

# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*<sup>☆</sup>

María de Toro<sup>a,b</sup>, Cristina Seral<sup>c,d</sup>, Beatriz Rojo-Bezares<sup>a</sup>, Carmen Torres<sup>a,b</sup>, F. Javier Castillo<sup>c,d</sup> e Yolanda Sáenz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España

<sup>b</sup> Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España

<sup>c</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

<sup>d</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 22 de diciembre de 2012

Aceptado el 7 de marzo de 2013

On-line el 22 de abril de 2013

#### Palabras clave:

Resistencia a ampicilina

*bla*<sub>PSE-1</sub>

*bla*<sub>OXA-1</sub>

Fenotipo ACSSuT

Integrones

Isla genómica de *Salmonella* de tipo 1

Electroforesis en gel de campo pulsado

### R E S U M E N

**Introducción:** El incremento de *Salmonella enterica* multirresistente a los antibióticos, incluidos β-lactámicos y fluoroquinolonas, es un problema de importancia clínica. La propagación de *Salmonella* 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>. En los aislados portadores del gen *bla*<sub>PSE-1</sub> se determinó la relación clonal mediante PFGE, y la presencia de la SGI1 y 29 genes de virulencia mediante PCR.

**Resultados:** Entre los 114 aislados analizados se detectaron 18 serotipos distintos, destacando entre ellos Typhimurium (61%) y Enteritidis (16%). 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</sub> + *strA-strB* + *tet*(B) + *sul2*. El 48% de los aislados presentaron integrones de clase 1 (7 estructuras distintas), destacando la estructura *bla*<sub>OXA-1</sub> + *aadA1* (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 perfil de virulencia.

**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</sub> + *strA-strB* + *tet*(B) + *sul2* evidencia un riesgo importante de posibles fracasos en el tratamiento de infecciones graves producidas por este serotipo.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Antibiotic resistance and virulence factors in clinical *Salmonella enterica* isolates

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Ampicillin-resistance

*bla*<sub>PSE-1</sub>

*bla*<sub>OXA-1</sub>

ACSSuT phenotype

Integrons

*Salmonella* Genomic Island type 1

Pulsed-field gel electrophoresis

**Introduction:** The increase of *Salmonella enterica* isolates multi-resistant to different antibiotics, including β-lactams and fluoroquinolones, is a problem of clinical importance. The dissemination of *Salmonella* Typhimurium resistant to ampicillin (AMP)-chloramphenicol (CHL)-streptomycin (STR)-sulphonamides and (SUL)-tetracycline (TET), that harbour the *Salmonella* Genomic Island type 1 (SGI1), and the acquisition of transferable genetic material have favoured the multi-resistance in this genus.

**Methods:** A total of 114 clinical *S. enterica* isolates were studied (period 2009-2010). The susceptibility to 20 antibiotics was determined by disc diffusion and microdilution. The antimicrobial resistance mechanisms and the integrons were analysed by PCR, and sequencing in the AMP<sup>R</sup> isolates. In all the *bla*<sub>PSE-1</sub>-positive isolates, the clonal relationship was determined by PFGE, as well as the presence of SGI1 and 29 virulence genes by PCR.

<sup>☆</sup> 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.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ysaez@riojasalud.es (Y. Sáenz).

**Results:** Eighteen different serotypes were found among the 114 isolates studied, Typhimurium (61%) and Enteritidis (16%) being the most prevalent. High percentages of resistance to SUL (68%), TET (58%), AMP (55%) and STR (46%) were observed. The great majority (92%) of 63 AMP<sup>R</sup> isolates were multi-resistant, with the AMP-STR-TET-SUL phenotype (19 isolates) being the most frequent one and associated with the *bla*<sub>TEM-1b</sub> + *strA-strB* + *tet*(B) + *sul2* genotype. Class 1 integrons (7 different structures) were observed in 48% AMP<sup>R</sup> isolates, highlighting the *bla*<sub>OXA-1</sub> + *aadA1* structure (8 isolates), one empty integron and non-classical integrons (5 isolates). The *bla*<sub>PSE-1</sub> gene was detected inside the classical SG11 structure in 13 clonally-related isolates that showed the same virulence profile.

