGLMQREN AALSERV TGLSRVQVQLSEQLRRLSQG"

gene complement(379..864)

/gene="mobB"

CDS complement(379..864)

/gene="mobB"

/codon\_start=1

/product="mobilization protein MobB"

/translation="MNSLLTLAKDLEQKSKAQQQSTGEMLKA AFSEHEKS VRAELSES EKRI SAAILDHDKLSSAMSQR TKGMVRMVSQTWLTIVLVSTLLTASGASILWWGQQQ

```

ILDNYTIIREQKSTQAMLSERNQVQLSTCGEQRRRCVVRVNPEAGRFGEDSSWMILAG
K"
gene      complement(1542..1865)
          /gene="mobC"
CDS       complement(1542..1865)
          /gene="mobC"
          /codon_start=1
          /product="mobilization protein MobC"
          /translation="MLTMWVTEDEHRRLLERCDCGKQLAAWMRQTCLDEKPARAGKLP
ISPALLRQLAGMGNNLNQIARQVNAAGGSGHDRVQVVAALMAIDAGLERLRHAVLEKG
ADDDR"
misc_feature 1911..2191
          /note="basis of mobility (bom)"
oriT      1978..2041
misc_feature 2033..2034
          /note="nic site of cleavage"
rep_origin 2488
          /note="origin of replication (oriV)"
gene      complement(2489..2841)
          /gene="RNA II"
gene      2661..2803
          /gene="RNA I"
-35_signal 2661..2666
          /gene="RNA I"
-10_signal 2685..2690
          /gene="RNA I"
-10_signal complement(2813..2818)
          /gene="RNA II"
-35_signal complement(2836..2841)
          /gene="RNA II"
gene      complement(3076..3471)
          /gene="orf1"
CDS       complement(3076..3471)
          /gene="orf1"
          /note="unknown function"
          /codon_start=1
          /product="hypothetical protein Orf1"
          /translation="MSPSIIMKHTFNLSLRWLVSAINQLVGGLVRCSSLLSINKLPLKF
ARLSCTSFIVTLCLLVSLSSIYLLITIVIFHDAPAFVVKLDLLYIQNLHLSILSSVGR
VIVCFFVYTATERKLRFLCFWPIAVGYER"
gene      3745..4113
          /gene="orf2"
CDS       3745..4113
          /gene="orf2"
          /codon_start=1
          /product="hypothetical transcriptional regulator Orf2"
          /translation="MKTTFSEFARDAQKWDRELGASEDHVEVASMAEMSAFNDALSLQ
AISIRLQKNLVSDLKSLAESYIGYQPMVRDQLLQRFVIAEKKQALRRELDKLNEREEM
HQQEDTVPVDQFIESIRKQA"
RBS       4162..4165
gene      4172..4849
          /gene="aac(6')-Ib-cr4"
CDS       4172..4849
          /gene="aac(6')-Ib-cr4"
          /codon_start=1
          /product="aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type
Ib-cr, AAC(6')-Ib-cr4"
          /translation="MSLKPGPKRIAESTGQPDQRQRDNKKTPGNTDKLGITKYSIVTN
STDSVTLRLMTEHDLAMLVEWLNRSRSHIVEWGGEEARPTLADVQEQYLPVLAQESVT
PYIAMLNGEPIGYAQSVALGSGDGRWEEETDPGVRGIDQLLANASQLGKGLGTKLVR
ALVELLFNDPEVTKIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTVTTPYGPVAVYMQTRQAF
ERTRSDA"
misc_recomb 4844..4915
          /note="attC site"
gene      5341..5892
          /gene="orf3"
CDS       5341..5892
          /gene="orf3"

```

Orf3" /codon\_start=1 /product="hypothetical macrophage stimulating factor

/translation="MKDKMAVVVFTGKDLNIMRTEGGSGYWHARTDRLNDADYLI AVR NRRETWAVKDLEHGTAFLIAKITGCFKSPDYDDRNVITFDEYAEIHTPKAWKMLTDGQRYPVAYL SAQEAFLRIGVTPEQLEWKKFHPSSPSVPNTVIPGLAEKTEKLSLNEAIERAKKDISNATGIDS SAITISIKI"

BASE COUNT 1549 a 1570 c 1457 g 1355 t

ORIGIN

1 actgaacctg tacgccagaa acagcaagcc catgcttttc eggcgcacag attcaaagtg
61 acggaccggt gtacgttgcg tgcgctgag atcgttccag ctccagcgct ttctgatgct
121 gcgccgcccg ttctgtctca cgatgtgctt ctatcacggt cagccttggt acaaccggcg
181 cagctgctcg ctcaaactct gcacctgctt gctcaagccc gtgacgcgct cgctcagcgc
241 cgcgttctcc cgttgcataa gaccagacat cgtccgcat tccgcgaagg cgttctccca
301 ctcgccagc ctttctgagt agtctgctg tagctgctct aatgcgctca gcaactgttt
361 ttccagctcc gtcattgtgt atttccccgc cagtatcatt cagctcgaat cctctccgaa
421 cegtcccgtt tccgggttca cctcacgca gcggcgcttc tgctctccgc aggtcgagag
481 ctgacgcgcg ctgttctctt cggacagcat ggctgcgctg ctcttctgct cccggatgat
541 cgtgtaattg tgcagtatct gctgcccctg ccaccataga atgcttgccg ccgatgctgt
601 cagcagtgta gacaccagga cgtggctcag ccacgtctgg ctgaccatac gcaccatgcc
661 tttctgctgc tggctcatgg ctgaggacag cttccggctg tggtcgagga tggcggcgct
721 gattctcttc tcgcttctgc tcagtctcgc tctgacagac ttctctgctg cgtggaatgc
781 ggctttcagc atctcgcggg tactctgctg ctgcgctttc gatttctgct ctaagtctct
841 tgccagcgtt aaaagactgt tcatagatgg ctcccttcag tcggatgttt cccccccgt
901 ccgggtcggc aatgctgatg ctgctttttg tggcgcttac cacctcaaaa cctgctcttt
961 ccagcgcctc agtgacgtcc tggcgggttt tcagctcccc ggacgaggct aaggccagta
1021 aaccccggtg aattgcctga gcggcttctt gcttcgtttt cggcagcgcg gacggcggtg
1081 ccagcgcgcg ccggttttca ggcgcttctg ggtcatgcag cccagcctg ccgttcacga
1141 tggctcgcga ggcataatg cgcggacggt cggcgcggtc gtaatacggc tggagacgcc
1201 tgccagtcag cagctccatg ttcgggatca ggaagtccag ctccagcgcg ccttatctct
1261 ggtgctcaac ccacagcacg ctgtactggt cttatctgag tccgggcatc agaaccggtt
1321 caaagctcgc catcagcttt tcgctgctgc cggcgggtaa atccttttcg gcaaggaca
1381 ggacgcggga tgtgtacttt tttgcgtagg gcgaggcgtc gataagctcc ctgacttctt
1441 ccgcttcccc ctgcaaaacg gtggcgcctg cgcgctgctg gtctttcccc agcagataat
1501 ccacgggacc ggcgccaccg ccgcgccctc cgcgggtgaaa cttaacgatc atcgtctgca
1561 cctttttcca gcacggcatg ccgcagccgc tcgagtcggg catctatggc catcagcgcg
1621 gcgacgacct gcacgcggtc gtgcccgtg ccaccaccgg cgttaacctg ccgggcaatc
1681 tggttgaggt tgttccccat gccggcaagc tgacgaagca gcgccggcga gatcgagggg
1741 agcttgccgg cgcgggcggg tttctcgtcc aagcacgtct ggccatcca ggtgcaagc
1801 tgtttaccgt cgcagcgttc caacagacgg cgggtgctcat cttcggctac ccacatcgtg
1861 agcattttac tgcgtttgtc tgccaatcca gcctcctgat aacgcgggga cgggcgggaa
1921 atcttttccc ggtcggcgcg ggttgggaca agccgcaggc gcgtcagtg ttttagcagg
1981 tttcggggcg cagcctgaa ccagtcacct agcctagcgc gagtgtatac tggcttagta
2041 tgttacggcg agatggagat tcaggaaagt gcttcatgtg agagggggaa aatgctgctg
2101 cagggagtag gtgcgaaatg ccggtgctcg tgacatgacg cctcctcgtc cactcggctc
2161 ctacgctcct gccgtgagac tgcggcgggc gttacgggct tacagataac gggatagcaa
2221 gaagttagga aaggcggaaa aaggatgcgg cgttgccgtt tttccatagg cttcgcctc
2281 ctgacgagct tcacggaaat cacagcatgg ccggtgctca aatcagaagg ggcgaaacct
2341 gacaggactt aaagatcccc accgtttccg atgggtcgtc cctcgtgcg ctctcctggt
2401 ccacccgtga ggtttaccgc ttgcagaccg ccgtaagggt gcgttttctc attcctccc
2461 atgcaactgg gttcctgtta ggtggttcgc tccaagctgg actatatgca cgaactcccc
2521 gtttagtccg actaccacgt ccgatcaggt aactgttctc ttgattocaa cctgacgga
2581 cagcaaaaat cgccactggc ggtagccaac ggtaactgaa ttacggagcg ggaagtaca
2641 caatagaaaa atcagagttc ttgaagtgtc accataacta cggctacact ggaaggacag
2701 ttttggttac tgcgctccgt aaaagccagt taccacgggt aaaagatctg ccaggatcat
2761 ttaaccttcg aaaaaccacc tgcagggtg gtttttctgt tttggataga agagattacg
2821 acgactaaca tatgatctca agaagatcct caacttaaga ctgtgccttt ttcttttgc
2881 tatccgcagc gcctttagcg cgacagccta tccaccacgt ttgaggggct acgtaccgc
2941 gtaaatctct aaagcaaat agagtttcaa cttcttgata ggtcgaagcc acgactgggt
3001 ttaatcgaca atcatagtca gcacaatgac atggatgagg caacgctatt gtattgctca
3061 taatttctcc tatatctatc tttcataacc aacagcaata ggccaaaagc agagaaaacg
3121 cagtttctct tcagtcgctg tatatacaaaa aaaacagaca ataaccctac caacgctgga
3181 caaaattgac aagtgtaaat tttgtatata caataaatcc aatttcacaa caaaggccgg
3241 ggcatcatgg aatatgacaa ttgtaatcag taataaatt gaagataaac taaccaataa
3301 acacaaggta acgataaaaag aagtacatga aagccttgcg aattttaaag gcaacttggt
3361 gatagataac agggagcagc accggactaa tctccaact aactggttta tcgctgaaac

3421 taaccagcgt agagaattaa aagtgtgttt catgattatc gatggcgaca ttcatatcaa  
3481 aacagctttc gagccaaacg aattagaacg taaaatctat gctaagcatg gaaagaagac  
3541 ggcataacag cgctaaataa gttattatth ttgcaagggct tacatgataa gcccttgcaa  
3601 aaagcttacc tcagcgaaaa aaaacaaaac taaaatgaag ctgaacctga tttctcaaca  
3661 tagaagttcc tttcggaaact agatcaagca taaaaattgc agctaactct gatctgcagg  
3721 aaacagcacc tagaggtcta tacaatgaaa actaccagtg aattcgcacg tgatgcacag  
3781 aaatgggatg atcgagagct cggcgctctc gaggatcacg ttgaagtagc atcaatggct  
3841 gaaatgtcag ctttcaacga tgcattatca ctgcaagcca tctcaataag attacagaaa  
3901 aatcttghta gcgatttaaa atcgatagct gaaagctatg gtatcggtta tcaaccaatg  
3961 gttagagatc ttctgcaaag atttgttatt gcagaaaaaa aacaagcatt acgtagagag  
4021 ttagacaagc ttaatgaacg agaagaaatg catcagcagg aggacacggt tcctgttgat  
4081 cagttcattg aaagcataag aaaacaagca taagaaaact taccatctag atacaagaa  
4141 tctcatcatc acgttttaaa ggaggattac catgagcctt aaacccggac caaaaagaat  
4201 tgccgaatcg acggggcaac ctgatcaacg ccaacgcgac aataaaaaaga cgcctggaaa  
4261 tactgacaag ttaggcatca caaagtacag catcgtgacc aacagcacg attcctgcac  
4321 actgcgctc atgactgagc atgacctgac gatgctctat gagtggctaa atcgatctca  
4381 tctcgtcag tgggtgggcy gagaagaagc acgcccgaca cttgtgacg tacaggaaca  
4441 gtacttgcca agcgttttag cgcaagatc cgtcactcca tacattgcaa tgcgtaagg  
4501 agagccgatt ggggtatgccc agtcgtactg tgctcttggg agcggggcagc gacgggtggga  
4561 agaagaacc gatccaggag tacgcggaat agaccagtta ctggcgaatg catcacaact  
4621 gggcaaagc ttgggaacca agctggttcg agctctggtt gagttgctgt tcaatgatcc  
4681 cgaggtcacc aagatccaaa cggaccctgc gccgagcaac ttgcgagcga tccgatgcta  
4741 cgagaaagc ggggtttgaga ggcaaggtag cgttaaccacc ccatatggtc cagccgtgta  
4801 catggttcaa acacgcagc cattcgagc aacacgcag gatgcctaac ccttccatcg  
4861 agggggcag ccaagggctg gcgcccctgg ccgcccctca tgtcaaacgt tgaaccagc  
4921 taaatcttca ggaaagtaag ttgtcagcaa agcccttcgg ggctttttt atacctgcag  
4981 gtcggcatga tttaccataa cacccttgc ccgaccgct ccggacggtc agcgtgaaag  
5041 cggcgttagc ccggtaaaac cggcagtaaa ctccccgcta aaccgcgcat tctgcgctg  
5101 ataaatttca cgcgactgca tagccatgca gccacgtgaa tggctcatgc tttcaatgta  
5161 tatcctcgtc caagcgcctg ttttaaccg tttatcaaaa aatcaaacag aaagccttac  
5221 cactaacagt aaaagagta gggggctgta ttttatcgca taaaaaacat ttacaacacg  
5281 aattctatcg tatagatttc ataaaaaat gaaatttact cacctattaa gggtttctat  
5341 atgaaagata tgaaagctgt tgtgggtttt accgggaagg atttgaacat aatgagaact  
5401 gagggggggt caggctactg gcatgccaga acagacaggc tcaacgatgc cgattacctc  
5461 atagcagtaa gaaacagaag ggaacgtgg gcagtaaaag acctagaaca cggcacagca  
5521 ttctgatcgc ccaaaattac cgggtgtttt aaaagccctg attacgacga caggaacgctc  
5581 ataaccttgc atgaatacgc agaaattc acgcccagc catggaaaat gctaaccgat  
5641 ggtcagcgt atccggttgc ttacctgagc gcacaggaag cttttttacg tattgggta  
5701 acaccggaac aactggaatg gaagaaatc catccttcat ccccatcggg tccataatac  
5761 gtgattcctg gtctggctga agagaaaaca gaaaaactct cccttaacga ggcaattgaa  
5821 agagccaaaa aggatattag caacgcaaca gggattgata gctcagccat aacaataagc  
5881 atcaagatct gatgaagcgt gaacaacaag atagcagcct catgttctag a

//

## ***Anexo II: Publicaciones***

## In vivo selection of *aac(6′)-Ib-cr* and mutations in the *gyrA* gene in a clinical *qnrS1*-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment

María de Toro<sup>1,2</sup>, Beatriz Rojo-Bezares<sup>1</sup>, Laura Vinué<sup>2</sup>, Esther Undabeitia<sup>3</sup>, Carmen Torres<sup>1,2</sup> and Yolanda Sáenz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain; <sup>2</sup>Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain; <sup>3</sup>Laboratorio de Microbiología, Hospital San Pedro, Logroño, Spain

\*Corresponding author. Tel: +34-941278868; Fax: +34-941278887; E-mail: ysaenz@riojasalud.es

Received 19 April 2010; returned 26 May 2010; revised 14 June 2010; accepted 16 June 2010

**Objectives:** To characterize the mechanisms implicated in the *in vivo* selection of quinolone and aminoglycoside resistance in a faecal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after ciprofloxacin treatment of a hospitalized elderly patient with acute gastroenteritis.

**Methods:** Two *Salmonella* Typhimurium isolates were obtained before (Se6) and after (Se20) treatment and they were typed by PFGE and multilocus sequence typing (MLST). Antimicrobial susceptibility was determined by disc diffusion and agar dilution methods. Class 1, 2 and 3 integrons and resistance mechanisms were studied by PCR and sequencing. Plasmids were typed.

**Results:** Both *Salmonella* Typhimurium strains were resistant to tetracycline, streptomycin and sulphonamides, while Se20 was also resistant to nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, ofloxacin, amikacin, tobramycin, kanamycin and trimethoprim. PFGE and MLST showed a clonal relationship between the strains, which belonged to the sequence type ST36. Both strains contained the *repC-sul2-strA-strB* structure and *tet(A)* and *qnrS1* genes, and strain Se20 also contained the *aac(6′)-Ib-cr* gene, the Ser83→Tyr substitution in *GyrA* and one class 1 integron with the *dfrA17+aadA5* gene cassette arrangement lacking *qacEΔ1+sul1*. Two different transconjugants from *Salmonella* Se20 (TCSe20B and TCSe20L) harboured *qnrS1* and *sul2* genes and the class 1 integron. The TCSe20B strain also acquired the *aac(6′)-Ib-cr* gene located on a non-typeable plasmid. *qnrS1* was identified on a ColE-type plasmid and the class 1 integron on an IncI1-type plasmid.

**Conclusions:** This is the first report of *in vivo* selection of the *aac(6′)-Ib-cr* gene and the Ser83→Tyr change in *GyrA* in a *qnrS1*-positive *Salmonella* Typhimurium strain after ciprofloxacin treatment; the *in vitro* transfer of both plasmid-mediated quinolone resistance genes was also demonstrated.

**Keywords:** plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms, class 1 integrons, multilocus sequence typing, plasmids

### Introduction

*Salmonella* is an important zoonotic pathogen and salmonellosis constitutes a public health problem worldwide. Fluoroquinolones are one of the alternative treatments for invasive infections caused by *Salmonella* in adult patients. The emergence of antimicrobial resistance involves some therapeutic failures or restrictions in the use of antimicrobial agents. However, high-level fluoroquinolone resistance is relatively uncommon in *Salmonella*, probably due to a prohibitive fitness cost for the bacteria.<sup>1</sup>

The classical chromosomally encoded mechanisms of resistance to quinolones in Enterobacteriaceae were associated

with modifications in the quinolone targets (DNA gyrase and DNA topoisomerase IV subunits), outer membrane impermeability and overexpression of efflux pump systems. However, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) mechanisms have been recently described:<sup>2–5</sup> quinolone target protection by Qnr proteins; modification of some fluoroquinolones by an acetyltransferase [AAC(6′)-Ib-cr]; and active efflux pumps QepA or OqxAB.

The objective of this study was to characterize the mechanisms implicated in the *in vivo* selection of quinolone and aminoglycoside resistance in a clinical *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain after fluoroquinolone treatment.

## Materials and methods

### Bacterial strains

Two isolates (Se6 and Se20) of *Salmonella* Typhimurium DT104B were recovered from faecal samples of an elderly patient who was admitted to a Spanish hospital with acute gastroenteritis in 2008. The isolates were obtained before ciprofloxacin antimicrobial therapy (isolate Se6) and after this treatment (isolate Se20) that the patient received for 7 days.

### Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility to 23 antimicrobial agents (ampicillin, amoxicillin/clavulanate, cefalotin, cefazolin, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, streptomycin, kanamycin, tobramycin, gentamicin, amikacin, nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline, fosfomicin, rifampicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, sulphonamides and fusidic acid) was determined by the disc diffusion method.<sup>6</sup> MICs of nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, gentamicin, tobramycin, kanamycin, streptomycin and trimethoprim were also determined by the agar dilution method.<sup>6</sup>

### Detection of antimicrobial resistance genes

The presence of the *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6′)-Ib* and *qepA* genes was determined by PCR and sequencing, as well as the genetic environment of the *qnrS* gene. For this last purpose, specific primers were designed according to reported surrounding structures.<sup>7,8</sup> The *gyrA* and *parC* genes were amplified by PCR, sequenced and compared with those previously reported (GenBank accession numbers X78977 and AE008846 for *gyrA* and *parC* genes, respectively).

The genes associated with resistance to tetracycline (*tet*), sulphonamides (*sul*), trimethoprim (*dfra*) and aminoglycosides [*aadA*, *strA-strB*, *aph(3′)*, *rmtB* and *armA*] were studied by PCR [see Table S1, available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>)]. Positive controls were included in all PCR assays.

The presence and characterization of class 1, 2 and 3 integrons were analysed by PCR and sequencing, as well as the polymorphisms of the promoter (Pc) responsible for class 1 gene cassette expression.

The primers used in all of these PCRs are included in Table S1.

### Clonal relationship and molecular typing

The clonal relationship of the *Salmonella* isolates was examined by PFGE, using XbaI and SpeI enzymes (New England Biolabs Inc., USA), and conditions of 6 V/cm for 23 h at 14°C with pulse time ranging from 1 to 30 s.

Multilocus sequence typing (MLST) was performed for the *Salmonella* Typhimurium isolates according to web site database recommendations (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>).

### Mating experiments

A filter mating method was performed using *Escherichia coli* CSH26 (rifampicin resistant) as the recipient strain and *Salmonella* Typhimurium isolates Se6 and Se20 as the donors. Overnight cultures of donor and recipient strains were mixed together [1:10 (v/v)] on a membrane filter and incubated at 37°C for 24 h. After washing the filter with 1 mL of brain heart infusion (BHI), 0.1 mL of the mixture was spread onto selective BHI agar plates containing rifampicin (100 mg/L) plus ciprofloxacin (0.5 mg/L). PFGE was used to compare the transconjugant, donor and recipient patterns.

