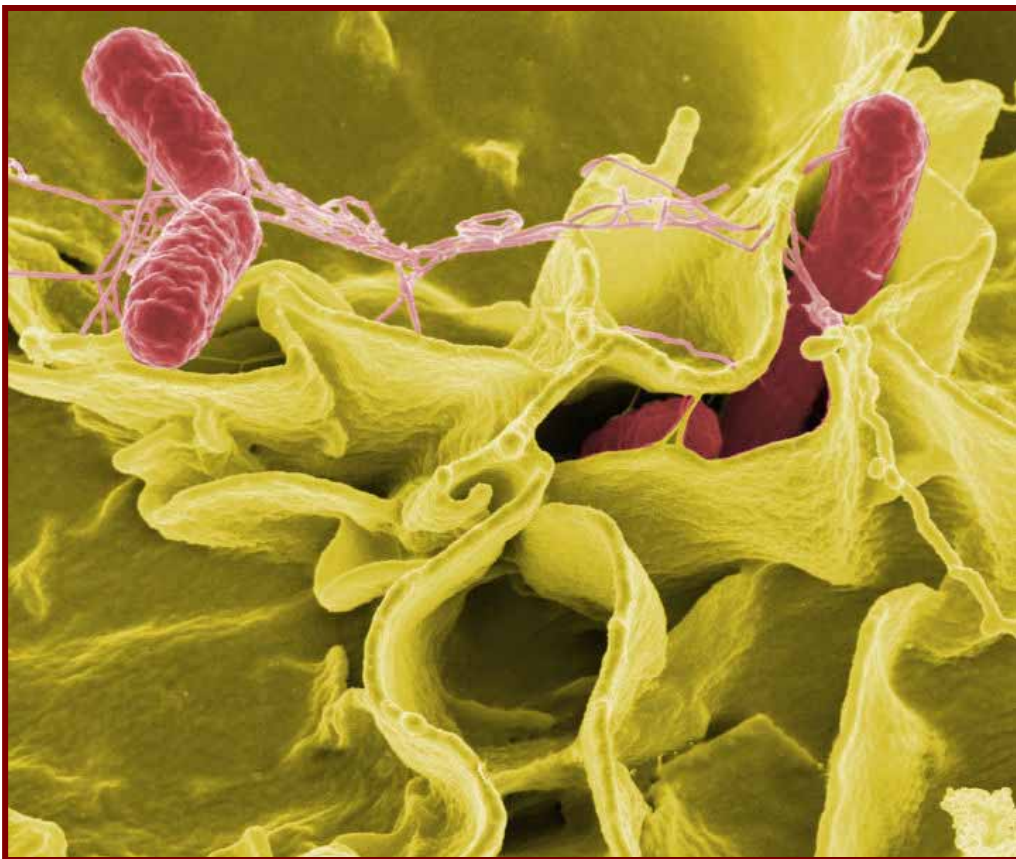


**Epidemiología y caracterización molecular de los
mecanismos de resistencia a diversos agentes
antimicrobianos en aislamientos clínicos de
*Salmonella spp.***



**Tesis Doctoral
Roberto Cabrera Ortega
2008**



**Departamento de Microbiología
y Parasitología Sanitarias**

Facultad de Medicina

Microbiología Médica 2004-2006

**Epidemiología y caracterización molecular de los
mecanismos de resistencia a diversos agentes
antimicrobianos en aislamientos clínicos de
*Salmonella spp.***

Tesis presentada por **ROBERTO CABRERA ORTEGA** para optar al título
de **Doctor en Biología.**

Director de Tesis: **Dr. Jordi Vila Estapé**

Jordi Vila Estapé, Catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Universidad de Barcelona y Consultor Senior del Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “**Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella spp.***” presentado por **Roberto Cabrera Ortega**, ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona, bajo su dirección y cumple todos los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa delante del tribunal correspondiente.

Firmada: Dr. Jordi Vila Estapé
Director de la tesis doctoral

Barcelona, 2007

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mi hermano. Su apoyo, su cariño, y su amor, nunca me han faltado a pesar de la distancia que nos separa. Me han llenado de fuerza y voluntad para seguir adelante.

Al Dr. Jordi Vila, director de esta tesis. Por la confianza depositada en mí, por su amabilidad, comprensión y su sabia enseñanza.

A mi Esther y a Joan por hacer tan feliz mí día a día. Sin su ayuda no hubiera sido posible seguir adelante.

Al Dr. Joaquim Ruiz (Quim), por ser un gran amigo y una gran persona. Por su asesoramiento, sus consejos científicos y su ayuda incondicional en todo momento. Gracias Quim.

A mi gran amigo Javi por su esfuerzo y su ayuda para la culminación de esta tesis.

A todos los chicos del laboratorio: Javi, Marc, Sara Martí, Vero, Eva, Sara Soto, Josep, Ana, Patricia. Gracias por todos los momentos agradables compartidos durante estos años.

A todo el personal del Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic. Por su compañerismo y profesionalidad.

ÍNDICE

1) INTRODUCCIÓN	7-54
a) Taxonomía	7-8
b) Características microbiológicas	8
c) Aislamiento	8-10
d) Manifestaciones clínicas	10-12
e) Epidemiología	12-13
f) Susceptibilidad antimicrobiana	13-16
g) Diarrea del viajero	16-19
1.1) MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS	19-32
a) Conjugación	21-22
b) Transducción	22
c) Transformación	23
1.2) AGENTES ANTIMICROBIANOS	32-54
a) β -lactámicos	32-37
b) Quinolonas	38-41
c) aminoglicósidos	41-45
d) Cloranfenicol	45-47
e) Sulfamidas y trimetoprim	47-50
f) Tetraciclinas	50-54
2) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55-56

3) RESULTADOS (Artículos)	57
3.1) Artículo 1. Mecanismos de resistencia a varios agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de <i>Salmonella</i> causante de diarrea del viajero.	57
3.2) Artículo 2. Integrones Clase 1 en cepas de <i>Salmonella</i> causantes de diarrea del viajero.	58
3.3) Artículo 3. Caracterización de un gen de resistencia a aminoglicósidos, encontrado en un integron Clase 1 en <i>Salmonella</i> Haifa causante de diarrea del viajero.	59
3.4) Artículo 4. Diseminación de <i>Salmonella entérica</i> serotipo Agona y <i>Salmonella entérica</i> serotipo Typhimurium multiresistente en Cuba.	60
4) DISCUSIÓN	61-74
5) CONCLUSIONES	75-77
6) BIBLIOGRAFÍA	78-101

1. Introducción

La salmonelosis constituye uno de los principales problemas de salud pública, así como un importante coste para la sociedad en muchos países del mundo. Millones de casos son reportados todos los años produciéndose altos índices de morbilidad y mortalidad (1). En los últimos años ha habido un aumento significativo en la incidencia y la severidad de los casos de salmonelosis, la mayoría de ellos en países pobres cuyas condiciones socioeconómicas y sanitarias favorecen la proliferación de estos microorganismos (1). En este sentido, debemos hacer un especial énfasis en la ya conocida diarrea del viajero donde el género *Salmonella* también juega un papel importante a nivel mundial. En la actualidad el hombre tiene la mayor capacidad de desplazamiento de la historia de la humanidad, hasta el punto de que ningún punto de la tierra dista de otro más de 36 horas, período de tiempo inferior al de incubación de la mayoría de los agentes infecciosos. La diarrea del viajero constituye uno de los problemas de salud más frecuentes en los viajes internacionales y es la infección más frecuente en los turistas (2).

El género *Salmonella* debe su nombre al célebre patólogo Salmon que la describió por primera vez al aislar *Salmonella Cholerasuis* del intestino del ganado porcino (3). Desde hace tiempo la existencia de múltiples especies de *Salmonella* era taxonómicamente aceptada. Sin embargo, recientemente como resultado de experimentos que indican un alto grado de similitud en el ADN el género se dividió en dos especies solamente, cada una con múltiples subespecies como se describe a continuación:

a) Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Salmonella*

Especies: *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (I) y *Salmonella bongori* subespecie V

- subespecie *salamae* (II)

- subespecie *arizonae* (IIIa)

- subespecie *diarizonae* (IIIb)

- subespecie *houtenae* (IV)

- subespecie *indica* (VI)

b) Características microbiológicas:

El género *Salmonella* está compuesto por microorganismos Gram-negativos, en forma de bacilos anaerobios facultativos que no forman espora y miden aproximadamente 2 - 3 por 0.4 - 0.6 µm. Como otras *Enterobacteriaceas* producen ácidos de la fermentación de la glucosa, reducen nitratos a nitritos y son oxidasa negativos. Todos los organismos son móviles (excepto *S. Gallinarium-Pullorum*) debido a la presencia de flagelos (flagelación peritrica) y no fermentan la lactosa (solo el 1% de las cepas de *Salmonella* fermentan la lactosa, la mayoría de estas cepas pertenecen al serogrupo C) (3,4).

c) Aislamiento:

Para el aislamiento de *Salmonella* las muestras adecuadas son las heces frescas que se siembran directamente sobre placas de agar. Medios medianamente selectivos tales como agar MacConkey y agar deoxicolato, y medios selectivos intermedios como agar *Salmonella-Shigella*, agar xilosa-lisina-deoxicolato o agar Hektoen, son ampliamente utilizados para detectar especies de *Salmonella*. Nuevos medios selectivos cromogénicos, como CHROMagar and COMPASS agar son cada vez más utilizados para el aislamiento primario y la identificación presuntiva de

Salmonella a partir de muestras clínicas debido a que son más específicos que otros medios selectivos, reducen la necesidad de pruebas de confirmación y el tiempo de identificación. Además de los medios anteriormente descritos son utilizados a menudo caldos de enriquecimiento como tetracionato y selenito para facilitar la recuperación de microorganismos en las muestras. Medios altamente selectivos para *Salmonella* como el selenito con verde brillante deben ser reservados ante la duda de portadores y para el uso durante circunstancias especiales, tales como brotes.

El agar sulfito de bismuto, que contiene un indicador de la producción de sulfuro de hidrógeno y que no contiene lactosa es el preferido para el aislamiento de *Salmonella entérica* serovar Typhi y para la detección del 1% de las cepas de *Salmonella* (La mayoría pertenecen al serogrupo C) que fermentan la lactosa. Después del aislamiento primario, los posibles aislamientos de *Salmonella* son probados con sistemas de identificación comercial o inoculados en medios de detección como agar TSI (del inglés: Triple- Sugar- Iron) y LIA (del inglés: Lysine-Iron Agar).

(3)

Los aislamientos con perfiles bioquímicos característicos de *S. Typhi* deben ser serotipados con antisueros polivalentes comerciales. Hasta la actualidad se han descrito 2501 serotipos que son identificados en base a los antígenos O (polisacárido somático), antígenos Vi (polisacárido capsular) y antígenos H (flagelar) de acuerdo con el esquema de Kauffman y White (5). El antígeno Vi es un homopolímero termolábil de ácido *N*-acetilgalactosaminouronico que es utilizado para la identificación de cepas de *S. Typhi* y ocasionalmente otros serotipos por aglutinación en lámina. En *S. Typhi* y *S. Paratyphi C*, el antígeno Vi puede inhibir la aglutinación con el antígeno O por su abundancia por lo que se requiere hervir para inactivar el antígeno Vi y detectar el antígeno O. La mayor variabilidad antigénica está en los antígenos O,

que están compuestos de cadenas de oligosacáridos unidos a un oligosacàrido central enlazado covalentemente al lípido A.

Aunque se utiliza la serotipificación de todos los antígenos de superficie para una identificación formal, la mayoría de los laboratorios llevan a cabo solo algunas reacciones de aglutinación que definen los antígenos O específicos dentro de los serogrupos A, B, C₁, C₂, D y E debido a que las cepas que se ubican dentro de estos serogrupos son responsables del 99% de las infecciones en humanos y animales de sangre caliente (3).

d) Manifestaciones clínicas

Gastroenteritis

La infección por *Salmonella* más frecuente es una gastroenteritis aguda autolimitada que es indistinguible de las causadas por otros patógenos bacterianos entéricos. Las náuseas, vómitos, dolor abdominal y fiebre (38°C-39°C) aparecen 6-48 horas después de la ingestión de agua o alimentos contaminados. También pueden ocurrir otros síntomas tales como: dolor de cabeza y mialgias. El examen microscópico de las heces muestra neutrófilos y también aunque en menor frecuencia glóbulos rojos. *Salmonella* también puede causar síndrome de pseudoapendicitis o puede imitar los cambios intestinales de la enfermedad inflamatoria del intestino delgado. El megacolon tóxico es una rara pero potencial complicación.

Fiebre entérica

La fiebre tifoidea (*S. Typhi*) y paratifoidea (*S. Paratyphi*) son enfermedades sistémicas graves caracterizadas por fiebre y síntomas intestinales. En áreas endémicas la mayoría de los pacientes que acuden a los hospitales con fiebre entérica están entre los 5 y los 25 años de edad. Aquellos menores de 4 años de edad son más propensos a padecer una fiebre no específica no reconocida como tifoidea. Cuando los niños menores de 1 año de edad adquieren fiebre tifoidea la

enfermedad es a veces más grave y puede venir acompañada de complicaciones. Además, en los pacientes con inmunosupresión, anomalías en el tracto urinario y biliar, defectos del sistema retículo endotelial tales como hemoglobinopatías y enfermedades infecciosas como: malaria, esquistosomiasis, bartonelosis e histoplasmosis aumenta el riesgo de una enfermedad grave (6).

Bacteriemia e infección vascular

Clásicamente, *S. Choleraesuis* y *S. Dublin* producen un síndrome sostenido de bacteriemia con fiebre. Sin embargo, cualquier serotipo de *Salmonella* puede causar bacteriemia. Del 1%-4% de los individuos inmunocompetentes con gastroenteritis por *Salmonella* poseen hemocultivos positivos. El riesgo de bacteriemia es mayor en niños, ancianos, y en pacientes inmunocomprometidos. Entre los niños la bacteriemia por *Salmonellas* no tifoideas usualmente se asocia con gastroenteritis y fiebre prolongada, puede causar infección focal aunque con menor frecuencia, y es fatal en menos del 10% de los casos. En contraste, en adultos es más probable una bacteriemia primaria y tener una alta incidencia de infección focal secundaria y muerte. Estos microorganismos son propensos a causar infección en sitios vasculares, donde un alto grado de bacteriemia o una bacteriemia persistente sugiere una infección endovascular. En pacientes VIH y en niños mal nutridos es muy frecuente sobre todo por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (7). Otras infecciones propias de países en vías de desarrollo como la esquistosomiasis, también favorecen el desarrollo de bacteriemias (8).

Salmonellosis y VIH

Las personas infectadas con el VIH presentan un mayor riesgo de salmonellosis comparados con la población general. En estos pacientes las *Salmonellas* pueden causar enfermedad invasiva grave: diarrea fulminante, enterocolitis aguda, ulceración rectal, bacteriemia recurrente,

meningitis y hasta la muerte. Entre las personas infectadas por el VIH en África, estos patógenos son una de las causas más comunes de bacteriemia, son a menudo multirresistentes a los antimicrobianos y están asociados a una alta mortalidad (24%-80%). Las infecciones focalizadas en estos paciente no son frecuente, suelen ocurrir más a menudo a aquellos con cantidades de CD4 menores de $100/\text{mm}^3$ (9). En los principios de la era del SIDA eran muy frecuentes las bacteriemias por *Salmonella* pero la introducción de algunos antiretrovirales como zidovudina las erradicó, debido no solo al control del VIH, sino a que posee actividad contra las cepas de *Salmonella* (10).

Infecciones localizadas

Se desarrollan aproximadamente en el 5%-10% de las personas con bacteriemia por *Salmonella* y la presentación puede ser retardada.

Estado de portador crónico

Se define como la persistencia de cepas de *Salmonella* en heces u orina por un período mayor de 1 año. Del 0.2%-0.6% de los pacientes con salmonelosis no tifoidea desarrollan el estado de portador crónico. Hasta el 10% de pacientes no tratados con fiebre tifoidea excretan *S. Typhi* en las heces hasta 3 meses, y el 1%-4% se convierten en portadores crónicos.

e) Epidemiología

Esta enfermedad está muy relacionada con los alimentos de origen animal. Alimentos como carne, huevos, y productos avícolas pueden contaminarse con *Salmonella*. Los cambios en el consumo alimenticio y el rápido crecimiento del comercio internacional de los productos agrícolas ha facilitado la diseminación de nuevos serotipos asociados con frutas frescas y

vegetales. Las heces de humanos y animales pueden contaminar la superficie de las frutas y vegetales que pueden no ser eliminadas al lavarlas. Aunque los brotes de alimentos contaminados son más frecuentes también se han reportado brotes con agua contaminada (3,4).

S. Typhi solo coloniza a los humanos. Aunque la transmisión directa de persona a persona no es común, la transmisión de *S. Typhi*, incluyendo la transmisión fecal-oral ha sido reportada. Ocasionalmente, trabajadores sanitarios adquieren esta enfermedad de pacientes infectados (3).

f) Susceptibilidad antimicrobiana

Los antimicrobianos más ampliamente utilizados con óptimos resultados en el tratamiento de las salmonelosis en adultos son el grupo de las fluoroquinolonas. Estos son bien tolerados, tienen una buena absorción oral y son rápidos y efectivos. Las cefalosporinas de tercera generación son ampliamente utilizadas en niños con infecciones serias, debido a que las quinolonas no son recomendadas para este grupo de edad (afectan los cartílagos). Cloranfenicol, ampicilina, amoxicilina y trimetoprim-sulfametoxazol son usadas también como alternativas (1).

Para el tratamiento de la fiebre tifoidea las fluoroquinolonas son el tratamiento más adecuado. Son más rápidas y efectivas muestran rangos más bajos de recaída que cloranfenicol, ampicilina, y trimetoprim-sulfametoxazol. Las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, cefixima), y la azitromicina (500 mg/kg diarios durante 7 días) también son efectivas en el tratamiento de la fiebre tifoidea. Las cefalosporinas de 1^{ra} y 2^{da} generación son clínicamente inefectivas y no deben ser usadas para tratar la fiebre tifoidea ni las salmonelosis no tifoideas. También los aminoglicósidos son clínicamente inefectivos, debido quizás a su carente actividad contra la salmonelosis intracelular.

El cloranfenicol (500 mg 4 veces al día), ampicilina o amoxicilina (1g 4 veces al día) y trimetoprim-sulfametoxazol son ampliamente utilizados para la fiebre tifoidea. Sin embargo, la

emergencia de un plásmido de resistencia a cloranfenicol en los años 70 que en 1989 amplió su espectro a ampicilina y trimetoprim, limitó la utilidad de estos agentes antimicrobianos en muchos países desarrollados.

Los pacientes con una fiebre tifoidea complicada que requieren hospitalización, deben recibir inicialmente terapia parenteral con fluoroquinolonas o cefalosporinas de 3^{ra} generación y reemplazo de electrolitos y fluidos perdidos. Después del control inicial de los síntomas se completa el tratamiento con 10-14 días de terapia con fluoroquinolonas, cefixima o azitromicina vía oral.

En la gastroenteritis la terapia adecuada debe ir dirigida en primera instancia a reemplazar los fluidos y electrolitos perdidos. En un largo meta-análisis la terapia antimicrobiana para gastroenteritis no complicadas, incluyendo regímenes con cursos cortos o simples dosis de fluoroquinolonas, amoxicilina o trimetoprim-sulfametoxazol por vía oral ha demostrado que el tratamiento no disminuye significativamente la duración de la enfermedad, ni la duración de la fiebre o la diarrea, y se asocia con un aumento del riesgo de recaída, con cultivos positivos después de tres semanas, y reacciones adversas a las drogas. Debido a esto, los antimicrobianos no deben ser utilizados rutinariamente para el tratamiento de gastroenteritis no complicadas causadas por salmonellas no tifoideas, ni para reducir la excreción de las heces de convalecientes.