**Conclusions:** The high percentage of multi-resistant *S. enterica* isolates, especially associated to *S. Typhimurium*, to the AMP, STR, TET and SUL phenotype, and to the *bla*<sub>TEM-1b</sub> + *strA-strB* + *tet*(B) + *sul2* genotype, shows an important risk of possible failures in the treatment of serious infections caused by this serotype.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La salmonelosis es una de las infecciones alimentarias más importantes en Europa, donde alcanza un ratio de 29,8 casos por 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 toxiinfección 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 gastrointestinales 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 enterica* 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 β-lactámicos en *S. enterica* se debe principalmente a la adquisición de enzimas β-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 génicos 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 *sul1* en su región 3'-conservada (3'-CS), aunque también se han descrito integrones no clásicos carentes de dicha región<sup>8-10</sup>.

La aparición a escala 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*, *sul1* 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» (SGI1)<sup>11,12</sup>. Sin embargo, también se han descrito variantes de la SGI1 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 (SPI) 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 β-lactámicos y a otros antibióticos, así como los integrones en los aislados resistentes a ampicilina. Asimismo, en los aislados portadores del gen *bla*<sub>PSE-1</sub> se llevó a cabo la determinación de la relación clonal, el perfil de virulencia y la presencia de la isla genómica de *Salmonella* (SGI1).

## Métodos

### Aislamientos clínicos

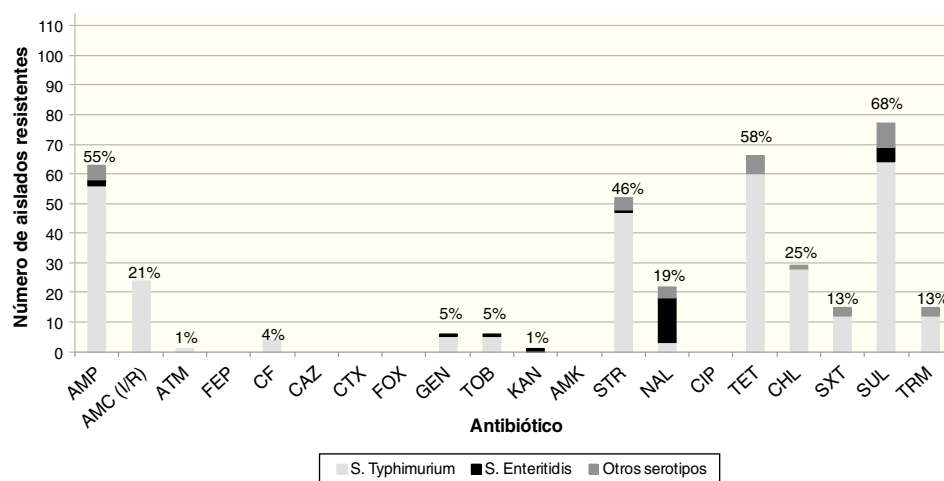
Entre septiembre de 2009 y noviembre de 2010 se procesaron 7.606 coprocultivos en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza). Durante el periodo de tiempo estudiado se obtuvieron 247 aislados de *S. enterica*, entre los que se seleccionó un aislado por 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, cefepima, aztreonam, ceftioxima, gentamicina, tobramicina, kanamicina, amikacina, estreptomina, ácido nalidixico, ciprofloxacino, tetraciclina, cloranfenicol, sulfamidas, trimetoprim y trimetoprim/sulfametoxazol) mediante microdilución (WIDER®) y/o difusión en disco<sup>20</sup>. La producción de β-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 los aislados resistentes a ampicilina (AMP<sup>R</sup>), se evaluó la presencia de los genes implicados en la resistencia a β-lactámicos (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> y *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 (*sul1*, *sul2*, *sul3*), trimetoprim (*dfrA*), cloranfenicol (*cmlA*, *catA* y *floR*) y quinolonas (*qnrA*, *qnrB*,



