

Integrone de clase 1 en aislados de *Salmonella enterica* productores de diferentes tipos de betalactamasas recogidos en la región sanitaria de Tortosa

Mar Olga Pérez-Moreno, Mireia Carulla-Pont, Marta Pérez-Moreno, Anna María Jardí-Baiges, María Isabel Llovet-Lombarte, Xavier Tejedor-Ganduxé y Juan Zaragoza-López

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital de Tortosa Verge de la Cinta. Tortosa. Tarragona. España.

OBJETIVO. Estudiar la frecuencia de integrone de clase 1 en aislados de *Salmonella enterica* productores de diferentes tipos de betalactamasas recogidos en la región sanitaria de Tortosa e intentar determinar los genes de resistencia que llevan insertados.

MÉTODOS. Se investigó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de integrone de clase 1 y de los genes *aadA1*, *aadA2*, *dfrA1*, *tem-1*, *oxa-1* y *pse-1* en la región variable de éstos, en 100 aislados de *S. enterica* (30 *S. enteritidis*, 56 *S. ser Typhimurium* y 14 de otros serotipos) resistentes a ampicilina recuperados consecutivamente en nuestro laboratorio entre 2000 y 2001. Las betalactamasas se caracterizaron por isoelectroenfoque y PCR.

RESULTADOS. a) 6/57 aislados productores de TEM-1 presentaban integrone: 1 *S. ser Panama*, 2 *S. ser Enteritidis* y 1 *S. ser Typhimurium* (1.600 pb/*aadA1-dfrA1*); 1 *S. ser Panama* (1.600 pb/*aadA2-dfrA1*); 1 *S. ser Grumpensis* (1.500 pb + 1.700 pb; *aadA2* y ??); b) todos los aislados productores de OXA-1 (20 *S. ser Typhimurium*) transportaban un integrone de 2.000 pb/*aadA1-oxa-1*. c) todos los aislados productores de PSE-1 (22 *S. ser Typhimurium*, la mayoría fagotipo 104, y 1 *S. enterica* inmóvil [4,12:-:-]) contenían 2 integrone (1.000 pb/*aadA1* y 1.200 pb/*pse-1*).

CONCLUSIÓN. La presencia de integrone que transportaban los genes *oxa-1* o *pse-1* en todos los aislados estudiados productores de OXA-1 y PSE-1 podría haber facilitado su diseminación y explicar el incremento de aislados multiresistentes de *S. ser Typhimurium* portadores de estas enzimas en la región sanitaria de Tortosa. Se describe, asimismo, por primera vez la presencia de integrone en un aislado del serotipo Grumpensis.

Palabras clave: *Salmonella enterica*. Betalactamasas. Integrone clase 1.

Class 1 integrone among *Salmonella enterica* isolates producing different types of beta-lactamases from the health region of Tortosa (Spain)

OBJECTIVE. To assess the frequency of class 1 integrone among isolates of *Salmonella enterica* producing different types of beta-lactamases from the health region of Tortosa, and to attempt to establish the resistance genes located within their variable regions.

METHODS. The presence of class 1 integrone and of *aadA1*, *aadA2*, *dfrA1*, *tem-1*, *oxa-1* and *pse-1* resistance genes within their variable regions was investigated by PCR in 100 ampicillin-resistant isolates of *S. enterica* (30 *S. enteritidis*, 56 *S. Typhimurium* and 14 from other serotypes) consecutively recovered in our laboratory between 2000 and 2001. Beta-lactamases were characterized by isoelectric focusing and PCR.

RESULTS. a) 6/57 TEM-1 producing isolates carried integrone: 1 *S. ser Panama*, 2 *S. ser Enteritidis* and 1 *S. ser Typhimurium* (1600 pb/*aadA1-dfrA1*); 1 *S. ser Panama* (1600 pb/*aadA2-dfrA1*); 1 *S. ser Grumpensis* (1500 pb + 1700 pb; *aadA2* and ??) b) All OXA-1 producing isolates (20 *S. ser Typhimurium*) bore an integrone of 2000 pb/*aadA1-oxa-1*; c) All PSE-1 producing isolates (22 *S. ser Typhimurium*, most of them 104 phage type, and 1 *S. enterica* immobile [4,12:-:-]) harbored 2 integrone (1000 pb/*aadA1* and 1,00 pb/*pse-1*).

CONCLUSION. The presence of class 1 integrone carrying *oxa-1* or *pse-1* resistance genes in all the OXA-1-producing and PSE-1-producing isolates investigated could have contributed to their spread and explain the increase in frequency of multiresistant *S. ser Typhimurium* isolates harboring these enzymes seen in the health region of Tortosa. In addition, we report the first isolate of *S. ser enterica* serotype Grumpensis harboring integrone.

Key words: *Salmonella enterica*. Beta-lactamases. Class 1 integrone.