Para organismos susceptibles el tratamiento con fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol, o amoxicilina es adecuado. Ocasionalmente, la profilaxis antimicrobiana ha sido requerida para el control de brotes institucionales, especialmente en unidades de cuidados intensivos o salas pediátricas, donde el establecimiento de medidas de control de la infección puede ser difícil (3,4).

En el tratamiento de bacteriemias o infecciones focales causadas por *Salmonella* se deben incluir cefalosporinas de 3^{ra} generación y fluoroquinolonas. Cuando existe sospecha de infección endovascular se recomienda terapia de seis semanas con β -lactámicos tales como ampicilina o ceftriaxona. El cloranfenicol no debe ser usado debido a su alta tasa de fallo en infecciones endovasculares y por su elevada toxicidad.

En personas con SIDA y un primer episodio de bacteriemia por *Salmonella*, el tratamiento a seguir incluye 1-2 semanas de terapia antimicrobiana intravenosa seguida de 4 semanas con fluoroquinonas vía oral para erradicar al microorganismo y disminuir el riesgo de bacteriemia recurrente. En caso de recaída después de este período de tratamiento se debe administrar fluoroquinolonas o trimetoprim-sulfametoxazol vía oral durante un largo período de tiempo. Además, las fluoroquinolonas y la zidovudina tienen un efecto antibacterial sinérgico contra *Salmonella*; la administración de las dos drogas disminuye el riesgo de infección recurrente. Además, la zidovudina es activa por sí sola ante *Salmonella* (10).

El trimetoprim-sulfametoxazol puede ser una buena elección para terapias supresivas de larga duración si el microorganismo es susceptible, debido a la eficacia en la prevención de otras infecciones oportunistas, incluyendo neumonía por *Pneumocystis*.

El portador crónico de *Salmonella* no tifoidea es tratado de manera similar al portador crónico de *S. Typhi*. Amoxicilina (3g en adultos o 100mg/kg en niños tres veces al día durante 3 meses), trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina (750 mg dos veces al día durante 4 semanas) son efectivos en la erradicación del estado de portador crónico asociado con cepas susceptibles, con un rango de cura de más del 80%.

El tratamiento en casos de diarrea del viajero causadas por *Salmonella* requiere en primer lugar la reposición hídrica. Es la medida terapéutica más importante; se puede realizar disolviendo seis cucharaditas de azúcar y una de sal en cada litro de agua. En adultos y en niños mayores, la

cantidad que debe ser ingerida es ilimitada, no así para niños pequeños. Para niños menores de 2 años ½ taza (50-100ml) después de cada deposición diarreica, niños entre 2-10 años 1 taza (100-200 ml) después de cada deposición diarreica.

g) DIARREA DEL VIAJERO (DV)

La diarrea del viajero, también llamada “*venganza de Moctezuma*” se ha definido, como la existencia de tres o más deposiciones líquidas o pastosas por día o como cualquier número de deposiciones asociado a dolor abdominal, fiebre, vómitos o sangre en las heces (2).

Etiología

Las bacterias son los enteropatógenos más frecuentemente incriminados (50-80%) como causa de DV. *E. coli* diarreogénica es la bacteria más frecuentemente aislada en pacientes con esta enfermedad (2). Hasta la fecha se han descrito 6 patotipos de *E. coli* diarreogénicos (11), siendo los más relevantes como causa de DV los *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC) y los *E. coli* enteroagregativos (EAEC). Sin embargo, otras bacterias como *Aeromonas spp.*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y las especies de *Vibrio* también han sido descritas con frecuencia como causa de DV (2). Los porcentajes de aislamiento de cada patógeno varían al consultar varios estudios principalmente por las diferentes técnicas antimicrobianas utilizadas en la identificación microbiológica, las estaciones y las variaciones en los destinos de los viajeros que están influenciadas por factores geográficos como la proximidad. Un ejemplo de ello es la elevada frecuencia de viajeros de Los Estados Unidos a México, o de España a Marruecos. También influyen las relaciones socioculturales, siendo un ejemplo típico las existentes entre España e Ibero América.

Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo más importantes se encuentran la conducta de los viajeros así como las medidas de salud pública en el país visitado. La carencia de higiene y las pobres condiciones sanitarias en general en los países tropicales generan una alta contaminación ambiental. Debido a esto, el destino es uno de los principales factores de riesgo. La incidencia de diarrea del viajero (DV) aumenta por otros factores relacionados con la calidad, el tipo y la localización donde se consumen los alimentos. También hay otros factores personales importantes en la adquisición de esta enfermedad como la inmunodeficiencia y la disminución de la actividad gástrica. Los niños y adultos jóvenes tienen más episodios de diarrea que otros grupos de edad. En el caso de los adultos jóvenes es debido en gran medida a los viajes de aventura escogidos que incluyen una variedad de hábitos alimenticios. Por lo tanto la modalidad del viaje también constituye un factor de riesgo.

Fisiopatología

El desarrollo de las gastroenteritis bacterianas depende de varios mecanismos tales como la elaboración de enterotoxinas por patógenos toxigénicos, la acción de una endotoxina de naturaleza lipopolisacárida, la invasión de la mucosa intestinal por patógenos invasivos y la secreción de citotoxinas.

Todas las bacterias necesitan colonizar la mucosa y para ello se valen de varios factores de colonización, tales como: movilidad, fimbrias, pili y adhesinas no fimbriales, que juegan un papel fundamental en la unión de las bacterias a la mucosa intestinal. Después de la colonización las citotoxinas son liberadas.

Las enterotoxinas en la mayoría de los casos son liberadas por microorganismos que colonizan la parte superior del intestino delgado. Estas se unen a un receptor celular específico para penetrar

dentro de las células y entonces interferir en el sistema regulador de la adenilato ciclasa celular aumentando así la expresión de esta enzima y con ello los niveles de AMPc, induciendo un mecanismo secretor fluido. ETEC, (termoestable (ST) y termolábil (LT)) y *Vibrio cholerae* (toxina colérica) son el prototipo de bacteria que exhibe estas propiedades. La diarrea causada por estos enteropatógenos es no inflamatoria y acuosa. Los mecanismos osmóticos son otra vía para inducir diarrea no inflamatoria.

Las bacterias que causan diarrea inflamatoria usualmente colonizan el extremo distal del ileum y el colón, donde invaden la mucosa intestinal induciendo enfermedad disentérica. Sin embargo, algunas bacterias liberan citotoxinas que afectan la mucosa intestinal. Estas citotoxinas destruyen las células dianas a través de dos mecanismos fundamentales: actúan a niveles intracelulares inhibiendo la síntesis de proteínas celulares o inhibiendo la formación de filamentos de actinas. *Shigella dysenteriae* tipo 1 es el prototipo de bacteria que causa diarrea inflamatoria mediante la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (toxina de shiga). Otros tipos de citotoxinas actúan formando poros en la membrana celular (hemolisinas). *Vibrio parahemolyticus* es un ejemplo de ello. Algunas bacterias pueden exhibir ambos mecanismos, liberando endotoxinas y citotoxinas. *C. jejuni* libera una enterotoxina similar a la toxina colérica y una citotoxina que puede jugar un papel importante en la diarrea inflamatoria.

Salmonella spp. y *Aeromonas spp.* Con capacidad invasiva, pueden inducir los dos tipos de mecanismos diarreicos (diarrea inflamatoria y diarrea secretoria). Algunas cepas de *Salmonella* también pueden causar diarrea persistente (> 14 días) o diarrea crónica (> 30 días).

La diarrea es una de las causas más relevantes de mortalidad a nivel mundial, afectando principalmente a niños de países pobres. Se calcula que cada año hay en el mundo 2.5 millones de muertes asociadas a esta patología (1). La situación socioeconómica de estos países hace que exista un gran desconocimiento de los patógenos implicados. Así, el estudio de la DV tiene una

gran importancia al ser un espejo donde se refleja una realidad que de otro modo pasaría desapercibida.

Aunque esta enfermedad es muy conocida hay algunas preguntas aún por resolver, relacionadas principalmente con el nicho ecológico que constituye el intestino para una mezcla de cepas bacterianas que intercambian genes relacionados con factores de virulencia y resistencia a los antibacterianos. Además, la vigilancia y el monitoreo de las migraciones geográficas de ciertas cepas y sus niveles de resistencia a antibióticos son necesarios en la presente era de globalización.

1.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

En el año 1929 Fleming publica el que es considerado el trabajo que abrió la era antibiótica. En este trabajo describe la penicilina, que se considera el antibiótico por antonomasia. Sin embargo, debemos mencionar que las primeras observaciones empíricas de científicos que mostraban fenómenos debidos a la producción natural de antibióticos datan de mediados del siglo XIX.

Existen dos trabajos independientes desarrollados por Duchesne (1897) y Tiberio (1895) donde se describe la penicilina y se demuestra, no solo la capacidad bactericida *in vitro*, sino que arriban más allá que Fleming, llegando a demostrar su capacidad para curar infecciones experimentales en ratones.

Desde que la penicilina fue introducida de manera estable en la clínica, un mundo de sustancias han sido aisladas o sintetizadas, permitiendo atacar las bacterias de manera directa. Hasta se ha conseguido disponer de sustancias capaces de hacer frente a infecciones por parásitos, hongos y, aunque de una manera más limitada, de virus. Estos avances con el tiempo se han visto ensombrecidos por dos razones: a) El hecho de que las bacterias han desarrollado mecanismos de

resistencia a los agentes antimicrobianos y b) Las relaciones “familiares” de los agentes antimicrobianos.

Las bacterias han sido capaces de desarrollar mecanismos de resistencia que abarcan la totalidad del arsenal antibacteriano del cual se dispone. Hasta existen patógenos específicos que presentan resistencia a todos los antimicrobianos empleados hasta ahora, convirtiendo a estas bacterias en auténticos paradigmas de la resistencia. Algunos mecanismos de resistencia son de hecho adaptaciones de mecanismos que en su origen tenían otras funciones.

La adquisición de los diferentes mecanismos de resistencia puede ser originada por el mismo microorganismo, fruto de errores en su replicación o por la adquisición de material genético que codifica genes de resistencia. En el primer caso estaríamos hablando de mutaciones, que nada más se difunden verticalmente, es decir serán transmitidas de célula madre a célula hija. También existen una serie de mecanismos de adquisición de material genético mediante los cuales la resistencia puede ser difundida de una célula a otra (de la misma especie o no), contribuyendo a la difusión horizontal de la resistencia.

Actualmente se conocen hasta tres mecanismos de transferencia de material genético: La conjugación, la transducción y la transformación.

a) La **conjugación** consiste en la transferencia de genes entre dos células que están en contacto. Este tipo de transferencia se debe a estructuras genéticas que portan los microorganismos denominadas plásmidos. Es probablemente el mecanismo más frecuente para intercambiar material genético, con el cual se adquieren una gran variedad de genes, que una vez en el interior de la bacteria pueden transferirse a otros plásmidos o integrarse al cromosoma.

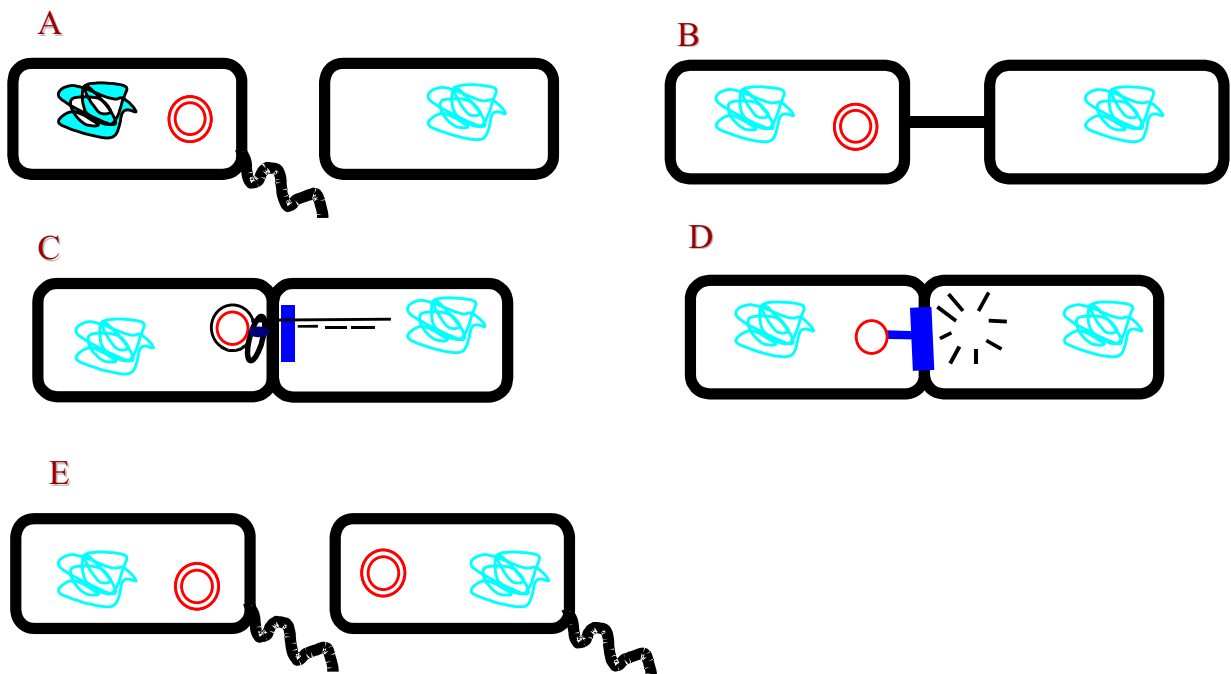


Figura 1. Mecanismo de conjugación. a) Célula conjugativa (F+), con su pili sexual, y célula no conjugativa (F-), sin pili. b) Establecimiento del contacto entre las dos células mediante el pili sexual. c) Contracción del pili sexual y contacto célula-célula. Formación de un poro por donde pasa el DNA de cadena sencilla desde la célula donante a la receptora. d) Síntesis de las cadenas de DNA conjugativo: continua a la célula donante y discontinua a la receptora. e) Sellado de los

poros y separación de las dos células. Cada una contiene una copia del factor F y por tanto pueden sintetizar el pili. (Adoptado de Ruiz J., 2004)

b) La **transducción** es la adquisición de material genético por la acción de un bacteriófago (virus) y permite a la bacteria adquirir una cantidad relativamente pequeña de DNA (40 kb).

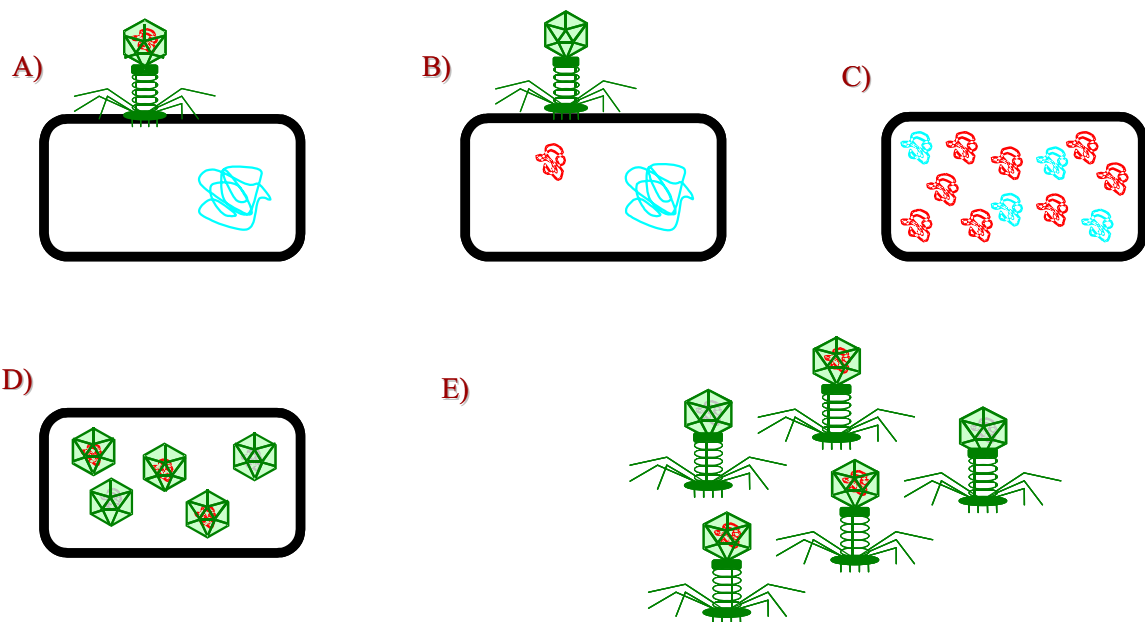


Figura 2. Transducción generalizada. **a)** Fijación del fago a la célula. **b)** Inyección del material genético vírico. **c)** Degradación del DNA bacteriano y replicación del genoma vírico. **d)** Síntesis de las cápsides y empaquetamiento del material genético bacteriano y vírico. **e)** Lisis celular y liberación de las nuevas partículas víricas. (Adoptado de Ruiz J., 2004)

c) En la **transformación** la bacteria adquiere el DNA directamente del medio ambiente en circunstancias favorables a partir de otra bacteria que ha liberado su material genético. Este nuevo material genético se recombina con el cromosoma de la bacteria receptora en aquellas regiones donde hay suficiente homología y puede dar lugar a genes funcionales.

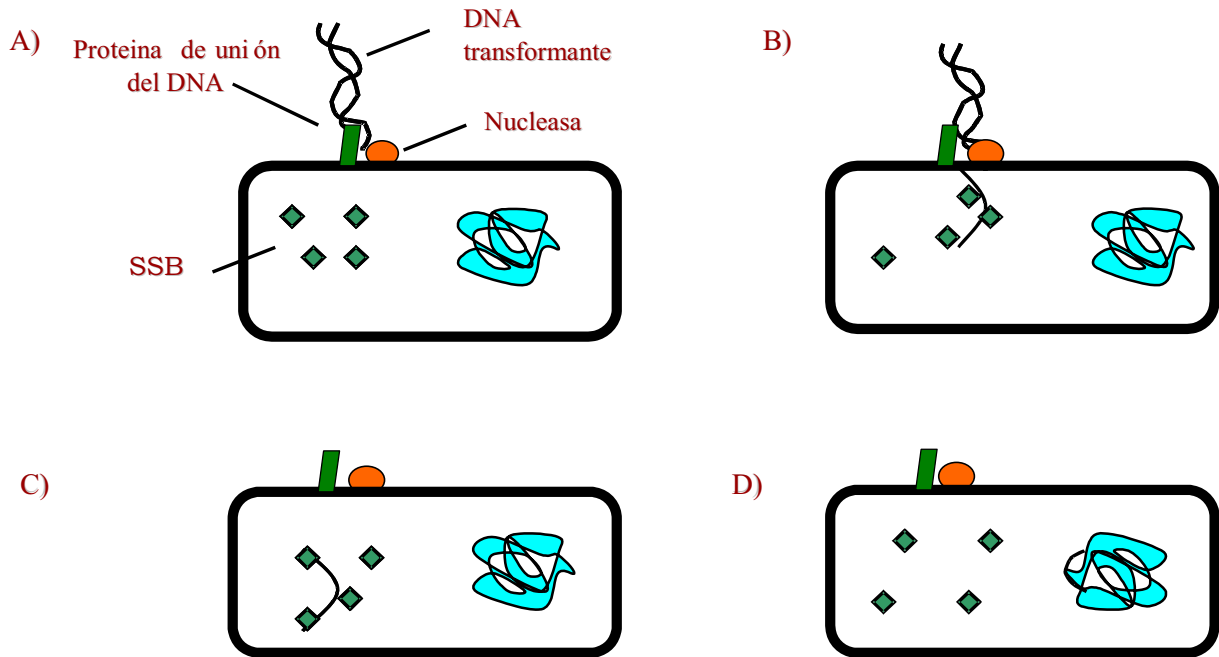


Figura 3. Mecanismo de transformación. a) Desarrollo de la competencia y unión del DNA transformador. b) Procesamiento y captura del DNA exógeno. c) Las proteínas específicas (SSB) se unen y protegen el DNA exógeno monocatenario. d) El DNA exógeno se integra al cromosoma bacteriano en regiones homólogas mediante la proteína RecA. (Adoptado de Ruiz J., 2004)

El término elemento móvil hace referencia a secuencias de DNA, que tienen la capacidad de moverse entre células o entre moléculas de DNA. Pueden ser pequeñas o grandes. Tradicionalmente, estos elementos móviles se clasificaban en bacteriófagos, plásmidos, transposones, secuencias de inserción y genes cassette. Esta clasificación se ha modificado a causa de unos elementos quiméricos denominados islas genómicas.

d) Plásmidos

Son moléculas circulares de DNA doble cadena con superenrollamiento negativo (aunque también se pueden encontrar en forma lineal) (12). Son literalmente material genético accesorio. No codifican funciones esenciales para la célula y su medida puede variar entre pocos y centenares de kb. Estos se replican autónomamente (replicones) independiente del cromosoma de la célula (13).