### Identification and typing of plasmids

Plasmids were classified with regard to incompatibility groups by the PCR-based replicon typing (PBRT) scheme.<sup>9</sup> Plasmids belonging to incompatibility group I1 (IncI1) were subtyped by plasmid MLST (pMLST) (see Table S1).

### Plasmid DNA hybridization analysis

Genomic DNA digestion with S1 nuclease (Takara Inc., Japan) and subsequent PFGE analysis were performed to determine the number and size of the plasmids. S1-PFGE nuclease gels were analysed by Southern blot hybridization using *qnrS1*, *aac(6′)-Ib-cr*, *int11*, *aadA5*, *sul2*, *strB*, *tet(A)* and IncI1 probes (PCR Dig Probe Labelling Mix; Roche Applied Science, Barcelona, Spain).

## Results and discussion

An elderly patient was admitted to hospital with acute gastroenteritis, and a *Salmonella* Typhimurium DT104B (Se6 isolate) was recovered from a faecal sample. The patient was treated for 7 days with ciprofloxacin, but *in vivo* selection of quinolone resistance was observed in the Se20 isolate recovered post-treatment. PFGE and MLST analysis showed that the two isolates were clonally related and belonged to ST36. This sequence type is a singleton, which until June 2010 included six strains, all of them Typhimurium, of the 3176 strains (438 *Salmonella* Typhimurium) publicly available in the database (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>).

### Characterization of antimicrobial resistance genes

The antimicrobial resistance phenotypes of Se6 and Se20 are shown in Tables 1 and 2. The Se6 strain presented diminished susceptibility to ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin and ofloxacin (MIC 0.5–2 mg/L) and intermediate resistance to nalidixic acid (MIC 16 mg/L), and Se20 was resistant to nalidixic acid (MIC >512 mg/L) as well as to all tested fluoroquinolones (MICs 8–32 mg/L) (Table 1). The presence of the *qnrS1* gene was detected in both strains, whereas the Se20 strain additionally contained the *aac(6′)-Ib-cr* gene and the Ser83→Tyr substitution in GyrA, which explains the differences in quinolone and aminoglycoside resistance between the two strains (Tables 1 and 2).

An ISEc1 (IS3 family) partial sequence and the genes encoding the mobilization proteins MobA, MobB and MobC were detected upstream of the *qnrS1* gene, similar to the pTPqnrS-1a plasmid structure.<sup>7</sup> On the other hand, downstream of the *qnrS1* gene, an incomplete Tn5058-related resolvase gene was detected, as well as a segment of ~2000 bp that presented high identity with plasmids pTPqnrS-1a and pS5-1.<sup>7,8</sup>

No association between QnrS-like determinants and plasmid-mediated cephalosporinases has yet been reported.<sup>3</sup> In our work, this fact was confirmed because both *Salmonella* strains were neither resistant to β-lactams nor amplified possible silent *bla* genes (data not shown). Although the *qnr* genes confer low-level quinolone resistance, the clinical importance of these genes is that their presence contributes to a final higher quinolone resistance level and may help in the selection of resistant strains.<sup>2,5</sup> Indeed, in an *in vivo* study,<sup>10</sup> a susceptible *qnrA1*-producing *E. coli* strain developed amino acid substitutions in GyrA and ParC proteins and therefore high-level quinolone

**Table 1.** MICs of various antimicrobial agents for *Salmonella* Typhimurium Se6 and Se20 strains, as well as for Se20 transconjugants and for the recipient strain

Strains	MIC (mg/L)									
	NAL	CIP	LVX	NOR	OFX	GEN	KAN	TOB	STR	TMP
Se6	16	0.5	1	2	2	2	4	1	>512	1
Se20	>512	8	8	32	16	1	128	32	>512	>128
TcSe20B	16	2	2	16	2	0.5	128	32	8	>128
TcSe20L	16	1	2	2	2	0.5	4	1	8	>128
Recipient	4	0.015	0.06	0.125	0.125	0.5	2	0.5	8	0.5

NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; LVX, levofloxacin; NOR, norfloxacin; OFX, ofloxacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; STR, streptomycin; TMP, trimethoprim.

**Table 2.** Resistance mechanisms detected in *Salmonella* Typhimurium Se6 and Se20 and transconjugants of Se20

Strain	Phenotype of resistance	Mechanisms of resistance <sup>a</sup>	Plasmid type (size)/gene probes that hybridized
Se6	NAL <sup>b</sup> , STR, TET, SUF, FUS	<i>qnrS1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i>	NT (194 kb)/ <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>strB</i> ColE <sub>TP</sub> (9 kb)/ <i>qnrS1</i> NT (8 kb)/ <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>strB</i>
Se20 <sup>c</sup>	NAL, CIP, NOR, AMK, TOB, KAN, STR, TET, SXT, SUF, TMP, FUS	<i>qnrS1</i> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , S83Y (GyrA substitution)	NT (194 kb)/ <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>strB</i> IncI1 (ST3, 97 kb)/ <i>aadA5</i> , <i>intI1</i> , <i>sul2</i> ColE <sub>TP</sub> (9 kb)/ <i>qnrS1</i> NT (8 kb)/ <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>strB</i> NT (6 kb)/ <i>aac(6′)-Ib-cr</i>
TcSe20B <sup>c</sup>	NAL <sup>b</sup> , CIP <sup>b</sup> , NOR <sup>b</sup> , AMK, TOB, KAN, SXT, SUF, TMP	<i>qnrS1</i> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>sul2</i>	IncI1 (ST3, 97 kb)/ <i>aadA5</i> , <i>intI1</i> , <i>sul2</i> ColE <sub>TP</sub> (9 kb)/ <i>qnrS1</i> NT (6 kb)/ <i>aac(6′)-Ib-cr</i>
TcSe20L <sup>c</sup>	NAL <sup>b</sup> , SXT, SUF, TMP	<i>qnrS1</i> , <i>sul2</i>	IncI1 (ST3, 97 kb)/ <i>aadA5</i> , <i>intI1</i> , <i>sul2</i> ColE <sub>TP</sub> (9 kb)/ <i>qnrS1</i> NT (6 kb)/ND

STR, streptomycin; TET, tetracycline; SUF, sulphonamides; FUS, fusidic acid; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; NOR, norfloxacin; AMK, amikacin; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TMP, trimethoprim; NT, plasmids that were not typeable; ND, none of the specific tested probes hybridized in this plasmid.

<sup>a</sup>Genes detected by PCR, not included in the integron structure, and substitutions in GyrA.

<sup>b</sup>The resistance to these antimicrobial agents was classified in the intermediate resistance category.

<sup>c</sup>These strains showed a class 1 integron harbouring *dfrA17*+*aadA5* genes in their variable region.

resistance, after a patient was treated with norfloxacin for 5 days. In our work, although the *qnrS1*-harbouring Se6 strain is not a hypermutable strain (data not shown), the post-treatment Se20 strain acquired not only the Ser83→Tyr substitution in GyrA but also the *aac(6′)-Ib-cr* gene. This gene encodes an aminoglycoside acetyltransferase AAC(6′)-Ib variant that confers resistance to tobramycin, amikacin and kanamycin, and also to ciprofloxacin and norfloxacin.<sup>2,5</sup> To our knowledge this is the first report in which an *in vivo* selection of *aac(6′)-Ib-cr* is described, even in a *qnrS1*-harbouring *Salmonella* strain.

The presence of other resistance genes was also studied in the Se6 and Se20 strains. The *tet(A)*, *strA-strB* and *sul2* genes implicated in resistance to tetracycline, streptomycin and

sulphonamides, respectively, were found in both *Salmonella* strains. The genetic environment of the *sul2* gene contained the *repC+sul2+strA-strB* structure, as previously described.<sup>11</sup> In addition, the Se20 strain contained a class 1 integron lacking *qacEΔ1+sul1* genes with the *dfrA17+aadA5* gene cassette arrangement (Table 2). The Pc promoter implicated in their transcription was the Pc hybrid 1 (PcH1).

### Transfer of resistance and plasmid characterization

Two different transconjugants (TcSe20B and TcSe20L) were obtained from *Salmonella* Se20. Nevertheless, conjugation experiments were negative for the Se6 donor. Both Se20

transconjugants harboured the *qnrS1* and *sul2* genes, as well as the class 1 integron (*dfrA17*+*aadA5*) (Table 2). In addition, only the TCSe20B strain showed the *aac(6′)-Ib-cr* gene. This difference between TCSe20B and TCSe20L was also evident when the phenotypes of resistance to ciprofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, ofloxacin, amikacin, kanamycin and tobramycin were compared (Tables 1 and 2). The horizontal transfer of only the *qnrS1* gene increased the MICs of nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin and ofloxacin by 4-, 67-, 33-, 16- and 16-fold, respectively, as shown in the values obtained for strain TCSe20L, which were similar to those for Se6 (Table 1). The transconjugant TCSe20B contained the *qnrS1* and *aac(6′)-Ib-cr* genes and had increased MICs of nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, kanamycin and tobramycin by 4-, 133-, 33-, 128-, 16-, 64- and 64-fold, respectively. As expected, the presence of the *aac(6′)-Ib-cr* gene in TCSe20B had no effect on the MICs of levofloxacin and ofloxacin, which were similar to those for Se6 or TCSe20L strains. On the other hand, although the donor Se20 presented both PMQR genes, the MICs of nalidixic acid and all the tested fluoroquinolones were higher than those for TCSe20B due to the presence of the Ser83→Tyr substitution in GyrA. The additive effect of these different mechanisms of resistance to quinolones and fluoroquinolones is clearly observed in this work, as previously reported by other authors.<sup>2,3,5</sup>

The genetic structure surrounding the *qnrS1* gene detected in both transconjugants was identical to that of the donor; however, the *sul2* gene was not associated with the *strA-strB* genes. This last fact could suggest the presence of more than one *sul2* copy in the donor strain, with at least one of them located in a conjugative plasmid.

In order to determine the plasmid content in Se6, Se20 and the two transconjugant strains, PBRT and S1-PFGE methods were applied. Table 2 shows the number and size of the plasmids detected, and also the gene probes that hybridized by Southern blotting.

The specific ColE<sub>TP</sub> amplification was positive for both donors and for both transconjugant strains, in which not only was the collinearity of the *qnrS1* gene with the ColE<sub>TP</sub> *oriV* demonstrated but also the *qnrS1* gene probe hybridized with plasmids of the same size (9 kb) (Table 2). These results indicate the localization of the *qnrS1* gene on small pTPqnrS-1a-like plasmids that are not self-conjugative, but which can be mobilized by other co-resident plasmids.<sup>7-9</sup>

Curiously, both Se6 and Se20 strains presented two non-typeable plasmids of 194 and 8 kb to which the *tet(A)*, *sul2* and *strB* gene probes hybridized, but none of them was transferred by conjugation (Table 2). On the other hand, the difference between the initial Se6 strain and the post-treatment Se20 strain was the presence of a non-typeable small plasmid, which harboured the *aac(6′)-Ib-cr* gene, and of another IncI1 plasmid, which contained the class 1 integron (*intI1*+*dfrA17*+*aadA5*) and the *sul2* gene not associated with *strA-strB*. These two plasmids might have been transferred to the Se6 strain from other intestinal bacteria during the treatment of the patient, although we cannot discard that both Se6 and Se20 strains were already present in the patient's gut, and Se20 was selected by the treatment. In any case, the *in vitro* mating experiments demonstrated that the IncI1 plasmid was transferred from Se20 to the recipient strain, and it could participate in the

mobilization of ColE<sub>TP</sub>-*qnrS1* and even of *aac(6′)-Ib-cr*-harbouring plasmids, as was shown with the TCSe20B transconjugant. The absence of the IncI1 plasmid in the Se6 strain could explain the absence of transconjugants from this strain.

In summary, this is the first report of *in vivo* selection of the *aac(6′)-Ib-cr* gene and the Ser83→Tyr change in GyrA in a *qnrS1*-positive *Salmonella* Typhimurium DT104B strain after ciprofloxacin treatment. The *in vitro* transfer of both PMQR genes was also demonstrated. The presence of PMQR genes in *Salmonella* strains plays a significant role in the generation of resistant mutants and therapeutic failure, and the localization of these genes on different plasmid backbones may facilitate their rapid dissemination even in other bacterial genera of clinical significance.

## Acknowledgements

Part of this study was presented at the Nineteenth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 2009 (Abstract P1477).

We thank Dr A. Caratolli for providing the positive control strains for the PBRT study.

## Funding

The study did not receive financial support from third parties. M. de T. has a pre-doctoral fellowship from the Instituto de Salud Carlos III of Spain (Ministerio de Ciencia e Innovación) (grant number FI08/00506).

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect* 2006; **8**: 1937–44.
- Martínez-Martínez L, Cano ME, Rodríguez-Martínez JM et al. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; **6**: 685–711.
- Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in Gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* 2009; **16**: 1028–46.
- Gunell M, Webber MA, Kotilainen P et al. Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3832–6.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 664–89.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100-S18*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- Kehrenberg C, Hopkins KL, Threlfall EJ et al. Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1*-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 903–5.

- 8** Poirel L, Cattoir V, Soares A *et al.* Novel Ambler class A  $\beta$ -lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 631–7.
- 9** García-Fernández A, Fortini D, Veldman K *et al.* Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 274–81.
- 10** Poirel L, Pitout JD, Calvo L *et al.* In vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1525–7.
- 11** Vinué L, Sáenz Y, Rojo-Bezares B *et al.* Genetic environment of *sul* genes and characterization of integrons in *Escherichia coli* isolates from blood origin in a Spanish Hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 492–6.

# Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals

María de Toro,<sup>1,2</sup> Yolanda Sáenz,<sup>1</sup> Emilia Cercenado,<sup>3</sup> Beatriz Rojo-Bezares,<sup>1</sup> Marta García-Campello,<sup>4</sup> Esther Undabeitia,<sup>5</sup> Carmen Torres<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Microbiology Area, Center for Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain. <sup>2</sup>Biochemistry and Molecular Biology Area, University of La Rioja, Logroño, Spain. <sup>3</sup>Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. <sup>4</sup>Microbiology Service, Pontevedra Hospital Complex, Pontevedra, Spain. <sup>5</sup>Microbiology Laboratory, San Pedro Hospital, Logroño, Spain

**Summary.** The mechanisms of antimicrobial resistance were characterized in 90 *Salmonella enterica* isolates either resistant or with intermediate resistance to amoxicillin/clavulanate (AMC<sup>R/I</sup>) or resistant to third-generation cephalosporins (C3G<sup>R</sup>). These isolates were recovered in three Spanish hospitals during 2007–2009. The C3G<sup>R</sup> phenotype was expressed by three isolates that carried the following extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes: phage-associated  $bla_{CTX-M-10}$  in *S. Virchow*,  $bla_{CTX-M-14a}$  surrounded by *ISEcp1* and *IS903* in *S. Enteritidis*, and  $bla_{CTX-M-15}$  linked to *ISEcp1* and *orf477* in *S. Gnesta* (first description in this serotype). The AMC<sup>R/I</sup> phenotype was found in 87 isolates (79 *S. Typhimurim*, 7 *S. Enteritidis*, and one *S. Thompson*). The  $bla_{PSE-1}$  gene, followed by  $bla_{OXA-1}$  was mostly found among *S. Typhimurim*, and the  $bla_{TEM-1}$  gene among *S. Enteritidis*. Three different gene combinations [ $bla_{PSE-1}+floR+aadA2+sul+tet(G)$ ;  $bla_{OXA-1}+catA+aadA1/strA-strB+sul+tet(B)$  and  $bla_{TEM-1}+cmlA1+aadA/strA-strB+sul+tet(A)/tet(B)$  genes] were associated with the ampicillin-chloramphenicol-streptomycin-sulfonamides-tetracycline phenotype in 68 AMC<sup>R/I</sup> *S. enterica* isolates. Class 1 integrons were observed in 79% of the isolates and in most of them (45 isolates) two integrons including the *aadA2* and  $bla_{PSE-1}$  gene cassettes, respectively, were detected. The  $bla_{OXA-1}+aadA1$  arrangement was detected in 23 isolates, and the  $aac(6)-Ib-cr+bla_{OXA-1}+catB3+arr3$  in another one. Non-classic class 1 integrons were found in three isolates: *dfi:A12+orfF+aadA2+cmlA1+aadA1* (1 isolate), *dfi:A12+orfF+aadA2+cmlA1+aadA1+qacH+IS440+sul3* (1 isolate) and *dfi:A12+orfF+aadA2+cmlA1+aadA1+qacH+IS440+ sul3+orfI+mef(B) $\Delta$ -IS26* (1 isolate). Taken together, these results underline the need for clinical concern regarding  $\beta$ -lactam resistance in *Salmonella* and thus for continuous monitoring. [Int Microbiol 2011; 14(3):173-181]

**Keywords:** *Salmonella enterica* ·  $\beta$ -lactam-resistance · integrons · extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL)

## Introduction

*Salmonella enterica* is the second most frequent cause of zoonotic diseases in humans in Europe, and more than

150,000 cases of human salmonellosis were reported by The European Surveillance System during 2007 [8]. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium are two of the ten most common serotypes confirmed in salmonellosis cases in humans, representing 81% of the isolates [8]. *S. Typhimurium* is frequently associated with multidrug resistance [3,26], in part due to the worldwide emergence of *S. Typhimurium* definitive phage type (DT) 104, which contains the chromosomal *Salmonella* genomic island type I (SGI-1). SGI-1 harbors genes that confer the ACSSuT phenotype (i.e., resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sul-

\*Corresponding author: C. Torres  
Área de Bioquímica y Biología Molecular  
Departamento de Agricultura y Alimentación  
Universidad de La Rioja  
26006 Logroño, Spain  
Tel. +34-941299750. Fax: +34-941299721  
E-mail: carmen.torres@unirioja.es

fonamides, and tetracycline) [16]. Although *S. Typhimurium* DT104 is the main example of multiresistance in *S. enterica*, many antimicrobial resistance genes have been reported also in isolates of other serotypes [14].

Non-typhoidal *Salmonella* infections generally result in mild-to-moderate self-limiting gastroenteritis, and antimicrobial treatment is only required in severe cases occurring in vulnerable patient groups or to combat invasive infections. However, due to the increasing resistance of this bacterium to the conventional antimicrobial agents (ampicillin, and trimethoprim/sulfamethoxazole) used in the treatment of salmonellosis, amoxicillin/clavulanate, third-generation cephalosporins, and fluoroquinolones have become further treatment options. Resistance to  $\beta$ -lactams in *S. enterica* is mainly due to the production of acquired  $\beta$ -lactamases [14]. Among these, TEM-1, PSE-1, and OXA-1 have been described as the enzymes most frequently related to ampicillin and amoxicillin/clavulanate resistance [3,11]. The resistance of *Salmonella* to third-generation cephalosporins is primarily mediated by the production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) of the TEM, SHV, and CTX-M types, which are associated with different mobile genetic elements [11,14]. ESBL have been described not only in clinical *Salmonella* isolates but also in isolates from animals and food [6,21].

Mobile genetic elements such as plasmids and transposons, possibly containing integrons, are able to disseminate antimicrobial resistance by horizontal transfer in Enterobacteriaceae. Integrons are genetic elements that capture and incorporate gene cassettes by using a site-specific recombination mechanism [4]. Thus far, class 1 and, less frequently, class 2 integrons have been reported for *S. enterica* [4]. Class 1 integrons contain a 5'-conserved segment (5'-CS) that includes the integrase *intI1* gene, the *attI1* recombination site, and the Pc promoter. It is followed by a variable region where one or more gene cassettes are located. This class of integrons also contains a 3'-conserved segment (3'-CS) that includes the *sul1* and *qacE $\Delta$ 1* genes, which encode resistance to sulfonamides and ammonium quaternary compounds, respectively [4].

In recent years, resistance to amoxicillin/clavulanate among *S. enterica* isolated from different Spanish hospitals has become increasingly widespread, accompanied by the emergence of ESBL-producing isolates, detected in human samples. Consequently, there are fewer therapeutic options for the treatment of *S. enterica* infections, placing these patients at greater risk of serious morbidity and even death.

The aim of the present work was to characterize the mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams and other antimicrobial agents as well as the integrons in all amoxicillin/clavulanate-resistant, intermediately resistant (AMC<sup>R/I</sup>), and third-generation cephalosporin-resistant (C3G<sup>R</sup>) *S. enterica* isolates recovered in three Spanish hospitals during the period 2007–2009.

## Materials and methods

**Isolates and antimicrobial susceptibility testing.** In this study, 90 *S. enterica* isolates with the AMC<sup>R/I</sup> phenotype (87 isolates) or the C3G<sup>R</sup> phenotype (3 isolates) were recovered in three Spanish hospitals located in geographically distinct areas: Hospital General Universitario Gregorio Marañón of Madrid (HGM, 39 isolates), Hospital San Pedro of Logroño (HSP, 36 isolates), and Complejo Hospitalario of Pontevedra (CHP, 15 isolates). AMC<sup>R/I</sup> and C3G<sup>R</sup> phenotypes were detected in 12–23% and <1%, respectively, of all *S. enterica* isolated in the three hospitals. The 90 isolates were recovered from fecal (73 isolates), blood (2 isolates), urine (1 isolate) and other (14 isolates) samples from different patients during 2007 (29 isolates), 2008 (34 isolates), and 2009 (27 isolates). The serotypes of these isolates were as follows: *S. Typhimurium* (79 isolates), *S. Enteritidis* (8 isolates, one of them C3G<sup>R</sup>), *S. Virchow* (1 isolate, C3G<sup>R</sup>), *S. Gnesta* (1 isolate, C3G<sup>R</sup>), and *S. Thompson* (1 isolate).