Introducción

La gastroenteritis es la manifestación más común de la salmonelosis. Suele tratarse de un cuadro leve y autolimitado que no requiere tratamiento antibiótico. Sin embar-

Correspondencia: Dra. M.O. Pérez-Moreno.
Servicio de Análisis Clínicos. Hospital de Tortosa Verge de la Cinta.
Esplanetes, s/n. 43500 Tortosa. Tarragona. España.
Correo electrónico: marolgap@terra.es

Manuscrito recibido el 23-9-2004; aceptado el 2-11-2004.

go, en aquellos casos cada vez más habituales por el aumento del número de pacientes inmunocomprometidos y su mayor supervivencia, en que la infección es extraintestinal o cursa con bacteriemia es esencial la instauración precoz de un tratamiento antibiótico eficaz¹. Desafortunadamente, el tratamiento empírico de este tipo de infecciones se ha visto complicado por el progresivo aumento de la resistencia a antibióticos considerados tradicionalmente activos como cotrimoxazol (T/S), amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas que han experimentado las cepas de *Salmonella enterica* y, en particular, las pertenecientes al serotipo Typhimurium²⁻⁴.

La resistencia a betalactámicos en *S. enterica* suele estar mediada por betalactamasas plasmídicas clásicas^{2,3,5,6}. Se ha comprobado que los genes que codifican algunas betalactamasas y muchos otros genes involucrados en la resistencia a distintos grupos de antimicrobianos, pueden localizarse en una nueva familia de elementos genéticos denominados integrones, que a menudo están contenidos en transposones o en plásmidos de multiresistencia^{2,6-8}.

Los integrones, descritos por primera vez por Stokes y Hall en 1989, son estructuras genéticas aparentemente móviles cuyo tamaño no supera los 4.000 pb, capaces de integrar o movilizar genes individuales de resistencia a antibióticos. Los integrones están constituidos por dos regiones de ADN muy conservadas, la 5'CS y la 3'CS, y otra variable situada entre las dos anteriores, en la que se pueden insertar hasta cinco determinantes genéticos de resistencia.

Hasta el momento se han descrito varias clases de integrones, siendo los de clase 1 los que se encuentran en la mayoría de aislados clínicos. La acumulación y extraordinaria capacidad de recombinación e intercambio que poseen los genes de resistencia dentro de los integrones y la gran aceptación de estos últimos por parte de las bacterias, debido a que no es necesario que almacenen grandes piezas de material genético para hacerse resistentes a los antibióticos, podrían haber contribuido a la continua aparición y diseminación de enterobacterias y otros gramnegativos multiresistentes⁹, como ha sucedido en *S. ser Typhimurium*¹⁰⁻¹³.

De particular relevancia es el caso de *S. ser Typhimurium* DT104 multiresistente que, desde que se identificó en el Reino Unido en 1984 en ganado y seres humanos, se ha diseminado ampliamente dando lugar a una verdadera epidemia mundial relacionada con el consumo de alimentos de origen animal contaminados¹⁰. Las cepas de *S. ser Typhimurium* DT104 causantes de esta epidemia comparten un mismo patrón de resistencia (ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomycin y sulfamidas), asociado a un locus cromosómico de resistencia (SGII) en el que están presentes dos integrones de clase 1. La presencia de integrones en el serotipo Enteritidis y en otros serotipos menos comunes, aunque menos habitual que en el serotipo Typhimurium, cada vez se comunica con mayor frecuencia^{7,8,14,15}.

En nuestro laboratorio hemos podido constatar un creciente incremento en el porcentaje de aislados de *S. ser Typhimurium* que producen betalactamasas del tipo OXA y PSE-1, en detrimento de aquellos que producen TEM-1, prevalentes hasta mediados de la década de los noventa (datos no publicados) y consideramos que sería interesan-

te investigar si este extremo podría estar relacionado con el hecho de que los genes que codifican las dos primeras betalactamasas se han localizado en integrones, lo que habría facilitado su diseminación, mientras que esto nunca ha sucedido con el gen que codifica TEM-1.

El objetivo de nuestro trabajo es estudiar la frecuencia de integrones de clase 1 entre aislados de *S. enterica* de origen humano productores de diferentes tipos de betalactamasas recuperados en la región sanitaria de Tortosa, así como intentar determinar los genes de resistencia insertados en dichos integrones.

Métodos

Aislados

Entre junio de 2000 y octubre de 2001 se obtuvieron en nuestro laboratorio (Laboratorio de Microbiología del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta) 233 aislados clínicos de *S. enterica* (121 *S. enterica* ser Enteritidis, 92 ser Typhimurium y 20 de otros serotipos) que procedían de pacientes atendidos tanto en nuestro hospital como en cualquiera de los 34 centros de atención primaria de la región sanitaria de Tortosa. Se incluyeron en el estudio todos los aislados resistentes a ampicilina (30 aislados de *S. enterica* ser Enteritidis, 56 ser Typhimurium, 4 ser Hadar, 3 ser [4,5,12:i:-], 2 ser Panama, 1 ser inmóvil [4,12:i:-], 1 ser Virchow, 1 ser Grumpensis, 1 ser Give y 1 ser Mbandaka); en aquellos casos en que se tenía constancia de que varios aislados estaban epidemiológicamente relacionados se incluyó sólo uno de ellos en el estudio. Se recuperaron 98 aislados a partir de coprocultivos, uno a partir de un hemocultivo y otro a partir de un urocultivo.

Identificación y pruebas de sensibilidad *in vitro*

La identificación de especie y la sensibilidad *in vitro* por microdilución en caldo a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, C, T/S, ácido nalidixico, ciprofloxacino, gentamicina, tobramicina, tetraciclina y colistina se estudiaron mediante los paneles comerciales 95W y 93W (Soria Melguizo, Madrid, España). La sensibilidad a estreptomycin, kanamicina y sulfamidas se llevó a cabo por la técnica de difusión en agar de Kirby-Bauer. Las cepas se clasificaron como sensibles, intermedias o resistentes siguiendo los criterios del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹⁶ y se incluyeron las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 35218 y *E. coli* ATCC 25922 como controles. La serotipificación y fagotipificación se realizaron en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid).