Se han observado dos tipos de replicación plasmídica: la replicación en Θ , frecuente en bacterias gramnegativas, y la replicación en σ o círculo rodante, frecuente en bacterias grampositivas. También pueden integrarse al cromosoma de la cepa receptora, e incrementar así la estabilidad de la información genética que transportan (14), replicándose como cualquier otro carácter cromosómico. Estos plásmidos integrados se denominan *episomas*. Los plásmidos conjugativos son más frecuentes en bacterias gramnegativas en especial los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas* (12).

Los plásmidos bacterianos pueden clasificarse según diferentes caracteres (15):

a) Según sean autotransferibles por conjugación o no:

- Plásmidos autotransferibles o conjugativos. Capaces de conjugar por sí mismos.
- Plásmidos no conjugativos, dentro de los que se encuentran los movilizables y los no movilizables.

b) Según el control de la replicación vegetativa (El número de copias de define como la cantidad de copias del plásmido en una nueva célula inmediatamente después de la división celular):

- Plásmidos de control estricto: Mantienen un bajo número de copias en la célula. Son plásmidos de talla mediana (30 kb) y grande (centenares de kb).
- Plásmidos de control relajado: alto número de copias por cromosoma (más de 10). Son plásmidos pequeños (menos de 10 kb).

c) Según el tipo de fenotipo que codifican:

- Plásmidos R: que codifican una o más resistencia a antibióticos o metales pesados. Estos plásmidos son flexibles y evolucionan rápidamente ante la presión selectiva. Se ha visto que esta resistencia se difunde entre especies y géneros muy diferentes mediante difusión horizontal. Aunque en la naturaleza ya existen plásmidos R, el uso masivo de antibióticos ha provocado un aumento de cepas portadoras de plásmidos R, con muchos genes de resistencia.
- Plásmidos bacteriocinogénicos: Codifican una bacteriocina e inmunidad contra esta (Plásmidos Co1 E1 o Clo DF13).
- Plásmidos de virulencia: Codifican funciones relacionadas con la virulencia (toxina de *Bacillus anthracis*) (16).
- Plásmidos que codifican factores de colonización.
- Plásmidos que confieren la capacidad de utilizar rutas metabólicas alternativas.
- Plásmidos responsables de la fijación de nitrógenos.
- Plásmidos Ti y Ri: Responsables de la producción de tumores en plantas dicotiledóneas.

d) Plásmidos según el grupo de incompatibilidad: Muchas bacterias contienen más de un tipo de plásmido, pero no todos los plásmidos pueden coexistir en una misma célula. Este fenómeno se denomina *incompatibilidad plasmídica*. Se conocen más de 30 grupos de incompatibilidad (17).

e) Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (IS) son los transposones más pequeños. Oscilan entre 760 y 2500 pb. Tienen dos repeticiones invertidas (IR) cortas a cada extremo (excepto en las familias IS91, IS110 y IS200/605) y una o diversas pautas abiertas de lectura (ORF), que codifican la transposasa, (18) y en algunos casos, también funcionan como reguladoras de la transcripción de esta (19). Dos IS pueden formar un transposón compuesto y ser capaces de movilizar los genes situados dentro de estos. En 1998 se agruparon en diferentes familias según 4 criterios: La organización genética, la transposasa, las IR y las dianas de inserción (20). Se han descrito 17 familias: IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 y ISL3. Aunque, aún quedan elementos por clasificar.

f) Transposones

Los transposones (Tn) se caracterizan por su capacidad para moverse dentro del genoma bacteriano, mediante recombinación no homóloga, pueden saltar de un lugar a otro del cromosoma o del plásmido. Este movimiento se denomina *transposición* y se da gracias a la transposasa. Esta actividad transposasa al igual que en las secuencias de inserción permaneces muy regulada ya que, un elevado índice de transposición sería letal para la célula. Los transposones dependen de la replicación de su hospedador, debido a que son incapaces de replicarse autónomamente.

Los transposones se clasifican en transposones compuestos o de clase 1 y transposones no compuestos o de clase 2.

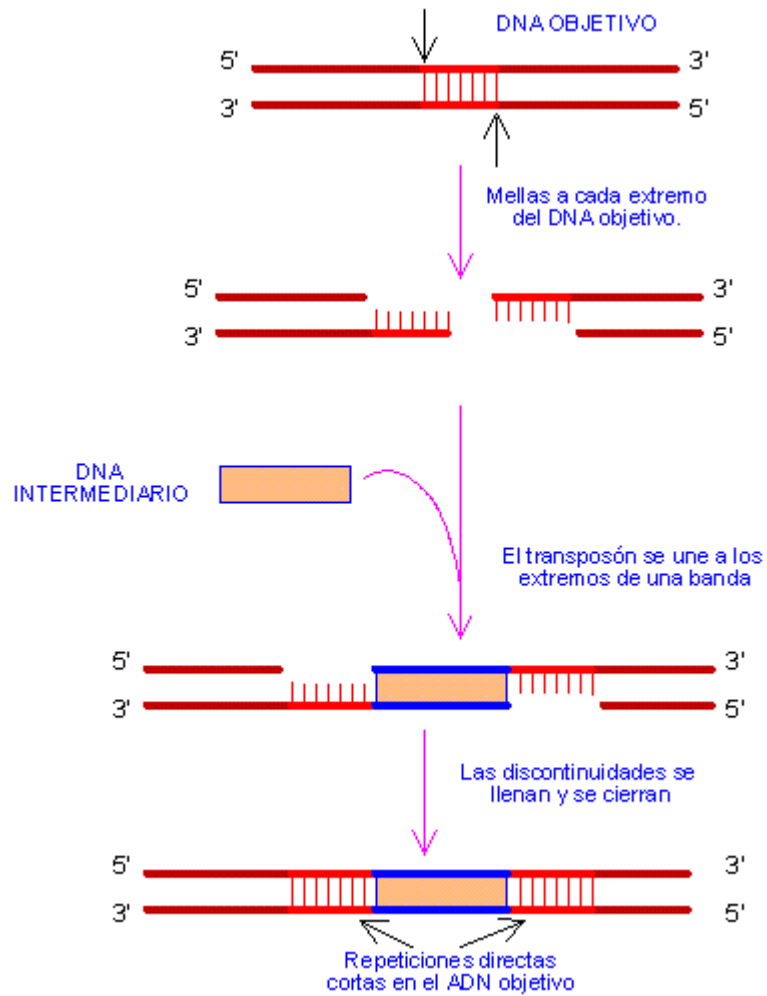
Los transposones compuestos o de clase 1 son segmentos de DNA flanqueados por dos secuencias de inserción (IS) iguales o muy similares, que pueden estar orientadas en el mismo sentido o invertidas. Para que se pueda efectuar la transposición, nada más se necesita que una de

las dos IS codifique una transposasa (TnpA). Los transposones de clase 1 pueden tener diversas IS en su estructura y diferentes genes que normalmente codifican resistencia a antimicrobianos o funciones metabólicas. La transposición en este grupo puede ser compleja ya que la TnpA puede activar la transposición de las IS independientemente de la estructura del transposón o bien la recombinación entre las IS puede dar lugar a reorganizaciones en la estructura del transposón.

Los transposones no compuestos o de clase 2 no tienen IS en los extremos. Se caracterizan por tener a una banda y a otra repeticiones invertidas (IR) que oscilan entre 30 y 50 pb. En estos se encuentran genes que codifican una o más funciones necesarias para la transposición (*tnp*), pero también, igual que los transposones clase 1 tienen otros genes adicionales.

También encontramos un tipo de transposón capaz de conjugarse. Son los denominados transposones conjugativos, los cuales pueden transferirse por sí mismos de una célula a otra, ya que disponen de los genes necesarios para llevar a cabo esta función. Para transferirse primero se separan y se circularizan, una de las cadenas es transferida hacia a la otra célula desde *oriT* y una vez allá se sintetiza la cadena complementaria y forma de nuevo una estructura circular capaz de integrarse al genoma de su hospedador. Estos transposones parecen ser que son los principales responsables de la diseminación de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Streptococcus* y otras bacterias Gram-positivas (21).

Figura 4. Esquema de mecanismo de transposición (www.virtual.unal.edu.co)



g) Integrones

Se descubrieron a principios de la década de los años 1980. Se caracterizan por ser capaces de captar genes que codifican determinantes de resistencia a antibióticos y determinantes con otras funciones. Estos se han diseminado ampliamente entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gramnegativas (*Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*) (22,23,24,25).

Los genes que se incorporan a los integrones presentan una estructura particular y se han denominado genes cassette. La integración se produce por un mecanismo de integración sitio específico. Hasta la actualidad se han descrito más de 60 genes cassette de resistencia en bacterias gramnegativas.

Los integrones en su forma más sencilla, están formados por 3 elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (cassettes). Uno que codifica para una integrasa (*intI*), el otro es el lugar de recombinación sitio específico (*attI*) y, por último, un promotor (P_{ant}) para la expresión de los genes cassettes integrados. A veces contienen un segundo promotor más fuerte, P_2 , localizado adyacentemente a 3' del primero. El lugar de recombinación sitio específico *attI* está formado por 65 pares de bases, incluyendo dos regiones correspondientes a los lugares de unión fuerte y débil de la integrasa y un lugar de recombinación, en el cual los genes capturados son integrados gracias a la acción de la integrasa. Esta integrasa de aproximadamente 1 kb, pertenece a la familia de las recombinasas. En total un integrón simple con estos únicos elementos y sin genes casetes incorporados posee un tamaño aproximado de 1.1 kb.

La clasificación de los integrones se basa en la secuencia de la integrasa. Actualmente se conocen nueve clases. Los miembros de la clase 1, 2 y 3 contienen genes cassette de resistencia a los antibióticos (26,27); los de las clases 4, 5, 6 y 7 contienen genes que no codifican resistencia

a antibióticos (28,29), el de la clase 9 contiene un gen cassette de resistencia a antibióticos y otros genes casetes de función desconocida (30) y el integrón de la clase 8 no presenta ningún gen cassette (29).

Los integrones clase 1 son los que se encuentran con mayor frecuencia en cepas aisladas de casos clínicos, excepto en *Shigella sonnei* donde el tipo 2 es el más frecuente (30). Se caracterizan por tener la secuencia 5' conservada (5' CS) que contiene el gen codificante de la integrasa y la mayoría de ellos contiene también una secuencia 3' conservada (3' CS) que contiene un gen que confiere resistencia a componentes de amonio cuaternario (*qacEΔ1*) y un gen de resistencia a sulfonamida (*sulI*); estos dos genes de resistencia no son casetes sino que se encuentran fijados en el integrón. Muchos de los integrones pertenecientes a esta clase se han localizado en elementos transponibles.

Los integrones son estructuras sedentarias que funcionan como sistema de captación de genes que confieren ventajas selectivas y que raramente captan genes indispensables para las bacterias. Poseen una gran versatilidad por tener la habilidad de reconocer una amplia variedad de secuencias de recombinación, así como una capacidad prácticamente ilimitada de intercambio y reserva de casetes. Esta flexibilidad le permite a la bacteria una rápida adaptación al flujo impredecible de los nichos ecológicos (31).

h) Islas genómicas

Estas estructuras se dividen en islotes (< 10 kb) o islas genómicas (GEI) (> 10 kb). Estos elementos móviles forman parte de un *pool* flexible de genes que se caracterizan por modificar funciones no esenciales para la célula, pero que le confieren ventajas frente a condiciones particulares. Estos elementos transportan *clusters* de genes con funciones específicas que son incorporados al nuevo DNA en bloque. Estos bloques se encuentran muy a menudo al lado o

insertados en genes tRNA o tmRNA del cromosoma del hospedador. Por tanto, será muy frecuente encontrar a cada lado de las islas genómicas los dos fragmentos de tRNA. (32)

Las islas genómicas se pueden dividir en diferentes grupos según las ventajas que confieren al nuevo hospedador: islas ecológicas en microorganismos ambientales, islas saprófitas, islas de simbiosis o islas de patogenicidad (PAI) en microorganismos que interactúan con su hospedador. Se localizan en el cromosoma bacteriano, aunque también se han descrito casos de localización plasmídica. Una isla genómica normalmente está flanqueada por secuencias repetidas directas (DR) y transporta diversas IS, ya sean funcionales o fragmentadas. Pueden transportar también transposasas (33) o integrasas que actuarán en la integración y escisión de la isla genómica (34). Se ha visto que en algunas islas genómicas el gen de la integrasa puede estar delecionado o no ser funcional y por tanto se denominan islas genómicas no móviles (35).

Además de los genes que le confieren la capacidad de movilizarse, pueden portar genes que confieren ventajas adaptativas o de patogenicidad a la célula donde se insertan, como puede ser la producción de toxinas, factores de adherencia, degradación de fenoles, resistencia a antibióticos como la meticilina (*SCCmec*), la fijación de nitrógeno, la expresión de adhesinas, etc.

Tipos de resistencia bacteriana a los antibióticos

Las bacterias pueden expresar básicamente dos tipos de resistencia a los antibióticos:

- a) Resistencia natural o primaria.
- b) Resistencia adquirida.

En el primer caso las bacterias presentan una resistencia intrínseca a un determinado antibiótico, ya sea por expresión constitutiva de bombas de expulsión activa, falta de un sistema de transporte o desactivación del antibiótico. La resistencia adquirida se puede producir por una

mutación de un gen propio de la bacteria, por la adquisición de resistencia exógena o por mutaciones en genes adquiridos.

Mecanismos bioquímicos de resistencia bacteriana a los antibióticos.

Los mecanismos básicos mediante los cuales una bacteria puede expresar resistencia a los antibióticos son:

- a) Modificación de la diana o molécula sobre la cual actúa el antibiótico.
- b) Modificación, alteración o desactivación del antibiótico.
- c) Disminución de la cantidad de antibiótico que puede acceder a la diana. Puede producirse por una disminución en la entrada del antibiótico al interior de la bacteria por problemas de permeabilidad, secuestro del antibiótico, o bien por eliminación del antibiótico debido a un sistema de expulsión activa.

1.2. AGENTES ANTIMICROBIANOS

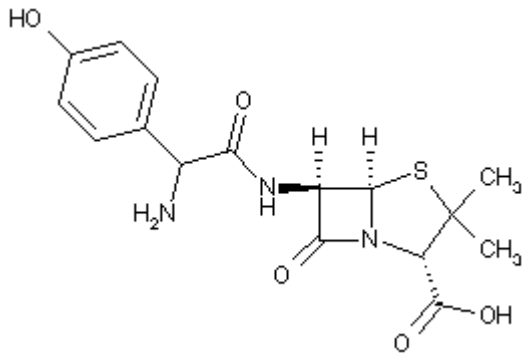
a) β -lactámicos

Estructura y clasificación:

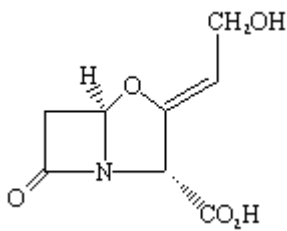
El nombre de la familia de los β -lactámicos se explica por la presencia del anillo β -lactámico en su estructura química. La unión de este anillo a uno secundario origina las diferentes clases descritas dentro de la familia (penicilinas, inhibidores de β -lactamasas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemes) y condiciona su espectro de acción y sus propiedades farmacocinéticas.

Penicilinas: Todas tienen básicamente la estructura del ácido 6-aminopenicilánico que tiene un anillo de tiazolina, con un grupo amino libre, unido a un anillo β -lactámico.

Amoxicilina

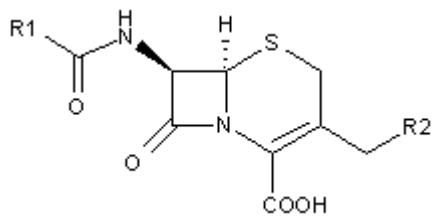


Ácido clavulánico



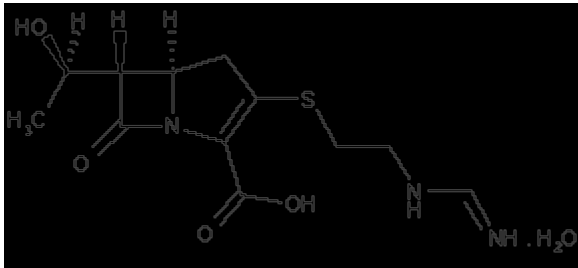
Cefalosporinas: Similares a las penicilinas en relación a la estructura y su modo de acción. Poseen un anillo β -lactámico fusionado con un anillo de dihidrotiazina de 6 átomos, en lugar del anillo de tiazolina.

Ácido 7-aminocefalosporánico

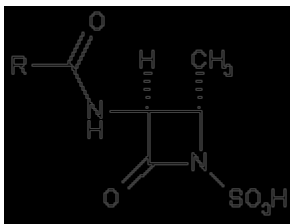


Carbapenemes: Son antimicrobianos relacionados estructuralmente con los β -lactámicos. El imipenem fue el primer compuesto de este grupo en sintetizarse (semi-sintético).

Imipenem



Monobactamas: Compuestos monocíclicos derivados del ácido 3-aminomonobactámico, en que el nitrógeno del anillo β -lactámico se encuentra unido a un radical sulfónico que activa el núcleo.