Susceptibility testing to 20 antimicrobial agents (ampicillin, AMC, cefalotin, cefazolin, ceftazidime, cefotaxime, aztreonam, ceftiofur, gentamicin, tobramycin, kanamycin, amikacin, streptomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol, sulfonamides, trimethoprim, trimethoprim/sulfamethoxazole) was performed by the disc-diffusion [5] and microdilution methods (MicroScan Combo Neg panels, Siemens, Sacramento, CA, USA) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. The AmpC phenotype was determined by comparison of the inhibition zone of ceftiofur discs (30  $\mu$ g) in the presence or absence of cloxacillin (200  $\mu$ g) [29]. The ESBL phenotype was determined using the double-disc synergy test with ceftiofur, ceftazidime, and aztreonam discs placed in the proximity of the AMC disc [13].

**Detection of antimicrobial resistance genes.** The presence of genes implicated in the resistance to  $\beta$ -lactams (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *bla*<sub>PSE-1</sub>), and the *bla*<sub>CTX-M</sub> genetic environment was detected by PCR and sequencing [7,17,31]. In addition, multiplex PCR for the detection of plasmidic AmpC-type  $\beta$ -lactamases was carried out [20].

Tetracycline [*tet*(A)-*tet*(E),*tet*(G)], aminoglycoside [*aadA*, *strA-strB*, *aac*(3)-I, *aac*(3)-II, *aac*(3)-IV, *ant*(2''), *aph*(3')-Ia, *aph*(3')-IIa, *rmtB*, *armA* and *aac*(6')-Ib], sulfonamides [*sul1*, *sul2* and *sul3*], trimethoprim [*dhfrA*], chloramphenicol [*cmlA*, *catA* and *floR*], and quinolone [*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *qepA*] resistance genes were studied by PCR and sequencing [7,24,27]. The genetic environments of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes were determined as previously reported [32].

**Detection and characterization of integrons.** The presence of class 1, 2, and 3 integrase-encoding genes and of the 3'-CS of class 1 integrons, *qacE $\Delta$ 1+sul1*, was analyzed by PCR. The variable regions of these integrons were PCR-amplified and subsequently sequenced to determine their gene cassette arrangements [24].

## Results

Antimicrobial susceptibility in *Salmonella enterica* isolates. Table 1 shows the antimicrobial susceptibility of the 90 AMC<sup>R/I</sup> or C3G<sup>R</sup> *S. enterica* isolates included in this study. The *S. Typhimurium* isolates were highly resistant to sulfonamides (100%), tetracycline (91%), chloramphenicol (86%), and streptomycin (80%). Aminoglycosides resistance was found only among isolates of serotype *S. Typhimurium*. All isolates studied were susceptible to amikacin, ceftaxime and ciprofloxacin. A multiresistant phenotype (resistant to at least three different antimicrobial agent families) was observed among 100% of the *S. Typhimurium* and 12.5% of the *S. Enteritidis* isolates. Two *S. Typhimurium*

isolates had a heptaresistant phenotype that included the ACSSuT phenotype in addition to resistance to trimethoprim and gentamicin or nalidixic acid (ACGSSuTTm and ACSSuTTmN, respectively).

The AmpC phenotype was not identified among the isolates tested. However, the ESBL phenotype was determined in three of them and corresponded to one isolate each of *S. Enterica*, *S. Virchow*, and *S. Gnesta* serotypes (Table 1). All three were resistant to ceftaxime, while *S. Gnesta* isolate was also resistant to ceftazidime and aztreonam.

Antimicrobial resistance genes. Tables 2 and 3 list the resistance genes detected in the 90 *S. enterica* isolates, according to serotype. The most frequent  $\beta$ -lactamase gene identified among the AMC<sup>R/I</sup> isolates was *bla*<sub>PSE-1</sub>, detected in

**Table 1.** Number of AMC<sup>R/I</sup> or C3G<sup>R</sup> of *Salmonella enterica* isolates resistant to antimicrobial agents. The isolates were of different serotypes and obtained from three Spanish hospitals

Antimicrobial agent <sup>a</sup>	<i>S. Typhimurium</i> (n = 79)	<i>S. Enteritidis</i> (n = 8)	<i>S. Virchow</i> (n = 1)	<i>S. Gnesta</i> (n = 1)	<i>S. Thompson</i> (n = 1)	All <i>S. enterica</i> tested (n = 90)
AMC <sup>b</sup>	79	7	0	0	1	87
Cefalotin	7	1	1	1	0	10
Cefazolin	9	1	1	1	0	12
Ceftazidime	0	0	0	1	0	1
Ceftaxime	0	1	1	1	0	3
Aztreonam	0	0	0	1	0	1
Gentamicin	1	0	0	0	0	1
Tobramycin	1	0	0	0	0	1
Kanamycin	2	0	0	0	0	2
Streptomycin	63	0	0	0	0	63
Nalidixic acid	17	2	1	0	0	20
Tetracycline	72	1	1	0	1	75
Chloramphenicol	68	0	0	0	1	69
Sulfonamides	79	3	1	1	1	85
Trimethoprim	5	0	0	0	0	5
SXT <sup>c</sup>	5	1	0	0	0	6
ESBL phenotype	0	1	1	1	0	3

<sup>a</sup>All the isolates were resistant to ampicillin, but susceptible to ceftaxime, amikacin, and ciprofloxacin.

<sup>b</sup>AMC: Amoxicillin/clavulanate.

<sup>c</sup>SXT: Trimethoprim-sulfamethoxazole.

**Table 2.** Antimicrobial resistance genes and the resistance phenotype of *Salmonella enterica* isolates from three Spanish hospitals

Number of resistant isolates	Resistance genes	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>	Other serotypes	Total (n = 90)
β-Lactams (n = 90)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub>	41	–	–	41
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	23	–	1	24
	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	9	6	–	15
	<i>bla</i> <sub>TEM-1c</sub>	1	–	–	1
	<i>3bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	1	–	–	1
	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	3	–	–	3
	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>	–	–	1	1
	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	–	1	–	1
	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> <sup>c</sup>	–	–	1	1
	No studied <i>bla</i> genes	1	1	–	2
Tetracycline <sup>a</sup> (n = 82)	<i>tet(A)</i>	5	–	–	5
	<i>tet(B)</i>	29	–	1	30
	<i>tet(G)</i>	45	–	–	45
	No studied <i>tet</i> genes	–	1	1	2
Streptomycin <sup>b</sup> (n = 76)	<i>aadA1/aadA2</i>	66	–	–	66
	<i>strA-strB</i>	5	–	–	5
	<i>aadA1/aadA2</i> + <i>strA-strB</i>	4	–	–	4
	No studied genes	1	–	–	1
Gentamicin (n = 1)	<i>aac(3)-IV</i>	1	–	–	1
Kanamycin (n = 2)	<i>aph(3')-Ia</i>	1	–	–	1
	No studied genes	1	–	–	1
Chloramphenicol (n = 69)	<i>floR</i>	44	–	1	45
	<i>catA</i>	18	–	–	18
	<i>cmlA1</i>	3	–	–	3
	<i>floR</i> + <i>catA</i>	2	–	–	2
	<i>floR</i> + <i>cmlA</i>	1	–	–	1
Sulfonamides (n = 85)	<i>sul1</i>	54	–	–	54
	<i>sul2</i>	8	–	1	9
	<i>sul1</i> + <i>sul2</i>	14	–	1	15
	<i>sul2</i> + <i>sul3</i>	1	–	–	1
	<i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>sul3</i>	1	–	–	1
	No studied <i>sul</i> genes	1	3	1	5
Trimethoprim (n = 5)	<i>dfrA12</i>	3	–	–	3
	<i>dfrA14</i>	2	–	–	2

<sup>a</sup>Seven of the studied isolates with a phenotype of intermediate resistance to tetracycline harbored the *tet(G)* gene.

<sup>b</sup>Twelve of the studied isolates with a phenotype of intermediate resistance to streptomycin harbored the *aadA1/aadA2* gene. Three of the isolates with a susceptibility to streptomycin harbored *strA-strB* genes.

<sup>c</sup>*bla*<sub>TEM-1</sub> variant showed a silent nucleotide change (T→C) at position 735 [28].

51.7% of the 87 AMC<sup>R/I</sup> isolates including all those belonging to *S. Typhimurium*. In addition, the gene was associated with other *bla* genes in four of these isolates (*bla*<sub>TEM-1b</sub> or *bla*<sub>OXA-1</sub>). The *bla*<sub>OXA-1</sub> gene was identified in 27.6% of the AMC<sup>R/I</sup> isolates (23 *S. Typhimurium* and 1 *S. Thompson*), and only in one case in association with other *bla* genes. In addition, the *bla*<sub>TEM-1</sub> gene was demonstrated in 21.8% of the AMC<sup>R/I</sup> isolates (13 *S. Typhimurium* and 6 *S. Enteritidis*) and associated with other *bla* genes in three of them. As shown in Table 2, *bla*<sub>TEM-1</sub> was the most frequent *bla* gene in *S. Enteritidis* isolates.

The β-lactamase genes identified among the three C3G<sup>R</sup> isolates with an ESBL-positive phenotype were as follows: *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> (*S. Enteritidis*), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (*S. Gnesta*), and *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (*S. Virchow*). In these isolates, the *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M-14a</sub>-IS903 and *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M-15</sub>-*orf477* structures were identified. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-positive *S. Gnesta* isolate also carried a new variant of the *bla*<sub>TEM-1</sub> β-lactamase gene that showed a silent nucleotide change (T→C) at position 735 according to the Sutcliffe nomenclature [28]. Regarding the *bla*<sub>CTX-M-10</sub> genetic environment, the gene's upstream region included a group of ORFs (*orf2*, *orf3* and *orf4*) and a phage-related DNA invertase. Downstream, *orf7* was identified. All of the *S. enterica* isolates tested were negative for the plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, and *qepA*.

**Integron detection and characterization.** Seventy-one of the 90 isolates (79%) were positive for the *intI1* gene, and six different gene cassette arrangements were determined (Table 3, Fig.1). Class 2 and 3 integrons were absent. All 45 *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive *S. Typhimurium* isolates showed two integrons, with variable regions of 1000 and 1200 bp, harboring the *aadA2* and *bla*<sub>PSE-1</sub> gene cassettes, respectively. The *bla*<sub>OXA-1</sub> + *aadA1* gene array was found in most of the *bla*<sub>OXA-1</sub>-positive isolates (23 of 25), whereas the *S. Thompson* isolate showed the *aac(6')-Ib-cr+bla*<sub>OXA-1</sub>+*catB3+arr3* arrangement. Three non-classic class 1 integrons (lacking the 3'-CS) were found in three isolates (Fig. 1).

**Genetic environment of *sul* genes.** Of the 90 *S. enterica* isolates studied, 94.4% were resistant to sulfonamides. At least one *sul* gene was detected in 80 of them, and more than one *sul* gene in 17 of them (Table 2). The *sul1* gene was associated with class 1 integrons in all 70 *sul1*-positive isolates (Table 3).

The genetic environment of the *sul2* gene was determined in 11 of the 26 *sul2*-positive *S. enterica* isolates (42.3%). Four different structures were demonstrated (number of iso-

lates): *repC+sul2+strA-strB+tnpB* (6), *repC+sul2+strA-strB+IS26* (2), *repC+sul2+strA-strB* (1) and *sul2+strAΔdfrA14-strB* (2). In these two last isolates, the *strA* gene was truncated by the *dfrA14* gene, and a streptomycin-susceptibility phenotype was determined in both isolates. The *sul3* gene was associated with the above mentioned non-classic class 1 integrons (lacking the 3'-CS) in the two *sul3*-positive isolates.

In summary, an ACSSuT phenotype (including intermediate resistance) was confirmed in 68 *S. enterica* isolates (all of them *Typhimurium*), 15 of which were additionally resistant to nalidixic acid and three others to trimethoprim (Table 3). Three general gene profiles were mostly responsible for the ACSSuT multiresistant phenotype: (i) The *bla*<sub>PSE-1</sub> and *aadA2* genes, located within two class 1 integrons (structure A, Fig. 1), were associated with the *floR*, *sul* and *tet(G)* genes in 45 of these isolates. In five of the 45 isolates, one non-classic class 1 integron (*dfrA12+orfF+aadA2+cmlA1+aadA1*), the *bla*<sub>TEM-1</sub> gene, and the *bla*<sub>OXA-1</sub> gene were additionally detected (one, three, and one isolate, respectively). (ii) The *bla*<sub>OXA-1</sub> and *aadA1* (located within a class 1 integron of structure B, Fig. 1), *catA*, *sul*, and *tet(B)* gene profile occurred in 20 isolates. The *floR* gene was additionally found in two of them. (iii) An association between *bla*<sub>TEM-1b</sub>, *cmlA1*, *aadA* or *strA-strB*, *sul*, and *tet(A)* or *tet(B)* genes was detected in three isolates. In one of them, the *aac(3)-IV* and *dfrA12* genes were additionally amplified, confirming this *S. Typhimurium* isolate's ACGSSuTTm phenotype (Table 3).

## Discussion

Antimicrobial resistance in *S. enterica* is a cause of serious concern in human medicine. The drugs of choice for the treatment of complicated salmonellosis are usually ampicillin, amoxicillin/clavulanate, third-generation cephalosporins, or fluoroquinolones, but the increasing emergence of resistance to these antimicrobials limits the therapeutic choices [9,15,18]. In our study, the AMC<sup>R/I</sup> phenotype was detected in 12–23% of all *S. enterica* isolates recovered from human samples obtained from three Spanish hospitals. The β-lactamase-related mechanisms implicated in this AMC<sup>R/I</sup> phenotype were the production of the enzymes PSE-1, OXA-1 and TEM-1, as previously reported in other series [11]. The high prevalence of *bla*<sub>PSE-1</sub> and *bla*<sub>TEM-1</sub> observed among *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* isolates, respectively, was also previously reported [3,11,26]. The detection of more than one β-lactamase gene in the same isolate was infrequent in our study (4 isolates), in contrast to the data from other studies [3,11].

**Table 3.** Phenotypes and mechanisms of resistance detected in the 90 AMC<sup>R1</sup> and C3G<sup>R</sup> *Salmonella enterica* isolates

	Phenotype of resistance (number of isolates) <sup>a,b</sup>	Genotype of resistance (number of isolates) <sup>c</sup>	Class 1 integron <sup>d</sup>
<i>S. Typhimurium</i> (n = 79)	SUL+TET (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1c</sub> + <i>sul2</i> + <i>tet</i> (B) (1)	–
	STR+SUL+TET (7)	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>tet</i> (B) (2)	(B)
		<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB</i> + <i>sul2</i> + <i>tet</i> (B) (3)	–
		<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB</i> + <i>sul2</i> + <i>tet</i> (A) (1)	–
		<i>tet</i> (B) (1)	–
	STR+SUL+TET+NAL (1)	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>tet</i> (B) (1)	(B)
	SUL+TET+TMP+SXT (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strAΔdfrA14-strB</i> + <i>sul2</i> + <i>tet</i> (A) (1)	–
	<b>CHL+STR+SUL+TET+KAN</b> (2)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>tet</i> (G) (1)	(A)
		<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>tet</i> (G) + <i>aph</i> (3')-Ia (1)	(A)
	<b>CHL+STR+SUL+TET+NAL</b> (14) <sup>f</sup>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>tet</i> (G) (10)	(A)
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>floR</i> + <i>catA</i> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>tet</i> (B) (1)		(B)	
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>catA</i> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>tet</i> (B) (3)		(B)	
SUL+TET+TMP+SXT+NAL (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>sul2</i> + <i>tet</i> (A) + <i>strAΔdfrA14-strB</i>	–	
<b>CHL+STR+SUL+TET+TMP+SXT</b> (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>cmlA1</i> + <i>aadA</i> + <i>strA-strB</i> + <i>sul2</i> + <i>sul3</i> + <i>tet</i> (A) + <i>dfrA12</i>	(E)	
<b>CHL+STR+SUL+TET+TMP+SXT+NAL</b> (1)	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>floR</i> + <i>cmlA1</i> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>tet</i> (G) + <i>dfrA12</i>	(A)+(D)	
<b>CHL+STR+SUL+TET+GEN+TOB+TMP+SXT</b> (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>cmlA1</i> + <i>aadA</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>sul3</i> + <i>tet</i> (A) + <i>aac</i> (3)-IV + <i>dfrA12</i>	(F) <sup>g</sup>	
<i>S. Enteritidis</i> (n = 8)	None (2)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	–
	NAL (1)	– (1)	–
	TET (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	–
	SUL (2)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	–
	CTX+NAL (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	–
	SUL+SXT (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	–
<i>S. Gnesta</i> (n = 1)	ATM+CAZ+CTX+SUL (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	–
<i>S. Thompson</i> (n = 1)	CHL+SUL+TET (1)	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>floR</i> + <i>catB3</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>aac</i> (6')-Ib-cr	(C)
<i>S. Virchow</i> (n = 1)	SUL+TET+CTX+NAL (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> + <i>sul2</i> + <i>tet</i> (B) + <i>strA-strB</i>	–

<sup>a</sup>Abbreviations: CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, ATM: aztreonam, GEN: gentamicin, TOB: tobramycin, KAN: kanamycin, STR: streptomycin, NAL: nalidixic acid, TET: tetracycline, CHL: chloramphenicol, SUL: sulfonamides, TMP: trimethoprim, SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole.

<sup>b</sup>ACSSuT phenotype is marked in bold letters.

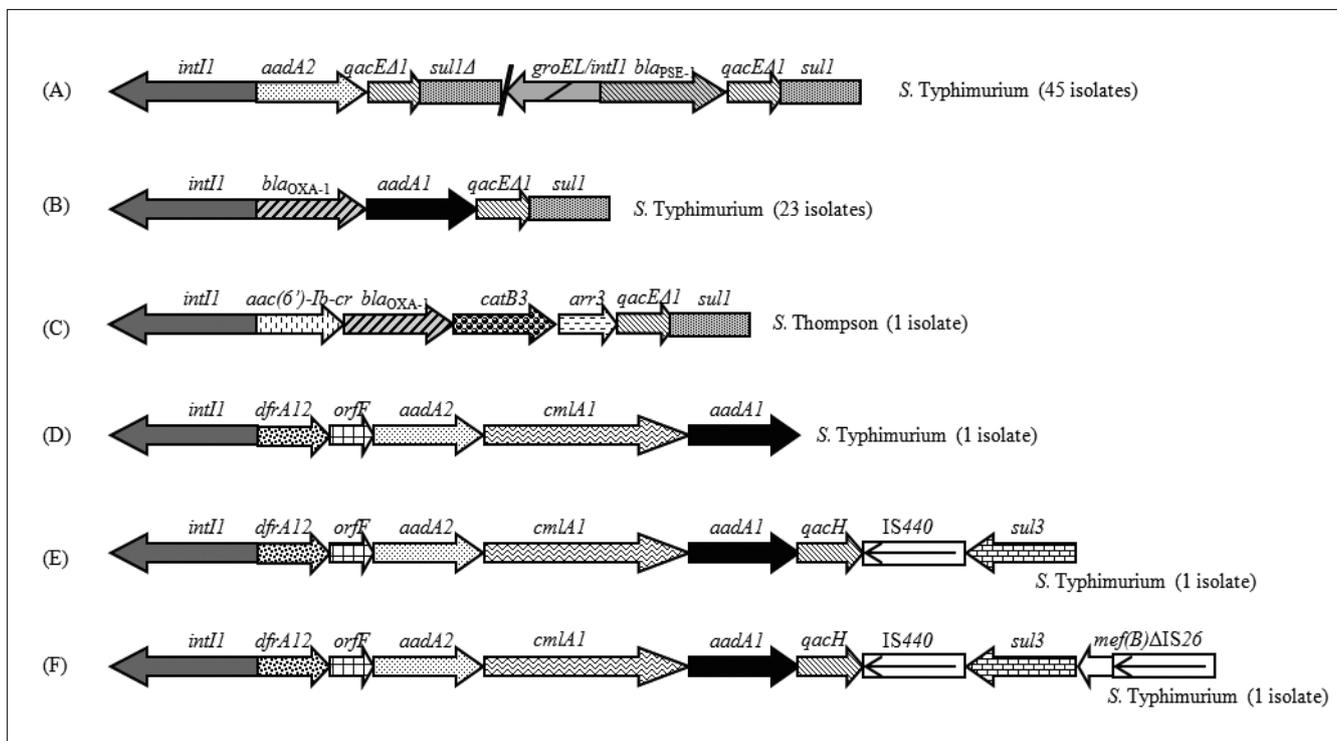
<sup>c</sup>Streptomycin resistance genes *aadA* correspond to *aadA1* or *aadA2*.

<sup>d</sup>Integron structures A-F correspond to those shown in Fig. 1.

<sup>e</sup>Six of these isolates had an intermediate phenotype with respect to tetracycline and nine isolates with respect to streptomycin.

<sup>f</sup>One of these isolates had an intermediate phenotype with respect to tetracycline and two with respect to streptomycin.

<sup>g</sup>This integron contained the putative macrolide efflux gene *mef*(B), truncated by IS26 such that only 256 bp of *mef*(B) remained.



**Fig. 1.** Gene cassette arrangements among class 1 integrons detected in *Salmonella enterica* isolates.

The ESBL phenotype in human clinical isolates of *S. enterica* is of particular interest but in our study it was detected in <1% of the *S. enterica* isolates obtained from the three hospitals. ESBL are spreading very rapidly among *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates whereas their frequency among *S. enterica* isolates is much lower [2,15,18]. The diversity of ESBL detected among our three ESBL-positive *S. enterica* isolates (CTX-M-14, CTX-M-15, and CTX-M-10) is noteworthy as is the fact that these genes were identified in unusual serotypes, i.e., *S. Gnesta* and *S. Virchow*.