Identificación de betalactamasa e investigación de genes codificadores de betalactamasas

Los extractos para los ensayos de betalactamasas se obtuvieron a partir de un cultivo reciente de cada aislado en fase de crecimiento exponencial, por sonicación en baño de hielo a 160 W, durante 3 min, a intervalos de 1 min, y posterior centrifugación a 14.000 rpm y 4 °C durante 30 min. Las betalactamasas se identificaron por su pI, que se determinó por isoelectroenfoque en un equipo LKB Multiphor II (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) con geles de poliacrilamida con un rango de pH de 3.5 a 9.5 (*Pharmacia LKB Uppsala, Suecia*) siguiendo un protocolo descrito previamente¹⁷. Las betalactamasas se visualizaron tras tinción con nitrocefina (500 µg/ml) y su pI se determinó por comparación con las enzimas patrón TEM-1 (pI 5,4), TEM-2 (pI 5,6), PSE-1 (pI 5,7), SHV-1 (pI 7,6), OXA-1 (pI 7,4) y OXA-2 (pI 7,7 / 7,5). Por otro lado, se investigó en todas las cepas la presencia de los genes *tem-1*, *oxa-1* y *pse-1* que codifican las betalactamasas TEM-1, OXA-1 y PSE-1 respectivamente, mediante PCR. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía Cl₂Mg, 1,5 mM; tampón PCR 1x; 0,2 mM de cada uno de los nucleósidos trifosfato, 0,5 mM de cada uno de los correspondientes cebadores (*tem-1*: 5'-TTG GGT GCA CGA GTG GGT-3' y 5'-TAA TTG TTG

CCG GGA AGC-3'^{18,19}; *oxa-1*: 5'-ACC AGA TTC AAC TTT CAA-3' y 5'-TCT TGG CTT TTA TGC TTG-3'¹⁹; *pse-1*: 5'-AAT GGC AAT CAG CGC TTC-3' y 5'-GGG GCT TGA TGC TCA CTC-3'^{18,19}, 1,5 U de taq-polimerasa (Ecogen, Barcelona, España) y 25 µl de lisado bacteriano, obtenido tras someter a ebullición a 100 °C durante 10 min una suspensión de tres colonias, procedentes de un cultivo fresco en agar sangre, en 50 µl de agua bidestilada estéril y posterior centrifugación a 14.000 rpm durante 20 s. La mezcla de reacción se amplificó en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) empleando las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s; 1 ciclo final de 72 °C durante 5 min. Los productos finales de cada PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio.

Investigación de integrones de clase 1

Se investigó la presencia de integrones de clase 1 en todos los aislados mediante amplificación por PCR y posterior análisis de los amplicones generados por electroforesis en geles de agarosa, empleando una mezcla de reacción de composición idéntica a la indicada en el apartado anterior y usando los cebadores 5'CS (5'-GGC ATC CAA GCA GCA AGC-3') y 3'CS (5'-AAG CAG ACT TGA CCT GAT-3')². El programa de amplificación fue un ciclo inicial de 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 2 min y 30 s; 1 ciclo final de 72 °C durante 5 min. El tamaño de los amplicones generados se calculó por comparación con el patrón de tamaño molecular Supperladder-Mid 1 100 pb (Gensura, San Diego, EE.UU.).

Investigación de los genes de resistencia incluidos en la región variable de los integrones

Se investigó la presencia de los genes de resistencia *aadA1*, *aadA2* (resistencia a estreptomycin-espectinomycin), *dfrA1* (resistencia a trimetoprima) y *tem-1*, *oxa-1* y *pse-1* (resistencia a betalactámicos) mediante una segunda PCR, utilizando como ADN molde una dilución al 1:10 de los productos generados en la PCR para detección de integrones, con la finalidad de determinar los genes de resistencia incluidos en la región variable de éstos. Las condiciones de la PCR fueron las indicadas anteriormente en el apartado de investigación de genes codificadores de betalactamasas. Los cebadores utilizados para detectar la presencia de los tres primeros genes fueron 5'-GTG GAT GGC GGC CTG AAG CC-3' y 5'-ATT GCC CAG TCG GCA GCG-3' (*aadA1*)¹⁹; 5'-TGT TGG TTA CTG TGG CCG TA-3' y 5'-GCT GCG AGT TCC ATA GCT TC-3' (*aadA2*)⁷ y 5'-GTG AAA CTA TCA CTA ATG G-3' y 5'-CCC TTT TGC CAG ATT TGG-3' (*dfrA1*)¹⁹. Los cebadores empleados en el presente estudio para amplificar *aadA2* son

específicos para este gen, pero no así los que usamos para amplificar *aadA1*, que amplifican también *aadA2*, por lo que consideramos que en un integrón estaba presente el gen *aadA1* sólo cuando se obtenía amplificación con los cebadores para *aadA1* pero no con los específicos para *aadA2*.