**Figura 1.** Número de aislados resistentes a los 20 antibióticos analizados en las 114 *Salmonella* estudiadas según sus serotipos (porcentaje de resistencia marcado sobre las barras del histograma). Para AMC se consideraron tanto los valores de resistencia como los de resistencia intermedia al antibiótico según CLSI<sup>20</sup>. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; AMK: amikacina; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CF: cefalotina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; CTX: cefotaxima; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; GEN: gentamicina; KAN: kanamicina; NAL: ácido nalidíxico; STR: estreptomina; SUL: sulfamidas; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; TET: tetraciclina; TOB: tobramicina; TRM: trimetoprim.

*qnrS*, *qepA*, *oqxAB*), así como el entorno genético de los genes *sul2* y *sul3* mediante PCR y secuenciación<sup>7</sup>.

#### Detección y caracterización de integrones

La presencia de los genes codificantes de integrasas de tipo 1, 2 y 3 (*int1*, *int2*, *int3*), así como la región 3'-CS de los integrones de clase 1 (*qacEΔ1-sul1*), 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 los 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>21</sup>.

#### Detección y caracterización de la Isla Genómica de *Salmonella*, factores de virulencia y estudio de clonalidad en aislados *bla<sub>PSE-1</sub>*-positivos

En los aislados *bla<sub>PSE-1</sub>*-positivos se evaluó la presencia de la SGI1 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>.

Asimismo, en estas cepas portadoras del gen *bla<sub>PSE-1</sub>* se estudiaron por PCR y secuenciación 29 genes de virulencia: los genes *invE/A*, *orgA*, *avrA*, *ttrC*, *ssaQ*, *sugR*, *rhuM*, *rmbA*, *misL*, *mgtC*, *spi4R*, *spi4D*, *sopB* y *pipA* localizados en las SPI 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*, *pefA*, *pefB*, *pefC* y *pefD* localizados en plásmidos<sup>22</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 perfiles de virulencia<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 ADN genómico con las enzimas *XbaI* y *SpeI* (New England Biolabs Inc., EE.UU.). Se utilizó el método de preparación de insertos del ADN genómico y las condiciones de electroforesis previamente descritas<sup>22</sup>. Los geles de agarosa se analizaron e interpretaron según el criterio de Tenover et al. (1995)<sup>23</sup>. La finalidad además de este estudio fue comparar los patrones de PFGE detectados con los patrones determinados en un estudio previo<sup>22</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 estreptomina (46%) en los 114 aislados estudiados (fig. 1). Los mayores porcentajes de resistencia se observaron entre los aislados del serotipo Typhimurium, con la excepción del ácido nalidíxico, para el que se detectó que 15 de los 22 aislados resistentes a dicho antibiótico (68%) eran del serotipo Enteritidis (fig. 1). Por otra parte, considerando únicamente los 63 aislados AMP<sup>R</sup>, se encontraron altos porcentajes de co-resistencia a sulfamidas (94%), tetraciclina (90%) y estreptomina (76%), así como a cloranfenicol y AMC (38%) (tabla 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 las que presentaban resistencia a AMP-estreptomina-tetraciclina-sulfamidas (19 aislados) y AMP-AMC-estreptomina-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 se detectaron los fenotipos AmpC o BLEE. Todos los aislados fueron sensibles a cefepima, 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 β-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%), destacando que en los aislados AMP<sup>R</sup>-AMC<sup>I/R</sup> (n=24) el gen más