Mecanismo de acción:

Estos antimicrobianos son generalmente bactericidas (solo actúa sobre microorganismos en fase de crecimiento) que interfieren en la síntesis de la pared celular, debido a que se unen a receptores enzimáticos situados en la cara externa de la membrana bacteriana llevando a cabo la transpeptidación de los polímeros de mureína. El resultado bactericida se debe a la inactivación de un inhibidor de enzimas autolíticas de la pared bacteriana (autolisinas) que lleva a la lisis celular. Las autolisinas son enzimas finamente reguladas que en condiciones normales de crecimiento participan en el renovación de la pared celular (*cell wall turnover*). Los receptores

enzimáticos reciben el nombre de "Proteínas Fijadoras de Penicilinas (PBP-Penicillin Binding Proteins)" y son carboxipeptidasas, transpetidasas y endopeptidasas, implicadas en la fase final de la formación de la pared celular: la transpeptidación entre las cadenas de glucopéptidos que produce la formación de puentes peptídicos entre cadenas de mureína adyacentes. Las proteínas PBP también tienen la función de reorganizar la pared durante el crecimiento y la división celular.

También se pueden unir a una o varias de estas PBP porque actúan como análogos del sustrato de la transpeptidación normal. Esto produce la inactivación en forma irreversible de la PBP debido a que el antimicrobiano se comporta como agente acilante que actúa sobre el sitio activo de las enzimas.

Mecanismos de resistencia:

Son diversos los mecanismos de resistencia que han desarrollado las bacterias frente a estos antimicrobianos. Estos mecanismos pueden presentarse solos, pero cada vez tiene más fuerza la hipótesis que son diversos los mecanismos implicados en una misma resistencia.

a) La resistencia por modificación de la diana se produce por modificación de las proteínas (PBP, *penicillin binding proteins*) sobre las cuales actúan estos compuestos. Este tipo de resistencia la encontramos fundamentalmente en bacterias grampositivas en diferentes maneras: adquisición de una proteína con baja afinidad, recombinación de una PBP sensible con variedades más resistentes, mayor expresión de una determinada PBP o mutaciones puntuales que disminuyen la afinidad de una PBP por los antibióticos β -lactámicos (36).

b) La resistencia por modificación, alteración o desactivación del antibiótico: Las β -lactamasas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que hidrolizan el anillo β -lactámico, se produce

mediante la unión no covalente con la enzima, la cual hidroliza el enlace amida del anillo β -lactámico dando como resultado un derivado ácido sin actividad antibacteriana.

Actualmente las β -lactamasas se clasifican según la secuencia de aminoácidos (sistema de Ambler) o según la similitud funcional, perfil del sustrato y de inhibición (sistema de Bush-Jacoby-Medeiros) (37). Las β -lactamasas son codificadas por genes de localización cromosómica, plasmídica o en transposones y se pueden producir de manera constitutiva o inducible en presencia del sustrato. En las bacterias gramnegativas las β -lactamasas se encuentran en el espacio periplásmico. En la familia *Enterobacteriaceae*, las dos β -lactamasas de amplio espectro más frecuentes son la OXA 1, TEM-1 (plasmídica) y la SHV-1 (cromosómica), que se comportan como penicilinasas con escasa o nula actividad para las cefalosporinas (37). En los últimos años han aparecido un grupo de β -lactamasas derivadas de la TEM-1 y la SHV-1, con un espectro hidrolítico muy superior, que desactivan las cefalosporinas de tercera generación y los monobactamas. Se conocen con el nombre de *β -lactamasas de espectro extendido*, y aparecen como consecuencia de mutaciones secuenciales al gen que codifica la enzima. Se encuentran con más frecuencia en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, los microorganismos donde encontramos las enzimas originales, TEM-1 y SHV-1 respectivamente. En otros géneros como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia* o *Pseudomonas* las β -lactamasas habituales son generalmente cefalosporinasas de origen cromosómico. Su producción puede ser constitutiva o inducible por β -lactámicos con capacidad para hidrolizar cefalosporinas de tercera generación (37). Así mismo, el grupo CTX-M está emergiendo a nivel mundial.

Tabla 1. Clasificación de las β -lactamasas.

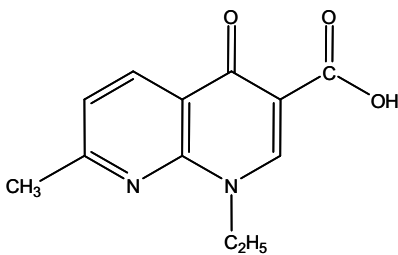
Clase molecular	Grupo funcional	Perfil de sustratos preferentes	Inhibición		Enzimas representativas
			AC	EDTA	
C	1	Penicilinas, cefalosporinas de 1a, 2a y 3a generación y monobactamas.	-	-	Cromosómicas en bacterias gramnegativas. Pueden ser constitutivas o inducibles. En plásmidos: FOX-1 a FOX-5, MIR-1, MOX-1, MOX-2, LAT-1 a LAT-4, CMY-1 a CMY-13, BUT-1, BIL-1, ABA-1, DHA-1
A	2a	Penicilinas	+	-	Penicilinasas de bacterias grampositivas, que pueden ser cromosómicas o plasmídicas.
A	2b	Penicilinas y cefalosporinas de 1a generación.	+	-	En plásmidos: TEM-1, TEM-2, SHV-1, OHIO-1 y ROB-1. En cromosoma: SHV-1 de <i>K. pneumoniae</i> .
A	2be	Penicilinas, cefalosporinas de 1a y 3a generación; monobactamas.	+	-	En plásmidos: TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a TEM-50, TEM-52 a TEM-58, TEM-60 a TEM-64, TEM-66 a TEM-72, TEM-75, TEM-79 a TEM-102, TEM-104 a TEM-132; SHV-2 a SHV-53 (excepto SHV-10); CTX-M-1 a CTX-M-33; TOHO-1, TOHO-2, UOE-1, UOE-2, SFO-1, FEC-1, VEB-1, PER-1, PER-2, GES-1, IBC-1, IBC-2, TLA-1. En cromosoma: K _{oxy} de <i>Klebsiella oxytoca</i> , KLUA-1 y KLUA-2 de <i>Kluyvera ascorbata</i> , KLUC-1 de <i>Kluyvera cryocrescens</i> . KLUG-1 de <i>Kluyvera georginana</i> .
A	2br	Penicilinas	-	-	En plásmidos: TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-78, TEM-81 a TEM-84, TEM-103 Y SHV-10.
A	2c	Penicilinas (carbenicilinas)	+	-	En plásmidos: PSE-1(CARB-2), PSE-3, PSE-4 (CARB-1), PSE-5 (CARB-7), CARB-3 a CARB-8.
A	2e	Penicilinas, cefalosporinas de 1a generación, cefuroxima.	+	-	Cefalosporinasa cromosómica inducible de <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus penneri</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , y <i>Citrobacter sedlakii</i> .
A	2f	Penicilinas, cefalosporinas de 1a, 2a y 3a generación; carbapenemas.	+	-	NMC-A y IMI-1 de <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 a SME-3 de <i>Serratia marcescens</i> y L-2 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .
B1	3a	Penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas (excepto monobactamas)	-	+	En plásmidos: IMP-1 a IMP-17, VIM-1 a VIM-10, MET-1, GES-2, KPC-1, KPC-2.
B2	3b		-	+	En cromosoma: CphA y Sfh-1 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .
B3	3a		-	+	En cromosoma. Inducible. L1 y THIN-B de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> y <i>Janthinobacterium lividum</i> .
B3	3c		-	+	En cromosoma: FEZ-1 de <i>Legionella gormanii</i> .
D	2d	Penicilinas (isoxazólicas)	+/-	-	OXA-1 a OXA-40
?	4	Penicilinas	-	-	Penicilinasa cromosómica o plasmídica de <i>Burkholderia cepacia</i> .

b) Quinolonas

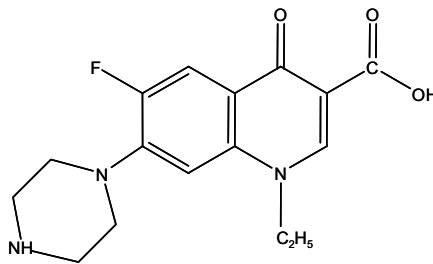
Estructura y clasificación:

Las quinolonas son antibacterianos de origen sintético. La primera quinolona descrita fue el ácido nalidíxico, agente sintetizado en el año 1962 (38). Originalmente solo eran útiles en infecciones urinarias, pero desde la incorporación de un átomo de fluor en la posición 6, y con el desarrollo del norfloxacin, agente antimicrobiano que abría la era de las quinolonas fluoradas o fluoroquinolonas, se amplió su espectro de acción. (39).

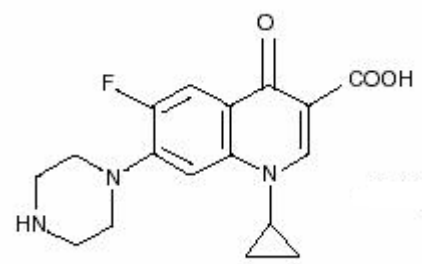
Ácido nalidíxico



Norfloxacin



Ciprofloxacin



Mecanismo de acción:

Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas tipo II (ADN-Girasa y Topoisomerasa IV). Para ejercer esta inhibición, las quinolonas interactúan a la vez con el ADN y la diana. En el caso de la ADN-Girasa se ha postulado que las quinolonas producen la existencia de horquillas de replicación abiertas, debido al anclaje de esta enzima con el ADN, que la bacteria interpreta como la presencia de lesiones en su cromóforo, activando el sistema SOS, que en el intento de reparar las lesiones acaba provocando la muerte bacteriana. (39)

Mecanismos de resistencia:

Actualmente se conocen 6 mecanismos de resistencia a estos antimicrobianos: **a)** alteraciones de sus dianas, **b)** impermeabilidad de la membrana, **c)** Expulsión activa, **d)** protección de las dianas, **e)** Nivel de expresión de las dianas y **f)** inactivación de las quinolonas (40,41).

El mecanismo de resistencia más importante a nivel clínico es la presencia de mutaciones espontáneas de los genes que codifican las topoisomerasas ADN-Girasa y Topoisomerasa IV, (42) estas dos enzimas están compuestas por dos subunidades, GyrA y GyrB para la ADN Girasa, y ParC y ParE para la Topoisomerasa IV respectivamente. Las mutaciones en GyrA y ParC son las más frecuentes. La combinación de diferentes mutaciones confiere un nivel de resistencia más elevado. (43)

a) La diana primaria de las quinolonas depende de dos factores: El tipo de microorganismo y la quinolona específica. De manera general, en los microorganismos gramnegativos la diana principal es GyrA y en grampositivos es ParC, aunque en algunas quinolonas como la clinafloxacina y la moxifloxacina, poseen la misma afinidad por estas dos enzimas. No todas las mutaciones tienen la misma importancia, “in vivo” las mutaciones más importantes están en *gyrA* y las de *parC* ocupan el segundo lugar en importancia. Las mutaciones en *gyrB* son casi ausentes y en *parE* solo en *E. coli* se han descrito in vitro (42). “In vitro” las más importantes son las que ocurren en *gyrA* y *parC*, aunque hay estudios que dan la misma relevancia a las mutaciones de *gyrB* (44).

Clásicamente, en *gyrA* la región donde se detectan las mutaciones implicadas en el desarrollo de la resistencia a quinolonas se nombra con las siglas QRDR (del inglés, *quinolones resistant determining region*), y comprende desde el codón 67 hasta el 106. No obstante, se han descrito mutaciones fuera de esta región. Ejemplo de ello son la mutación en el codon 51 de *E. coli* (45) y las mutaciones en el codón 119 de *Salmonella spp.* (46).

De todas las mutaciones descritas hasta el momento la más frecuente en microorganismos gramnegativos son las que afectan el codón 83, de hecho se pueden considerar el primer punto de mutación en estos microorganismos (42). Una de las posibles y escasas excepciones sería en las cepas de *Salmonella spp.* donde, son más frecuentes las mutaciones en el codón 87 (47).

La presencia de una sola mutación en *gyrA* se asocia con un alto nivel de resistencia al ácido nalidíxico, pero tan solo con una sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas. Es necesario el concurso de otras mutaciones en *gyrA* o en otras dianas (normalmente *parC*) para que exista una resistencia completa a fluoroquinolonas.

b) Los problemas de permeabilidad afectan desigualmente las quinolonas en función de su grado de hidrofobia. Todas las quinolonas pueden penetrar las bacterias por las porinas, pero nada más aquellas más hidrofóbicas pueden atravesar la bicapa lipídica. Usualmente los problemas de permeabilidad se asocian con una disminución en la expresión de alguna porina. En *E. coli* se ha asociado un descenso en el nivel de la porina OmpF, con un incremento de los niveles de resistencia a determinadas quinolonas (42). Este es un mecanismo de resistencia múltiple que afecta otros antibióticos no emparentados, debido a que esta porina es la puerta de entrada de diversos antimicrobianos (48).

c) En un principio se consideró la expulsión de quinolonas como un sistema complementario, sin embargo, estudios recientes han demostrado que la realidad es mucho más compleja. En la actualidad se han descrito 37 sistemas de expulsión en *E. coli* (49). De la misma manera se ha descrito en *E. coli* una mutación en el codón 83, en presencia de determinados inhibidores de bombas de expulsión, como la Phe-Arg- β -naftilamida, no puede producir resistencia al ácido nalidíxico por si misma (50).

d) En 1998 se demuestra la primera transferencia plasmídica de la resistencia a quinolonas (51). Posteriores análisis de este plásmido demostraron que portaba un gen, que denominó *qnr*, el

producto del cual interaccionaba con las dianas de las quinolonas y disminuía su afinidad por las quinolonas (52). Este gen se encuentra flanqueado por el ORF513, ORF que se ha descrito como parte de los denominados integrones complejos, lo que hace pensar que este gen se encuentra dentro de un integrón complejo de clase 1.

e) En el año 2003 se describió por primera vez un incremento de la resistencia a quinolonas mediante una disminución en los niveles de expresión de la Topoisomerasa IV. Esta disminución de la expresión se asocia con la presencia de mutaciones en el promotor del gen que hacen menguar su nivel de transcripción (53).

f) Inactivación de las quinolonas: Recientemente, se ha reportado un nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas. Inactivación enzimática de ciertas quinolonas. La variante *cr* de *aac(6)-Ib* codifica para una aminoglicósido acetiltransferasa que confiere susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina por *N*-acetilación de su grupo amino piperazinil (41).

c) Aminoglicósidos

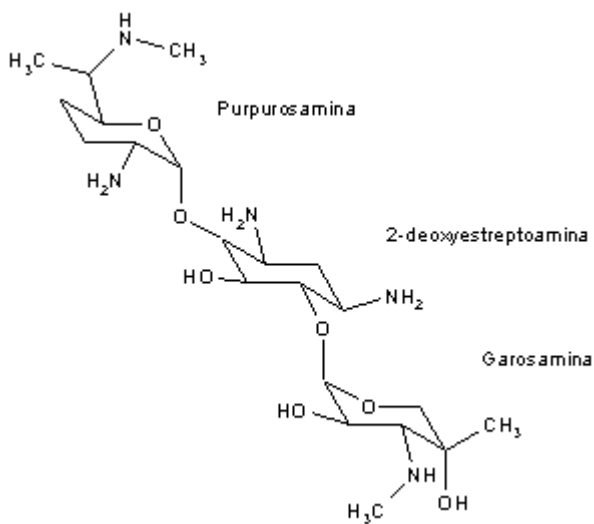
Estructura y clasificación:

El primer antibiótico aminoglicósido, la estreptomina, fue descubierto en el año 1944, y es también el primer antibiótico activo contra *Mycobacterium tuberculosis* (54). Después se introdujeron en la práctica clínica un gran número de compuestos como la neomicina, kanamicina, paromomicina, espectinomicina, gentamicina y tobramicina, todos derivados de *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Pero la toxicidad de estas moléculas, junto con la aparición de bacterias resistentes limitó su uso. Para solucionar este problema se desarrollaron nuevas moléculas semisintéticas, que se obtuvieron por modificación química de las moléculas preexistentes. Podemos mencionar como ejemplos la dibekacina y la amikacina,

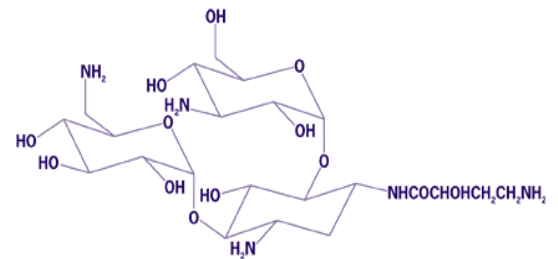
que derivan de kanamicina B y A respectivamente, o la sisomicina y las netilmicinas que derivan de la gentamicina.

Básicamente su estructura se caracteriza por poseer dos o mas aminoazúcares unidos glicosídicamente a un núcleo hexosa o aminociclitol, que se encuentra generalmente en posición central, por lo que sería más correcto denominarlos aminoglicósidos-aminociclitoles (55). Se clasifican según el aminociclitol central.

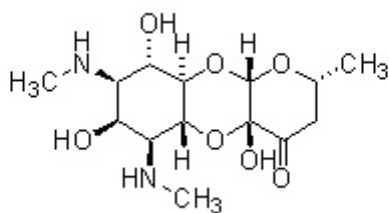
Molécula de gentamicina



Molécula de amikacina



Molécula de espectinomicina



Mecanismo de acción:

El órgano diana de este grupo de antibióticos es el ribosoma bacteriano, al cual se unen mediante un enlace covalente que es irreversible. El hecho de ser policationes a pH neutro, hace que penetren a través de la membrana mediante un mecanismo de transporte activo que ocurre en tres fases (dependientes de energía): **I)** unión de la molécula de antibiótico a los sitios aniónicos de la superficie celular (lipopolisacáridos, fosfolípidos, y proteínas en Gram-negativos y ácidos teicoicos en Gram-positivos, **II)** Fase *EDP-I*, el antibiótico atraviesa la membrana por efecto de la diferencia de potencial eléctrico, o con la ayuda de un transportador específico, **III)** Fase *EDP-II*, Aceleración de la entrada del antibiótico a través de la membrana citoplasmática, utilizando la energía de la cadena transportadora de electrones y la hidrólisis de ATP. Ya en el interior de la célula, el aminoglicósido se une a la subunidad ribosómica 30S que tiene un papel fundamental en la traducción del material genético e inhibe la síntesis de proteínas.

Mecanismos de resistencia:

Existen 4 mecanismos descritos de resistencia a los aminoglicósidos:

- a)** Alteración en la permeabilidad de la membrana: Provoca la disminución de la acumulación del antibiótico por la alteración de la permeabilidad de la membrana, disminución del transporte a través de la membrana interna o eflujo activo (56). Este mecanismo suele conferir resistencia cruzada a todos los aminoglicósidos. Mecanismo sin importancia clínica.
- b)** Mutaciones al órgano diana: mecanismo cromosómico que a veces es responsable de la resistencia a estreptomicina (57). Adquisición de mutaciones en las proteínas de la subunidad ribosómica 30S, estas disminuyen la afinidad del antibiótico por el ribosoma. Mecanismo poco frecuente en aislamientos clínicos.

c) Desactivación del antibiótico por modificación enzimática: Se producen enzimas modificadoras de aminoglicósidos dando lugar a un producto inactivo. La molécula modificada no es capaz de unirse correctamente al ribosoma, permitiendo que la bacteria sobreviva en presencia del antibiótico.