Definición diferentes perfiles de integrones

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

Resultados

Caracterización de betalactamasas

Los diferentes tipos de betalactamasas producidos por los 100 aislados estudiados aparecen reflejados en la figura 1. Los aislados que producían una betalactamasas de tipo TEM-1 (pI 5,4 y PCR positiva para *tem-1*) fueron los más frecuentes, seguidos por aquellos que albergaban una enzima de tipo PSE-1 (pI 5,7 y PCR positiva para *pse-1*) o de tipo OXA-1 (pI 7,4 y PCR positiva para *oxa-1*).

Patrones de resistencia

a) La sensibilidad de los 100 aislados de *S. enterica* investigados, agrupados por serotipos, frente a los diferentes antimicrobianos ensayados aparece reflejada en la tabla 1.

b) Aislados productores de TEM-1: Entre los aislados pertenecientes al serotipo Enteritidis productores de esta betalactamasas, el 83,3% resultaron resistentes a más de dos grupos de antibióticos y el 20% fueron multiresistentes (resistencia a cuatro o más grupos de antimicrobianos); se observaron hasta 11 patrones distintos de resistencia siendo las asociaciones más frecuentes ampicilina-colistina-ácido nalidixico (40%) y ampicilina-colistina (16,7%). En cuanto a los aislados del serotipo Typhimurium el 100% fueron resistentes a más de dos grupos de antimicrobianos y el 64% a más de tres; se encontraron 8 tipos de patrones de resistencia y los más habituales fueron ampicilina-tetraciclina-estreptomycin-sulfamidas (42,8%) y ampicilina-tetraciclina-estreptomycin (21,4%).

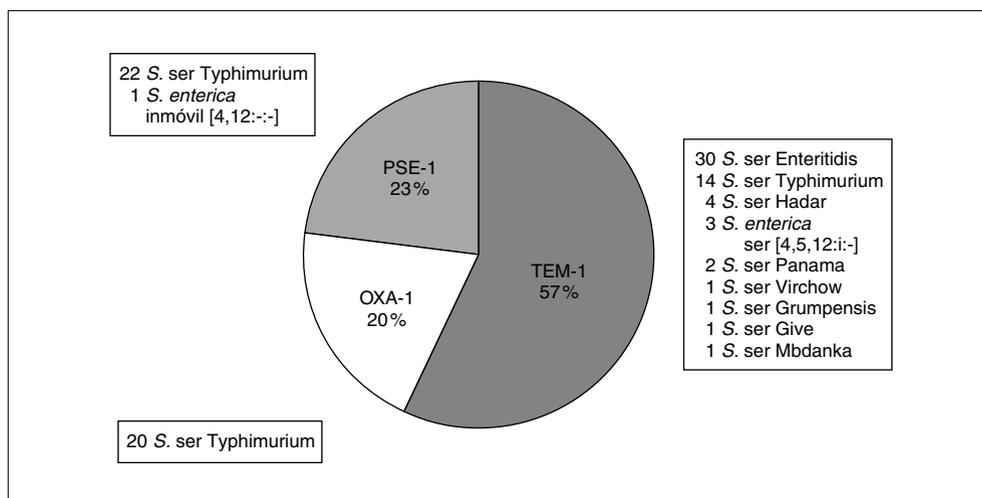


Figura 1. Distribución de los diferentes tipos de betalactamasas producidas por los 100 aislados de *Salmonella enterica* estudiados.

TABLA 1. Porcentaje de sensibilidad de los aislados de *Salmonella enterica* estudiados, agrupados por serotipos, frente a los diferentes antimicrobianos ensayados

	Enteritidis (n = 30)	Typhimurium (n = 56)	Hadar (n = 4)	4,5,12:i- (n = 3)	Panama (n = 2)
Ampicilina	0	0	0	0	0
Cloranfenicol	100	21,4	100	66,7	0
Cotrimoxazol	90	89,3	100	66,7	0
Nalidíxico	70	80,4	0	100	50
Ciprofloxacino	100 (23,3)*	100 (12,5)*	100 (100)*	100 (0)*	100 (50)*
Gentamicina	100	96,4	100	33,3	100
Tobramicina	100	96,4	100	33,3	100
Tetraciclina	76,7	1,8	0	0	0
Colistina	26,7	100	25	100	50
Estreptomina	90	1,8	0	0	0
Kanamicina	96,7	98,2	100	66,7	50
Sulfamidas	90	8,9	100	0	0
Cefotaxima	100	100	100	100	100
Ceftazidima	100	100	100	100	100

*Porcentaje de cepas con sensibilidad disminuida a ciprofloxacino (concentración inhibitoria mínima [CIM] 0,2-1 mg/ml).

Fenotipos de resistencia de los serotipos con un solo aislado. [4,12:-]: Amp, C, Tet, Str, Sul; Virchow: Amp, Nal (Cip), Tet, Sul; Grumpensis: Amp, Gen, Tob, Tet, Str, Sul; Give: Amp, T/S, Tet, Str, Sul; Mbdanka: Amp, Nal, Tet, Str, Sul.
Amp: ampicilina; C: cloranfenicol; Tet: tetraciclina; Str: estreptomina; Sul: sulfamidas; T/S: cotrimoxazol; Nal: ácido nalidíxico; Gen: gentamicina; Tob: tobramicina.