**Tabla 1**Fenotipos y mecanismos de resistencia detectados en los 63 aislados de *Salmonella* AMP<sup>R</sup>

| Fenotipo de resistencia (número de aislados) <sup>a,b</sup> | Genotipo de resistencia (número de aislados) <sup>c</sup>                                                                                                                      | Serotipo (número de aislados)                                                    | Integrón de clase 1 y entornos de genes <i>sul</i> (número de aislados) <sup>d</sup> |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| AMP (3)                                                     | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> (3)                                                                                                                                               | <i>S. Moscow</i> (1);<br><i>Salmonella</i> sp. (1);<br><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</i> + <i>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</i> + <i>tet</i> (B) + <i>sul2</i> (16)                                                                                            | <i>S. Typhimurium</i> (19)                                                       | c(11)/d(1)/e(3)/f(1)                                                                 |
|                                                             | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA</i> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (B) + <i>sul2</i> (2)                                                                               |                                                                                  | c (2)                                                                                |
|                                                             | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA5</i> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (B) + <i>sul2</i> (1)                                                                              |                                                                                  | f (1)                                                                                |
| AMP+AMC+TET+SUL (1)                                         | <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> + <i>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</i> + <i>tet</i> (B) + <i>catA</i> + <i>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</i> + <i>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</i> + <i>sul2</i> (2)                                                                              | <i>S. Typhimurium</i> (2)                                                        | F (1)                                                                                |
| <b>AMP+STR+TET+CHL+SUL (2)</b>                              | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (B) + <i>catA</i> + <i>sul2</i> (1)                                                                               | <i>S. Typhimurium</i> (2)                                                        | c (2)                                                                                |
|                                                             | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (B) + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> (1)                                                                               |                                                                                  |                                                                                      |
| AMP+STR+NAL+TET+SUL (1)                                     | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (B) + <i>tet</i> (G) + <i>sul2</i> (1)                                                                            | <i>Salmonella</i> sp. (1)                                                        | –                                                                                    |
| <b>AMP+AMC+STR+TET+CHL+SUL (14)</b>                         | <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>aadA1</i> + <i>tet</i> (B) + <i>catA</i> + <i>sul1</i> (3)                                                                                    | <i>S. Typhimurium</i> (14)                                                       | A (3)                                                                                |
|                                                             | <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (G) + <i>floR</i> + <i>sul1</i> (9)                                                                                    |                                                                                  | B (9)                                                                                |
|                                                             | <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (B) + <i>tet</i> (G) + <i>floR</i> + <i>sul1</i> (1)                                                                   |                                                                                  | B (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)                                                                      |                                                                                  | B (1)                                                                                |
| AMP+STR+TET+SUL+TRM+SXT (6)                                 | <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (A) + <i>sul1</i> + <i>dfrA12</i> (1) <sup>e</sup>                                                                                                   | <i>S. Rissen</i> (1)                                                             | C (1)                                                                                |
|                                                             | <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (B) + <i>sul1</i> + <i>dfrA12</i> (1) <sup>e</sup>                                                                                                   | <i>S. Rissen</i> (1)                                                             | C (1)                                                                                |
|                                                             | <i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (B) + <i>sul2</i> + <i>dfrA1</i> (2)                                                                              | <i>S. Typhimurium</i> (2)                                                        | D, c (2)                                                                             |
|                                                             | <i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (B) + <i>sul2</i> + <i>dfrA1</i> (1)                                               | <i>S. Typhimurium</i> (1)                                                        | D, c (1)                                                                             |
|                                                             | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aadA1</i> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (A) + <i>tet</i> (B) + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>sul3</i> + <i>dfrA1</i> (1)                  | <i>S. Typhimurium</i> (1)                                                        | E, a, f                                                                              |
| <b>AMP+AMC+STR+NAL+TET+CHL+SUL (1)</b>                      | <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub> + <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (G) + <i>floR</i> + <i>sul1</i> (1)                                                                                    | <i>S. Typhimurium</i> (1)                                                        | B(1)                                                                                 |
| AMP+AMC+STR+TET+SUL+TRM+SXT (1)                             | <i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub> + <i>strA-strB</i> + <i>tet</i> (B) + <i>sul2</i> + <i>dfrA1</i> (1)                                                                              | <i>S. Typhimurium</i> (1)                                                        | D, c (1)                                                                             |
| AMP+AMC+NAL+TET+SUL+TRM+SXT (1)                             | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>strA-Δ-dfrA14-ΔstrA-strB</i> + <i>tet</i> (A) + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> (1)                                                                | <i>S. Typhimurium</i> (1)                                                        | g (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</i> + <i>tet</i> (G) + <i>floR</i> + <i>sul1</i> (1)                                                                | <i>S. Typhimurium</i> (1)                                                        | B (1)                                                                                |
| AMP+GEN+TOB+CHL+SUL+TRM+SXT (1) <sup>f</sup>                | <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub> + <i>aac</i> (3)-IV + <i>aadA2</i> + <i>cmlA1</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>sul3</i> + <i>dfrA12</i> (1)                                   | <i>S. Typhimurium</i> (1)                                                        | C, b (1)                                                                             |
| <b>AMP+GEN+TOB+STR+TET+CHL+SUL+TRM+SXT (1)</b>              | <i>bla</i> <sub>TEM-1a</sub> + <i>aac</i> (3)-IV + <i>aadA1</i> + <i>aadA2</i> + <i>tet</i> (A) + <i>tet</i> (B) + <i>cmlA1</i> + <i>sul1</i> + <i>sul3</i> + <i>dfrA1</i> (1) | <i>S. Typhimurium</i> (1)                                                        | E, G (1)                                                                             |

AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; FOX: cefoxitina; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidixico; STR: estreptomicina; SUL: sulfamidas; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; TET: tetraciclina; TOB: tobramicina; TRM: trimetoprim.

<sup>a</sup> El fenotipo ACSSuT está marcado en negrita.

<sup>b</sup> Los aislados con fenotipo AMC corresponden a los que mostraban sensibilidad disminuida a amoxicilina-ácido clavulánico (AMC<sup>LI</sup>).

<sup>c</sup> El gen de resistencia a estreptomicina *aadA* corresponde a *aadA1* o *aadA2*.

<sup>d</sup> Estructuras de los integrones (A-G) y entornos de los genes *sul* (a-g) según la figura 2.

<sup>e</sup> Genotipo de resistencia a AMP no detectado.

<sup>f</sup> Resistencia intermedia a estreptomicina.

frecuentemente detectado fue *bla*<sub>PSE-1</sub> (13 aislados, 54%), seguido de *bla*<sub>OXA-1</sub> (8 aislados) y *bla*<sub>TEM-1</sub> (3 aislados). No se detectaron los genes codificantes de β-lactamasas estudiados (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> y *bla*<sub>PSE</sub>) en 2 aislados AMP<sup>R</sup> (CMI > 16 mg/l y sensibles al resto de β-lactámicos analizados). En los aislados *bla*<sub>OXA-1</sub>-positivos se observó un fenotipo de sensibilidad disminuida a cefepima.

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), y 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* (un 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