The CTX-M-14  $\beta$ -lactamase-encoding gene, flanked by *ISEcp1* and *IS903* sequences, has been frequently detected in *E. coli* isolates of human and animal origin in Spain [6]. In *S. enterica*, the first description of this enzyme, in a clinical isolate of *S. Enteritidis* recovered in Spain, was that of Romero et al. [23]. However, the *bla*<sub>CTX-M-14</sub> gene has been identified in *Salmonella* of different serotypes and in several countries [2,6,9,18]. The genetic element *ISEcp1* is a mobile and mobilizing element that may be implicated in the *bla*<sub>CTX-M-14</sub> gene mobilization [19]. Similarly, the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene, flanked by *ISEcp1* and *orf477* elements, has been shown to be disseminated throughout the world and is mostly detected among *E. coli* and *Klebsiella* isolates [6]. In our study, this enzyme was identified in a *S. Gnesta* isolate. To our knowledge,

this is the first description of the presence of the CTX-M-15  $\beta$ -lactamase in *S. Gnesta*, a serotype uncommonly associated with human salmonellosis.

The CTX-M-10 enzyme has been described in *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., and *S. Virchow* isolates in Spain [6,9,17,21]. In the present work, this enzyme was also found in a *S. Virchow* isolate, and the genetic environment of the *bla*<sub>CTX-M-10</sub> gene was associated with a phage-related element, similar to one previously reported [17,21].

The ACSSuT multiresistance phenotype was detected in 68 of the *S. Typhimurium* isolates. Although this phenotype is usually associated with the widely distributed chromosomal SGI-1 (contains the *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul*, and *tet(G)* genes) [16,30], other gene profiles have also been described [10,12,22]. Indeed, in our study different resistant genotypes were determined; the most common one was the SGI-1 linked profile. The association of the *bla*<sub>OXA-1</sub>, *catA*, [*aadA1* / *strA-strB*], *sul*, and *tet(B)* genes, with the *bla*<sub>OXA-1</sub>+*aadA1* arrangement included within a 2000-bp class 1 integron, was found among 20 *S. Typhimurium* ACSSuT-resistant isolates. In addition, the gene profile *bla*<sub>TEM-1</sub>, *cmlA1*, [*aadA* / *strA-strB*], *sul* and [*tet(A)* / *tet(B)*] was identified in three *S. Typhimurium* isolates. In previous studies, these latter two resistance-gene profiles were shown to be located on hybrid self-

transferable plasmids, which also contain virulence genes, such as the pUO-StVR plasmids in *S. Typhimurium* and the recently reported pUO-SeVR1 in *S. Enteritidis* [10,12,22]. Further studies of our isolates are needed to determine the plasmid localization of these ACSSuT resistance genes and/or their possible association with virulence genes.

Class 1 integrons were present in 79% of the 90 isolates tested. Note the presence of a class 1 integron with the *aac(6)-Ib-cr+bla<sub>OXA-1</sub>+catB3+arr3* structure in the *S. Thompson* isolate. While this arrangement has been previously described, it is usually associated with complex integrons containing the *ISCR1* elements, double copies of 3'-CS, and *qnr* genes, among others (e.g., GenBank accession numbers AJ971343 and AY259086). In addition, non-classical integrons (without *qacEΔ1+sul1* genes) were found in three isolates (4%). All three included the gene cassette organization *dfiA12+orfF+aadA2+cmlA1+aadA1*, in two of these three isolates in association with the *qacH+IS440+sul3* structure previously reported in *Salmonella* and *E. coli* [1,25].

In conclusion, *bla<sub>PSE-1</sub>* and *bla<sub>OXA-1</sub>* were the most frequent *bla* genes implicated in the AMC<sup>RI</sup> phenotype in *S. Typhimurium*, and *bla<sub>TEM-1</sub>* the most frequent in *S. Enteritidis*. ESBL-positive isolates, corresponding to non-*S. Typhimurium* serotypes, were identified in <1% of the *S. enterica* isolates obtained from the three hospitals. Among the three different ESBL variants detected, ours is the first description of CTX-M-15 in *S. Gnesta*. In addition, the frequent association of the β-lactamase production with nalidixic acid resistance (22%), which precludes the use of fluoroquinolones in the treatment of salmonellosis, is a cause for clinical concern and underlines the need to track the evolution of β-lactamases in *S. enterica* isolates.

**Acknowledgements.** We thank M. Aurora Echeita from the Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, for serotyping of the isolates. M. de T. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Instituto de Salud Carlos III of Spain (MINCINN) (grant number FI08/00506).

**Competing interests.** None declared.

## References

- Antunes P, Machado J, Peixe L (2007) Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1545-1548
- Arllet G, Barrett TJ, Butaye P, Cloeckaert A, Mulvey MR, White DG (2006) *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect* 8:1945-1954
- Biendo M, Laurans G, Thomas D, Canarelli B, Hamdad-Daoudi F, Rousseau F, Castelain S, Eb F (2005) Molecular characterisation and mechanisms of resistance of multidrug-resistant human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Amiens (France). *Int J Antimicrob Agents* 26: 219-229
- Cambray G, Guerout AM, Mazel D (2010) Integrons. *Annu Rev Genet* 44:141-166
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eighteenth informational supplement M100-S20. CLSI, Wayne, PA, USA
- Coque TM, Baquero F, Cantón R (2008) Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill* 13:19044
- de Toro M, Rojo-Bezares B, Vinué L, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y (2010) *In vivo* selection of a *aac(6)-Ib-cr* and mutations in the *gyrA* gene in a clinical *qnrS1*-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. *J Antimicrob Chemother* 65:1945-1949
- European Food Safety Authority (EFSA) (2009) The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *EFSA J* 223
- González-Sanz R, Herrera-León S, de la Fuente M, Arroyo M, Echeita MA (2009) Emergence of extended-spectrum β-lactamases and AmpC-type β-lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *J Antimicrob Chemother* 64:1181-1186
- Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC (2002) Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2977-2981
- Güerri ML, Aladueña A, Echeita A, Rotger R (2004) Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. *Int J Antimicrob Agents* 24:327-333
- Herrero A, Mendoza MC, Threlfall EJ, Rodicio MR (2009) Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:1087-1093
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A (1988) Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10:867-878
- Michael GB, Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S (2006) Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes Infect* 8:1898-1914
- Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouveleki LS (2004) Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents* 23:547-555
- Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A (2006) The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* 8:1915-1922
- Oliver A, Coque TM, Alonso D, Valverde A, Baquero F, Cantón R (2005) CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1567-1571
- Pardos de la Gándara M, Seral C, Castillo García J, Rubio Calvo C, Weill FX (2011) Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella enterica* isolates in Saragossa, Spain (2001-2008) *Microb Drug Resist* 17:207-213

19. Partridge SR (2011) Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 35:820-855
20. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153-2162
21. Riaño I, García-Campello M, Sáenz Y, Álvarez P, Vinué L, Lantero M, Moreno MA, Zarazaga M, Torres C (2009) Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clin Microbiol Infect* 15:292-295
22. Rodríguez I, Guerra B, Mendoza MC, Rodicio MR (2011) pUO-SeVR1 is an emergent virulence-resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J Antimicrob Chemother* 66:218-220
23. Romero L, López L, Martínez-Martínez L, Guerra B, Hernández JR, Pascual A (2004) Characterization of the first CTX-M-14-producing *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolate. *J Antimicrob Chemother* 53:1113-1114
24. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C (2004) Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3996-4001
25. Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, Martínez S, Rojo-Bezares B, Zarazaga M, Torres C (2010) Class 1 integrons lacking qacEDelta1 and *sull* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol* 144:493-497
26. Soto SM, González-Hevia MA, Mendoza MC (2003) Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J Antimicrob Chemother* 51:1287-1291
27. Sunde M, Norström M (2006) The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J Antimicrob Chemother* 58:741-747
28. Sutcliffe JG (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3737-3741
29. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY (2009) Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:146-149
30. Targant H, Ponsin C, Brunet C, Doublet B, Cloeckaert A, Madec JY, Meunier D (2010) Characterization of resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from diseased cattle in France (2002 to 2007). *Foodborne Pathog Dis* 7:419-425
31. Vinué L, Lantero M, Sáenz Y, Somalo S, de Diego I, Pérez F, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Torres C (2008) Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. *J Med Microbiol* 57:916-920
32. Vinué L, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Olarte I, Undabeitia E, Somalo S, Zarazaga M, Torres C (2010) Genetic environment of sul genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents* 35:492-496



## High clonality and diversity of virulence determinants among *bla*<sub>PSE</sub>-positive *Salmonella* Typhimurium isolates recovered in three geographically distant Spanish hospitals

María de Toro <sup>a,b</sup>, Yolanda Sáenz <sup>a</sup>, Emilia Cercenado <sup>c</sup>, Beatriz Rojo-Bezares <sup>a</sup>, Marta García-Campello <sup>d</sup>, Esther Undabeitia <sup>e</sup>, Carmen Torres <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

<sup>b</sup> Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain

<sup>c</sup> Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra, Spain

<sup>e</sup> Laboratorio de Microbiología, Hospital San Pedro, Logroño, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 April 2012

Received in revised form 12 July 2012

Accepted 19 August 2012

Available online 20 September 2012

#### Keywords:

*Salmonella* Typhimurium

Beta-lactamases

PSE-1

Virulence genes

*Salmonella* genomic island 1

### ABSTRACT

Molecular typing, the presence of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1), and virulence factors were studied in 45 *bla*<sub>PSE</sub>-positive *S. Typhimurium* isolates from 3 hospitals. All isolates belonged to sequence type ST19, presented low clonal diversity, and harbored SGI1. The wide diversity of virulence factors was classified into 3 major virulotype groups.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium is the second most common serovar, after *S. Enteritidis*, implicated in human cases of salmonellosis (ECDC, 2010; EFSA, 2010). However, in recent years, an increasing prevalence of *S. Typhimurium* has been observed, associated with high percentages of resistance. So, it is important to monitor the resistance and the clonal spread of these isolates. *S. Typhimurium* isolates are frequently associated with the Ampicillin-Chloramphenicol/florfenicol-Streptomycin/spectinomycin-Sulphonamides-Tetracycline (ACSSuT) multiresistance phenotype that is additionally linked to the chromosomal *Salmonella* genomic island type 1 (SGI1) (Targant et al., 2010b). SGI1 harbours several resistance genes, such as *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul1*, and *tet(G)*, within the complex class 1 integron In104, and has been found not only in *S. Typhimurium* serotype, but also in a wide variety of *Salmonella enterica* serotypes and in *Proteus mirabilis* (Mulvey et al., 2006; Targant et al., 2010b).

The aim of this work was to determine the clonal relationship, the virulence profiles, and the SGI1 presence in all 45 *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive *S. enterica* serovar Typhimurium isolates (44 biphasic 4,12:i:1,2 and 1

monophasic variants), detected among a previously analyzed series of 90 isolates resistant or intermediately resistant to amoxicillin-clavulanic acid (AMC<sup>I/R</sup>). These isolates were recovered from 3 geographically distant Spanish hospitals (Hospital Gregorio Marañón, Madrid [HGM]; Complejo Hospitalario de Pontevedra [CHP]; and Hospital San Pedro, Logroño [HSP]) during 2007–2009 (de Toro et al., 2011).

In Spain, more than 4000 cases of human salmonellosis are reported per year, 29% of them due to *S. Typhimurium* (Instituto de Salud Carlos III, ISCIII, 2011). In our study, a total of 745 isolates were recovered in the 3 Spanish hospitals during 3 years, 252 (34%) of them belonging to the serovar Typhimurium. Resistance to ampicillin was detected in 67% (HGM), 64% (CHP), and 42% (HSP) of the isolates, and the AMC<sup>I/R</sup> phenotype was identified in 31% (HGM) and 20% (CHP and HSP) of isolates. All our 45 *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive *S. enterica* isolates presented the ACSSuT resistance phenotype and were classified into the following phage types (number of isolates): DT104 (3), DT104B (11), DT104L (10), DT193 (1), U302 (12), U310 (2), and NT (6).

All isolates were subjected to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after *Xba*I and *Spe*I digestion (de Toro et al., 2010). Considering the SGI1 structure and its association with the ACSSuT phenotype, the presence of SGI1 and its chromosomal location were studied by polymerase chain reaction (PCR) mapping in the 45 *S. Typhimurium*

\* Corresponding author. Tel.: +34-941299750; fax: +34-941299721.

E-mail address: [carmen.torres@unirioja.es](mailto:carmen.torres@unirioja.es) (C. Torres).

**Table 1**  
Virulence determinants detected in the 45 *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive *S. enterica* serovar Typhimurium strains.<sup>a</sup>

Genes contained in <i>Salmonella</i> pathogenicity islands (SPIs)	Chromosomal-encoded genes	Plasmid-encoded genes	Number of strains	%	Virulence pattern (virulotype) <sup>b</sup>
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4_R, spi4_D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, bcfC, slyA</i>	<i>spvC, rck, pef(A–D)</i>	32	71	A1
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4_R, spi4_D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, bcfC</i>	<i>spvC, rck, pef(A–D)</i>	3	7	A2
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4_R, spi4_D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, bcfC, slyA</i>	Non detected	7	16	B1
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4_R, spi4_D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, bcfC</i>	Non detected	2	4	B2
<i>invE/A, orgA, avrA, ttrC, ssaQ, sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC, spi4_R, spi4_D, sopB, pipA</i>	<i>phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE1, sopE2, bcfC, slyA</i>	Non detected	1	2	C

<sup>a</sup> The genes determining the virulotype profiles are underlined. Virulotype A: *avrA, ssaQ, mgtC, spi4\_D, sopB, sodC1, spvC, bcfC*. Virulotype B: *avrA, ssaQ, mgtC, spi4\_D, sopB, sodC1, bcfC*. Virulotype C: *avrA, ssaQ, mgtC, spi4\_D, sopB, sodC1, sopE1, bcfC*.

<sup>b</sup> The difference between virulotypes A1 and A2 is the presence of the *slyA* gene, as well as for B1 and B2.

isolates (Targant et al., 2010b). In addition, a total of 29 virulence genes were studied by PCR, including positive controls in all of them (Bej et al., 1994; Herrero et al., 2006; Huehn et al., 2010; Paiva de Sousa and Dubreuil, 2001; Soto et al., 2006; Way et al., 1993). A virulotype was defined as the combination of 10 potential virulence determinants (*avrA, ssaQ, mgtC, siiD, sopB, gipA, sodC1, sopE1, spvC, and bcfC*) (Table 1) (Huehn et al., 2010).

Although the 45 *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive *S. Typhimurium* isolates belonged to 3 geographically distant and nonrelated Spanish hospitals, a high clonal relationship was found among them. Isolates were considered closely related if their patterns showed from 1 to 3 band differences with respect to the first pattern for each digestion (named X1a and S1a, for PFGE-*XbaI* and PFGE-*SpeI*, respectively), and possibly related when 4 to 6 band differences were found. According to these criteria, the 45 isolates analyzed were classified into 10 closely related PFGE patterns using the *SpeI* enzyme (S1a–1j) and into 6 closely related and one possibly related patterns using the *XbaI* enzyme (X1a–1f, X2). The most prevalent combinations were S1a and X1a (12 strains) and S1d and X1a (8 isolates), whereas other combinations included 3 strains or less (Table 2). One strain for each pattern

combination was analyzed by the MLST technique (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>), and all of them belonged to sequence type ST19 (clonal complex CC19). *S. Typhimurium*, which is considered an old serovar, has developed a high diversity, and 12 different STs have been described, although the ST19 is the most widely disseminated (Lan et al., 2009; Littrup et al., 2010).

All but one *S. Typhimurium* strain showed the complete classical SG11 structure (Beutlich et al., 2011; Targant et al., 2010b), whereas an 859-bp deletion was detected in the *orf5–orf6* region located upstream of the IS6100 element in the sequence of strain W313. This alteration has not been previously described and has been included in GenBank with the accession number JF775513. Although several variants of the SG11 structure resulting from genetic recombination events (named as SG11-A to SG11-U) have been previously reported in association with different resistance phenotypes (Beutlich et al., 2011; Mulvey et al., 2006; Shuilian et al., 2011; Targant et al., 2010a), the resistance region of the strain W313 was not affected.

Virulence factors have been extensively studied in *Salmonella* spp. in order to determine their relationship with the host source, geographical location, or even their association with antimicrobial resistance determinants (Fluit, 2005; Herrero et al., 2006; Huehn et al., 2010; Littrup et al., 2010). In our study, all the strains were positive for the genes located in pathogenicity islands SPI1 (*avrA, invE/A, orgA* genes), SPI2 (*ttrC, ssaQ*), SPI3 (*sugR, rhuM, rmbA, misL, mgtC*), SPI4 (*spi4\_R, spi4\_D*), SPI5 (*sopB, pipA*), and chromosomal genes *phoP/Q, hinH2, iroB, sodC1, sopE2, and bcfC*. Chromosomal-encoded *slyA, sopE1, and gipA* genes were positive for 40 (89%), one, and none of the strains, respectively. Plasmid-encoded genes (*spvC, rck, pefA–D*) were positive in 35 (78%) isolates (Table 1). Among the 45 *S. Typhimurium* strains, 3 virulotypes were detected (Table 1), with virulotype A being the most prevalent (35 strains, 78% of the isolates), as previously described (Beutlich et al., 2011; Huehn et al., 2010). Virulotypes A and B detected in our study have also been found in *S. Typhimurium* isolates in other studies (Beutlich et al., 2011; Huehn et al., 2010). Virulotype C is characterized by the presence of *sopE1* and was only found in one of our strains. Previous studies (Ehrbar and Hardt, 2005; Mirold et al., 2001; Prager et al., 2000; Streckel et al., 2004) have demonstrated that *sopE1* is frequently found among host-adapted serovars such as *S. Typhi*, but not among *S. enterica* subsp. I strains, although it has been previously reported in *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* isolates (Huehn et al., 2010; Littrup et al., 2010; Mirold et al., 2001).

Although other resistance genes, such as *bla*<sub>TEM-1b</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aph(3')-Ia, cmlA1, dfrA12, or sul3*, were present in our isolates, none of them was detected inside the SG11 structure. Some studies have described the co-integration of virulence and antimicrobial resistance determinants into plasmids (Chu et al., 2001; Fluit, 2005; Herrero et al., 2008; Rodríguez et al., 2011), giving rise to new plasmids that

**Table 2**  
PFGE patterns, phage types, and virulence patterns (virulotype) of PSE-producing *S. Typhimurium* strains according to hospital.

PFGE pattern ( <i>XbaI–SpeI</i> ) <sup>a</sup>	Phage type (number of strains)	Virulence pattern <sup>b</sup> (number of isolates)	Hospital <sup>c</sup> (number of strains)		
			HSP	HGM	CHP
X1a–S1a	NT (1), 104 (2), 104B (2), 104L (4), U302 (2), U310 (1)	A1 (12)	6	5	1
X1a–S1b	104B (1), 104L (1)	A1 (2)	1	1	
X1a–S1c	NT (2)	A1 (2)		2	
X1a–S1d	104B (1), 104L (1), U302 (6)	A1 (7), B1 (1)	3	3	2
X1a–S1e	U302 (1)	A1 (1)	1		
X1a–S1h	U302 (1)	A1 (1)		1	
X1a–S1j	104B (1), U302 (1)	A1 (2)		2	
X1b–S1a	104L (1)	A1 (1)	1		
X1b–S1g	104B (1)	A1 (1)		1	
X1b–S1h	104B (1)	A2 (1)			1
X1b–S1i	U302 (1)	A2 (1)			1
X1c–S1a	104B (2)	A1 (1), B1 (1)		2	
X1d–S1b	104L (2)	A1 (1), A2 (1)			2
X1e–S1a	104L (1)	A1 (1)		1	
X1f–S1a	NT (2), 104B (1)	B1 (1), B2 (2)	1		2
X1f–S1b	NT (1), 104 (1), 104B (1)	B1 (2), C (1)	1	1	
X2–S1f	193 (1), U310 (1)	B1 (2)		2	

<sup>a</sup> All isolates corresponded to the sequence type ST19.

<sup>b</sup> Virulence patterns (virulotype) correspond to the A1, A2, B1, B2, and C profiles defined in Table 1.

<sup>c</sup> HSP = Hospital San Pedro, Logroño; HGM = Hospital Gregorio Marañón, Madrid; CHP = Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra.

can be selected by antimicrobial pressure. Further studies will be necessary to determine the presence of resistance genes linked to the plasmidic-virulence determinants.

High clonality, low genetic variations in SGI1, and diverse virulence profiles were found in the multiresistant *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive *S. enterica* serovar Typhimurium isolates recovered from 3 geographically distant and nonrelated Spanish hospitals. In our study, epidemiologic data of the 3 hospitals showed an increase in the number of *S. Typhimurium* isolates over the studied period (2007–2009). This tendency was also shown in other nationwide and European epidemiologic studies in the last years (EFSA, 2010; ISCIH, 2011). Because of that, dissemination of antimicrobial resistance and virulence traits in this bacterial species has important clinical relevance and its evolution should be tracked in the future.

## Acknowledgments

The authors thank M. Aurora Echeita from the Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, for serotyping of the isolates. The authors also thank B. Guerra (Federal Institute for Risk Assessment BfR, Berlin) for the virulence control strains.