TABLA 2. Relación entre el perfil de integrones (número y tamaño de los amplicones y genes de resistencia insertados) y características fenotípicas (tipo de betalactamasa, serotipo, fagotipo y patrón de resistencia) en los 49 aislados de *Salmonella enterica* en los que se constató la presencia de integrones de clase 1

Perfil de integrones	Genes de resistencia ^b	Tipo de betalactamasa	Patrón de resistencia	Serotipo (fagotipo)
A ₁ (1.600 pb) ^a	<i>aadA1-dfrA1</i>	TEM-1	Amp, C, Tet, Str, Sul, T/S	1 S. ser Panama
	<i>aadA1-dfrA1</i>	TEM-1	Amp, Tet, Str, Sul, T/S, Nal [Col] ^c	2 S. ser Enteritidis
	<i>aadA1-dfrA1</i>	TEM-1	Amp, Tet, Str, Sul, T/S	1 S. ser Typhimurium (195)
A ₂ (1.600 pb) ^a	<i>aadA2-dfrA1</i>	TEM-1	Amp, C, Tet, Str, Sul, T/S, Col, Kan, Nal	1 S. ser Panama
B (1.500 pb + 1.700 pb) ^a	<i>aadA2-??</i>	TEM-1	Amp, C, Tet, Str, Sul, T/S, Gen, Tob	1 S. ser Grumpensis
C (2.000 pb) ^a	<i>aadA1-oxa-1</i>	OXA-1	Amp, C, Tet, Str, Sul [T/S, Nal] ^c	20 S. ser Typhimurium (7 PNR ^d , 10 NT ^e , 2 104-b, 1 U302)
D (1.000 pb + 1.200 pb) ^a	<i>aadA2; pse-1</i>	PSE-1	Amp, C, Tet, Str, Sul [T/S, Nal] ^c	22 S. ser Typhimurium (4 PNR ^d , 4 NT ^e , 8 104, 1 104-b, 5 U302)
	<i>aadA2; pse-1</i>	PSE-1	Amp, C, Tet, Str, Sul	1 S. enterica ser [4,12:-:-]

^aEntre paréntesis número y tamaño de los amplicones generados en la PCR con los iniciadores 5'CS y 3'CS.

^bGenes de resistencia contenidos en la región variable de los integrones.

^cEntre corchetes perfiles adicionales de resistencia.

^dPatrón de lisis por fagos no reconocido.

^eNo fagotipable.

Amp: ampicilina; C: cloranfenicol; Tet: tetraciclina; Str: estreptomina; Sul: sulfamidas; T/S: cotrimoxazol; Nal: ácido nalidíxico; Col: colistina; Gen: gentamicina; Tob: tobramicina.

La totalidad de los aislados pertenecientes al resto de serotipos identificados fueron multirresistentes y el patrón de resistencia más frecuente fue ampicilina-tetraciclina-estreptomina-ácido nalidíxico (38,5%).

c) Aislados productores de OXA-1: Todos los aislados productores de OXA-1 pertenecían al serotipo Typhimurium y mostraban el patrón de resistencia ampicilina-C-estreptomina-tetraciclina-sulfamida. Dos aislados presentaban resistencia adicional a ácido nalidíxico y uno a ácido nalidíxico y T/S.

d) Aislados productores de PSE-1: La totalidad de los aislados productores de PSE-1 (22 serotipo Typhimurium y 1 serotipo inmóvil [4,12:-:-]) presentaban el patrón de resistencia ampicilina-C-estreptomina-tetraciclina-sulfamida. Siete aislados del serotipo Typhimurium eran también resistentes a ácido nalidíxico y uno a T/S.

Frecuencia de integrones de clase 1 y detección de los genes de resistencia insertados

Se detectó la presencia de integrones de clase 1 en casi el 50% (49/100) de los aislados estudiados (10,5% en los aislados productores de TEM-1 y 100% en los productores de OXA-1 y PSE-1). De éstos, el 51% albergaban un único integrón y el resto dos integrones. Si se analiza la frecuencia de integrones de tipo 1 según el serotipo de *S. enterica* se observa que éstos estaban presentes en el 76% (43/56) de los aislados del serotipo Typhimurium, en el 6,7% (2/30) de los de serotipo Enteritidis, en los dos aislados pertenecientes al serotipo Panama, en el de serotipo [4,12:-:-] y en el único del serotipo Grumpensis de nuestra serie; no se detectaron integrones en ninguno de los aislados pertenecientes al resto de serotipos a pesar de ser todos ellos multirresistentes.

Las características fenotípicas (tipo de betalactamasa, serotipo, fagotipo y patrón de resistencia) y el perfil de integrones de los 49 aislados en los que se constató la presencia de integrones se resumen en tabla 2. Se identificaron cinco perfiles diferentes de integrones: perfil A1 (1.600 pb/*aadA1-dfrA1*) que se detectó en dos aislados de *S. enterica* ser Enteritidis, en uno de *S. ser* Panama y en otro de *S. ser* Typhimurium fagotipo 195; el perfil A2 (1.600 pb/*aadA2-dfrA1*) se observó en el otro aislado del serotipo Panama; perfil B (1.500 pb + 1.700 pb, en los que además de *aadA2* presumiblemente deben estar ubicados otros determinantes de resistencia distintos a los que investigamos) que apareció en la única cepa de serotipo Grumpensis; perfil C (2.000 pb/*aadA1-oxa-1*) que se constató en 20 aislados del serotipo Typhimurium, la mayoría no fagotipables o de patrón de lisis no reconocido; perfil D (1.000 pb/*aadA2* + 1.200 pb/*pse-1*) que se observó en 23 aislados, todos ellos, excepto uno del serotipo inmóvil [4,12:-:-], pertenecientes al serotipo Typhimurium, de los fagotipos 104, 104-b y U302 o bien no fagotipificables o de patrón de lisis no reconocido (los aislados de *S. Typhimurium* que no poseían integrones eran no fagotipificables o pertenecían a los fagotipos 98, 193, 308 o 312).