Las enzimas modificadoras de aminoglicósidos son enzimas específicas que actúan sobre los grupos amino e hidroxilo de la molécula de antibiótico, disminuyendo de esta manera el grado de unión a la fracción 30S del ribosoma. Se clasifican en N-acetiltransferasas, O-fosfotransferasas y O-nucleotidiltransferasas y, según su capacidad para modificar estos grupos (fosforilación, adenilación o acetilación) (58). La producción de estas enzimas es la manera más frecuente de resistencia a los aminoglicósidos y los genes responsables están localizados en transposones, plásmidos o bien en el cromosoma por inserción de un transposón.

a) N-acetiltransferasas (AAC): Catalizan una reacción de acetilación, en el cual un grupo acetato es transferido desde la acetilcoenzima A, hasta un grupo amino del antibiótico.

b) O-fosfotransferasas (APH): Catalizan una reacción de fosforilación, es decir, la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP hasta un grupo hidroxilo del antibiótico.

c) O-nucleotidiltransferasas (ANT): Catalizan una reacción de nucleotilidación, que no es más que la transferencia de un nucleótido monofosfato desde un nucleótido trifosfato a un grupo hidroxilo del antibiótico, a veces utilizan ATP como cofactor.

d) Metilación del rRNA 16S. Tiene su origen en los microorganismos productores de aminoglicósidos que lo utilizaban como mecanismo defensivo ante sus propios productos, e implica la metilación post-transcripcional del rRNA con la utilización del S-adenosil-metionina como cofactor.

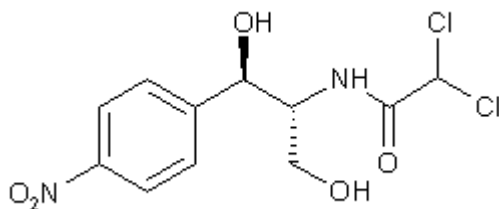
Los aminoglicósidos producen errores de lectura en la transducción e impiden la translocación (59) uniéndose a un motivo altamente conservado del rRNA 16S dando como resultado

alteraciones en la función del ribosoma. La alteración por sustitución o metilación de las bases implicadas en la unión entre el ARNr 16S y los aminoglicósidos puede producir pérdida de la afinidad por el antibiótico y resistencia al hospedador (60,61,62). En *Enterobacteriaceae* se han descrito los genes *armA* (63). En todos los casos los genes que codifican estas metilasas se encuentran localizados en plásmidos conjugativos y confieren resistencia a kanamicinas y gentamicinas.

d) Cloranfenicol

Estructura y clasificación:

El cloranfenicol es un antibiótico derivado del *Streptomyces venezuelae*, un hongo aislado por primera vez en 1947 en tierra recolectada de Venezuela (64). Este antibiótico tiene una estructura con una porción nitrobenzeno y es un derivado del ácido dicloroacético. Actualmente se produce sintéticamente.



Mecanismo de acción:

El cloranfenicol ejerce sus efectos mediante la unión reversible a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, hecho que impide la unión del aminoacil-tRNA al receptor del ribosoma y, en consecuencia, la síntesis de polipéptidos bacterianos (65). El bloqueo de la síntesis de proteínas produce un efecto bacteriostático en la mayoría de los microorganismos susceptibles. Aunque, también es bactericida frente a muchos patógenos.

Mecanismos de resistencia:

El mecanismo de resistencia más frecuente a este antibiótico es la producción de una acetiltransferasa. Es habitual que los genes responsables (*cat*) estén localizados en pequeños plásmidos con múltiples copias. La enzima acetila los dos grupos hidroxilo de la molécula en una reacción en la cuál también participa la acetilcoenzima A. Los derivados formados no tienen capacidad para unirse a la subunidad 50S del ribosoma e inhibir la peptidiltransferasa. Hay descritos diversos tipos de acetiltransferasas (5 tipos en *S. Aureus* y 3 en bacterias gramnegativas) (66,67). También existen otros mecanismos de resistencia descritos como son los sistemas de expulsión específicos de cloranfenicol y florfenicol y los transportadores de varias drogas.

Sistemas de expulsión específicos: Son genes asociados con la expulsión de cloranfenicol y florfenicol que se encuentran en una gran variedad de bacterias de importancia clínica y ambiental (68). Existen al menos 8 sistemas de expulsión específicos descritos hasta el momento, E-1 a E-8. Solo en los grupos E-3 y E-4 ha sido reportada la resistencia a ambas drogas. La resistencia a cloranfenicol por inactivación enzimática fue detectada por primera vez en 1979 en *Pseudomonas aeruginosa* (69) y más tarde en el transposón Tn1696 donde mediante secuenciación se describieron los genes *cmlA* (70,71). Los genes *cmlA* son parte de un cassette de genes. Sin embargo en contraste con otros cassettes que portan genes de resistencia, los genes *cmlA* tienen su propio promotor y su expresión es regulada de manera inducida por atenuación traslacional.

Otro número de genes llamados en la literatura como *pp-flo*, *cmlA-like*, *floSt*, *flo* o *floR*, confieren resistencia combinada a cloranfenicol y florfenicol y han sido agrupados en el grupo E-3. El primer miembro de este grupo *pp-flo* fue detectado en *P. damsela* subsp. *piscicida*,

microorganismo patógeno en peces (72). Más recientemente, se han descrito genes del grupo E-3 en un cluster cromosomal de genes multirresistentes en *Salmonella entérica* serovar Typhimurium DT 104 (73,74). Este cluster de genes de resistencia a antibióticos de aproximadamente 13 kb está incluido en una isla genómica cromosomal llamada, SGI1 (*Salmonella* Genomic Island 1) (75). El gen *floR* también ha sido descrito en plásmidos y en el cromosoma de *E. coli* (76,77,78,79).

Además de los sistemas de expulsión específicos, se han identificado un variado número de sistemas transportadores de varias drogas cuyo espectro de sustratos incluye al cloranfenicol y/o florfenicol. Estos se encuentran en menor medida que los sistemas de expulsión específicos. Un ejemplo de estos es el sistema de expulsión AcrAB-TolC que expulsa cloranfenicol y florfenicol a bajos niveles. También se ha descrito el sistema transportador de cloranfenicol MdfA en *E. coli* (80,81,82).

Otros mecanismos de resistencia tales como, O-fosforilación (83) y degradación hidrolítica de cloranfenicol a p-nitrofenilserinol (84) se han visto en la producción de cloranfenicol por parte de *S. venezuelae*. Este último parece ser un mecanismo de autodefensa ante la producción del antibiótico.

Finalmente, un nuevo gen llamado *cfi* que confiere resistencia a cloranfenicol y florfenicol (mecanismo de resistencia aún por determinar) ha sido detectado en el plásmido pSCFS1 en *Staphylococcus sciuri* (85,86).

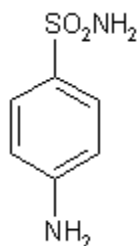
e) Sulfamidas y Trimetoprim

Estructura y clasificación:

Las sulfamidas fueron las primeras drogas eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de las infecciones bacterianas en el ser humano. Les caracteriza compartir una estructura química

similar al ácido para-amino-benzoico (PABA). La evolución en la investigación, con la aparición de nuevos agentes y el posterior desarrollo de elevada resistencia limitó su uso (87). Actualmente el cotrimoxazol ha aumentado su interés clínico. Este es una combinación a dosis fijas de sulfametoxazol con trimetoprim. El compuesto base de las sulfamidas es la sulfanilamida, cuya estructura es similar al PABA, factor requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico. Es importante el grupo amino libre en posición 4 pues se relaciona con su actividad. Las sustituciones a nivel del radical sulfonilo modifican las características farmacocinéticas, pero no la actividad antibacteriana. Las sustituciones en el grupo amino en la posición 4 dan compuestos de mejor absorción intestinal.

Molécula de sulfamida



Mecanismo de acción:

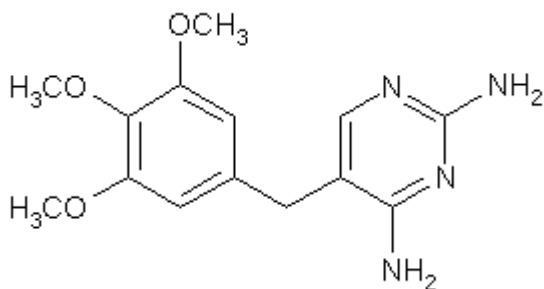
Las sulfamidas son análogos estructurales y antagonistas del PABA e impiden la utilización de este compuesto para la síntesis de ácido fólico. Este a su vez actúa en la síntesis de timina y purina. Esta acción se ejerce compitiendo por la acción de una enzima bacteriana (dihidropteroico-sintasa) responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. Las células de los mamíferos requieren ácido fólico preformado ya que no pueden sintetizarlo y por lo tanto no son atacadas (88).

Mecanismo de resistencia:

Están implicados diversos mecanismos. Disminución de la permeabilidad, expulsión activa y alteraciones enzimáticas que permiten la producción de ácido fólico por una vía alternativa, o por hiperproducción de PABA lo que neutraliza la competencia de las sulfamidas. La resistencia cromosómica puede ser debida a el gen *dhps* que codifica una dihidropteroato sintetasa resistente a la acción de las sulfamidas. También se han descrito al menos dos genes en plásmidos o integrones (*SuII* y *SuIII*) codificadores de enzimas que implican modificaciones de la sintasa y disminución de la permeabilidad (89).

Trimetoprim: No es posible referirse a las sulfamidas sin hacerlo al **trimetoprim**, ya que las primeras tienen actualmente escasas indicaciones clínicas, siendo mucho más usado el cotrimoxazol, que es una combinación de sulfamida y trimetoprim. Fue obtenido por síntesis a partir de una pirimidina.

Molécula de trimetoprim



Mecanismo de acción:

Es **trimetoprim** es un poderoso inhibidor de la dihidrofolato reductasa bacteriana, enzima que actúa en la síntesis del ácido fólico. Es un mecanismo similar al de las sulfamidas, pero actúa en

un paso posterior. El trimetoprim interfiere en la conversión del ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico, precursor de la síntesis de ácido fólico. Como el sulfametoxazol y el trimetoprim ejercen un bloqueo secuencial en la biosíntesis del ácido fólico, su combinación tiene una acción sinérgica altamente eficaz contra un amplio espectro de microorganismos.

Mecanismos de resistencia:

La resistencia se relaciona a múltiples mecanismos que pueden ser cromosómicos o plasmídicos. El más importante desde el punto de vista clínico es la presencia de plásmidos que poseen genes que codifican dihidrofolato-reductasas diferentes de la original, en estos plásmidos son comunes los integrones donde se encuentran genes *dfr* (90). También puede deberse a cepas hiperproductoras de la enzima que agotan la capacidad de inhibición del fármaco, o bien alteraciones de la permeabilidad celular.

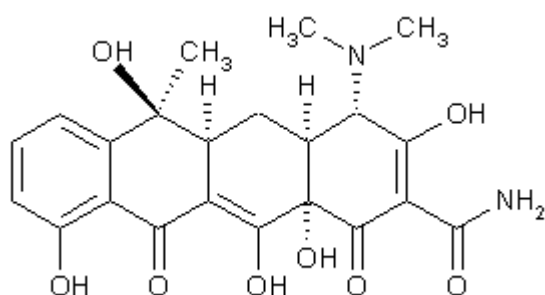
f) Tetraciclinas

Estructura y clasificación:

Los primeros miembros de esta familia fueron descubiertos a finales de los años 40 (clorotetraciclina y oxitetraciclina). Estas moléculas eran productos de *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus* respectivamente. Otras tetraciclinas se identificaron posteriormente, como moléculas naturales (tetraciclina y dimetilclorotetraciclina) o como productos semisintéticos, como metaciclina, doxiciclina y minociclina. El prematuro éxito de la tetraciclina, llevó a la síntesis de análogos que permiten una mejor solubilidad, una administración parenteral y mejor absorción oral. Estos compuestos semisintéticos son la rolitetraciclina y la limeciclina.

Las moléculas de tetraciclina están formadas por un núcleo tetracíclico (cuatro anillos bencénicos) donde se unen diferentes grupos funcionales que dan lugar a las diferentes moléculas de tetraciclinas. Una característica importante para no perder la actividad antibacteriana entre las tetraciclinas es la de mantener la linealidad del núcleo. Otra característica importante es el hecho de que estos antimicrobianos son agentes quelantes fuertes y por tanto sus propiedades antimicrobianas y farmacocinéticas se ven influenciadas por la quelación de los iones metálicos.

Molécula de tetraciclina



Mecanismo de acción:

Las tetraciclinas se unen de manera definitiva a la subunidad 30S ribosómica, provocando inhibición de la síntesis de proteínas. Para llegar a la diana tienen que penetrar la pared celular a través de los poros o por un proceso de transporte. La resistencia a tetraciclina ocurre cuando disminuye la penetración o cuando se forman proteínas que protegen al ribosoma de la unión de las tetraciclinas a su sitio blanco. La disminución en la penetración de este antibiótico dentro de la célula bacteriana puede acompañarse de un mecanismo de expulsión activo (bombas de expulsión activa) mediado por proteínas de membrana tipo Tet. Estas proteínas exportan la tetraciclina del interior celular disminuyendo la concentración de la droga en el citoplasma.

Mecanismos de resistencia:

La causa principal de resistencia a tetraciclina es debida a la adquisición por parte de las bacterias de los genes *tet*. Hasta hoy, se han caracterizado 29 genes de resistencia a tetraciclina (*tet*) y tres genes de resistencia a oxitetraciclina (*otr*). Dieciocho de los genes *tet* y uno de los genes *otr* codifican bombas de expulsión activa, y 7 de los genes *tet* y *otr* (A) codifican proteínas de protección del ribosoma. Así, los principales mecanismos de resistencia son:

- a) Bombas de expulsión activa específicas para tetraciclinas.
- b) Protección del ribosoma.
- c) Desactivación enzimática.
- d) Disminución de la acumulación de las tetraciclinas en el interior de la bacteria, debido a alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa y sistemas de expulsión activa no específicos para tetraciclinas.
- e) Alteraciones en la diana de la tetraciclina.

La mayoría de los genes de resistencia a tetraciclina están asociados a plásmidos móviles, transposones, transposones conjugativos e integrones. Estos elementos móviles han permitido que los genes de resistencia a tetraciclina hayan pasado de especie a especie y de género a género mediante conjugación (91).

Las bombas de expulsión son las más estudiadas. Los genes que codifican para estas proteínas pertenecen a la superfamilia de facilitación mayor (MFS). Estas proteínas están divididas en 6 grupos según la identidad de la secuencia de aminoácidos:

Grupo1: Tet (A), Tet (B), Tet (C), Tet, (D), Tet (G), Tet (H), Tet (Z) y probablemente Tet (I), Tet (J) y Tet (30). De este grupo el único que se ha encontrado en grampositivos es Tet (Z); las demás solo se han descrito en gramnegativos.

Grupo 2: Incluye Tet (K) y Tet (L). Se encuentran mayoritariamente en grampositivos.

Grupo 3: Incluye Otr (B) y Tcr, encontradas en *Streptomyces* sp. Son similares topológicamente al grupo 2.

Grupo 4: TetA (P) de *Clostridium* sp. El gen *tet*(P) es bastante inusual porque consiste en un gen que codifica una bomba de expulsión funcional *tetA*(P), unida a un gen que codifica una proteína de protección de ribosoma, *tetB*(P). *tetA*(P) se ha encontrado solo, pero *tetB*(P) siempre se ha encontrado unida al gen *tetA*(P).

Grupo 5: Incluye Tet (V) de *Mycobacterium smegmatis*.

Grupo 6: incluye determinantes aún sin ningún nombre en concreto, de *Corynebacterium striatum* y también incluye una proteína que se cree utiliza ATP en lugar de un gradiente de protones como fuente de energía.

La protección del ribosoma se debe a la presencia en las bacterias de genes *tet* que codifican la síntesis de unas proteínas citoplasmáticas cuya función es proteger el ribosoma frente a la acción de estos antimicrobianos. A diferencia de las bombas de expulsión confieren resistencia a tetraciclina, minociclina y doxiciclina, por tanto confieren un mayor espectro de resistencia que las bombas de expulsión específicas para estos antimicrobianos. En este grupo se han descrito 9 proteínas: Tet (M), Tet (O), Tet (P), Tet (Q), Tet (S), Tet (T), Tet (W), Otr (A) y otra que aún no se le ha asignado nombre específico (91).

La desactivación enzimática, está inducida por el gen *tet*(X), es el único ejemplo de resistencia a tetraciclina a causa de una alteración enzimática del antibiótico. No tiene importancia clínica, debido a que su actividad solo se ha demostrado *in vitro* (91).

Disminución de la acumulación: Las bacterias poseen de manera innata proteínas codificadas por el cromosoma que transportan moléculas dentro y fuera de la célula. Estas proteínas se dividen en diferentes grupos, en los cuáles se incluye las MFS, la familia RND (*resistance*

nodulation cell division), la pequeña familia de resistencia a múltiples antibióticos (SMR), que codifica bombas de expulsión activa que dependen del flujo de protones, con un mecanismo de entrada y salida de protones, y la familia de transportadores de unión a ATP (ABC). Algunas de estas bombas de expulsión activa confieren resistencia a las tetraciclinas. Un gran número de bombas de expulsión activa tienen la tetraciclina como sustrato. Estas bombas son diferentes a las de la familia MFS, ya que se encuentran principalmente en bacterias gramnegativas y están involucradas a expulsar ligandos (tanto antibióticos, como iones metálicos tóxicos) fuera de la célula. Además se asocian a una proteína que actúa como ligando y a un canal de membrana externa.

Alteraciones en la diana. Recientemente, en 15 cepas clínicas resistentes a tetraciclina de *Propionibacterium cutania*, se encontró que en lugar de una guanina en la posición 1058 del gen del rRNA 16S había una citosina. Este cambio se asocia con el aumento de la resistencia a este antibiótico, aunque no está del todo clara su repercusión clínica (92). Lo que si es importante es la región donde ocurre la mutación debido a que interviene en la terminación de la cadena peptídica y garantiza un buen resultado en la traducción. En este punto se han descrito mutaciones en *Helicobacter pylori* (93).

2) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la actualidad los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* constituyen uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis aguda y diarrea del viajero. Estos patógenos forman un grupo muy heterogéneo con diferentes características fenotípicas y genotípicas, donde una de estas características y a la postre la más importante es la elevada resistencia antimicrobiana, dada principalmente por la transferencia horizontal de genes de resistencia. Esta característica indudablemente representa un problema para la salud pública mundial, que reafirma la necesidad de mantener la vigilancia de estos microorganismos, para obtener suficiente información de los niveles de resistencia y de los mecanismos moleculares de resistencia, y así poder desarrollar mejores tratamientos y estrategias para prevenir y detener su diseminación. Si bien en muchas ocasiones las enteritis no necesitan tratamiento antibiótico, en nuestro hospital aproximadamente un 50% de los pacientes con DV requiere tratamiento lo que hace necesario conocer la susceptibilidad antimicrobiana de estas cepas. Por todo lo anterior expuesto, los objetivos de nuestro trabajo fueron los siguientes:

Objetivo general

Investigar las bases moleculares de los mecanismos de resistencia a diferentes agentes antimicrobianos en cepas de *Salmonella spp.*

Objetivos específicos

- Analizar la evolución de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* causantes de diarrea del viajero y caracterizar los mecanismos de resistencia a diferentes agentes antimicrobianos presentes en estas cepas.

- Determinar la presencia de integrones Clase 1 (elementos que tienen la función de integrar o movilizar genes de resistencia a antibióticos) así como, los genes de resistencia que portan, en cepas de *Salmonella* causantes de diarrea del viajero.
- Caracterizar el mecanismo de resistencia que provoca susceptibilidad disminuida a gentamicina en un aislamiento clínico de *Salmonella* Haifa causante de diarrea del viajero.
- Determinar la epidemiología molecular, susceptibilidad antimicrobiana, y los mecanismos de resistencia de cepas de *Salmonella spp.* causantes de gastroenteritis aguda, aisladas en diferentes provincias de Cuba.