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

## References

- Bej AK, Mahbubani MH, Boyce MJ, Atlas RM. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(1):368–73.
- Beutlich J, Jahn S, Malorny B, Hauser E, Hühn S, Schroeter A, et al. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(16):5655–64.
- Chu C, Chiu CH, Wu WY, Chu CH, Liu TP, Ou JT. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(8):2299–303.
- de Toro M, Rojo-Bezares B, Vinué L, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y. In vivo selection of a *aac(6′)-Ib-cr* and mutations in the *gyrA* gene in a clinical *qnrS1*-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(9):1945–9.
- de Toro M, Sáenz Y, Cercenado E, Rojo-Bezares B, García-Campello M, Undabeitia E, et al. Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals. *Int Microbiol* 2011;14(3):173–81.
- Ehrbar K, Hardt WD. Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect Genet Evol* 2005;5(1):1–9.
- European Food Safety Authority (EFSA). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J* 2010; 8(1):1496.
- European Centre for Disease Prevention, Control (ECDC). Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC; 2010.
- Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43(1):1–11.
- 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(1):39–45.
- Herrero A, Mendoza MC, Rodicio R, Rodicio MR. Characterisation of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(12): 4514–7.
- Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, et al. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog Dis* 2010;7(5):523–35.
- Instituto de Salud Carlos III (ISCIH). Boletín epidemiológico semanal. 2011 Vol. 19, no. 8/100–116.
- Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol* 2009;9(5):996–1005.
- Littrup E, Torpdahl M, Malorny B, Huehn S, Christensen H, Nielsen EM. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica*. *Infect Genet Evol* 2010;10(7):1132–9.
- Mirolid S, Rabsch W, Tschäpe H, Hardt WD. Transfer of the *Salmonella* type III effector *sopE* between unrelated phage families. *J Mol Biol* 2001;312(1):7–16.
- Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* 2006;8(7):1915–22.
- Paiva de Sousa C, Dubreuil JD. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 2001;291(1):15–20.
- Prager R, Mirolid S, Tietze E, Strutz U, Knüppel B, Rabsch W, et al. Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 2000;290(7):605–17.
- Rodríguez I, Guerra B, Mendoza MC, Rodicio MR. pUO-SeVR1 is an emergent virulence-resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(1):218–20.
- Shuilian B, Yan H, Chen M, Zhang Z, Shi L, Wang H. New variant *Salmonella* genomic island 1-U in *Proteus mirabilis* clinical and food isolates from South China. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(5):1178–9.
- Soto SM, Rodríguez I, Rodicio MR, Vila J, Mendoza MC. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 4):365–73.
- Streckel W, Wolff AC, Prager R, Tietze E, Tschäpe H. Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1, and AvrA differ with systemic, enteric, and epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Mol Nutr Food Res* 2004;48(7):496–503.
- Targant H, Doublet B, Aarestrup FM, Cloeckaert A, Madec JY. IS6100-mediated genetic rearrangement within the complex class 1 integron In104 of the *Salmonella* genomic island 1. *J Antimicrob Chemother* 2010a;65(7):1543–5.
- Targant H, Ponsin C, Brunet C, Doublet B, Cloeckaert A, Madec JY, et al. Characterization of resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from diseased cattle in France (2002 to 2007). *Foodborne Pathog Dis* 2010b;7(4):419–25.
- Way JS, Josephson KL, Pillai SD, Abbaszadegan M, Gerba CP, Pepper IL. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(5):1473–9.

# pMdT1, a small ColE1-like plasmid mobilizing a new variant of the *aac(6′)-Ib-cr* gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

María de Toro<sup>1,2</sup>, Irene Rodríguez<sup>3†</sup>, Beatriz Rojo-Bezares<sup>1</sup>, Reiner Helmuth<sup>3</sup>, Carmen Torres<sup>1,2</sup>,  
Beatriz Guerra<sup>3‡</sup> and Yolanda Sáenz<sup>1\*‡</sup>

<sup>1</sup>Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain; <sup>2</sup>Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain; <sup>3</sup>Department for Biological Safety, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany

\*Corresponding author. Tel: +34-941278868; Fax: +34-941278887; E-mail: ysaenz@riojasalud.es

†Present address: Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

‡These authors contributed equally to this work.

Received 9 October 2012; returned 30 November 2012; revised 17 December 2012; accepted 27 December 2012

**Objectives:** To characterize a 5.9 kb *aac(6′)-Ib-cr*-harbouring plasmid that was detected in a clinical *Salmonella* Typhimurium DT104B strain.

**Methods:** Extraction and purification of plasmid DNA and electrotransformation assays were carried out in order to obtain kanamycin-resistant transformants. MICs of several fluoroquinolones and aminoglycosides were determined. DNA sequencing was performed by primer walking on purified plasmid preparations. The new plasmid nucleotide sequence was analysed and compared with available sequences using bioinformatic tools.

**Results:** pMdT1 is a 5.9 kb mobilizable ColE1-like plasmid that harbours *aac(6′)-Ib-cr4*, a gene encoding a new variant of the AAC(6′)-Ib-cr protein (225 amino acids). This active protein conferred resistance to tobramycin and kanamycin, and also decreased susceptibility to ciprofloxacin and norfloxacin in the transformant strain, as MICs demonstrated. The mobilization region, necessary for horizontal transfer and composed of the *mobA*, *mobB*, *mobC* and *mobD* genes, displayed a high degree of identity with those from representative ColE1-like plasmids. The basis of mobility (*bom*), *oriT* and origin of replication regions were also detected. Apart from the acetylase-encoding gene, three other open reading frames (ORFs) were determined. No similarities were found when the ORF1 sequence was compared with the sequences included in GenBank. The deduced ORF2 protein predicted a CopG-like structure characteristic of transcriptional regulators, and the deduced ORF3 protein was identical to macrophage stimulating factors.

**Conclusions:** The pMdT1 is the smallest mobilizable ColE1-like plasmid containing an *aac(6′)-Ib-cr* gene that has been described so far.

**Keywords:** plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR, *Salmonella* Typhimurium, *mob* genes

## Introduction

The *aac(6′)-Ib* gene (also named *aacA4*), coding for an acetyltransferase, confers resistance to kanamycin, amikacin and tobramycin, and can be mobilized and spread by plasmids.<sup>1,2</sup> The *aac(6′)-Ib* genes have mainly been found as gene cassettes within class 1 integrons, although fused genes and different variants, such as the *aac(6′)-Ib-cr* gene, have also been described.<sup>1</sup> The AAC(6′)-Ib-cr variant displays Trp102→Arg and Asp179→Tyr changes with respect to the reference AAC(6′)-Ib (GenBank AAD22142.2), and leads to additional low-level resistance to the fluoroquinolones ciprofloxacin and norfloxacin.<sup>2,3</sup> Different

genetic environments facilitating the dissemination of *aac(6′)-Ib-cr* have been described.<sup>1,4</sup> In this sense, the first *in vivo* selection of the *aac(6′)-Ib-cr* gene and the GyrA change (Ser83→Tyr) in the *qnrS1*-positive *Salmonella* Typhimurium DT104B strain Se20 after ciprofloxacin treatment was described in previous work by our group.<sup>5</sup> This strain was resistant to nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, kanamycin, tobramycin, streptomycin and trimethoprim, and harboured five plasmids (sizes ranged from 6 to 194 kb). The aim of the present work was to characterize the ~6 kb plasmid (designated pMdT1) in which the *aac(6′)-Ib-cr* gene was located.

## Materials and methods

### Plasmid analysis, transformation assays and transformant strain characterization

*Salmonella* Typhimurium Se20 plasmid DNA was extracted by an alkaline lysis procedure<sup>6</sup> and transformed into *Escherichia coli* ElectroMax DH10B cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by electrotransformation following the manufacturer's recommendations. Transformants were selected on Luria-Bertani agar plates containing kanamycin (30 mg/L), and the presence of the *aac(6')-Ib* gene was confirmed by PCR amplification. Plasmid DNA from transformant TF-Se20 was obtained using the QIAfilter Plasmid Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). MICs of nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, gentamicin, tobramycin and kanamycin were determined by the agar dilution method.<sup>7</sup>

### pMdT1 sequencing analyses

The nucleotide sequence of plasmid pMdT1 harboured by TF-Se20 was determined by primer walking (Qiagen and Cogenics sequencing service) with specific primers for *aac(6')-Ib* gene binding sites as the start point on purified plasmid preparations. Analysis and comparisons of sequences were carried out using the programs BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), Transeq sequence translation (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) and Clone Manager 9 (Sci-Ed Software). Gene sequences were further compared and aligned with the GenBank data ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)). The pMdT1 nucleotide sequence has been deposited in the GenBank database under accession number JX457478.

## Results and discussion

A small plasmid, designated pMdT1, of 5931 bp containing a gene coding for an acetyltransferase was detected in *Salmonella* Typhimurium Se20.<sup>5</sup> pMdT1 could be electrotransformed to an *E. coli* recipient (the transformant was named TF-Se20). The sequence of pMdT1 (GenBank JX457478) was compared with available data on the GenBank database. The maximum identity (97%) of this plasmid was found against the plasmid pBERT from *Salmonella* Berta (GenBank AF025795), though pBERT shared only 52% of pMdT1. Bioinformatic analysis showed eight open reading frames (ORFs) in the sequence, and the average G+C content was 51% compared with the 52% reported for the *Salmonella enterica* genome.

### Antimicrobial resistance region

Compared with the *E. coli* DH10B parent, the MICs for the TF-Se20 transformant were increased 16-, >32-, >2- and 4-fold for tobramycin, kanamycin, ciprofloxacin and norfloxacin, respectively. The MICs of gentamicin, nalidixic acid, levofloxacin and ofloxacin remained unchanged (Table 1).

Regarding the pMdT1 sequence, the ORF Finder analysis revealed that one *orf* sequence (nt 4172–4849), encoding a protein of 225 amino acids, showed the acetyltransferase (GNAT) superfamily domain between amino acids 51 and 208, and possessed 99% identity in a 184 amino acid overlap with the AAC(6')-Ib-cr responsible for the phenotype detected in TF-Se20 strain. The encoded pMdT1 N-acetyltransferase (here named AAC(6')-Ib-cr4) showed Trp128→Arg and Asp205→Tyr substitutions, analogous to Trp102→Arg and Asp179→Tyr of AAC(6')-Ib-cr.<sup>2,3</sup> Additionally, AAC(6')-Ib-cr4 showed the

**Table 1.** MICs of aminoglycoside, nalidixic acid and fluoroquinolone antimicrobial agents for the *Salmonella* Typhimurium Se20 strain, the transformant TF-Se20 strain and the electrotransformation recipient strain (*E. coli* ElectroMax DH10B)

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)		
	Se20 <sup>a</sup>	TF-Se20	<i>E. coli</i> ElectroMax DH10B
Nalidixic acid	>512	2	2
Gentamicin	1	1	1
Tobramycin	32	32	2
Kanamycin	128	128	≤4
Ciprofloxacin	8	0.016	≤0.008
Levofloxacin	8	0.016	0.016
Norfloxacin	32	0.125	0.03
Ofloxacin	16	0.016	0.016

<sup>a</sup>The Se20 strain harboured the Ser83→Tyr GyrA mutation and the *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr4* genes.

Asn46→Thr change that has previously been detected in other AAC(6')-Ib variants (e.g. X98393 and GQ293500).

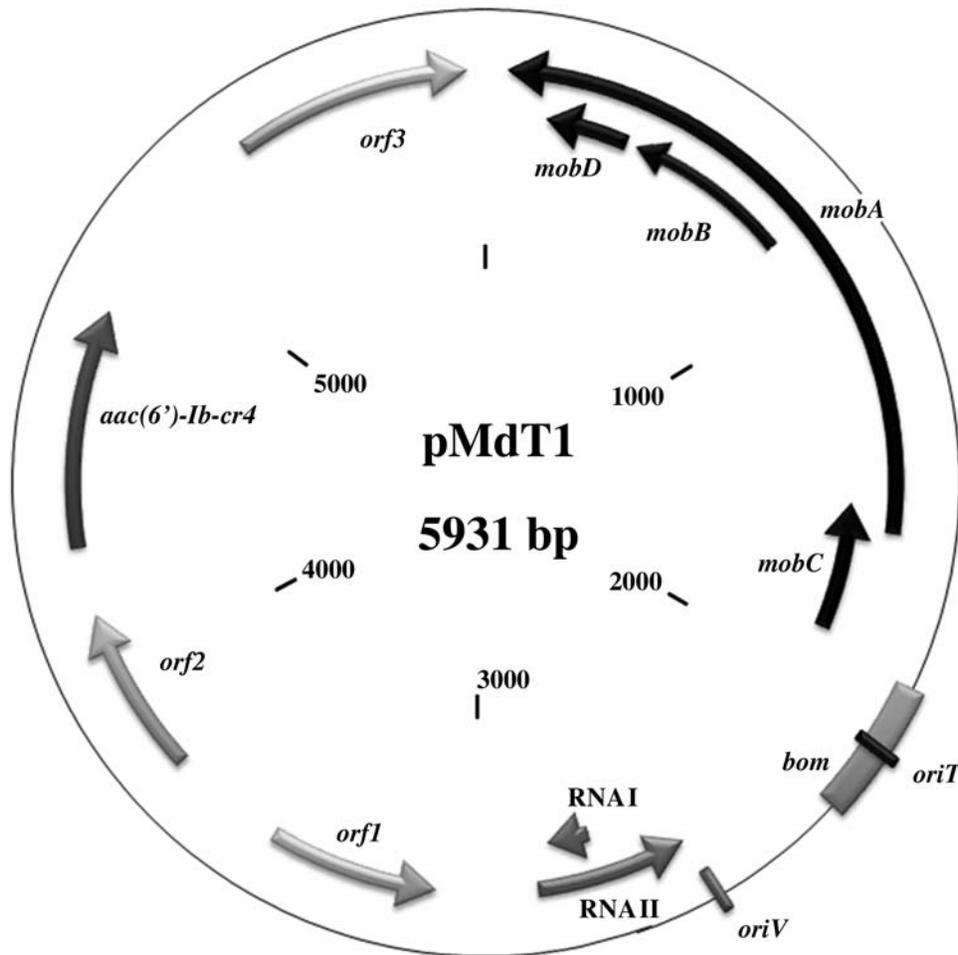
The *aac(6')-Ib-cr* is often part of gene cassettes located inside class 1 integrons.<sup>1</sup> Indeed, in the pMdT1 sequence the *aac(6')-Ib-cr4* gene was embedded in its classical gene cassette structure with the conserved *attC* recombination site downstream of the gene; however, no integrase or *attI* sequences or other gene cassettes could be identified in the whole pMdT1. The ORF Finder program predicted a long N-terminal extension of AAC(6')-Ib-cr (225 instead of 184 amino acids), and the detection of a very good putative ribosomal binding site upstream of this start codon strongly supported this prediction. Variations in the start codon of some *aac(6')-Ib* variants have been previously described with no consequence for the efficiency of their proteins.<sup>8</sup> In any case, the AAC(6')-Ib-cr4 enzyme was active in the TF-Se20 strain, as the MICs of aminoglycosides and some fluoroquinolones demonstrated (Table 1).

### Mobilization region

Four partially overlapping ORFs that code for the MobA, MobB, MobC and MobD mobilization proteins<sup>9</sup> were detected between nt 53 and nt 1865. The pMdT1 *mob* region showed significant identity to that of ColE1-like plasmids, and the highest degree of similarity (>96%) was observed for proteins of the *Salmonella* pK plasmid (see Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). As has been previously reported (pSW200 and pRK10 plasmids), the *mob* region is preceded by the basis of mobility (*bom*) region, a *cis*-requiring region for plasmid mobility. Plasmid pMdT1 also contained (nt 1911–2191) a sequence similar to the *bom* region of pSW200 and pRK10 plasmids (GenBank L42525 and EU697813, and with 87% and 79% of similarity, respectively). The *nic*-cleavage site was determined at nt 2033 by comparison with pRK10 and MOB<sub>HEN</sub> family plasmids.<sup>9</sup>

### Replication region

The 354 bp region, between nt 2488 and nt 2841, displayed identity of 78% and 75% to the replication region of the



**Figure 1.** Genetic map of the pMdT1 plasmid. The predicted protein-encoding regions on the plus and minus strands are shown with arrows, indicating the direction of transcription. The features of the ColE1-like replicon are indicated as RNAI, RNAII and *oriV*.

ColE1-like cryptic pHW15 plasmid (AM167518) and the *qnrB19*-pSGI15 plasmid (FN428572), respectively. In ColE1-like plasmids two partially overlapping RNAs (RNAI and RNAII) are transcribed from the origin of vegetative replication (*oriV*) and constitute the basic replicon of the ColE1-like plasmids, necessary for replication and copy number of plasmids.<sup>10</sup> In the case of pMdT1, the *oriV* was located at position 2488, the RNAI and RNAII segments were 108 and 354 nt long, respectively (Figure 1), and their corresponding  $-10$  and  $-35$  promoter sequences were highly conserved compared with pHW15 and pSGI15.

### Other accessory genes

In the remaining 2412 bp of the pMdT1 sequence, three ORFs were determined using ORF Finder. No similarities were found when the ORF1 sequence was compared with the GenBank sequences. Regarding ORF2 and ORF3, of 122 and 183 amino acids, respectively, no conserved domains were detected among them, whereas the ORF3 sequence was identical to a macrophage-stimulating factor detected in *Salmonella* Heidelberg and *E. coli* (e.g. accession EIC34781 and EIL42560); the Phyre2 protein secondary structure program predicted that

ORF2 may adopt the CopG-like structure characteristic of many transcriptional regulators.

### Conclusions

The pMdT1 is the smallest ColE1-like resistance plasmid that harbours the *aac(6′)-Ib-cr4* gene described so far. This transferable plasmid contains mobilizable elements that enable it to disseminate further.

### Acknowledgements

Part of this study was presented at the International Plasmid Biology Conference, Santander, Spain, 2012 (Abstract number 60).

We thank T. Jové (Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgium) and M. R. Rodicio (Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain) for their help in genetic analysis and critical review of the manuscript prior to submission.

### Funding

This work was partially supported by the Federal Institute for Risk Assessment (BfR-46-001 and BfR-45-004). M. d. T. has a pre-doctoral fellowship

from the Instituto de Salud Carlos III of Spain (MICINN) (grant number FI08/00506); she had a 3 month stay at the Federal Institute for Risk Assessment (BfR, Berlin), supported by the same grant.

---

## Transparency declarations

None to declare.

---

## Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

---

## References

- 1 Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E et al. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009; **33**: 757–84.
- 2 Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front Microbiol* 2012; **3**: 24.
- 3 Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; **12**: 83–8.
- 4 Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 2010; **13**: 151–71.
- 5 de Toro M, Rojo-Bezares B, Vinué L et al. *In vivo* selection of *aac(6′)-Ib-cr* and mutations in the *gyrA* gene in a clinical *qnrS1*-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1945–9.
- 6 Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; **7**: 1513–23.
- 7 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S21*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
- 8 Casin I, Bordon F, Bertin P et al. Aminoglycoside 6′-N-acetyltransferase variants of the Ib type with altered substrate profile in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 209–15.
- 9 Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia M et al. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 2004; **28**: 79–100.
- 10 Hammerl JA, Beutlich J, Hertwig S et al. pSGI15, a small ColE-like *qnrB19* plasmid of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain carrying *Salmonella* genomic island 1 (SGI1). *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 173–5.

# Manuscrito sometido

## Resistencia a antibióticos y virulotipos en aislados clínicos de *Salmonella enterica*.

María de Toro<sup>1,2</sup>, Cristina Seral<sup>3,4</sup>, Beatriz Rojo-Bezares<sup>1</sup>, Carmen Torres<sup>1,2</sup>, F. Javier Castillo<sup>3,4</sup>, Yolanda Sáenz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España. <sup>2</sup>Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España. <sup>3</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España. <sup>4</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

### ARTICLE INFO

#### Palabras clave :

Resistencia a ampicilina, *bla*<sub>PSE-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, fenotipo ACSSuT, integrones, SGI1, PFGE.

### ABSTRACT

**Introducción:** El incremento de *Salmonella enterica* multirresistente a los antibióticos, incluidos beta-lactámicos y fluoroquinolonas, es un problema de importancia clínica. La propagación de *S. Typhimurium* resistente a ampicilina (AMP)-cloranfenicol (CHL)-estreptomina (STR)-sulfamidas (SUL)-tetraciclina (TET) portadoras de la Isla Genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1) y la captación de material genético transferible han favorecido la multirresistencia en este género.

**Métodos:** Se estudiaron 114 aislados clínicos de *S. enterica* (período 2009-2010). Se determinó la sensibilidad a 20 antibióticos por difusión en disco y microdilución. Los mecanismos de resistencia e integrones se analizaron por PCR y secuenciación en los aislados AMP<sup>R</sup>. La relación clonal de los aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos se determinó mediante PFGE, y la presencia de SGI1 y 29 genes de virulencia mediante PCR.

**Resultados:** Se observaron altos porcentajes de resistencia a SUL (68%), TET (58%), AMP (55%) y STR (46%). El 92% de los 63 aislados AMP<sup>R</sup> fueron multirresistentes, siendo el más frecuente el fenotipo AMP-STR-TET-SUL (19 aislados) asociado al genotipo *bla*<sub>TEM-1b+strA-strB+tet(B)+sul2</sub>. Un 48% de los aislados presentaron integrones de clase 1 (7 estructuras distintas) destacando la estructura *bla*<sub>OXA-1+aadA1</sub> (8 aislados), un integrón vacío e integrones no clásicos (5 aislados). El gen *bla*<sub>PSE-1</sub> se detectó dentro de la SGI1 clásica en 13 aislados clonalmente relacionados y portadores del mismo virulotipo.

**Conclusiones:** El alto porcentaje de *S. enterica* multirresistentes, especialmente asociado a *S. Typhimurium*, al fenotipo AMP, STR, TET y SUL, y al genotipo *bla*<sub>TEM-1b+strA-strB+tet(B)+sul2</sub> evidencia un riesgo importante de posibles fracasos en el tratamiento de infecciones graves producidas por este serotipo.