Discusión

A pesar de existir pocos datos publicados acerca de la prevalencia de diferentes betalactamasas en *S. enterica* nuestros resultados coinciden con los de otros autores^{3,5,6} en cuanto a que la betalactamasa producida con mayor frecuencia por los aislados de *S. enterica* recogidos en nuestra región geográfica fue TEM-1. En efecto, TEM-1 fue la única betalactamasa detectada en los aislados del serotipo Enteritidis, coincidiendo con lo reflejado en otros trabajos¹⁴, y también en los aislados del resto de serotipos incluidos en nuestra serie a excepción de los del serotipo Typhimurium y del único aislado del serotipo inmóvil [4,12:-:-]. En el caso de *S. ser* Typhimurium, PSE-1 fue la betalactamasa mayoritaria (39,3%) seguida a poca distancia por OXA-1 (35,7%), mientras que TEM-1 sólo representaba el 25% de las betalactamasas identificadas. Es interesante destacar que el porcentaje de aislados de *S. ser* Typhimurium productores de OXA-1 en la región sanitaria de Tortosa es sensiblemente más alto que el descrito por otros investigadores: en un estudio realizado en Francia en 1996 con aislados de *S. ser* Typhimurium de origen tanto humano como animal, Casini et al⁶ encuentran una frecuencia similar de aislados productores de enzimas tipo TEM y el 75% de tipo CARB, pero sólo descubren un aislado productor de una enzima tipo OXA; también en Francia, Llanes et al²⁰ en un estudio de vigilancia llevado a cabo entre 1987 y 1994 refieren aproximadamente el 52% de aislados de *S. enterica* ser Typhimurium productores de PSE-1, el 45% productores de TEM-1 y sólo el 4% de productores de OXA-1, en España Gallardo et al estudian 23 aislados de *S. Typhimurium* resistentes a ampicilina procedentes de pacientes atendidos en 1999 en consultas externas de un hospital de Barcelona y el 39,1% de ellas albergan PSE-1, el 8,7% OXA-1 y el resto TEM-1³.

A diferencia de otros trabajos, nosotros no hallamos en el período comprendido en el estudio ningún aislado

que produjese betalactamasa TEM-2 o de tipo SHV^{5,6} y tampoco betalactamasas de espectro extendido²¹, aunque anterior y posteriormente a este período sí se han identificado algunos aislados de *S. enterica* ser Enteritidis y *S. ser* Virchow productores de este último tipo de betalactamasa.

Respecto a la sensibilidad antimicrobiana, tal y como cabía esperar^{2,19,22}, las cepas de los serotipos Hadar y Typhimurium, en particular las que producían OXA-1 o PSE-1, resultaron ser las que presentaban porcentajes más elevados de resistencia, al igual que sucedió con las del serotipo recientemente descrito [4,5,12:i:-], siendo tetraciclina, estreptomina y sulfamida los antimicrobianos frente a los que se detectó mayor número de aislados resistentes. El porcentaje de resistencia a ácido nalidíxico, por el contrario, fue más elevado en el serotipo Enteritidis que en el Typhimurium, y coincidiendo con lo descrito en otros estudios^{2,14,22} no hubo ningún aislado resistente a ciprofloxacino, si bien el 77,8% de los aislados resistentes a ácido nalidíxico presentaban sensibilidad disminuida a esta fluoroquinolona.

La frecuencia de integrones entre los aislados de *S. enterica* estudiadas fue muy diferente según el tipo de betalactamasa que producían: esta era muy baja entre aislados productores de TEM-1 (10,1%) (aproximadamente la misma frecuencia que encontramos en nuestro laboratorio para aislados de *S. enterica* no productores de betalactamasa [datos no publicados]), mientras que la presencia de integrones fue constante en los aislados productores de OXA-1 y PSE-1. Por otro lado, los genes de resistencia que codifican estas enzimas siempre se localizaron en la región variable de integrones de clase 1; sin embargo, el gen que codifica TEM-1 no se encontró en ninguna ocasión formando parte de uno de estos elementos genéticos.

En cuanto a los genes insertados en la región variable de los integrones, los más prevalentes fueron, como ya han señalado otros autores^{2,7,23}, los que codifican enzimas modificantes de aminoglucósidos. En nuestro estudio todos los integrones contenían los genes *aadA1* o *aadA2*.