3.1. ARTICULO 1

Mecanismos de resistencia a varios agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella* causante de diarrea del viajero.

En este artículo se analizó la evolución de la resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Salmonella* causantes de diarrea del viajero y sus mecanismos de resistencia frente a diversos agentes antimicrobianos probados.

Un total de 62 cepas de *Salmonella* fueron aisladas de muestras de pacientes con diarrea del viajero en el período comprendido entre 1995-2002. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana frente a 12 antimicrobianos y se estudiaron los mecanismos moleculares de resistencia. Se encontraron altos niveles de resistencia frente a tetraciclina, ampicilina (21 y 19%, respectivamente), y ácido nalidíxico (16%), que fue detectada principalmente a partir del año 2000. Los mecanismos moleculares de resistencia fueron analizados en 16 aislamientos. En los aislamientos que se detectó resistencia a ampicilina se identificaron tres genes que codificaban para β -lactamasas: *oxa-1*, *tem-like* y *carb-2*. La resistencia a tetraciclina estuvo relacionada principalmente a *tetA* (5 casos), y *tetB* y *tetG* (un caso cada una). La resistencia al cloranfenicol estuvo relacionada con la presencia de los genes *floR*, *cmlA* y la actividad cloranfenicol acetil transferasa. En las cepas resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol se detectaron diferentes genes que codificaban para dihidrofolato reductasas (*dfrA1*, *dfrA2*, *dfrA14* y *dfrA17*). La resistencia al ácido nalidíxico estuvo relacionada con la presencia de mutaciones en los codones 83 y 87 del gen *gyrA*. El fomento de la vigilancia de *Salmonella spp.* causantes de diarrea del viajero es necesaria para detectar las tendencias en su resistencia frente a los agentes antimicrobianos, como mostramos en nuestro estudio con el ácido nalidíxico. Además, tales estudios deben ir dirigidos a mejorar el tratamiento y las estrategias para prevenir y limitar su diseminación.

Mechanism of Resistance to Several Antimicrobial Agents in *Salmonella* Clinical Isolates Causing Traveler's Diarrhea

Roberto Cabrera,^{1,2,3} Joaquín Ruiz,³ Francesc Marco,¹ Inés Oliveira,³ Margarita Arroyo,⁴
Ana Aladueña,⁴ Miguel A. Usera,⁴ M. Teresa Jiménez De Anta,¹
Joaquín Gascón,³ and Jordi Vila^{1*}

Servicio de Microbiología, IDIBAPS, Hospital Clínic,¹ and Centro de Salud Internacional, IDIBAPS, Universidad de Barcelona, Hospital Clínic,³ Barcelona, and Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid,⁴ Spain, and Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí," Havana, Cuba²

Received 24 November 2003/Returned for modification 1 March 2004/Accepted 26 June 2004

The evolution of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates causing traveler's diarrhea (TD) and their mechanisms of resistance to several antimicrobial agents were analyzed. From 1995 to 2002, a total of 62 *Salmonella* strains were isolated from stools of patients with TD. The antimicrobial susceptibility to 12 antibiotics was determined, and the molecular mechanisms of resistance to several of them were detected as well. The highest levels of resistance were found against tetracycline and ampicillin (21 and 19%, respectively), followed by resistance to nalidixic acid (16%), which was mainly detected from 2000 onward. Molecular mechanisms of resistance were analyzed in 16 isolates. In these isolates, which were resistant to ampicillin, two genes encoding β -lactamases were detected: *oxa-1* (one isolate) and *tem*-like (seven isolates [in one strain concomitantly with a *carb-2*]). Resistance to tetracycline was mainly related to *tetA* (five cases) and to *tetB* and *tetG* (one case each). Resistance to chloramphenicol was related to the presence of the *floR* and *cmlA* genes and to chloramphenicol acetyltransferase activity in one case each. Different genes encoding dihydrofolate-reductases (*dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA14*, and *dfrA17*) were detected in trimethoprim-resistant isolates. Resistance to nalidixic acid was related to the presence of mutations in the amino acid codons 83 or 87 of the *gyrA* gene. Further surveillance of the *Salmonella* spp. causing TD is needed to detect trends in their resistance to antimicrobial agents, as we have shown in our study with nalidixic acid. Moreover, such studies will lead to better treatment and strategies to prevent and limit their spread.

Traveler's diarrhea (TD) is the most frequent infection acquired by travelers to developing countries, affecting 20 to 50% of the 35 million travelers from industrialized countries each year. The most important risk factors are the destination of the traveler, host-associated factors, and exposure to contaminated food and water (19). Farm animals often carry salmonellas, affecting meat, dairy products and eggs. Thus, salmonella is one of the main etiologic agents causing TD (7, 19, 36).

Salmonella usually produces a self-limited illness, although the duration or the severity of the symptoms may require antibiotic treatment. *Salmonella* spp. display high natural susceptibility levels to the most commonly used antibacterial agents (34). However, the occurrences of isolated *Salmonella* strains showing resistance to one or more antibacterial agent have steadily increased, probably due to continuous antibiotic pressure (3, 6, 18, 27, 35). This is an important public health problem that may be related to therapeutic failure (43).

This problem is especially relevant in developing areas, where the lack of economic resources does not allow a wide antibacterial armamentarium. Moreover, in some of these areas, both the social situation and the presence of other basal illnesses, such as malaria, favor the acquisition of systemic *Salmonella* infections (9). To date, only a few studies have extensively analyzed the levels of resistance to antimicrobial

agents in *Salmonella* spp. isolated in developing areas (9, 15, 16, 21, 31). Moreover, none of them have analyzed in depth the mechanisms of resistance underlying the resistant phenotypes.

Analysis of bacterial infections in international travelers is an indirect source of information about these developing countries, providing information on both the characteristics of these particular infections and the current situation in some less-developed areas.

Thus, resistance to some antibiotics, such as β -lactam, tetracycline, chloramphenicol, or trimethoprim-sulfamethoxazole is being reported with increasing frequency (3, 12). Moreover, the development of quinolone resistance has been described not only in some clones of the widespread *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104 (8) but also in some *Salmonella* strains isolated from travelers returning from India and other areas due to the introduction of nalidixic acid for the treatment of some infections (4, 12).

The aim of our study was to analyze the evolution of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates causing TD and to characterize the mechanisms of resistance to several antimicrobial agents.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. From 1995 to 2002, a total of 2,216 travelers with TD presented at the Tropical Medicine Unit; feces samples were processed at the laboratory of clinical microbiology of the Hospital Clínic, Barcelona, Spain. In all cases, diarrhea commenced during the trip or no more than 3 days after return. Diarrheagenic pathogens were isolated and identified by conventional methods (20). All patients filled out a clinical and epidemiological protocol form.

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Hospital Clínic de Barcelona, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-2275522. Fax: 34-93-2279372. E-mail: vila@medicina.ub.es.

TABLE 1. Sequences of primers for amplification

Antibiotic	Gene	Primer sequence	Amplicon size (bp)	Annealing temp (°C)	Source or reference
Nalidixic acid	<i>gyrA</i>	5'-AAATCTGCCCGTGTCTGGT-3'	343	55	30
		5'-GCCATACCTACG GCGATACC-3'			
Tetracycline	<i>tetA</i>	5'-GATATTCTGAGCACTGTCTGC-3'	950	55	10
	<i>tetB</i>	5'-CTGCCTGGACAACATTGCTT-3'	600	55	26
	<i>tetG</i>	5'-TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG-3'			
		5'-GTAATGGGCAATAACACCG-3'	500	55	26
Trimethoprim	<i>dfrA1</i>	5'-GTGAAACTATCACTAATGG-3'	474	55	25
		5'-TTAACCCCTTTGCCAGATTT-3'	393	60	25
	<i>dfrA14</i>	5'-GAGCAGCTICTITTTAAAAGC-3'			
		5'-TTAGCCCTTTIICCAATTTT-3'	319	60	25
	<i>dfrA12</i>	5'-GGTSGCAGAAAGATTTTCGC-3'	474	55	25
		5'-TGGGAAGAAGGCGTCACCTC-3'	141	60	25
	<i>dfrA7</i>	5'-TTGAAAATTTTCATTGATTG-3'			
	<i>dfrB</i>	5'-TTAGCCTTTTTCCAAATCT-3'			
		5'-GATCACGTGCGCAAGAAATC-3'			
		5'-AAGCGCAGCCACAGGATAAAT-3'			
Chloramphenicol	<i>floR</i>	5'-CACGTTGAGCCTCTATAT-3'	868	55	26
		5'-ATGCAGAAGTAGAACGCG-3'	435	55	This study
	<i>cmlA</i>	5'-TGTCATTTACGGCATACTCG-3'			
		5'-ATCAGGCATCCCATTCCCAT-3'			
Ampicillin	<i>tem</i>	5'-TTGGGTGCACGAGTGGGTTA-3'	503	55	6
		5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3'	586	55	6
	<i>carb</i>	5'-AATGGCAATCAGCGCTTCCC-3'			
		5'-GGGGCTTGATGCTCACTCCA-3'	598	55	6
	<i>oxa-1-like</i>	5'-ACCAGATTCAACTTTCAA-3'	841	55	This study
	<i>shv</i>	5'-TCTTGGCTTTATGCTTG-3'			
		5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3'			
		5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'			

Serotyping and phage typing. Serotyping was performed with somatic and flagella antiserum. The flagellum phase was determined by the inversion of phase method as described by Kauffman and White and according to the recommendations of Edward and Ewing (20). We also determined the phage types of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, Hadar, and Virchow (20).

Antimicrobial susceptibility testing. The antimicrobial susceptibility test to 12 antimicrobial agents: ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, nalidixic acid, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, gentamicin, amikacin, imipenem, norfloxacin, ciprofloxacin, and ceftazidime were performed by using the Kirby-Bauer method (2). Interpretation of results was performed according to NCCLS guidelines.

The MICs of ampicillin, chloramphenicol, nalidixic acid, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin, and amoxicillin-clavulanic acid to the strains showing resistance was also determined by the agar dilution method according to NCCLS guidelines. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as controls (23).

Detection of the mechanism of resistance. To determine the quinolone resistance mechanisms, mutations in the *gyrA* and *parC* genes were detected by PCR with the primers and conditions presented in Table 1. The presence of the *cmlA* and *floR* genes associated with chloramphenicol resistance was determined by PCR (Table 1) and electrophoresis in 2% agarose gels. A previously described colorimetric assay was performed to determine the presence of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity (6, 11). The detection of genes encoding β -lactamases (*tem*-like, *carb*-like, *shv*-like, and *oxa-1*-like (24)) was carried out by PCR (Table 1). The PCR products were detected by electrophoresis in 2% agarose gels. To detect the mechanism of tetracycline resistance, the presence of *tetA*, *tetB*, and *tetG* genes was determined by PCR and electrophoresis in 2% agarose gels (Table 1) (10, 11, 26). To determine the mechanism of trimethoprim resistance, the presence of dihydrofolate reductases was detected by PCR with ge-

neric primers (Table 1), and posterior restriction fragment length polymorphism with the appropriate restriction enzyme as described previously (25).

DNA sequencing of the PCR products. The purified PCR products visualized in gels were processed for DNA sequencing and analyzed in an automatic DNA sequencer (ABI 377; Perkin-Elmer, Emeryville, Calif.) by using the BigDye terminator cycle sequencing kit (v3.1; Perkin-Elmer).

RESULTS AND DISCUSSION

From 1995 to 2002, 2,216 patients with TD were treated in the Tropical Medicine Unit of our hospital. *Salmonella* spp. were identified in 62 patients (3.8%) in as described in previous studies developed for Spanish travelers (37), showing that the relevance of this pathogen remains unaltered as a cause of TD. The distribution of the *Salmonella* spp. clinical isolates according to serovar and geographical origin is shown in Table 2. Overall, 20 different serovars were identified, with serovar Enteritidis being the most prevalent, followed by serovar Typhimurium. Similar results were reported by Hakonen et al. (12) for *Salmonella* spp. isolated from travelers to Southeast Asia. The remaining isolates belonged to a wide variety of serovars (Table 2).

According to the geographical origins, 16 isolates (25.8%) were from Western Africa and 8 (12.9%) were from the Indian subcontinent. Meanwhile, other geographical areas showed <10% of the total isolates (Table 2), and six isolates were of

TABLE 2. Distribution of *Salmonella* clinical isolates according to serovar and geographical origin

No. of strains	Serovar	Phage type	Country(ies) visited (<i>n</i>) ^b
4	Enteritidis	4	Senegal, Ecuador, Thailand, ND
10	Enteritidis	1	Kenya, Ecuador, Australia, India, Mexico/Guatemala, Peru, Morocco, ND (3)
1	Enteritidis	20	Tanzania
4	Enteritidis		Turkey, Nepal, Dominican Republic, SEA
5	Typhimurium		Maldives, Mali, Cuba, India/Nepal, Gambia
1	Typhimurium	104B	Ivory Coast
1	Braenderup		Nicaragua
1	Tennessee		Egypt
1	Newport		Mexico/El Salvador
1	London		ND
1	Vinohrady		Mali
1	Paratyphi A		India
1	Carno		Ivory Coast
1	Typhi		Philippines
1	Kiambu		Mali/Burkina-Faso
1	Muenchen		Cameroon
1	Hadar	NRP ^a	Bolivia
1	Agona		India
1	Infantis		Equatorial Guinea
2	Kentucky		Mali/Burkina-Faso, Senegal
1	Cholerasuis		Mexico
1	Haifa		Egypt
1	Wangata		Equatorial Guinea
1	Lexington		Uganda
1	Montevideo		Senegal
1	Goldcoast		Senegal
1	Risseu		Mali/Burkina-Faso
1	Virchow	31	India
14	<i>Salmonella</i> spp.		India (3), Mali (2), SEA, Morocco, South Africa, Peru, Cuba, Vietnam, Nepal, Indonesia (2)

^a NPR, nonrecognized pattern.

^b ND, not determined; SEA, Southeast Asia. *n* = number of isolates.

unknown origin. No relationship was observed between the serotypes found and the geographical origin of the samples.

In some of these patients other microorganisms, such as *Shigella* sp. (one case), *Campylobacter* spp. (two cases), *Aeromonas* sp. (one case), diarrheagenic *Escherichia coli* (four cases), and *Giardia lamblia* (one case) were isolated.

Twenty-eight strains showed resistance to at least one of the antibacterial agents analyzed. Seven of these strains showed resistance to three or more unrelated antibacterial agents being considered as multiresistant strains. The antimicrobial resistance observed mainly affected five antibacterial agents: ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, tetracycline, and nalidixic acid. Similar results have been observed in analyses of clinical isolates in developing areas (9, 16, 21, 31, 39). The highest levels of resistance, 21 and 19%, were found against tetracycline and ampicillin, respectively, followed by nalidixic acid (16%). Resistance to the other antimicrobial agents tested was <10% (Table 3). The incidence of nalidixic acid-resistant *Salmonella* isolates causing TD has been steadily rising since 2000 (Fig. 1) and has mainly been observed in isolates belonging to serotype Enteritidis. The wide use of quinolones such as nalidixic acid and ciprofloxacin for the treatment of infections in regions such as India and Central America has been correlated with the increase in resistance to these antimicrobial agents (4, 39, 40). In our study, two nalidixic acid-resistant strains were isolated from feces of travelers to India, and two strains were from Central America.

The remaining nalidixic acid-resistant isolates were from Egypt, Morocco, Peru, and Kenya, with two strains of unknown origin. These results suggest that quinolone resistance is not limited to aforementioned areas but is widespread.

Antibiotic treatment (mainly ciprofloxacin) was required in 73% of the patients. In all cases the treatment was done empirically prior to obtaining laboratory results. The analysis of the outcome of these patients showed that treatment with

TABLE 3. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* clinical isolates^a

Antimicrobial agent	Susceptible		Intermediate		Resistant	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Ampicillin	49	79	1	2	12	19
Amoxicillin-clavulanic acid	57	92	5	8	0	0
Imipenem	62	100	0	0	0	0
Ceftazidime	62	100	0	0	0	0
Norfloxacin	62	100	0	0	0	0
Nalidixic acid	51	82	1	2	10	16
Ciprofloxacin	62	100	0	0	0	0
Gentamicin	59	95	0	0	3	5
Amikacin	62	100	0	0	0	0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	56	91	0	0	6	9
Tetracycline	47	76	2	3	13	21
Chloramphenicol	57	92	0	0	5	8

^a *n*, number of strains.

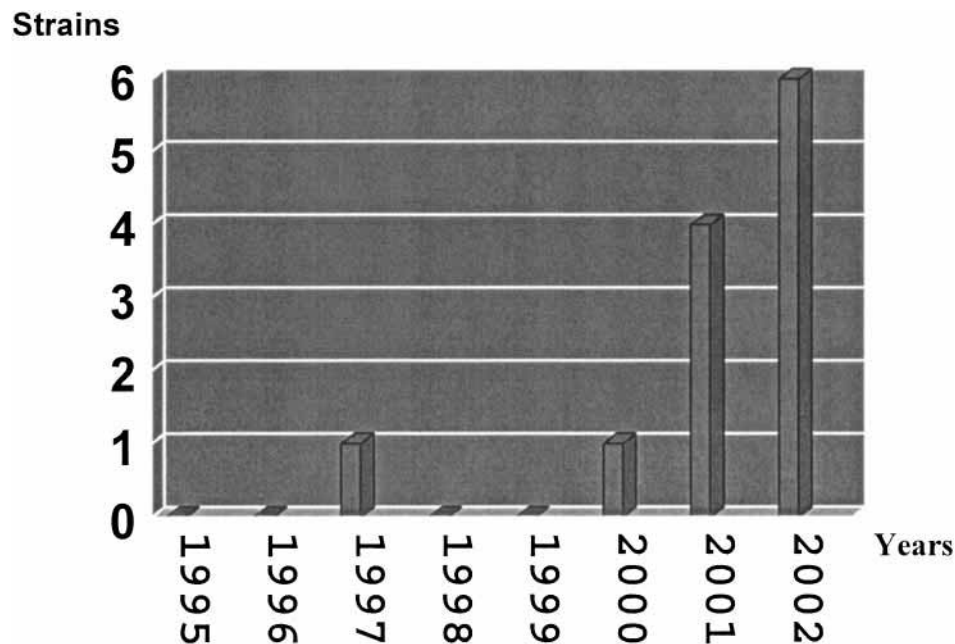


FIG. 1. Evolution of nalidixic acid resistance in *Salmonella* spp. causing TD from 1995 to 2002. The resistance to nalidixic acid represented in this figure was established according to the number of strains isolated in each year.

ciprofloxacin was effective in all patients with nalidixic acid-resistant isolates except one, in whom a change in the treatment to amoxicillin-clavulanic acid was required.

Reports of different microorganisms, such as *Shigella flexneri* or *Salmonella enterica* serovar Typhi, showed high levels of therapeutic failure in treatments with fluoroquinolones in patients infected with isolates showing nalidixic acid resistance but fluoroquinolone susceptibility (17, 41). Thus, although fluoroquinolones might be used as treatment in diarrhea by nalidixic acid-resistant *Salmonella* strains, this option should be carefully chosen, as shown by the therapeutic failure reported in the present study.

Only 44 of the 62 *Salmonella* strains were able to grow from the frozen stock, and these strains were therefore serotyped again and phage typed in a reference laboratory (Table 2). Of these 44 isolates, 16 isolates showed resistance to any antibiotic and were further investigated to determine the mechanisms of antibacterial resistance.