### Introducción

La salmonelosis es una de las infecciones alimentarias más importantes en Europa, donde alcanza un ratio de 29,8 casos por cada 100.000 habitantes cada año y afecta, principalmente, a niños entre 0 y 4 años<sup>1</sup>. Aunque se ha reducido el número de salmonelosis durante los últimos años, *Salmonella enterica* sigue siendo una de las primeras causas de brotes de toxoinfección alimentaria<sup>2</sup>. Enteritidis y Typhimurium son las serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (*S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, respectivamente) más prevalentes en el ámbito clínico, representando más del 80% de los aislados obtenidos<sup>2-4</sup>.

Las infecciones por salmonelas gastroentéricas cursan como una gastroenteritis autolimitada de manera que el tratamiento antibiótico solo es requerido en casos graves, en pacientes inmunodeprimidos, con factores

predisponentes de riesgo o en edades extremas de la vida. No obstante, es preocupante el incremento de aislados de *Salmonella* resistentes a algunos de los antibióticos utilizados para el tratamiento empírico, en particular amoxicilina/ácido-clavulánico (AMC), cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas. La resistencia a beta-lactámicos en *S. enterica* se debe principalmente a la adquisición de enzimas beta-lactamasas, siendo TEM-1, PSE-1 y OXA-1 las más frecuentemente detectadas y relacionadas con la resistencia a ampicilina (AMP) y AMC<sup>5-7</sup>. La diseminación de este tipo de resistencias de manera horizontal está mediada por elementos genéticos móviles o movilizables, como plásmidos, transposones e integrones.

Los integrones son elementos genéticos capaces de adquirir y expresar casetes genéticos mediante un

mecanismo de recombinación sitio-específica<sup>8</sup>. Los integrones de clase 1 son los más frecuentemente descritos y presentan habitualmente los genes *qacEΔ1* y *sull* en su región 3'-conservada (3'-CS), aunque también se han descrito integrones no-clásicos carentes de dicha región<sup>8-10</sup>.

La emergencia a nivel mundial de cepas de *S. Typhimurium* con fenotipo de pentarresistencia ACSSuT (resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas y tetraciclina), especialmente del fagotipo DT104 y fagotipos relacionados, se ha asociado principalmente con la presencia de los genes *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sull* y *tet(G)* localizados en un integrón complejo de clase 1 denominado In104<sup>11, 12</sup>. Este integrón forma parte de una isla genómica de 43 kb denominada "Salmonella Genomic Island type 1" (SGII)<sup>11,12</sup>. Sin embargo, también se han descrito variantes de la SGII surgidas en eventos de recombinación y asociadas a distintos fenotipos de resistencia<sup>11,13</sup>.

Se han estudiado diversos factores de virulencia, incluso su relación con determinantes de resistencia, en aislados del género *Salmonella* de distintos hospedadores y localizaciones geográficas<sup>14, 15</sup>. Estos factores de virulencia pueden encontrarse tanto formando parte de islas de patogenicidad (SPIs), como codificados en cromosoma o en plásmidos<sup>15, 16</sup>. Así, algunos estudios inciden en la co-integración de determinantes de virulencia y de resistencia a antibióticos en plásmidos híbridos virulencia-resistencia que pueden ser fácilmente seleccionados bajo presión antibiótica<sup>14, 17, 18</sup>.

Tras conocer el fenotipo de resistencia a distintos antibióticos en una colección de aislados de *S. enterica* identificados en pacientes asistidos en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, los objetivos de nuestro trabajo fueron caracterizar los mecanismos de resistencia a beta-lactámicos y a otros antibióticos, así como los integrones, y determinar la relación clonal, el perfil de virulencia y la presencia de la isla genómica de *Salmonella* (SGII) en los aislados resistentes a ampicilina.

## Material y Métodos

### Aislamientos clínicos.

Entre septiembre de 2009 y noviembre de 2010 se procesaron 7.606 coprocultivos en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" (Zaragoza), que presta asistencia a una población de 286.774 habitantes con 29.506 ingresos, 2.315.197 consultas y 127.694 urgencias anuales. Durante el periodo de tiempo estudiado se obtuvieron 247 aislados de *S. enterica*, entre los que se seleccionó un

aislado por paciente, incluyéndose así un total de 114 aislados en el presente trabajo. La identificación se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas (WIDER®, Francisco Soria Melguizo, Madrid, España) y el serotipado mediante el estudio del antígeno somático O (Lipopolisacárido) y de los factores antigénicos flagelares H (proteínas) (Biorad, Marne-la-Coquette, Francia), siguiendo el esquema de Kauffmann y White<sup>19</sup>.

### Estudios de sensibilidad a antibióticos.

Se estudió la sensibilidad a 20 antibióticos (AMP, AMC, cefalotina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, aztreonam, cefoxitina, gentamicina, tobramicina, kanamicina, amikacina, estreptomina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, tetraciclina, cloranfenicol, sulfamidas, trimetoprim y trimetoprim/sulfametoxazol) mediante microdilución (WIDER®) y/o difusión en disco<sup>20</sup>. La producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) se determinó fenotípicamente utilizando el test de sinergia de doble disco y el fenotipo AmpC se estableció por comparación de la zona de inhibición del disco de cefoxitina (30 µg), en presencia o en ausencia de cloxacilina (200 µg)<sup>7</sup>.

### Detección molecular de genes de resistencia.

En aquellos aislados resistentes a ampicilina (AMP<sup>R</sup>), se evaluó la presencia de los genes implicados en la resistencia a beta-lactámicos [*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *bla*<sub>PSE-1</sub>], tetraciclina [*tet(A)*-*tet(E)*, *tet(G)*], aminoglucósidos [*aadA*, *strA-strB*, *aac(3)-I*, *aac(3)-II*, *aac(3)-IV*, *ant(2'')*] y *aac(6')*-Ib], sulfamidas [*sull*, *sul2*, *sul3*], trimetoprim [*dfrA*], cloranfenicol [*cmlA*, *catA* y *floR*] y quinolonas [*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxAB*], así como el entorno genético de los genes *sul2* y *sul3* mediante PCR y secuenciación<sup>7</sup>. Se utilizó una PCR-multiplex para la detección de beta-lactamasas de tipo AmpC<sup>21</sup>.

### Detección y caracterización de integrones.

La presencia de los genes codificantes de integrasas de tipo 1, 2 y 3 (*intI1*, *intI2*, *intI3*), así como la región 3'-CS de los integrones de clase 1 (*qacEΔ1-sull*) fueron analizados por PCR en los aislados AMP<sup>R</sup>. La región variable del integrón fue estudiada por PCR y posterior secuenciación para conocer el conjunto de casetes génicos que portaban<sup>7</sup>. En aquellos integrones de clase 1 que contenían el casete génico *bla*<sub>OXA-1</sub> se caracterizaron los promotores implicados en su expresión mediante PCR y secuenciación<sup>22</sup>.

*Detección y caracterización de la Isla Genómica de Salmonella (SGII), factores de virulencia y estudio de la clonalidad en aislados bla*<sub>PSE-1</sub>*-positivos.*

En los aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos se evaluó la presencia de la SGII y su localización en el cromosoma mediante PCR y secuenciación con cebadores anclados a las uniones al cromosoma; así como a los determinantes de resistencia e integrones localizados en ella<sup>12</sup>.

Se estudiaron por PCR y secuenciación 29 genes de virulencia: los genes *invE/A*, *orgA*, *avrA*, *trrC*, *ssaQ*, *sugR*, *rhuM*, *rmbA*, *misL*, *mgtC*, *spi4R*, *spi4D*, *sopB* y *pipA* localizados en las SPIs de tipo 1-5; los genes *phoP/Q*, *hin/H2*, *iroB*, *slyA*, *sodC1*, *sopE1*, *sopE2*, *bcfC*, y *gipA* en el cromosoma y los genes *spvC*, *rck* y *pefA-D* localizados en plásmidos<sup>23</sup>. La presencia o ausencia de los genes de virulencia *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4D*, *sopB*, *gipA*, *sodC1*, *sopE1*, *spvC* y *bcfC* se utilizó para clasificar las cepas en virulotipos<sup>15</sup>.

Se estudió la relación clonal de los aislados *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) tras digestión del DNA genómico con las enzimas *XbaI* y *SpeI* (New England Biolabs Inc., USA). Se utilizó el método de preparación de insertos del DNA genómico y las condiciones de electroforesis previamente descritas<sup>23</sup>. Los geles de agarosa se analizaron e interpretaron según el criterio de Tenover et al. (1995)<sup>24</sup> y se compararon con patrones de PFGE determinados en estudios previos<sup>23</sup>.

## Resultados.

### *Aislados bacterianos y estudios de sensibilidad a antibióticos.*

Durante el período analizado (2009-2010), entre los 114 aislados de *Salmonella* estudiados se identificaron una *Salmonella enterica* subesp. *arizonae* y 113 aislados de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serotipos Typhimurium (70 aislados), Enteritidis (18), Rissen (3), Infantis (3), Mikawashima (2), Ohio (2), Riggil (1), Nigeria (1), Manhattan (1), Newport (1), Lindenburg (1), Bovis-morbificans (1), Neasden (1), Dublin (1), Moscow (1), Anatum (1), *Salmonella* spp. (5). *S.* Typhimurium y *S.* Enteritidis fueron los más prevalentes (61 y 16%, respectivamente).

Se observó un alto porcentaje de resistencia a sulfamidas (68%), tetraciclina (58%), AMP (55%) y estreptomicina (46%) en los 114 aislados estudiados (Figura 1). Asimismo, considerando únicamente los 63 aislados AMP<sup>R</sup>, se encontraron altos porcentajes de co-resistencia a sulfamidas (94%), tetraciclina (90%) y estreptomicina (76%), así como a cloranfenicol y AMC (38%) (Figura 1). En 58 de los 63 aislados AMP<sup>R</sup> (mayoritariamente pertenecientes al serotipo Typhimurium, 55 aislados), se observaron 17 fenotipos distintos de multiresistencia (resistencia a 3 o más familias de antibióticos); siendo las asociaciones más comunes, aquellas que presentaban

resistencia a AMP-estreptomicina-tetraciclina-sulfamidas (19 aislados) y AMP-AMC-estreptomicina-tetraciclina-cloranfenicol-sulfamidas (14 aislados) (Tabla 1). Se detectó el fenotipo ACSSuT en el 30% de los aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup>, y en ningún caso de detectaron los fenotipos AmpC o BLEE. Todos los aislados fueron sensibles a cefepime, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, amikacina y ciprofloxacino.

### *Detección de genes de resistencia.*

En la Tabla 1 se observan los genes de resistencia detectados en los 63 aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup>. Entre los genes codificantes de beta-lactamasas, el más frecuente fue *bla*<sub>TEM-1</sub> (40 aislados, 64%), seguido de *bla*<sub>PSE-1</sub> (13 aislados, 21%) y *bla*<sub>OXA-1</sub> (8 aislados, 13%). No se detectaron genes codificantes de beta-lactamasas en dos aislados AMP<sup>R</sup>. En aquellos aislados *bla*<sub>OXA-1</sub>-positivos se observó un fenotipo de sensibilidad disminuida a cefepime.

Se encontraron distintas asociaciones genéticas responsables del fenotipo ACSSuT detectado en 18 aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> (Tabla 1): a) *bla*<sub>OXA-1</sub>+*catA*+*aadA1*+*sul1*+*tet*(B); b) *bla*<sub>PSE-1</sub>+*floR*+*aadA2*+*sul1*+*tet*(G); c) *bla*<sub>TEM-1</sub>+*catA* o *cmlA*+*aadA* o *strA-strB*+*sul2* o *sul3*+ *tet*(A) o *tet*(B).

Se detectaron los genes *dfrA1* (6 aislados), *dfrA14* (1 aislado) y *dfrA12* (3 aislados), entre los 10 aislados trimetoprim-resistentes, y el gen *aac*(3)-IV en los 5 aislados resistentes a gentamicina (Tabla 1). Ningún aislado de *S. enterica* testado amplificó *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxAB* ni *aac*(6')-Ib-cr.

### *Detección y caracterización de integrones.*

Treinta aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> (48%) amplificaron el gen *intI1*, sin embargo no se detectaron integrones de clase 2 ó 3. Se observaron siete estructuras distintas de integrones de clase 1 (Tabla 1, Figura 2). Los 13 aislados de *S.* Typhimurium *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos mostraron dos integrones, con regiones variables de 1000 y 1200 pb, que albergaban los genes *aadA2* y *bla*<sub>PSE-1</sub>, respectivamente. La estructura genética *bla*<sub>OXA-1</sub>+*aadA1*, asociada a un promotor PcW-P2, se encontró en los 8 aislados *bla*<sub>OXA-1</sub>-positivos.

Se observó la presencia de un integrón vacío en un aislado y de integrones no clásicos (defectivos en su región 3'-CS) en 5 aislados, con las siguientes organizaciones (número de aislados): *dfrA1* (4) y *estX*+*psp*+*aadA2*+*cmlA1*+*aadA1*+*qacH*+IS440+*sul3* (1) (Figura 2).

### *Entorno genético de genes sul.*

Un total de 59 aislados (94%) con fenotipo AMP<sup>R</sup> presentaron resistencia a sulfamidas, en los que se detectaron las siguientes combinaciones de genes de resistencia: *sul1* (22 aislados), *sul2* (28), *sul1+sul2* (5), *sul1+sul3* (1) y *sul1+sul2+sul3* (2) (Tabla 1). Se encontraron 5 entornos distintos para el gen *sul2* asociados a los genes de resistencia a estreptomicina *strA-strB* (Figura 2). En uno de los aislados, el gen *strA* se encontraba truncado por el gen *dfrA14*, dando lugar a un fenotipo de sensibilidad a estreptomicina (Tabla 1, Figura 2). El gen *sul3* (detectado en 3 aislados) se relacionó en su entorno genético con el gen de resistencia a eritromicina (*mef(B)*), deletado en todos los casos por una IS26) y adicionalmente a los genes *aadA1*, *aadA2*, *cmlA* y *qacH* en dos aislados, uno de los cuales era portador de un integrón defectivo de clase 1 (Figura 2).

#### *Detección y caracterización de la SGI1, factores de virulencia y estudio de clonalidad en aislados bla<sub>PSE-1</sub>-positivos.*

Los 13 aislados de *S. Typhimurium* *bla<sub>PSE-1</sub>*-positivos mostraron el fenotipo de multiresistencia ACSSuT asociado con los genes *bla<sub>PSE-1</sub>*, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*, y presentaban el doble integrón de 1000 y 1200 pb (Figura 2B). Toda esta zona de resistencia se encontró junto con las uniones a cromosoma en la estructura de SGI1, mapeada por PCR y secuenciación en los 13 aislados.

Todos los aislados fueron positivos para los genes albergados en las islas de patogenicidad SPI1-SPI5; para los genes codificados en cromosoma (*phoP/Q*, *hin/H2*, *iroB*, *slyA*, *sodC1*, *sopE2* y *bcfC*) y para los genes plasmídicos *spvC*, *rck* y *pefA-D*. Los genes *gipA* y *sopE1* no se detectaron en ningún aislado. Todos los aislados se agruparon en un único virulotipo, compuesto por los genes *avrA-ssaQ-mgtC-spi4D-sopB-sodC1-spvC-bcfC*.

El PFGE tras digestión con la enzima *XbaI* agrupó a los 13 aislados en tres perfiles (X1a, X1b y X1g); mientras que el PFGE-*SpeI* los clasificó en cuatro patrones (S1a, S1d, S1k y S1l) (Figura 3). Teniendo en cuenta ambas digestiones, se encontraron seis combinaciones de patrones: X1a-S1a (2 cepas), X1a-S1d (4), X1a-S1k (1), X1b-S1a (1), X1b-S1d (4) y X1g-S1l (1). Los patrones mostraban entre 1 y 3 bandas de diferencia con respecto al primer patrón de cada digestión (X1a y S1a para PFGE-*XbaI* y PFGE-*SpeI*, respectivamente) y se clasificaron como cepas clonalmente relacionadas.

#### **Discusión.**

Entre los antibióticos más utilizados para el tratamiento de infecciones graves producidas por *S. enterica* figuran AMC, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas, pero la emergencia de mecanismos de

resistencia a dichos antibióticos limita las opciones terapéuticas. Además, el creciente incremento de la prevalencia del serotipo Typhimurium durante los últimos años se asocia a mayores porcentajes de resistencia a AMP y AMC, en detrimento del serotipo Enteritidis, menos relacionado con fenotipos de multiresistencia<sup>2-4, 25</sup>. Este fenómeno se está observando también en nuestro entorno clínico en el que a principios del período 2001-2008, el serotipo Enteritidis (56%) dominaba sobre Typhimurium (26%), mientras que se observó una inversión en esta tendencia al final del mismo (27% Enteritidis versus 41% Typhimurium)<sup>26</sup>. Además el aumento en el número de *S. Typhimurium* estuvo acompañado por un porcentaje mayor de aislados de *S. enterica* resistentes a AMP (de 39% a 52% al avanzar el período) y a AMC (0,4%-16%), por unos porcentajes de resistencia a cotrimoxazol y ciprofloxacino mantenidos (13% y 0,5%, respectivamente), y por una disminución en la resistencia a ácido nalidíxico (de 42,5% a 20%). Durante el período 2009-2010, continuó la tendencia creciente de Typhimurium frente a Enteritidis (61% vs 16%) y el porcentaje de aislados AMP<sup>R</sup> que se encontró fue del 55%, el 87% de ellos del serotipo Typhimurium, valores acordes con otros estudios previos<sup>5-7</sup>.

Entre los 63 aislados AMP<sup>R</sup> estudiados se encontraron 17 fenotipos distintos de multiresistencia, siendo el más común la corresponsión a AMP-estreptomicina-tetraciclina-sulfamidas detectado en 19 aislados que portaban los genes de resistencia *bla<sub>TEM-1b</sub>-strA-strB-tet(B)-sul2*. Esta asociación fenotipo-genotipo había sido previamente descrita por nuestro grupo<sup>7</sup>. Por otra parte, el fenotipo ACSSuT de *S. Typhimurium* ha sido frecuentemente asociado a la presencia de SGI1, que contiene los genes *bla<sub>PSE-1</sub>*, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*<sup>11, 12</sup>, aunque en nuestro caso solo 13 de 19 aislados con fenotipo ACSSuT presentaron el gen *bla<sub>PSE-1</sub>* y sensibilidad disminuida a AMC. Otros perfiles que incluyen los genes *bla<sub>TEM-1</sub>* y *bla<sub>OXA-1</sub>* han sido previamente referidos y relacionados con la presencia de plásmidos transferibles<sup>17, 18</sup>. Al contrario que otros estudios y conforme a trabajos realizados en nuestro grupo, no se detectó la presencia de más de una beta-lactamasa en el mismo aislado<sup>5-7</sup>.

A semejanza de estudios previos<sup>5, 11</sup>, se encontraron integrones de clase 1 en el 48% de los 63 aislados AMP<sup>R</sup>, siendo los más numerosos aquellos que contenían en su región variable los genes *bla<sub>OXA-1</sub>+aadA1* (8 aislados) y la presencia de cepas con el doble integrón característico de la SGI1 (*bla<sub>PSE-1</sub>/aadA1*, 13 aislados). Aunque el gen *bla<sub>TEM-1</sub>* no se encontró dentro de integrones, diez de los aislados *bla<sub>TEM-1</sub>*-positivos albergaron genes *dfrA* en estructuras de tipo integrón previamente descritas, como la estructura *intI1+dfrA12+gcuF+aadA2+qacEΔ1+sul1* y relacionado con el serotipo Rissen<sup>9</sup>; el gen *dfrA1* presente en dos estructuras distintas<sup>27</sup> o el integrón de

clase 1 carente de su región 3'-CS asociado al gen *sul3* previamente descrito en *Salmonella* y *E. coli*<sup>9, 10</sup>.

Algunos autores sugieren que dentro de la subespecie I de *Salmonella* existe una baja clonalidad<sup>28</sup>, mientras que otros estudios muestran por PFGE la alta clonalidad existente en un mismo serotipo<sup>29</sup>. Las 13 cepas de *S. Typhimurium bla<sub>PSE-1</sub>*-positivas estaban clonalmente relacionadas, y sus patrones de PFGE eran coincidentes con los de aislados procedentes de otros hospitales españoles geográficamente distantes<sup>23</sup>. En este trabajo se vuelve a demostrar que además de la alta clonalidad existente entre las cepas de *S. Typhimurium bla<sub>PSE-1</sub>*, todas ellas mostraron el mismo perfil de virulencia, virulotipo *avrA-ssaQ-mgtC-spi4D-sopB-sodCI-spvC-bcfC* muy prevalente entre las cepas de *S. Typhimurium* de acuerdo con datos previos<sup>15, 23</sup>. Además, en nuestros aislados se encontró el gen *bla<sub>PSE-1</sub>* dentro de la estructura clásica de la SGI1 en cepas *S. Typhimurium*, serotipo frecuentemente asociado a dicha estructura<sup>11, 12</sup>.

En resumen, se ha encontrado una alta prevalencia de cepas resistentes a AMP, estreptomicina, tetraciclina y sulfamidas. El serotipo *Typhimurium* resultó el más prevalente, tanto en el total de aislados como entre los AMP<sup>R</sup> (87%). El 92% de los aislados AMP<sup>R</sup> mostraron un fenotipo de multirresistencia, siendo el gen *bla<sub>TEM-1</sub>* el más frecuentemente detectado (63,5%). Las cepas que albergaban el gen *bla<sub>PSE-1</sub>* mostraron una baja diversidad clonal, así como homogeneidad en cuanto a la presencia y estructura de la SGI1 detectada y a los determinantes de virulencia contenidos. La asociación de genes de virulencia y resistencia en cepas clonalmente relacionadas plantea la conveniencia de vigilar su evolución y establecer los reservorios y vías de propagación que podrían explicar su emergencia en aislados clínicos.