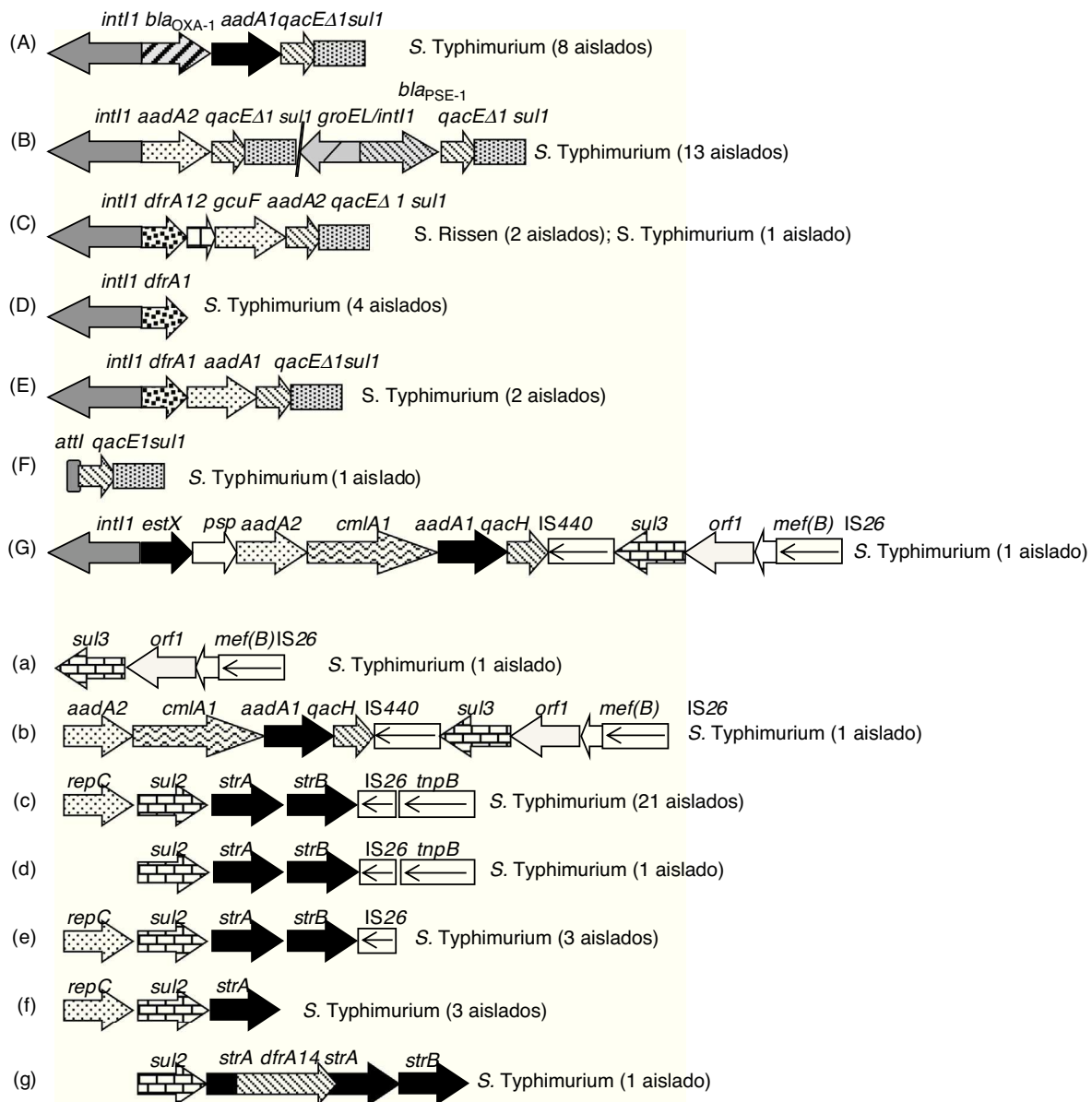
Treinta aislados de *S. enterica* AMP<sup>R</sup> (48%) amplificaron el gen *intI1*, sin embargo no se detectaron integrones de clase 2 o 3. Se

observaron 7 estructuras distintas de integrones de clase 1 (tabla 1 y fig. 2). Los 13 aislados de *S. Typhimurium* *bla*<sub>PSE-1</sub>-positivos mostraron 2 integrones, con regiones variables de 1.000 y 1.200 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) (fig. 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* (fig. 2). En uno de los aislados, el gen *strA* se encontraba truncado por el gen



**Figura 2.** Estructuras genéticas de los integrones de clase 1 (estructuras de «A» a «G») y entornos de los genes de resistencia a sulfamidas *sul* (estructuras de «a» a «g») encontrados en los aislados de *Salmonella enterica* AMP<sup>R</sup>.

*dfrA14*, dando lugar a un fenotipo de sensibilidad a estreptomicina (tabla 1, fig. 2). El gen *sul3* (detectado en 3 aislados) se relacionó en su entorno genético con el gen de resistencia a eritromicina (*mef(B)*), truncado en todos los casos por una *IS26*) y adicionalmente a los genes *aadA1*, *aadA2*, *cmlA* y *qacH* en 2 aislados, uno de los cuales era portador de un integrón defectivo de clase 1 (fig. 2).