Single amino acid substitutions in both positions 83 and 87 of GyrA have been described as a cause of nalidixic acid resistance in *Salmonella* spp., whereas substitutions at both positions plus substitutions in ParC have been detected in fluoroquinolone-resistant isolates (1, 11, 13, 22, 30, 32). In the present study 9 of these 16 isolates showed resistance to nali-

TABLE 4. Mechanisms of resistance of *Salmonella* spp. causing TD

Strain	Serovar	Origin	Resistance ^b (MIC [μ g/ml])	Mechanism of resistance				
				Q (GyrA)	CHL	AMP	TET	SXT
30922	Virchow	India	NAL (\geq 256), SXT (\geq 32)	Tyr-87				<i>dfrA14</i>
62155	Enteritidis	Mexico	AMP (\geq 256), NAL (\geq 256)	Tyr-87		<i>tem</i>		
57360	Haifa	Egypt	TET (\geq 256), NAL (\geq 256)	Tyr-83			<i>tetA</i>	
37758	Enteritidis	Morocco	NAL (\geq 256)	Tyr-87				
13472	Enteritidis	Peru	NAL (\geq 256)	Tyr-87				
14089	Enteritidis	ND ^a	NAL (\geq 256)	Tyr-87				
49297	Enteritidis	ND	NAL (\geq 256)	Tyr-87				
33568	Enteritidis	India	NAL (\geq 256)	Tyr-87				
86 DV	Enteritidis	Kenya	NAL (\geq 256)	Tyr-87				
36452	Typhimurium	Ivory Coast	TET (128), AMP (\geq 256)			<i>tem</i>	<i>tetA</i>	
21340	Typhimurium	Gambia	TET (\geq 256), AMP (\geq 256), SXT (\geq 32), CHL (128)		<i>cmlA</i>	<i>tem</i>	<i>tetA</i>	<i>dfrA12</i>
27976	Goldcoast	Senegal	TET (128), AMP (\geq 256), SXT (\geq 32), CHL (32)			<i>tem</i>	<i>tetA</i>	<i>dfrA17</i>
29839	Risseu	Mali	TET (128), AMP (\geq 256)			<i>tem</i>	<i>tetA</i>	
36498	Paratyphi	India	TET (\geq 258), AMP (\geq 256), SXT (\geq 32), CHL (\geq 128)		<i>cat</i>	<i>oxa-1</i>	<i>tetB</i>	<i>dfrA1</i>
13805	Kiambu	Mali	TET (64), AMP (\geq 256), CHL (\geq 256)	<i>floR</i>		<i>tem, carb</i>	<i>tetG</i>	
15095	Hadar	Bolivia	TET (128), AMP (\geq 256)			<i>tem</i>	<i>tetA</i>	

^a ND, not determined.

^b NAL, nalidixic acid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; AMP, ampicillin; TET, tetracycline; CHL, chloramphenicol; Q, quinolones.

dixic acid and decreased susceptibility to ciprofloxacin and norfloxacin. Seven were identified as serovar Enteritidis; the rest were identified as serovar Virchow and serovar Haifa. Eight of these nine nalidixic-resistant *Salmonella* strains, including all of the serovar Enteritidis strains, presented a mutation in codon 87 of the *gyrA* gene, resulting in the amino acid change Asp to Tyr, whereas the other strain (serovar Haifa) presented a mutation in amino acid codon 83 (Ser to Tyr). No mutation was found in the *parC* gene.

Eight isolates were resistant to ampicillin. This resistance was associated with the presence of β -lactamases. The *oxa-1* gene was detected in one strain, whereas a *tem*-like gene was found in the other seven strains, in one case concomitantly with a *carb-2* (*pse-1*) gene. This result is in agreement with previously developed studies (5, 6, 29, 42). Although in some of these studies, such as that performed by Roy et al. (29), the percentage of TEM-like β -lactamase-producing strains was higher than in ours, this may be explained by the diversity of the geographical origin of the strains collected in our study. In some of the strains producing a TEM-like β -lactamase an intermediate level of susceptibility to amoxicillin plus clavulanic acid was found. It has been shown that an overproduction of these enzymes may result in decreased susceptibility or resistance to amoxicillin plus clavulanic acid, which may explain the above-mentioned situation (33).

The main mechanism of resistance to trimethoprim is the presence of integron-borne dihydrofolate reductases. Only four isolates resistant to trimethoprim were studied, showing the presence of four different dihydrofolate reductase genes (*dfiA1*, *dfiA12*, *dfiA14*, and *dfiA17*) (Table 4). Despite the greater use of cotrimoxazole in developing countries, in our study only four strains showed resistance to this antimicrobial agent. This finding is in contrast to the high percentages of trimethoprim resistance in *Shigella* or diarrheagenic *E. coli* isolates causing TD (38, 39, 40). To our knowledge, this is the first time that *dfiA17* has been found in a *Salmonella* strain of African origin.

Resistance to chloramphenicol was determined in four cases and was associated with the presence of *floR* and *cmlA* genes and CAT activity in three different cases. These cases showed chloramphenicol MICs higher than 128 μ g/ml, whereas no specific mechanism was identified in the remaining isolate (chloramphenicol MIC of 32 μ g/ml) (Table 4).

Eight isolates were resistant to tetracycline; the *tetA* gene was detected in six cases and the *tetB* and *tetG* genes were detected in one case each (Table 4). The intestinal tract is a suitable habitat for the acquisition of the *tetA* and *tetB* genes by horizontal gene transfer, since these tetracycline determinants are common in *Enterobacteriaceae* (10, 14, 28). In a recent study developed in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* of different geographical origins, the *tetB* gene was more prevalent than the *tetA* gene (14). Our results show that the most prevalent mechanism of resistance to tetracycline among the strains we tested was *tetA*. This difference may be explained by the fact that *Shigella* and *Salmonella* spp. may have different ecological niches.

In summary, our results show the level of antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. from different geographical origins and although, overall, this resistance is lower than that presented by *Shigella* spp. or diarrheagenic *Escherichia coli*, the

increasing resistance to nalidixic acid in compared to the above-mentioned microorganisms is of special concern and may result in a loss of therapeutic usefulness of fluoroquinolones. Moreover, high heterogeneity of the mechanisms of resistance to ampicillin, trimethoprim, and tetracycline was observed. Surveillance of the *Salmonella* spp. causing TD is necessary in order to have current information on the resistance levels and the mechanism of resistance present in these strains, which will in turn help to provide better treatment and to develop strategies to prevent and limit their spread.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grant FIS02/0353 from the Spanish Ministry of Health and grant 2002 SGR00121 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya of Spain. R.C. has a fellowship from Fundació Carolina and BBVA (Spain). J.R. and I.O. have RICET fellowships.

REFERENCES

- Baucher, S., H. Imberechts, E. Chlaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2002. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT 204. *Microb. Drug Resist.* 8:285–289.
- Bauer, A., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Truck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493–496.
- Brisabois, A., I. Cazin, J. Breuil, and E. Collatz. 1997. Vigilancia de la resistencia a antibióticos de *Salmonella*. *Eurosurv. Month* 2:19–20.
- Brown, J. C., C. J. Thomson, and S. G. Amyes. 1996. Mutation of the *gyrA* gene of clinical isolates of *Salmonella typhimurium* and three other *Salmonella* species leading to decreased susceptibilities to 4-quinolone drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:351–356.
- Bush, K. 2001. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32:1085–1089.
- Gallardo, F., J. Ruiz, F. Marco, K. J. Towner, and J. Vila. 1999. Increase in incidence to 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.* 48:367–374.
- Gascón, J., J. Vila, M. E. Walls, J. Ruiz, J. Vidal, M. Corachan, G. Prats, and M. T. Jiménez de Anta. 1993. Etiology of traveller's diarrhea in Spanish travellers to developing countries. *Eur. J. Epidemiol.* 9:217–223.
- Giraud, E., A. Cloeckaert, S. Baucher, C. Mouline, and E. Chlaslus-Dancla. 2003. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Med. Microbiol.* 52:697–703.
- Graham, S. M., A. L. Walsh, E. M. Molyneux, A. J. Phiri, and M. E. Molineux. 2000. Clinical presentation of non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia in Malawian children. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:310–314.
- Guardabassi, L., L. Dijkshoorn, J. M. Collard, and J. E. Olsen Dalsgaard. 2000. Distribution and in vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J. Med. Microbiol.* 49:929–936.
- Guerra, B., B. Malorny, A. Schroeter, and R. Helmuth. 2003. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2059.
- Hakanen, A., P. Kotilainen, P. Huovinen, H. Helenius, and A. Siitonen. 2001. Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 7:996–1003.
- Hansen, H., and P. Heisig. 2003. Topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant salmonellae selected in vitro. *Microb. Drug Resist.* 9:25–32.
- Hartman, A. B., I. I. Essiet, D. W. Isenbarger, and L. E. Linder. 2003. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. an enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of Tet (A)-1. *J. Clin. Microbiol.* 41:1023–1032.
- Hoge, C. W., J. M. Gambel, A. Srijan, C. Pitarangsi, and P. Echeverría. 1998. Trends in antimicrobial resistance among diarrheal pathogens isolated in Thailand over 15 years. *Clin. Infect. Dis.* 26:341–345.
- Isenbarger, D. W., C. W. Hoge, A. Srijan, C. Pitarangsi, N. Vithayasai, L. Bodhidatta, K. W. Hickey, and P. Dac Cam. 2002. Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996–1999. *Emerg. Infect. Dis.* 8:175–180.
- Khan, W. A., C. Seas, U. Dhar, M. A. Salam, and M. L. Bennis. 1997. Treatment of shigellosis. V. Comparison of azithromycin and ciprofloxacin. *Ann. Intern. Med.* 126:697–703.

18. Lawson, A. J., M. U. Dassama, L. R. Ward, and E. J. Threlfall. 2000. Multiply resistant (MR) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 12 and DT 120: a case of MR DT 104 in disguise? *Emerg. Infect. Dis.* **8**:434–436.
19. Moreira Lima, A. A. 2001. Tropical diarrhoea: new developments in traveller's diarrhoea. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**:547–552.
20. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). 1995. *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington, D.C.
21. Mwansa, J., K. Mutela, I. Zulu, B. Amadi, and P. Kelly. 2002. Antimicrobial sensitivity in enterobacteria from AIDS patients, Zambia. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:92–93.
22. Nakaya, H., A. Yasuhara, K. Yoshimura, Y. Oshihoi, H. Izumiya, and H. Watanabe. 2003. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutation in both *gyrA* and *parC*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:255–257.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9th ed. Approved standard M100–S13. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
24. Navia, M. M., L. Capitano, J. Ruiz, M. Vargas, H. Urassa, D. Schelleberg, J. Gascón, and J. Vila. 1999. Typing and characterization of mechanisms of resistance *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3113–3117.
25. Navia, M. M., J. Ruiz, J. Sánchez Céspedes, and J. Vila. 2003. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**:295–298.
26. Ng, L.-K., M. R. Mulvey, I. Martin, G. A. Peters, and W. Johnson. 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:3018–3021.
27. Orman, Be., S. A. Piñeiro, S. Arduino, M. Galas, R. Melano, M. I. Caffer, D. O. Sordelli, and D. Centrón. 2002. Evolution of multiresistance in no typhoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3963–3970.
28. Roberts, M. C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microb. Rev.* **19**:1–24.
29. Roy, C., A. Foz, C. Segura, M. Tirado, C. Fuster, and R. Reig. 1983. Plasmid-determined β -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **12**:507–510.
30. Ruiz, J., D. Castro, P. Goñi, J. A. Santamaría, J. J. Borrego, and J. Vila. 1997. Analysis of the mechanism of quinolone-resistance in nalidixic acid-resistance clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium. *J. Med. Microbiol.* **46**:623–628.
31. Shapiro, R. L., L. Kumar, P. Phillips-Howard, J. G. Wells, P. Adcock, J. Brooks, M. L. Ackers, J. B. Osheng, E. Mintz, S. Wahlquist, P. Waiyaki, and L. Slutsker. 2001. Antimicrobial resistance bacterial diarrhea in rural Western Kenya. *J. Infect. Dis.* **183**:1701–1704.
32. Soto, S. M., J. Ruiz, M. C. Mendoza, and J. Vila. 2003. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**:537–540.
33. Stapleton, P., P. Wu, A. King, K. Shanon, G. French, and I. Phillips. 1995. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2478–2483.
34. Stock, I., and B. Wiedemann. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* strains. *Int. J. Antimicrob. Agents* **16**:211–217.
35. Szych, J., A. Cieslik, J. Paciorek, and S. Kaluzewski. 2001. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18**:37–42.
36. Venolakis, E. N., A. Markogiannakis, L. Kondili, E. Varjoti, Z. Mahera, E. Dedouli, A. Karaitianou, N. Vakalis, and K. Bethimouti. 2001. Evolución de la resistencia a antibióticos de *Salmonellas* no tifoideas en Grecia durante el período comprendido entre 1990 y 1997. *Eurosurv. Month* **6**:117–120.
37. Vila, J., J. Gascón, S. Abdalla, J. Gómez, A. Moreno, M. Corachán, and M. T. Jimenez de Anta. 1995. Antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* isolates in traveller's diarrhea. *J. Travel Med.* **2**:45–47.
38. Vila, J., J. Gascón, S. Abdalla, J. Gómez, A. Moreno, M. Corachán, and M. T. Jimenez de Anta. 1994. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates causing traveler's diarrhoea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2668–2670.
39. Vila, J., M. Vargas, J. Ruiz, M. Corachán, M. T. Jiménez de Anta, and J. Gascón. 2000. Quinolone resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* causing diarrhea in travelers to India in comparison with travelers to other geographical areas. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1731–1733.
40. Vila, J., M. Vargas, J. Ruiz, M. Espasa, M. Pujol, M. Corachán, M. T. Jiménez de Anta, and J. Gascón. 2001. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated to traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. *J. Med. Microbiol.* **50**:996–1000.
41. Wain, J., N. T. T. Hoa, N. T. Chinh, H. Vinh, M. J. Everett, T. S. Diep, N. P. J. Day, T. Solomon, N. J. White, L. J. V. Piddock, and C. M. Parry. 1997. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Vietnam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1404–1410.
42. Walker, R. A., E. Lindsay, M. J. Woodward, L. R. Ward, and J. Threlfall. 2001. Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage-type U302 (MR U302) from humans, animals, and foods. *Microb. Drug Resist.* **7**:13–21.
43. Zahurul Haque Asna, S. M., J. Ashraf Haq, and M. D. Mushfequr Rahman. 2003. Nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi with decreased susceptibility to ciprofloxacin caused treatment failure: a report from Bangladesh. *Jpn. J. Infect. Dis.* **56**:32–33.

3.2. ARTÍCULO 2

Integrones Clase 1 en cepas de *Salmonella* causantes de diarrea del viajero.

Elementos genéticos tales como plásmidos, transposones, e integrones que portan genes de resistencia han sido previamente reportados en *Salmonella spp.* y en otras muchas especies, siendo estos los principales responsables de la adquisición de resistencia antimicrobiana por parte de la mayoría de los microorganismos.

El principal objetivo de este estudio fue determinar la presencia de integrones Clase 1 e identificar los genes de resistencia localizados en ellos en diferentes serotipos de cepas resistentes de *Salmonella* causantes de diarrea del viajero. Se estudiaron cepas de *Salmonella spp.* pertenecientes a los siguientes serotipos: Enteritidis (7 cepas), Typhimurium (2 cepas), Virchow (1 cepa), Haifa (1 cepa), Goldcoast (1 cepa), Risseu (1 cepas), Paratyphi A (1 cepa), Kiambu (1 cepa), y Hadar (1 cepa). La presencia de integrones Clase 1 se determinó por PCR, utilizando primers específicos previamente descritos. Posteriormente los integrones fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se compararon en el banco de genes (GenBank) para la identificación exacta de los genes de resistencia.

Se identificaron integrones Clase 1 en 4 cepas (*S. Virchow*, *S. Goldcoast*, *S. Haifa* y *S. Kiambu*) lo que representa un 25% de las cepas resistentes analizadas. Tres cepas presentaron un integrón y en una se encontró dos integrones. El tamaño de los integrones estuvo en un rango de 1050 a 1700 pb. Los genes de resistencia localizados en los integrones codificaban para enzimas asociadas con resistencia a aminoglicósidos, β -lactámicos, trimetoprim, y cloranfenicol. El serotipo Virchow portaba un integrón de 1500 pb que contenía los genes *aadA1a* y *dfrA1*, el serotipo Goldcoast contenía un integrón de 1700 pb con los genes *aadA5* y *dfrA17*, el serotipo Haifa portaba un integrón de 1500 pb con el gen *tetA*. El serotipo Kiambu tenía dos integrones de 1050 pb y 1300 pb que contenían los genes *aadA2* y *carb-2*, respectivamente. El amplio rango de orígenes geográficos y los integrones contenidos en nuestras cepas demuestran la capacidad de diseminación de estos elementos genéticos.

Class 1 Integrons in *Salmonella* Strains Causing Traveler's Diarrhea

Traveler's diarrhea (TD) is a frequent health problem among travelers abroad. Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., and *Campylobacter* spp. are among the most common causes of TD (3, 5). The antimicrobial resistance in *Salmonella* strains is an increasing problem (15). Genetic elements, such as plasmids, transposons, and integrons, carrying resistant genes have previously been reported for this microorganism (13, 14, 15). We previously studied the evolution of antimicrobial resistance and the mechanisms of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* isolates causing TD and found different genes encoding resistant determinants (3). The aim of the present study was to determine the presence of class 1 integrons and identify the resistance genes located therein in different serotypes of TD-causing, resistant *Salmonella* strains obtained in the previous study.

Sixteen *Salmonella* strains that were isolated from the stool samples of patients with TD were analyzed (1) using the Kirby-Bauer method and chosen for their resistance to at least one of the following tested antimicrobial agents: ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, nalidixic acid, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, gentamicin, ciprofloxacin, amikacin, imipenem, norfloxacin, and ceftazidime. The results were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS) guidelines (9). The strains belonged to the following *Salmonella enterica* serotypes: Enteritidis (seven strains), Typhimurium (two strains), Virchow (one strain), Haifa (one strain), Goldcoast (one strain), Risseu (one strain), Paratyphi A (one strain), Kiambu (one strain), and Hadar (one strain).

The presence of class 1 integrons was determined by PCR amplification (7, 16). The sequences obtained were compared to those in GenBank to identify the genes.