El alto porcentaje de *S. enterica* multirresistentes detectadas, especialmente asociado a *S. Typhimurium*, dificulta la elección de alternativas seguras para el tratamiento empírico de infecciones graves ocasionadas por *Salmonella* y precisa estudios epidemiológicos continuos para que permitan vigilar la evolución de la resistencia y la emergencia de clones que aúnan resistencia y virulencia.

#### Agradecimientos.

M. de T. posee una beca de investigación del Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto de Salud Carlos III (ref FI08/00508).

Parte de este trabajo fue presentado en el XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y

Microbiología Clínica (comunicación 692). Bilbao, 9-11 de mayo de 2012.

#### Referencias

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual epidemiological report on communicable diseases, 2010. [consultada 8 de agosto de 2012] [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1011\\_sur\\_annual\\_epidemiological\\_report\\_on\\_communicable\\_diseases\\_in\\_europe.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1011_sur_annual_epidemiological_report_on_communicable_diseases_in_europe.pdf).
2. Instituto de Salud Carlos III. Boletín epidemiológico semanal. 2011. Vol 19; n°8: 100-16.
3. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DMA, Jensen AB, Wegener HC, et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis.* 2011; 8(8): 887-900.
4. Moreno-Flores A, Martínez-López J, Pulian-Morais V, García-Campello M. Evolución de la salmonelosis no tifoidea en el norte de la provincia de Pontevedra, España (2003-2010). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012 (en prensa).
5. Güerri ML, Aladueña A, Echeita A, Rotger R. Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24(4): 327-33.
6. Biendo M, Laurans G, Thomas D, Canarelli B, Hamdad-Daoudi F, Rousseau F, et al. Molecular characterization and mechanisms of resistance of multidrug-resistant human *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolated in Amiens (France). *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 26(3):219-29.
7. de Toro M, Sáenz Y, Cercenado E, Rojo-Bezares B, García-Campello M, Undabeitia E, et al. Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals. *Int Microbiol.* 2011; 14(3): 173-81.
8. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012; 3:119.
9. Antunes P, Machado J, Peixe L. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(4): 1545-8.

10. Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, Martínez S, Rojo-Bezares B et al. Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sull* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol.* 2010; 144(3): 493-7.
11. Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.* 2006; 8(7): 1915-22.
12. Targant H, Ponsin C, Brunet C, Doublet B, Cloeckaert A, Madec JY, Meunier D Characterization of resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from diseased cattle in France (2002 to 2007). *Foodborne Pathog. Dis.* 2010; 7(4): 419-25.
13. Beutlich J, Jahn S, Malorny B, Hauser E, Hühn S, Schroeter A, et al. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* Genomic Island 1-positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(16): 5655-64.
14. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*?. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 43(1): 1-11.
15. Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, et al. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog. Dis.* 2010; 7(5): 523-35.
16. Soto SM, Rodríguez I, Rodicio MR, Vila J, Mendoza MC. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *J Med Microbiol.* 2006; 55(4): 365-73.
17. Herrero A, Mendoza MC, Threlfall EJ, Rodicio MR. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmid in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(9): 1087-93.
18. Rodríguez I, Guerra B, Mendoza MC, Rodicio MR. pUO-SeVR1 is an emergent virulence-resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(1): 218-20.
19. Grimont, F, Weill, FX.. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars. WHO-Institut Pasteur [acceso electrónico] 2007 [consultada 16 diciembre 2012]. Disponible en <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eighteenth informational supplement M100-S22. Wayne, PA, EE.UU, 2012.
21. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(6): 2153-62.
22. Vinué L, Jové T, Torres C, Ploy MC. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 38(6): 526-34.
23. de Toro M, Sáenz Y, Cercenado E, Rojo-Bezares B, García-Campello M, Undabeitia E, et al. High clonality and diversity of virulence determinants among *bla*<sub>PSE</sub>-positive *Salmonella* Typhimurium isolates recovered in three geographically distant Spanish hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74(4): 426-8.
24. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2233-9.
25. Soto S, González-Hevia MA, Mendoza MC. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(5): 1287-91.
26. Pardos de la Gándara M, Seral C, Castillo-García FJ, Rubio-Calvo C, Weill FX. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella enterica* isolates in Saragossa, Spain (2001-2008). *Microb Drug Resist.* 2011; 17(2): 207-13.
27. Lapiere L, San Martín B, Araya-Jordán C, Borje C. Comparison of integron-linked antibiotic resistance genes in strains of *Salmonella spp.* Isolated from swine in Chile in 2005 and 2008. *Can J Microbiol.* 2010; 56(6): 515-21.
28. Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(5), 996-1005.
29. Litrup E, Torpdahl M, Malorny B, Huehn S, Christensen H, Nielsen EM. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica*. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(7): 1132-9.

**Tabla 1.**Fenotipos y mecanismos de resistencia detectados en los 63 aislados de *Salmonella* AMP<sup>R</sup>.

Fenotipo de resistencia (N° aislados) <sup>a,b,c</sup>	Genotipo de resistencia (N° aislados) <sup>d</sup>	Serotipo (N° aislados)	Integrón de clase 1 y entornos de genes <i>sul</i> (N° aislados) <sup>e</sup>
AMP (3)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (3)	<i>S. Moscow</i> (1); <i>Salmonella</i> sp. (1); <i>S. Enteritidis</i> (1)	-
AMP+TET (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>tet</i> (B) (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	-
AMP+SUL (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (1)	<i>S. Enteritidis</i> (1)	-
AMP+STR+SUL (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+sul2</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	c (1)
AMP+TET+SUL (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	-
AMP+STR+TET+SUL (19)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (16) <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA+strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (2) <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA5+strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (19)	c(11)/d(1)/e(3)/f(1) c (2) f (1)
AMP+AMC+TET+SUL (1)	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1+tet</i> (B)+ <i>sul1</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	A (1)
AMP+AMC+TET+CHL+SUL (4)	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1+tet</i> (B)+ <i>catA+sul1</i> (4)	<i>S. Typhimurium</i> (4)	A (4)
AMP+AMC+STR+TET+SUL (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	c (1)
AMP+GEN+TOB+TET+SUL (2)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aac</i> (3)-IV+ <i>tet</i> (A)+ <i>sul1+sul2</i> (2)	<i>S. Typhimurium</i> (2)	F (1)
AMP+STR+TET+CHL+SUL (2)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet</i> (B)+ <i>catA+sul2</i> (1) <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet</i> (B)+ <i>sul1+sul2</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (2)	c (2)
AMP+STR+NAL+TET+SUL (1)	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB+tet</i> (A)+ <i>tet</i> (B)+ <i>sul2</i> (1)	<i>Salmonella</i> sp. (1)	-
AMP+AMC+STR+TET+CHL+SUL (14)	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1+tet</i> (B)+ <i>catA+sul1</i> (3) <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet</i> (G)+ <i>floR+sul1</i> (9) <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet</i> (B)+ <i>tet</i> (G)+ <i>floR+sul1</i> (1) <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2+tet</i> (G)+ <i>floR+sul1+sul2</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (14)	A (3) B (9) B (1) B (1)

AMP+STR+TET+SUL+TRM+SXT (6)	<i>aadA2+tet(A)+sul1+dfrA12</i> (1) <sup>f</sup> <i>aadA2+tet(B)+sul1+dfrA12</i> (1) <sup>f</sup> <i>bla<sub>TEM-1a</sub>+strA-strB+tet(B)+sul2+dfrA1</i> (2) <i>bla<sub>TEM-1a</sub>+bla<sub>TEM-1b</sub>+strA-strB+tet(B)+sul2+dfrA1</i> (1) <i>bla<sub>TEM-1b</sub>+aadA1+strA-strB+tet(A)+tet(B)+sul1+sul2+sul3+dfrA1</i> (1)	<i>S. Rissen</i> (1) <i>S. Rissen</i> (1) <i>S. Typhimurium</i> (2) <i>S. Typhimurium</i> (1) <i>S. Typhimurium</i> (1)	C (1) C (1) D, c (2) D, c (1) E, a, f
<b>AMP+AMC+STR+NAL+TET+CHL+SUL</b> (1)	<i>bla<sub>PSE-1</sub>+aadA2+tet(G)+floR+sul1</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	B(1)
AMP+AMC+STR+TET+SUL+TRM+SXT (1)	<i>bla<sub>TEM-1a</sub>+strA-strB+tet(B)+sul2+dfrA1</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	D, c (1)
AMP+AMC+NAL+TET+SUL+TRM+SXT (1)	<i>bla<sub>TEM-1b</sub>+strAΔ-dfrA14-ΔstrA-strB+tet(A)+sul1+sul2</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	g (1)
<b>AMP+AMC+GEN+TOB+STR+TET+CHL+SUL</b> (1)	<i>bla<sub>PSE-1</sub>+aac(3)-IV+aadA2+tet(G)+floR+sul1</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	B (1)
AMP+GEN+TOB+CHL+SUL+TRM+SXT (1) <sup>e</sup>	<i>bla<sub>TEM-1b</sub>+aac(3)-IV+aadA2+cmlA1+sul1+sul2+sul3+dfrA12</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	C, b (1)
<b>AMP+GEN+TOB+STR+TET+CHL+SUL+TRM+SXT</b> (1)	<i>bla<sub>TEM-1a</sub>+aac(3)-IV+aadA1+aadA2+tet(A)+tet(B)+cmlA1+sul1+sul3+dfrA1</i> (1)	<i>S. Typhimurium</i> (1)	E, G (1)

<sup>a</sup>Abreviaturas: AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; FOX: cefoxitina; NAL: ácido nalidíxico; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; STR: estreptomicina; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; SUL: sulfamidas; TRM: trimetoprim; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol.

<sup>b</sup>El fenotipo ACSSuT está marcado en negrita.

<sup>c</sup>Los aislados con fenotipo AMC corresponden a aquellos que mostraban sensibilidad disminuida a amoxicilina-ácido clavulánico (AMC<sup>LR</sup>).

<sup>d</sup>El gen de resistencia a estreptomicina *aadA* corresponde a *aadA1* o *aadA2*.

<sup>e</sup>Estructuras de los integrones (A-G) y entornos de los genes *sul* (a-g) según la Figura 2.

<sup>f</sup>Genotipo de resistencia a AMP no detectado.

<sup>g</sup>Resistencia intermedia a estreptomicina.

## Characterization of plasmids implicated in the mobilization of extended-spectrum and AmpC beta-lactamase genes in clinical *Salmonella enterica* isolates and temporal-stability of the resistance genotype.

María de Toro<sup>a,b</sup>, Patricia García<sup>c</sup>, Irene Rodríguez<sup>d,1</sup>, Beatriz Rojo-Bezares<sup>b</sup>, Reiner Helmuth<sup>d</sup>, Yolanda Sáenz<sup>b</sup>, M. Rosario Rodicio<sup>c</sup>, Beatriz Guerra<sup>d†</sup>, Carmen Torres<sup>a,b†\*</sup>

<sup>a</sup>Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, La Rioja, Spain. <sup>b</sup>Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, La Rioja, Spain. <sup>c</sup>Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain. <sup>d</sup>Department for Biological Safety, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany.

<sup>1</sup>Current affiliation: Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

Keywords :

ESBL  
*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>,  
plasmid, *Salmonella enterica*

The plasmids implicated in the mobilization of beta-lactamase genes in ESBL- and AmpC-producing *Salmonella enterica* isolates recovered from three Spanish hospitals were characterized. The temporal stability of these plasmids and of resistance phenotype without antimicrobial pressure was also assessed in the laboratory setting. The resistance determinants and their genetic environments were characterized by PCR-sequencing, and their genomic location was analyzed by S1-PFGE and I-CeuI-PFGE followed by Southern-blot hybridization. The 11 *S. enterica* studied strains carried *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (serovar Virchow, 2 isolates), *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (Virchow, 2), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (Enteritidis, 1), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Gnesta and *S. enterica* group C, 2), *bla*<sub>SHV-2</sub> (Livingstone, 1), *bla*<sub>SHV-12</sub> (Enteritidis, 1) and *bla*<sub>CMY-2</sub> (Bredeney, 2). The *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M-14-IS903</sub> and *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M-15-orf477</sub> genetic structures were detected. IncII and IncA/C plasmids carried *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes. The *bla*<sub>CTX-M-9</sub> included into an In60 complex integron and the *bla*<sub>CTX-M-10</sub> linked to a phage related element, were found into non-typeable plasmids. Conjugation and temporal-stability experiments were performed in vitro through daily passages (100 days) in the absence of antimicrobials. In the stability experiments, five of the 11 tested isolates lost the ESBL or AmpC plasmidic genes and this fact was associated to the concomitant loss of the whole or partial plasmid. As conclusion, successful plasmids belonging to different Inc-groups mobilize ESBL and AmpC encoding genes in *S. enterica*. The loss of ESBL/AmpC genes in absence of antimicrobial pressure might explain the low prevalence of these beta-lactamases among *Salmonella* isolates.

### Introduction

Nontyphoidal salmonellosis is one of the most prevalent foodborne bacterial infections in Europe, and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* causes numerous foodborne outbreaks. Over the last decade, the increasing incidence of extended-spectrum (ESBLs) and AmpC-type beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* compromises the efficiency of third generation cephalosporins, one of the elected treatments for salmonellosis [1]. However the prevalence of ESBL and AmpC beta-lactamases is still low in *Salmonella* [2-7].

Plasmids belonging to different Inc-groups have been studied as vehicles of beta-lactamase gene dissemination. Some of them, designated as “epidemic resistance plasmids” due to their propensity to acquire and transfer resistance genes, have been involved in the spread of

*bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CMY</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes [1,4,7,8]. The emergence of epidemic clinical and foodborne strains harbouring plasmids with *bla*<sub>ESBL</sub> or *bla*<sub>AmpC</sub> is of great concern [1,3,7].

Selection pressure by antimicrobial usage has been studied as one of the determinant factors for persistence of plasmids over bacterial generations [9]. However, the loss of complete plasmids or of some antimicrobial resistance genes, could affect the bacterial fitness cost [9]. This fact could be a factor implied in the low prevalence of this type of beta-lactamases among *Salmonella* species. For that reason, the objective of our work was to characterize the plasmids implicated in the mobilization of beta-lactamase genes in a collection of ESBL- and AmpC-producing *S. enterica* isolates

recovered from different Spanish hospitals, as well as to assess in vitro the temporal stability of these plasmids in the absence of antimicrobial selective pressure.

## Material and methods

### 2.1. Bacterial isolates.

From the routinely collection of *S. enterica* isolates stored in three Spanish hospitals, eleven *S. enterica* isolates were selected for this work because only those exhibited AmpC (two isolates) or ESBL (nine) phenotype [Hospital San Pedro, Logroño, 2 isolates; Complejo Hospitalario de Pontevedra, 4 isolates; Hospital Universitario Central de Asturias, 5 isolates]. All isolates were obtained from faecal samples of different patients during 2003-2009. *S. Virchow* (4 isolates), *S. Bredeney* (2), *S. Enteritidis* (2), *S. Gnesta* (1), *S. Livingstone* (1), and *S. enterica* serogroup C (1) were the serovars found. Preliminary studies were previously performed in some of these isolates [6,10].

### 2.2. Antimicrobial susceptibility testing.

Susceptibility testing to 20 antimicrobial agents was determined by the disc-diffusion method, and the MIC values of ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, aztreonam and ceftazidime by the agar dilution method (CLSI, 2012).

### 2.3. Genetic relatedness.

The clonal relationship of the *S. enterica* isolates was examined by PFGE, using XbaI and SpeI enzymes, following the PulseNet protocol (<http://www.pulsenet-europe.org>). Multilocus sequence typing (MLST) was performed according to the website database recommendations (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>).

### 2.4. Characterization of antimicrobial resistance genes and integrons.

The presence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> and *bla*<sub>PSE-1</sub> genes, and the *bla*<sub>CTX-M</sub> genetic environment were investigated by PCR-mapping and sequencing [6,10,11]. Multiplex PCR was carried out for detection of AmpC-type beta-lactamase genes [10].

Tetracycline [*tet*(A)-*tet*(E)/*tet*(G)], aminoglycoside [*aadA/strA-strB/aac*(3)-*I/aac*(3)-*II/aac*(3)-*IV/ant*(2'')/*aph*(3')-*Ia/aph*(3')-*IIa/aac*(6')-*Ib*], sulphonamides [*sul1/sul2/sul3*], trimethoprim [*dfpA*], and quinolone [*qnrA/qnrB/qnrS/qepA*] resistance genes were studied by PCR [10].

The presence of class 1, 2, and 3 integrase-encoding genes and the *qacEΔ1+sul1* region was analysed by PCR. The gene cassette arrangements were PCR-amplified and subsequently sequenced [10].

### 2.5. Conjugation experiments

The *bla* genes transference was tested by conjugation experiments using the filter mating method and the *E.*

*coli* CSH26α (rifampicin-resistant) recipient strain [11]. The *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> or *bla*<sub>CMY</sub>-positive transconjugants were selected using BHI agar plates containing rifampicin (100 mg/L) plus: cefotaxime (5 mg/L), ceftazidime (8 mg/L) or ceftazidime (16 mg/L), respectively. PFGE was applied to compare the transconjugants, donor and recipient patterns, and phenotypic and genotypic analyses were performed over selected transconjugants [11].

### 2.6. In vitro experiments for stability of ESBL and AmpC resistance genes in the absence of antimicrobial selective pressure.

All *S. enterica* strains were subsequently plated onto antimicrobial-free BHI agar medium for daily-passages during 100 days. The ESBL and AmpC-resistance phenotype was checked daily and when variations were detected, a complete study was done. After 100 days, all the strains were checked for other genotypic and phenotypic variations. This experiment was designed to detect strains that have lost the phenotype (LP) of interest (ESBL or AmpC) in the laboratory setting. These strains were named as: LP-strain-days of passages in antimicrobial-free medium.

### 2.7. Plasmid characterization and location of resistance genes.

The plasmids of donor, transconjugant and LP strains were classified into Inc-groups by the PCR-based replicon typing scheme [12] and plasmids belonging to IncI1 and IncF groups were subtyped by pMLST (<http://pubmlst.org/plasmid/>). The genes encoding the toxin-antitoxin system *pndAC* were tested in selected IncI1 plasmid-carrying strains, by PCR with specific designed primers (*pndAC*-F: 5'-ACCGCCGTAAGGCAATGGAG-3'; *pndAC*-R: 5'-GCAACAAAGCGGCGGCAGAA-3'). Plasmid DNA was extracted and purified following a modified alkaline lysis procedure. The plasmids number/size was determined by genomic DNA digestion with S1-nuclease and subsequent PFGE analysis. S1-PFGE gels were analysed by Southern-blot hybridization using specific probes for *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *intI1*, *spvC*, IncFII, IncFIB, IncI1, and IncA/C [11]. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> chromosomal location was screened by Southern hybridization of I-CeuI-PFGE profiles with *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and 16S rDNA probes [13].

## Results and Discussion

### 3.1. Antimicrobial susceptibility testing and characterization of antimicrobial resistance genes and integrons.

The 11 ESBL/AmpC-producing *S. enterica* isolates displayed a phenotype and MIC values compatible with the presence of beta-lactamase genes (Table 1). It is important to highlight the diversity of beta-lactamase

families identified, even within the same serovar and despite the small number of isolates studied.

CTX-M is the most widely disseminated beta-lactamase family among *S. enterica* of human and animal origin [1,2,5,7,8]. Indeed, seven *bla*<sub>CTX-M</sub>-positive isolates were detected among our nine ESBL-producing *Salmonella*. The *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene detected into the In60 complex *sulI*-type integron (Table 2, Figure 1A) was found in two *S. Virchow*, and the *bla*<sub>CTX-M-10</sub> gene linked to a phage related element was detected in the other two *S. Virchow* isolates (Table 2, Figure 1C and 1D).

The CTX-M-14 enzyme, found in Spain and in the Asian continent [2,8], was identified in one of our *S. Enteritidis* isolates (Table 1). The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>TEM-1</sub> gene combination was detected in two *S. enterica* isolates (Table 1). The *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> genetic surroundings showed the *ISEcpI* element upstream of the *bla* genes, and *IS903* and *orf477* downstream of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, respectively (Table 2, Figure 1E and 1F).

SHV-2 and SHV-12 beta-lactamases were found in our study in Livingstone and Enteritidis serovars, respectively (Table 1).

The highest MICs of cefoxitin (64 mg/L) were found in our two *S. Bredeney* isolates that harboured the *ISEcpI*-*bla*<sub>CMY-2</sub>-*blc-sugE* structure (Table 1, Figure 1G). The *bla*<sub>CMY-2</sub> gene is the most disseminated among AmpC-producing *S. enterica* serovars from both animal and clinical samples [2,7], including serovar Bredeney [2,5].

Six of our 11 isolates showed a multiresistance phenotype ( $\geq 3$  antimicrobial families). All isolates were susceptible to ciprofloxacin, tobramycin, amikacin, and chloramphenicol, while nalidixic acid resistance was only found in the four *S. Virchow* and one *S. Enteritidis* isolates (Table 1). Table 2 shows the genes observed in most of the tetracycline/streptomycin/sulphonamides/kanamycin/trimethoprim-resistant *Salmonella* isolates.