#### Detección y caracterización de la Isla Genómica de Salmonella, 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 multirresistencia ACSSuT asociado con los genes *bla<sub>PSE-1</sub>*, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*, y presentaban el doble integrón de 1.000 y 1.200 pb (fig. 2, estructura B). 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*, *pefA*, *pefB*, *pefC* y *pefD*. Los genes *gipA* y *sopE1* no se detectaron en ningún aislado. Todos los aislados se agruparon en un único perfil de virulencia, 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 3 perfiles (X1a, X1b y X1g), mientras que el PFGE-*SpeI* los clasificó en 4 patrones (S1a, S1d, S1k y S1l). Teniendo en cuenta ambas digestiones, se encontraron 6 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 aparición de mecanismos de resistencia a dichos antibióticos limita las opciones terapéuticas. La resistencia a fluoroquinolonas resulta todavía infrecuente en *S. enterica*, quizás debido a que supone un alto coste energético para la bacteria<sup>24</sup>, mientras que 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 (del 39 al 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 (del 42,5 al 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%, con 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 corresponsencia a AMP–estreptomicina–tetraciclina–sulfamidas detectada 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 SG11, que contiene los genes *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul* 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 β-lactamasa en el mismo aislado<sup>5-7</sup>. Todos los aislados que portaban los genes *bla*<sub>PSE-1</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub> eran AMP<sup>R</sup>–AMC<sup>I/R</sup>, mientras que el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> estuvo relacionado con el fenotipo AMP<sup>R</sup>–AMC<sup>S</sup> en la mayoría de los casos, al igual que en trabajos previamente descritos<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 los 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 SG11 (*bla*<sub>PSE-1</sub>/ *aadA1*, 13 aislados). Aunque el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> no se encontró dentro de integrones, 10 de los aislados *bla*<sub>TEM-1</sub>–positivos albergaron genes *dfrA* en estructuras de tipo integrón previamente descritas, como la estructura *int1* + *dfrA12* + *gcuF* + *aadA2* + *qacEΔ1* + *sul1* y relacionado con el serotipo Rissen<sup>9</sup>, el gen *dfrA1*, presente en 2 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>22</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, conteniendo los genes *avrA*–*ssaQ*–*mgfC*–*spi4D*–*sopB*–*sodC1*–*spvC*–*bcfC*, muy prevalente entre las cepas de

*S. Typhimurium* según datos previos<sup>15,22</sup>. Además, en nuestros aislados se encontró el gen *bla*<sub>PSE-1</sub> dentro de la estructura clásica de la SG11 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 multiresistencia, 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 SG11 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 las vías de propagación que podrían explicar su aparición en aislados clínicos.

El alto porcentaje de *S. enterica* multiresistentes 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 que permitan vigilar la evolución de la resistencia y la aparición de clones que aúnan resistencia y virulencia.

## Financiación

M. de T. posee una beca de investigación del Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto de Salud Carlos III (ref. FI08/00508).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual epidemiological report on communicable diseases, 2010. [consultado 8 Ago 2012]. Disponible en: [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)
- Instituto de Salud Carlos III. Boletín epidemiológico semanal. 2011;19:100–16.
- 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;8:887–900.
- 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. 2013;31:120–1.
- 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;24:327–33.
- 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;26:219–29.
- 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.
- Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Front Microbiol. 2012;3:119.
- 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;51:1545–8.
- Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, Martínez S, Rojo-Bezares B, et al. Class 1 integrons lacking *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. Vet Microbiol. 2010;144:493–7.
- Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. Microbes Infect. 2006;8:1915–22.
- 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. 2010;7:419–25.

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;77:5655–64.
14. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;43:1–11.
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;7:523–35.
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;55:365–73.
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;28:1087–93.
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;66:218–20.
19. Grimont F, Weill FX. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars. WHO-Institut Pasteur [acceso electrónico] 2007 [consultado 16 Dic 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. 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;38:526–34.
22. 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;74:426–8.
23. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233–9.
24. O'Regan E, Quinn T, Frye JG, Pagès JM, Porwollik S, Fedorka-Cray PJ, et al. 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.* 2010;54:367–74.
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;51:1287–91.
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;17:207–13.
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;56:515–21.
28. Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol.* 2009;9:break 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;10:1132–9.