Los perfiles de integrones A₁ (1.600 pb/*aadA1-dfrA1*), A₂ (1.600 pb/*aadA2-dfrA1*), C (2.000 pb/*aadA1-oxa-1*) y D (1.000 pb/*aadA2* + 1.200 pb/*pse-1*) ya habían sido previamente descritos en *S. enterica*^{2,7,8,14,15}, si bien no se puede descartar que, debido a los cebadores empleados, en algún caso los genes que nosotros hemos denominado *oxa-1* o *dfrA1* no sean tales, sino genes estrechamente relacionados. Parece interesante resaltar la presencia de un integrón 1.600 pb/*aadA2-dfrA1* en uno de los dos aislados de *S. ser* Panama; no hemos encontrado ninguna referencia que mencione la presencia de un integrón de dichas características en este serotipo, en el que es frecuente el integrón 1.600 pb/*aadA1-dfrA1*, pero sí en una cepa de *S. enterica* ser Brandenburg que ocasionó un brote epidémico en Italia¹⁵. También llama la atención la ausencia de aislados con integrones del tipo 1.000 pb/*aadA1*, en contraste con lo observado en otros estudios realizados en España en que era el integrón más prevalente entre cepas de *S. ser* Enteritidis^{2,12}, y la baja frecuencia de aislados pertenecientes al serotipo emergente [4,5,12:i:-], así como la ausencia del integrón 1.900 pb/*dfAr12-aadA2*; en este último serotipo, en el que según un estudio realizado por Guerra et al¹⁹ con aislados procedentes del Principado de As-

turias su presencia era constante. En cuanto al perfil B (1.500 pb + 1.700 pb), que sólo apareció en la única cepa del serotipo Grumpensis de nuestra serie, será necesario recurrir a la secuenciación para caracterizar los casetes de resistencia contenidos en los integrones pues sólo obtuvimos amplificación para el gen *aadA2*; hasta donde sabemos nunca antes se había descrito la presencia de integrones en este serotipo.

La uniformidad en el patrón de resistencia y perfil de integrones que mostraban los aislados productores de OXA-1 y los de PSE-1 que, por otro lado, pertenecían en todos los casos menos uno al serotipo Typhimurium y se agrupaban en unos fagotipos concretos, sugiere que su propagación se debe fundamentalmente a la diseminación de un número limitado de clones. En el caso de *S. ser Typhimurium* DT 104 multirresistente, la particularidad de que los integrones que llevan insertados los genes *pse-1* y *aadA2* se hayan integrado en el cromosoma bacteriano formando parte de un locus cromosómico de resistencia denominado *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), en el que también están presentes los determinantes de resistencia a tetraciclina (*tetA*) y a florfenicol y cloranfenicol (*flo*)^{11,12}, les permite perpetuarse incluso en ausencia de presión antibiótica sin constituir un coste adicional para el microorganismo y ha conducido a su diseminación estable y de amplia distribución geográfica^{3,6,10,20,24-26}. Por el contrario, la gran diversidad de perfiles de resistencia y la escasa incidencia de integrones entre los aislados productores de TEM-1 parece indicar que su aparición se debe principalmente a la transferencia genética entre aislados de distinto origen.

La constatación del patrón de resistencia y el perfil de integrones D (1.000 pb/*aadA2* + 1.200 pb/*pse-1*) típicos de la cepa epidémica de *S. ser Typhimurium* DT104 de distribución universal en aislados del fagotipo U302, no fagotipificables o de patrón de lisis no reconocido e incluso del serotipo inmóvil [4,12:-] podría deberse a transmisión horizontal de estructuras genéticas de multirresistencia. Un estudio realizado en Grecia que demuestra que en este país los aislados de *S. typhimurium* DT104 multirresistentes están agrupados en varios clones diferentes²⁷ y otro llevado a cabo en Bélgica en que se informa de varios aislados de *S. enterica* ser Agona con una agrupación genética de multirresistencia idéntica a la de *S. ser Typhimurium* DT104²⁸, sugieren la posibilidad de transmisión horizontal de esta estructura de resistencia, que se cree que podrían formar parte de un transposón. De confirmarse este extremo nos encontraríamos ante una seria amenaza para la salud pública, ya que facilitaría la diseminación de genes de resistencia entre aislados de *S. ser Typhimurium* no relacionados genéticamente e incluso entre *Salmonella* de otros serotipos y otras especies de gramnegativos. Esta amenaza es tanto más preocupante en tanto en cuanto existen datos que sugieren que las infecciones producidas por *S. ser Typhimurium* DT104 multirresistentes tienden a producir cuadros infecciosos más graves que otros serotipos o fagotipos¹⁰. Otra posible explicación sería que algunos de nuestros aislados de *S. ser Typhimurium* DT104 hayan desarrollado una alteración en la susceptibilidad a los fagos empleados en la tipificación, tal y como han demostrado otros investigadores²⁹ y, por lo tanto, a pesar de ser genéticamente indistinguibles de las cepas clásicas, hayan sido consideradas

como pertenecientes a otros fagotipos al mostrar un patrón de lisis atípico. Por lo que respecta a los aislados portadores del integrón 2.000 pb/*aadA1-oxa-1*, cuya emergencia junto a la de los aislados con el integrón 2.000 pb/*aadA1-oxa-30* ya se ha constatado en algunas zonas de España y Portugal^{2,13}, resultaron sorprendentemente frecuentes en nuestra serie y estaban agrupados en diversos fagotipos (no fagotipificables, de fagotipo no reconocido, DT104-b y U302). Por lo tanto, tampoco puede excluirse la hipótesis de que, a pesar de haberse comprobado mediante técnicas de epidemiología molecular que los aislados de los dos anteriores países comparten un mismo perfil genómico^{13,30}, en algunos casos haya tenido lugar una diseminación horizontal de las estructuras genéticas de resistencia; además, Tosini et al¹² y Guerra et al³⁰ demostraron en aislados del serotipo Typhimurium de pacientes albaneses y españoles que un integrón aparentemente idéntico al de nuestros aislados era transportado por un plásmido conjugativo^{12,30}.