### 3.2. Genetic relatedness.

MLST analysis identified 6 sequence types (ST) among the 11 *S. enterica* isolates. The *S. Gnesta* belonged to the firstly described ST1587 (Table 1). PFGE-XbaI/SpeI patterns (data not shown) revealed a clonal relationship among isolates belonging to the same serovar. In this sense, isolates were clustered by serovar and also by ST (Table 1). The C1220 strain, for which no serovar was possible to determine, belonged to ST599, which is commonly associated with serovar Concord according to the MLST database. The *bla*<sub>SHV-2</sub>-harbouring *S. Livingstone* strain was assigned to the ST457, only reported, so far, in *S. Livingstone* in Spain (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>).

### 3.3. Gene transfer assays and in vitro genetic stability experiment. Plasmid characterization and location of genes.

Beta-lactam resistance was transferred by conjugation (frequency range  $10^{-3}$ – $10^{-8}$  transconjugants/donor) in eight of the 11 *S. enterica* strains (Tables 1 and 2). In all cases, parental and its transconjugant strain exhibited the same antimicrobial phenotype/genotype, except for nalidixic acid resistance.

The *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene has been previously found in a wide variety of plasmids [4], specifically in IncHI2 plasmids among *S. Virchow* isolates in Spain [5]. However in our work, the *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> and the In60 integron co-existed in self-transferable but non-typeable plasmids of 335 and 370 kb in *S. Virchow* C516 and C650, respectively (Table 2). The Tc-C650 and C650 strains showed the same genotype, whereas the Tc-C650 plasmid was slightly smaller. The C650 strain lost the *intI1* and *dfrA16* genes, while the rest of the In60 integron structure remained intact after 100 passages without antimicrobial pressure (Figure 1B). The removal of the *intI1* gene and overlapping promoter prevents the insertion, rearrangement and expression of gene cassettes, but the presence of *ISCR1* upstream of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> allows its expression and the ESBL-phenotype was observed in LP-C650-100 strain.

The *bla*<sub>CTX-M-10</sub> gene was located on 310 kb plasmids from two *S. Virchow* strains. In the W19 strain, conjugation experiments were successful, and after 100 days without antimicrobial pressure, a smaller 210 kb *bla*<sub>CTX-M-10</sub>-harbouring plasmid was detected apparently linked to the *tet(B)* loss. IncK and IncHI1 plasmids containing the *bla*<sub>CTX-M-10</sub> gene have been reported in *E. coli* and *S. Virchow* isolates [4,5], but those found in our study could not be typed.

*S. Enteritidis* strain W192 showed two plasmids. The *spvC* probe hybridized on a non-conjugative IncFII<sub>s</sub>(ST1)+IncFIB(ST22) multireplicon, which corresponds to the *S. Enteritidis* virulence plasmid (GenBank accession no. **JN885080**); and the *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> probe hybridized on a self-transferable IncII-ST80 plasmid in both W192 and TC-W192 strains. The parental W192 strain lost the ESBL phenotype after 72-days. The *bla*<sub>CTX-M-14</sub> gene has been detected on IncK, IncFII<sub>s</sub> and IncII plasmids in *Salmonella*, and on an IncII-ST6 plasmid in human *S. Enteritidis*, but as far as we know, not on IncII-ST80 plasmids [3,4,5].

The co-existence of the *ISEcpI*-*bla*<sub>CTX-M-15</sub> arrangement and the *bla*<sub>TEM-1</sub>-containing Tn3 transposon on IncF plasmids has been previously reported [4]. In our work, the *ISEcpI*-*bla*<sub>CTX-M-15</sub>-*orf477* and *bla*<sub>TEM-1</sub> gene were found into IncA/C and IncII-ST68(CC31) plasmids in C1220 and C1189 strains, respectively (Figure 1F, Table 2). In C1220 strain, the 420 kb IncA/C plasmid harboured the *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *intI1* genes; whereas in LP-C1220-100 strain, only the *bla*<sub>TEM-1</sub> probe

hybridized in the 275 kb IncA/C plasmid (Table 2). Differences in size and resistance phenotype reflected that *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene and the class 1 integron (Figure 1H) were lost after 100 passages without antimicrobial pressure. Hybridization experiments also showed a copy of the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene in the chromosome of both C1220 and LP-C1220-100 strains. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> chromosomal location has been previously reported [13], suggesting a possible plasmid integration or transposition events mediated by *ISEcp1* element.

Hybridization and conjugation experiments demonstrated that the *S. Livingstone* strain C493 harboured the *bla*<sub>SHV-2</sub> gene and a class 1 integron on a self-transferable 115 kb IncII-ST27(CC26) plasmid (Table 2, Figure 1I). After 11 passages in antimicrobial-free medium, no ESBL phenotype was observed in LP-C493-11 strain and the plasmid size was 100 kb, consistent with the *bla*<sub>SHV-2</sub> gene loss (Table 2).

Although the backbone of IncII plasmids is considered to be highly conserved, *S. Enteritidis* strain C1221 carried a 10 kb IncII plasmid, which amplified the *repII* gene but lacked the maintenance toxin-antitoxin *pndAC* system as well as the other pMLST genes. This small *bla*<sub>SHV-12</sub>-carrying IncII plasmid was not self-transferred by conjugation and it was completely lost at the fifth day of propagation without antimicrobial pressure (Table 2). The original strain and LP-C1221-5 also harboured the *S. Enteritidis* virulence plasmid.

*S. Bredeney* strain C1219 harboured a *bla*<sub>CMY-2</sub> gene on a 90 kb self-transferred IncII-ST2(CC2) plasmid that conserved the *pndAC* module and the rest of pMLST genes. However, this plasmid was completely lost after 49 passages in antimicrobial-free medium. The other *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive strain (C1218) also presented it on a conjugative and stably maintained IncII-ST18 plasmid (Table 2). The IncII-ST2 plasmids carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> have been extensively detected among *E. coli* and *Salmonella* isolates from different origins [5,7], but serovar Bredeney has been more associated with IncA/C plasmids [3].

Globally, in this study, the IncII plasmid family carried the CTX-M-14, CTX-M-15, SHV-2, SHV-12 and CMY-2 encoding genes, whereas large non-typeable plasmids harboured the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> and *bla*<sub>CTX-M-10</sub> genes. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was also detected in chromosomal location. The ESBL and AmpC genes were transferred from 72% of our *Salmonella* strains into the *E. coli* recipient strain. It is noteworthy that *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes and/or other resistance genes were lost in 45% of the studied *Salmonella* strains after passages in antimicrobial-free-BHI-plates. Not only resistance genes, but also complete IncII plasmids, were lost during the genetic-stability experiments in two strains. The absence of the toxin-antitoxin *pndAC* genes, and other genes of the IncII backbone, could explain its loss after only five antimicrobial-free passages. Although there is no evidence for deficiencies in the backbone of *bla*<sub>CMY-2</sub>-

harbouring IncII plasmid, its loss after 49 days could still be due to small deletions/mutations in maintenance genes, failures in the inheritance system, or to a high fitness cost imposed on the host [9].

Although the common believe is that the removal of antimicrobial pressure can reduce the number of antimicrobial-resistant bacteria partially due to the plasmids loss [14], recent studies demonstrated that some plasmids impose little fitness impact on host strains, resulting in a high persistence and maintenance over bacterial generations [14,15]. Compensatory mutations within the organism can ameliorate the biological cost of these resistance elements [15].

This is the first work in which the ESBL and AmpC encoded genes of *S. enterica* strains were studied assessing the plasmid content of each strain, the implication of these plasmids in the mobilization of beta-lactamase genes and its stability in the *in vitro* situation. The ESBL and AmpC genetic dissemination and maintenance could be an important factor which affects the prevalence of this type of beta-lactamases among *Salmonella* species, and involves a public health risk related to beta-lactam resistance transference among different bacteria.

#### Acknowledgements

We thank A. Carattoli for providing replicon typing control strains. We thank to Marta Lantero, Marta García-Campello and Esther Undabeitia for providing the strains included in this study. We thank the staff of the NRL-Salm of the Federal Institute for Risk Assessment and the staff of the Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, for serotyping of the isolates.

#### Funding

M. de T. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Instituto de Salud Carlos III of Spain (MICINN) (grant number FI08/00508). P. G. is the recipient of a predoctoral fellowship from the “Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología” (FICYT, Ref. BP08-031). This work was partially carried out during stays of M. d T. at Federal Institute for Risk Assessment (supported by the FI08/00508 grant) and at Universidad de Oviedo, Spain (financial support from Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC). This work was partially supported by the Federal Institute for Risk Assessment (BfR-46-001 and BfR-45-005), the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (Project SAF2009-08570) and the “Fondo de Investigación Sanitaria”, Instituto de Salud Carlos III of Spain (FIS PI11-00808; cofunded by the European Regional Development Fund of the European Union).

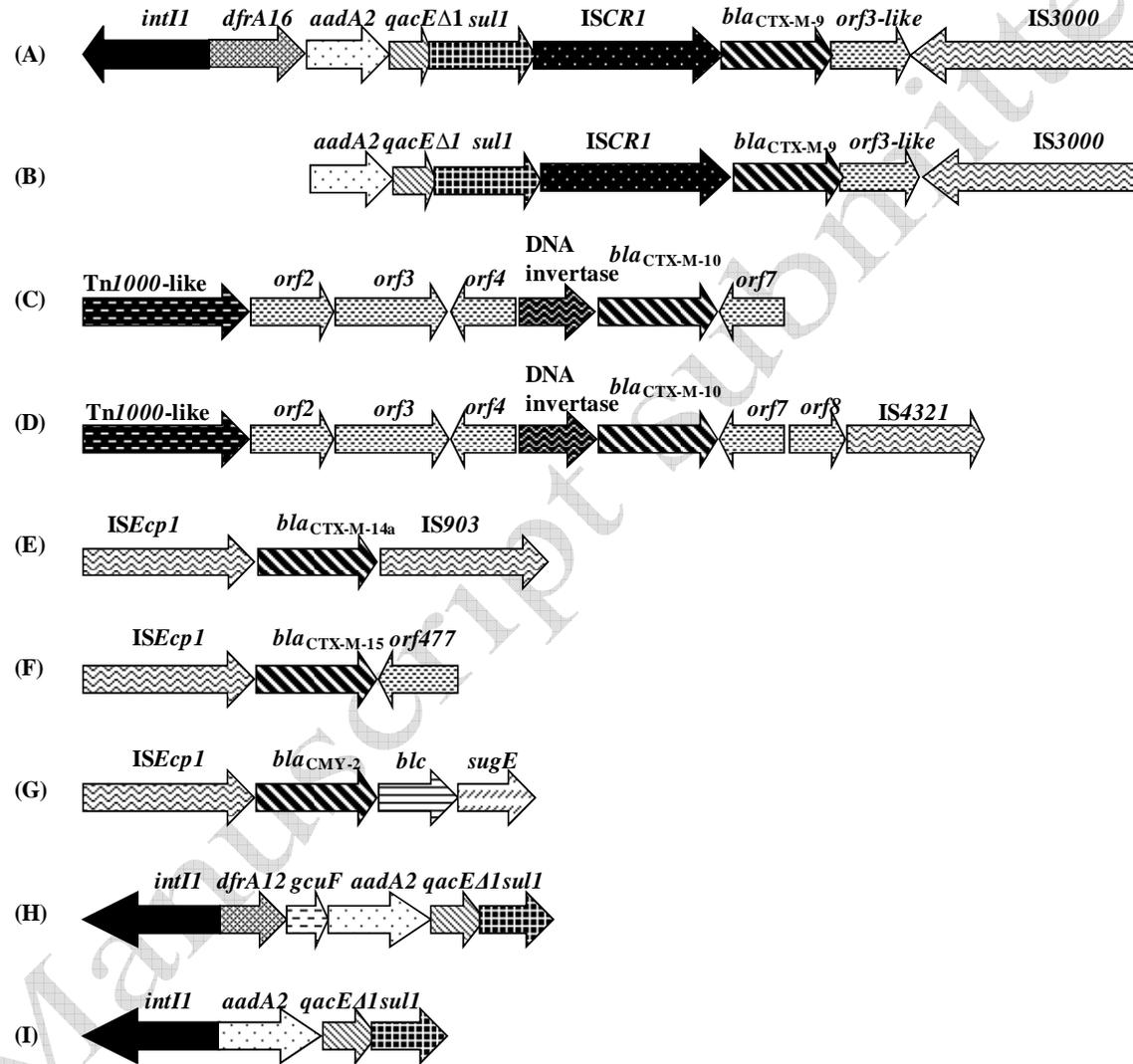
## Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Coque TM, Baquero F, Cantón R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 2008a; 13: 1-11.
2. Arlet G, Barrett TJ, Butaye P, Cloeckart A, Mulvey MR, White DG. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect* 2006; 8: 1945-54.
3. Hopkins KL, Liébana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3203-6.
4. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2227-38.
5. González-Sanz R, Herrera-León S, de la Fuente M, Arroyo M, Echeita MA. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC-type beta-lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1181-6.
6. Riaño I, García-Campello M, Sáenz Y, Álvarez P, Vinué L, Lantero M, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 292-5.
7. Rodríguez I, Barownick W, Helmuth R, Mendoza MC, Rodicio MR, Schroeter A, et al. Extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 301-9.
8. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012; 3: 1-19.
9. Subbiah M, Top EM, Shah DH, Call DR. Selection pressure required for long-term persistence of *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive IncA/C plasmids. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 4486-93.
10. de Toro M, Sáenz Y, Cercenado E, Rojo-Bezares B, García-Campello M, Undabeitia E, et al. Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals. *Int Microbiol* 2011; 14: 173-81.
11. de Toro M, Rojo-Bezares B, Vinué L, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y. *In vivo* selection of a *aac(6')-Ib-cr* and mutations in the *gyrA* gene in a clinical *qnrS1*-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1945-9.
12. 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: 219-28.
13. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 2008b; 14: 195-200.
14. Cottell JL, Webber MA, Piddock LJV. Persistence of transferable extended-spectrum-beta-lactamase resistance in the absence of antibiotic pressure. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 4703-6.
15. Martínez JL, Baquero F, Andersson DI. Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11: 439-45.

**Figure 1.** Genetic environments of the beta-lactamase genes and gene cassette arrangements included in the class 1 integrons detected among the ESBL and AmpC- positive *Salmonella enterica* strains.



**Table 1.** Resistance phenotype and beta-lactamases detected in *Salmonella enterica* donor, transconjugant and loss of phenotype (LP)-derived strains obtained from genetic-stability experiment.

Strain <sup>1</sup>	Serovar (ST/PFGE) <sup>2</sup>	MIC <sup>3</sup> (mg/L) of					<i>bla</i> phenotype	beta-lactamase	Resistance phenotype to other antimicrobial agents <sup>3</sup>
		AMP	CTX	CAZ	ATM	FOX			
<b>C516</b>	Virchow (ST16/P1a)	≥512	16	4	4	8	ESBL	CTX-M-9 + TEM-1	NAL, KAN, STR, TET, SUL, TMP, SXT
Tc-C516							ESBL	CTX-M-9 + TEM-1	KAN, STR, TET, SUL, TMP, SXT
<b>C650</b>	Virchow (ST16/P1a)	≥512	16	4	4	8	ESBL	CTX-M-9 + TEM-1	NAL, KAN, STR, TET, SUL, TMP, SXT
Tc-C650							ESBL	CTX-M-9 + TEM-1	KAN, STR, TET, SUL, TMP, SXT
LP-C650-100							ESBL	CTX-M-9 + TEM-1	NAL, KAN, STR
<b>W19</b>	Virchow (ST16/P1b)	≥512	64	4	4	8	ESBL	CTX-M-10	NAL, TET, SUL
Tc-W19							ESBL	CTX-M-10	TET, SUL
LP-W19-100							ESBL	CTX-M-10	NAL, SUL
<b>C683</b>	Virchow (ST16/P1b)	≥512	32	4	4	8	ESBL	CTX-M-10	NAL, SUL
<b>W192</b>	Enteritidis (ST11/P2)	512	128	32	16	8	ESBL	CTX-M-14a	NAL
Tc-W192							ESBL	CTX-M-14a	-
LP-W192-72							-	-	NAL
<b>C1220</b>	<i>S. enterica</i> group C <sup>4</sup> . (ST599/P3)	≥512	≥256	≥256	≥64	8	ESBL	CTX-M-15 + TEM-1	GEN, STR, TET, SUL, TMP, SXT
LP-C1220-100							ESBL	CTX-M-15 + TEM-1	STR, TET, SUL
<b>C1189</b>	Gnesta (ST1587/P4)	≥512	≥256	≥256	≥64	8	ESBL	CTX-M-15 + TEM-1	-
Tc-C1189							ESBL	CTX-M-15 + TEM-1	-
<b>C493</b>	Livingstone (ST457/P5)	≥512	64	32	16	4	ESBL	SHV-2	STR, TET, SUL
Tc-C493							ESBL	SHV-2	STR, TET, SUL
LP-C493-11							-	-	STR, TET, SUL
<b>C1221</b>	Enteritidis (ST11/P2)	≥512	64	≥256	≥64	8	ESBL	SHV-12	NAL, SUL
LP-C1221-5							-	-	NAL, SUL
<b>C1218</b>	Bredeney (ST306/P6)	≥512	32	128	16	64	AmpC	CMY-2	SUL
Tc-C1218							AmpC	CMY-2	SUL
<b>C1219</b>	Bredeney (ST306/P6)	≥512	32	256	8	64	AmpC	CMY-2	SUL
Tc-C1219							AmpC	CMY-2	SUL
LP-C1219-49							-	-	-

<sup>1</sup> Donor strains in bold letters. Tc: transconjugant; LP (loss of phenotype)-derived strain-number (day of ESBL/AmpC phenotype lost; -100: last day of experiment).

<sup>2</sup> ST: sequence type; PFGE: profile was determined by Pulsed Field Gel Electrophoresis.

<sup>3</sup> MIC values were determined for donor strains. AMP: ampicillin; CTX: cefotaxime; CAZ: ceftazidime; ATM: aztreonam; FOX: ceftoxitin; NAL: nalidixic acid; KAN: kanamycin; STR: streptomycin; TET: tetracycline; SUL: sulphonamides; TMP: trimethoprim; SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole; GEN: gentamicin.

<sup>4</sup> Serovar was not possible to completely determine in this strain.

**Table 2.** Location of beta-lactamase genes and characterization of plasmids carrying them in *Salmonella enterica* and the derived strain.

Strain <sup>1</sup>	ESBL/AmpC gene	Other resistance genes <sup>1</sup>	ESBL/AmpC genetic environment and integrons <sup>2</sup>	No. of plasmids	Detected plasmids and PFGE-S1 hybridization		
					Plasmid size (kb)	Replicon type (ST) <sup>3</sup>	Detected genes
<b>C516</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A	1	335	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>intI1</i>
Tc-C516	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A	1	335	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>intI1</i>
<b>C650</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A	1	370	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>intI1</i>
Tc-C650	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA16</i>	A	1	350	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>intI1</i>
LP-C650-100	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>aph</i> (3')-I, <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	B	1	340	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>
<b>W19</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	C	1	310	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>
Tc-W19	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>	<i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	C	1	310	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>
LP-W19-100	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>	<i>sul2</i>	C	1	210	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>
<b>C683</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>	<i>sul2</i>	D	1	310	NT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub>
<b>W192</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	None	E	2	95 60	IncII (ST80) IncFIIs (ST1)+IncFIB (ST22) <sup>3</sup>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>
Tc-W192	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14a</sub>	None	E	1	95	IncII (ST80)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>
LP-W192-72	-	None	-	2	95 60	IncII (ST80) IncFIIs (ST1)+IncFIB (ST22) <sup>4</sup>	-
<b>C1220<sup>5</sup></b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>aadA</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i>	F, H	1	420	IncA/C	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> , <i>intI1</i>
LP-C1220-100 <sup>4</sup>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>aadA</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul2</i>	F	1	275	IncA/C	<i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>
<b>C1189</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	F	1	85	IncII (ST68, CC31)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1new</sub>
Tc-C1189	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	F	1	85	IncII (ST68, CC31)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1new</sub>
<b>C493</b>	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub>	<i>aadA1</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i>	I	1	115	IncII (ST27, CC26)	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub> , <i>intI1</i>
Tc-C493	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub>	<i>aadA1</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i>	I	1	180	IncII (ST27, CC26)	<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub> , <i>intI1</i>
LP-C493-11	-	<i>aadA1</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul1</i>	I	1	100	IncII (ST27, CC26)	<i>intI1</i>

<b>C1221</b>	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	None	-	2	60	IncFIIIs (ST1)+IncFIB (ST22) <sup>4</sup>	<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>
					10	IncI1 (NT) <sup>6</sup>	
LP-C1221-5	-	None	-	1	60	IncFIIIs (ST1)+IncFIB (ST22) <sup>4</sup>	
<b>C1218</b>	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	None	G	1	85	IncI1 (ST18)	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
Tc-C1218	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	None	G	1	85	IncI1 (ST18)	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
<b>C1219</b>	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	None	G	1	85	IncI1 (ST2, CC2)	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
Tc-C1219	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	None	G	1	85	IncI1 (ST2, CC2)	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
LP-C1219-49	-	None	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>Donor strains in bold letters. Tc: transconjugant; LP: loss of phenotype-derived strain (-number: day of phenotype change, -100: last day of experiment). None: none analysed gene was detected. ---: the gene was lost in comparison with the parental strain.

<sup>2</sup>The genetic environments are named according to Figure 1.

<sup>3</sup>ST: sequence type. NT: Non-typable incompatibility group plasmid.

<sup>4</sup>The *spvC* probe hybridized on this plasmid, consistent with the specific virulence plasmid of *S. Enteritidis*.

<sup>5</sup>The probe *bla<sub>CTX-M-15</sub>* hybridized also on the chromosome (I-CeuI-PFGE hybridization).

<sup>6</sup>The IncI1 plasmid was not typeable (NT), the pMLST genes were absent.