En resumen, en nuestro ámbito geográfico la frecuencia de integrones en aislados de *S. enterica* productores de TEM-1 es muy baja, mientras que todos los aislados productores de betalactamasas de tipo OXA y PSE, que en su práctica totalidad pertenecen al serotipo Typhimurium, poseen integrones en cuya región variable están ubicados los determinantes de resistencia que codifican estas enzimas, circunstancia que podría haber facilitado su diseminación y explicar el incremento de aislados multirresistentes de *S. ser Typhimurium* portadoras de PSE-1 y especialmente de OXA-1 que hemos constatado en nuestro laboratorio en los últimos años. También cabe destacar la presencia de integrones, hasta ahora no descrita, en la única cepa de *S. ser Grumpensis* de nuestra serie.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Beca de Investigación de la Fundació Dr. Ferrán del año 2000. Agradecemos la inestimable colaboración técnica de la Sra. M. Pilar Cid Ventura y de la Sra. Mercé Escobedo Fontanet.

Bibliografía

- Casado JL, Valdezate S, Calderón C, Navas E, Frutos B, Guerra A. Zidovudine therapy protects against *Salmonella* bacteremia recurrence in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 1999;179:1553-6.
- Guerra B, Soto S, Cal S, Mendoza, MC. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2166-9.
- Gallardo F, Ruiz J, Marco F, Towner KJ, Vila J. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *J Med Microbiol.* 1999;48:367-74.
- Lee LA, Puhf ND, Maloney EK, Bean NH, Tauxe RV. Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990. *J Infect Dis.* 1994;170:128-34.
- Philippon A, Fournier G, Cornel E, Paul G, Le Minor L, Nevot P. Les β -Lactamases des *Salmonella* résistantes à l'ampicilline. *Ann Microbiol (Inst Pasteur).* 1984;135A:229-38.
- Casin I, Brisabois A, Berger N, Breuil J, Collatz E. Phénotypes et génotypes de résistance de 182 souches de *Salmonella* serotype Typhimurium résistantes à l'ampicilline d'origine humaine et animale. *Méd Mal Infect* 1996;26:426-30.
- Linstedt BA, Heir E, Nygard I, Kapperud G. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J Clin Microbiol.* 2003;52:141-9.

8. Hamada K, Oshima K, Tsuji H. Drug resistance genes encoded in integrons and in extra-integrons: their distribution and lateral transfer among pathogenic *Enterobacteriaceae* including enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Infantis. *Jpn J Infect Dis*. 2003;56:123-6.
9. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18:761-70.
10. Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT104- a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46:7-10.
11. Briggs CE, Fratamico PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:846-9.
12. Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, et al. Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncLM plasmids in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:3053-8.
13. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. J 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*. 2004;54:429-34.
14. Soto SM, González-Hevia MA, Mendoza MC. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationship between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:1287-91.
15. Nastasi A, Mammina C. Presence of class I integrons in multidrug-resistant, low-prevalence *Salmonella* serotypes, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:455-8.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. NCCLS Document M100-S5, Villanova, Pa, 2004.
17. Pérez-Moreno MMO, Pous G, Romera G, Panisello JM, Jardí AM, Zaragoza JJ. Caracterización de la resistencia a asociaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas en *Escherichia coli*. Influencia del tipo y nivel de producción de β -lactamasas. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 1997;15:477-81.
18. Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamasas (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett*. 1991;82:19-26.
19. Guerra B, Soto SM, Argüelles JM, Mendoza MC. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i-]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1305-8.
20. Llanes C, Kirchgessner V, Plesiat P. Propagation of TEM- and PSE-Type β -Lactamasas among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:2430-6.
21. Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23:547-55.
22. Breuil J, Berger N, Dublanquet A. Sensibilité aux antibiotiques de 2800 souches de salmonellas et shigelles isolées en France en 1994. *Med Mal Infect*. 1996;26:420-5.
23. Martínez-Freijoo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Verhooff J, Jones ME. Many class 1 Integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 1999;42:689-96.
24. Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integron and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;157:177-81.
25. Ribot EM, Wierzbka RK, Angulo FJ, Barrett TJ. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990 and 1995. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:387-91.
26. Daly M, Buckley J, Power E, O'Hare C, Cormican M, Cryan B, et al. Molecular characterization of Irish *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: detection of class I integrons and assessment of genetic relationships by DNA amplification fingerprinting. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:614-9.
27. Markogiannakis A, Tassios PT, Lambiri M, Ward L, Kourea-Kremastinou J, Legakis NJ, et al. Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1269-71.
28. Cloeckaert A, Boumedine KS, Flaujac G, Imberechts H, D'Hooghe I, Chalus-Dancla E. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the *floR* gene in *S. enterica* serovar Agona. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44: 1359-61.
29. Lawson AJ, Dassama MU, Ward IR, Threlfall EJ. Multiply resistant (MR) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 12 and DT 120: a case of MR DT 104 in disguise? *Emerg Infect Dis*. 2002;8:434-6.
30. Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC. 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*. 2002;46: 2977-81.