Class 1 integrons were present in 4/16 (25%) of the resistant strains analyzed (Table 1; Fig. 1). Three of the four strains presented one integron, whereas the fourth showed two integrons, with the integron sizes ranging from 1,050 to 1,700 bp. All integrons were sequenced to detect the gene cassettes located inside. The resistance genes located in the integrons encoded enzymes that were associated with resistance to aminoglycosides, β -lactams, trimethoprim, and chloramphenicol (Table 1). The prevalence of integrons among the *Salmonella* strains causing TD de-

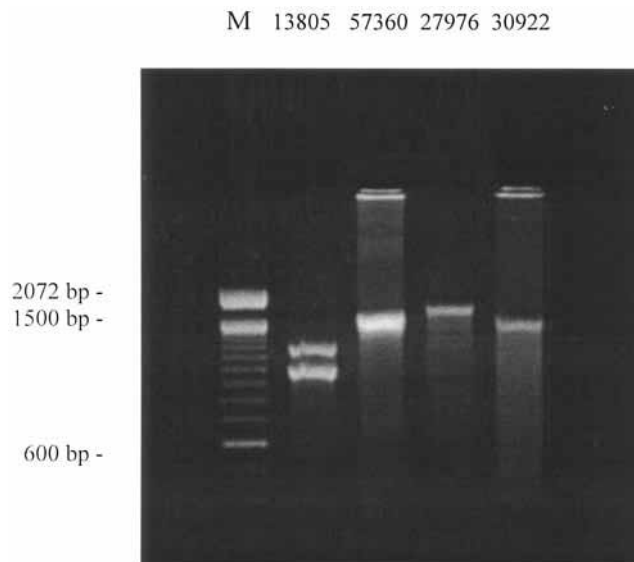


FIG. 1. Class 1 integrons of *Salmonella*-resistant strains. The designation numbers of the strains are reported above each lane. Lane M, the molecular weight marker.

scribed herein is similar to that described in other reports analyzing *Salmonella* strains not causing TD. Class 1 integrons were found in 20, 20, and 17% of the *Salmonella* strains that were isolated in Spain, the United Kingdom, and China (6, 12, 17), respectively. In these studies, serotype Virchow carried an integron containing the *aadA1a* and *dfrA1* genes and serotype Haifa carried an integron with the *tetA* gene (6, 12), which were different from those found in our study. We have not found any report in the scientific literature concerning the presence of integrons in *Salmonella* serotype Goldcoast. Moreover, the type of resistance genes that were found in the class 1 integrons agrees with previous studies that were undertaken with resistant *Shigella* strains causing TD (11). Serotype Kiambu had two integrons containing

TABLE 1. Characteristics of *Salmonella* strains with class 1 integrons

Strain	Serotype	Origin	Resistance ^a (MIC [μ g/ml])	Integron size (bp)	Resistance genes by type and location							
					Inside class 1 integrons				Outside class 1 integrons			
					Chl	Amp	Amg ^b	Sxt	Chl	Amp	Tet	Sxt
13805	Kiambu	Mali	Tet (64), Amp (\geq 256), Chl (\geq 256)	1,050/1,300 ^c		<i>carb-2</i>	<i>aadA2</i>			<i>floR</i>	<i>tem</i>	<i>tetG</i>
27976	Goldcoast	Senegal	Tet (128), Amp (\geq 256), Chl (32), Sxt (\geq 32)	1,700			<i>aadA5</i>	<i>dfrA17</i>		<i>tem</i>	<i>tetA</i>	
30922	Virchow	India	Nal (\geq 256), Sxt (\geq 32)	1,500	<i>catB3</i>		<i>aadB</i>					<i>dfrA14</i>
57360	Haifa	Egypt	Nal (\geq 256), Tet (\geq 256)	1,500			<i>aadA7</i> , <i>aac(3)I^d</i>				<i>tetA</i>	

^a Tet, tetracycline; Amp, ampicillin; Chl, chloramphenicol; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole.

^b Amg, aminoglycosides.

^c The *carb-2* and *aadA2* genes are located in the integrons with sizes of 1,050 and 1,300 bp, respectively.

^d The *aadA7* and *aac(3)I* genes are located in the same integron.

the *aadA2* and *carb-2* genes, respectively, which have also been described in different serotypes of *Salmonella*, such as Typhimurium, Agona, Paratyphi B, and Albany. These two integrons have been located in a genomic resistance island (SGI1) (2, 4, 8), suggesting that our strain also carries this genomic island. The range in the geographic origins of our strains containing integrons demonstrates the wide dissemination of these genetic elements. Nowadays, widespread international travel has facilitated the dissemination of multiresistant pathogenic strains throughout the world, and this has become a great public health problem (10). In addition, if resistance is associated with genes that are located in genetic elements such as plasmids, transposons, or integrons, they can be transferred and disseminated to the local bacterial population.

This study was funded by grant FIS02/0353 from the Spanish Ministry of Health and by grant 2002 SGR 05/00444 from the Department d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain. R.C. has a fellowship from Fundació Carolina and BBVA, Spain, and J.R. has a fellowship from RICET.

We are grateful for the collaboration of the Institute Carlos III, Madrid, Spain.

REFERENCES

- Bopp, C. A., F. W. Brenner, J. G. Wells, and N. A. Strockbine. 1999. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*, p. 459–474. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckaert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M. R. Mulvey. 2001. Complete nucleotide of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 and its identification in phage type DT 120 and serovar agona. *J. Bacteriol.* **183**:5725–5732.
- Cabrera, R., J. Ruiz, F. Marco, I. Oliveira, M. Arroyo, A. Aladueña, M. A. Usera, M. T. Jiménez de Anta, J. Gascón, and J. Vila. 2004. Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3934–3939.
- Doublet, B., R. Lailler, D. Meunier, A. Brisabois, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2003. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:585–591.
- Gascón, J., J. Vila, M. E. Walls, J. Ruiz, J. Vidal, M. Corachan, G. Prats, and M. T. Jiménez de Anta. 1993. Etiology of traveller's diarrhea in Spanish travellers to developing countries. *Eur. J. Epidemiol.* **9**:217–223.
- Guerra, B., S. Soto, S. Cal, and M. C. Mendoza. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2166–2169.
- Levesque, C., and P. H. Roy. 1993. PCR analysis of integrons, p. 590–594. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Meunier, D., D. Boyd, M. R. Mulvey, S. Baucheron, C. Mammina, A. Nastasi, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island 1 in serotype Paratyphi B. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:430–433.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9th ed. Approved standard M100–S13. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Navia, M., J. Ruiz, and J. Vila. 2003. Dispersión intercontinental de una cepa de *Shigella flexneri* resistente a trimetoprima. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21**:401–403. (In Spanish.)
- Navia, M., J. Ruiz, and J. Vila. 2004. Molecular characterization of the integrons in *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**:175–179.
- Randall, L. P., S. W. Cooles, M. K. Osborn, L. J. V. Pidock, and M. J. Woodward. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:208–216.
- Roe, M. T., E. Vega, and S. D. Pillai. 2003. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:822–826.
- Sabate, M., and G. Prats. 2002. Structure and function of integrons. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **20**:341–345.
- Vila, J., and S. B. Levy. 2003. Antimicrobial resistance. In C. D. Ericsson, H. L. Dupont, and R. Steffen (ed.), *Traveler's diarrhea*, BC Decker, Inc., Lewiston, N.Y.
- Vila, J., M. Navia, J. Ruiz, and C. Casals. 1997. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2757–2759.
- Zhang, H., L. Shi, L. Li, S. Guo, X. Zhang, S. Yamazaki, S. Miyoshi, and S. Shinoda. 2004. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. *Microbiol. Immunol.* **48**:639–645.

Roberto Cabrera*
Francesc Marco
Jordi Vila
Servei de Microbiologia
Centre de Diagnòstic Biomèdic
Facultat de Medicina

Joaquím Ruiz
Joaquím Gascón
Centro de Salud Internacional
IDIBAPS
Hospital Clínic
Universitat de Barcelona
Villarroel 170
08036, Barcelona, Spain

*Phone: 34 93 227 5522
 Fax: 34 93 2279372
 E-mail: jvila@ub.edu

3.3. ARTICULO 3

Caracterización de un gen de resistencia a aminoglicósidos encontrado en un integron Clase 1, en un aislamiento de *Salmonella* Haifa causante de diarrea del viajero.

El objetivo de esta investigación fue identificar y caracterizar el mecanismo que provoca susceptibilidad disminuida a gentamicina en un aislamiento clínico de *Salmonella*. Una cepa de *Salmonella* multiresistente fue recuperada de heces de un viajero procedente de Egipto. Se determinó la presencia de integrones por PCR y posteriormente el producto amplificado fue recuperado y secuenciado para determinar los genes de resistencia presentes en el integrón. Además de establecer el comportamiento de esta cepa frente 12 antimicrobianos según las normas del CLSI, se determinó la susceptibilidad a gentamicina C_{1a}, gentamicina C₁, sisomicina, neomicina, dibekacina, kanamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, apramicina, dactimicina, espectinomicina, estreptomycin, lividomicina y butirosina, por el método de difusión en disco usando placas de agar Mueller-Hinton. Para la clonación y expresión del gen se utilizó el kit de expresión Champion™ pET101 Directional TOPO®.

El aislamiento fue identificado como *Salmonella entérica* serovar Haifa. La cepa mostró resistencia al ácido nalidíxico, tetraciclina y susceptibilidad disminuida a gentamicina. Se observó un integrón de cerca de 1500 pb que portaba los genes de resistencia *aac(3)-Id* y *aadA7*. El análisis de susceptibilidad frente a los diferentes aminoglicósidos en la cepa transformada *E. coli* TOP10F portando la *aac(3)-Id* mostró resistencia a gentamicina C_{1a}, gentamicina C₁ y dactimicina de acuerdo con la presencia de una enzima AAC(3)-I. Sin embargo, fue sensible a sisomicina. La homología en la secuencia de aminoácidos y nucleótidos comparando la enzima AAC(3)-Id nuestra y la ya descrita AAC(3)-Id fueron del 100%. Las características fenotípicas de la cepa analizada (sensibilidad disminuida a gentamicina y sensibilidad a sisomicina) hicieron sospechar de la presencia de un nuevo gen de resistencia a aminoglicósidos. Sin embargo, el estudio genético nos desveló que estábamos en presencia de una enzima AAC(3)-Id descrita con anterioridad en *S. Newport*. El gen *aac(3)-Id* es descrito por primera vez en *S. Haifa*.

Caracterización de un gen de resistencia a aminoglicósidos encontrado en un integrón Clase 1 en *Salmonella* Haifa causante de diarrea del viajero.

Characterization of aminoglycoside acetyltransferase gene, found in a class 1 integron from a *Salmonella enterica* serovar Haifa isolate causing traveler's diarrhea.

Roberto Cabrera Ortega¹, Joaquín Ruiz Blázquez², Javier Sánchez-Céspedes¹, Pilar Goñi Cepero³, Rafael Gómez-Lus³, M. Teresa Jiménez de Anta Losada¹, Joaquín Gascón Brustenga² and Jordi Vila Estapé^{1*}.

¹Servicio de Microbiología, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ²Centro de Salud Internacional, IDIBAPS, Universidad de Barcelona, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

³Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Spain.

Running Title: Characterization of a novel aminoglycoside acetyltransferase gene.

Key words: aminoglycoside acetyltransferase, integron, *Salmonella*, traveler's diarrhea.

*Corresponding author: Dr. Jordi Vila

Servicio de Microbiología,

Hospital Clínic de Barcelona,

Villarroel 170, 08036, Barcelona, España.

Phone: + 34 93 227 5522

Fax: + 34 93 2279372

E-mail: jvila@ub.edu

Abstract

The objective of this investigation was to identify the mechanism of decreased susceptibility to gentamicin in a *Salmonella* clinical isolate, leading to the detection of a aminoglycoside acetyltransferase gene found in a class 1 integron. A multidrug-resistant *Salmonella* strain was recovered from feces of a traveler to Egypt. The antimicrobial susceptibility test was performed with the Kirby-Bauer method to 12 antimicrobial agents. The presence of class 1 integron was determined by PCR. The amplified product was recovered and sequenced in order to establish the genes carried. In addition, susceptibility to gentamicin C_{1a}, gentamicin C₁, sisomicin, neomycin, dibekacin, kanamycin, tobramycin, amikacin, netilmicin, apramycin, dactimicin, spectinomycin, streptomycin, lividomycin and butirosin, was established. The Champion™ pET101 Directional TOPO® Expression Kit was used to clone and express the *aac(3)I* gene. The isolate was identified as *Salmonella enterica* serovar Haifa, showing resistance to nalidixic acid, tetracycline and decreased susceptibility to gentamicin. One integron with a size circa 1,500 bp, encoding an *aac(3)-Id* plus *aadA7* genes was observed. The analysis of the susceptibility to different aminoglycosides in the *E. coli* TOP10F' transformed with the vector carrying *aac(3)-Id* gene showed resistance to gentamicin C_{1a}, gentamicin C₁, and dactimicin, in accordance with the presence of this enzyme but, was susceptible to sisomicin. The homology of the amino acid and nucleotide sequences with the AAC(3)-Id enzyme was of 100%. The presence of this enzyme was described for the first time in a *S. Haifa*.

Introduction

Traveler's diarrhea (TD) is a frequent health problem among travelers to developing countries. This illness may be due to a large variety of microorganisms, among these, *Salmonella* is one of the most frequent following diarrheogenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. (3,21). Diarrhea associated with *Salmonella* spp. is usually self-limited and does not require antibiotic therapy. However, in specific cases, due to both the severity or the duration of the symptoms, antibiotic treatment is required. Unfortunately, antimicrobial resistance levels among diarrheogenic pathogens have increased in recent years, and *Salmonella* spp. is not an exception (3,21).

Acquisition of resistance may be related to two different mechanisms: 1. Transferable, such as plasmids or transposons, and 2. Non transferable, usually associated with chromosomal point mutations (7,19). The gastrointestinal environment serves as a reservoir for integron-bearing strains and since integrons are carried on plasmids and transposons, antibiotic selective pressure can potentate the dissemination of antibiotic resistance genes through these genetic elements (15).

To date, nine classes of integrons have been described (16). Of these, the most relevant at a clinical level are those belonging to classes 1 and 2. The integrons of these two aforementioned classes usually carry gene-cassettes encoding for antibiotic resistance mechanisms. Among these gene-cassettes, the aminoglycoside-modifying encoding genes are considered the most prevalent (6). The aim of this work was to investigate the mechanism of decreased susceptibility to gentamicin in a clinical isolate of *Salmonella enterica* serotype Haifa.

Methods

Bacterial isolate. A *Salmonella* isolate recovered from feces of a traveler with diarrhea was identified by different typing methods, including biochemical tests and serotyping using somatic and flagella antiserum (11).

Antimicrobial susceptibility. A preliminary antimicrobial susceptibility test was performed, using an agar diffusion method with commercially available disks (Becton Dickinson) to the following antibiotics: ampicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, nalidixic acid, tetracycline, trimethoprim/sulphamethoxazole, chloramphenicol, gentamicin, amikacin, imipenem, norfloxacin, ciprofloxacin and ceftazidime. Interpretation of results was performed according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as controls (4).

To assess an activity pattern, susceptibility to gentamicin C_{1a}, gentamicin C₁, sisomicin, neomycin, dibekacin, kanamycin, tobramycin, amikacin, netilmicin, apramycin, dactimicin, spectinomycin, streptomycin, lividomycin and butirosin, the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar was used. These disks were manually prepared adding 30 µg of each antibiotic to 10 mm sterile blank filter disks. *E. coli* ATCC 25922 was used as a susceptible control strain. Reductions of the inhibition zone were considered as the result of aminoglycoside-modifying enzyme (AME) activity. Antimicrobial susceptibility levels of gentamicina were also established by the E-Test method following the manufacturer's instructions.

Detection of class 1 integrons. The presence of class 1 integrons was determined by PCR using the primers and conditions previously described (12). The amplified products were gel recovered using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up System Kit (Promega, Madison, USA)

and sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Emeryville, USA).

Plasmid analysis. Plasmid DNA was isolated as described by Kado and Liu (8). The plasmid extracted DNA was resolved by electrophoresis on 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide (0.5 mg/L).

Conjugation. Bacterial conjugation experiments were performed using *E. coli* J53 (F-, pro, Gm^S, Rif^R, Lac +) as the receptor strain as previously described (12), and were repeated three times.

DNA amplification and cloning of the *aac(3)-I* gene. The Champion™ pET101 Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen, USA) was used to clone and express the *aac(3)I* gene, following the manufacturer guidelines. Briefly, the entire AAC(3)I encoding gene was amplified using the forward primer AAC3IF: 5'-CAC CGT GTC AGT CGA AAT CAT C-3' and the reverse primer AAC3IR: 5'-GGC ATG ATT TTT ACT CTG C-3'. The amplification product was resolved by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The PCR product was gel recovered, using a Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wi) and was directly cloned into the pET vector and transformed into *E. coli* TOP10F'. Transformed *E. coli* strain were spread on a selective plate with ampicillin and incubated overnight at 37°C. Plasmids were isolated from several colonies and then analyzed by PCR using the AAC3IF primer and the specific vector primer T7 Reverse. The isolated plasmid was used to transform *E. coli* BL21 Star (DE3) for expression studies. The cloned insert was expressed in plates containing IPTG (1mM).

Results and Discussion

A *Salmonella enterica* serovar Haifa was isolated from feces of a traveler with diarrhea returning from Egypt. This strain showed resistance to nalidixic acid, tetracycline and decreased susceptibility to gentamicin, while remaining susceptible to ampicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, ceftazidime, cotrimoxazole, chloramphenicol, amikacin, imipenem, norfloxacin, and ciprofloxacin..

The isolate was investigated for the presence of class 1 integrons. One amplicon of circa 1500 bp was detected. The sequence of this amplicon revealed the association of the integron with *aac(3)Id* plus *ant(3'')* (also named *aadA7*) aminoglycoside-resistance genes (Figure 1). The detected *aac(3)-Id* nucleotide sequence showed amino acid and nucleotide homologies of 100% both with the *aac(3)-Id* and *aac(3)-Ie* genes located in similar integrons in *Salmonella enterica* serovars Newport and Kentucky (5,9), as well as in *Vibrio fluvialis* (1) (GeneBank access: AY458224, AY463797 and AB114632). Meanwhile, the homology with *aac(3)-Ia* , *aac(3)-Ib* and *aac(3)-Ic* was lower. The *ant(3'')* did not show differences with other nucleotide sequences previously reported.

The *Salmonella enterica* serovar Haifa isolate showed a resistance pattern partially consistent with the presence of an AAC(3)-Id plus an ANT(3'') aminoglycoside nucleotidyltransferase, with resistance or decreased susceptibility to gentamicin C_{1a}, gentamicin C₁, dactimicin, streptomycin and spectinomycin, but susceptible to sisomicin an aminoglycoside also considered also a substrate of the AAC(3)I-type enzymes. (Table 1). (10) In order to establish the exact role of the *aac(3)-Id* in the aminoglycoside resistance pattern detected, the gene was cloned in an expression vector. In the presence of IPTG, the transforming strain showed resistance to gentamicin C_{1a}, gentamicin C₁ and dactimicin, but lost the resistance to streptomycin, spectinomycin (Table 1), remaining susceptible to sisomicin.

Aminoglycoside modifying enzymes are commonly located within integrons in pathogens causing TD, such as *Shigella spp.* (13). In fact, different reports both in pathogens causing TD or not, considered that cassettes encoding for these genes are the most frequently found among integrons (2). To date, 5 different *aac(3)I* encoding genes have been described in the literature: *aac(3)-Ia* (22), *aac(3)-Ib* (17), and *aac(3)-Ic* (14), *aac(3)-Id* (1) and *aac(3)-Ie* (9). However, out of them, the *aac(3)-Id* and the *aac(3)-Ie* genes, showed the same nucleotide sequence. As in the above mentioned *aac(3)-I-like* genes, the *aac(3)-Id* described in the present study is located within an integron, together with the *ant(3'')* gene. Analysis of the transformed *E. coli* strain clearly showed that the *aac(3)-Id* gene product is responsible for the resistance to gentamicin C_{1a}, gentamicin C₁, and dactimicin, while resistance to streptomycin and spectinomycin was probably associated with the detected *ant(3'')* gene. (20,23).

The genetic location of the genes encoding the different acetyltransferases varies widely; for instance, the *aac(2')-I* gene is almost exclusively located in the chromosome in *Providencia spp.* and *Proteus spp.* (18), whereas most of the genes of the AAC(6) family are present in plasmids (18). To establish the genetic location of the *aac(3)I* gene, both plasmid analysis and conjugation experiments were performed, showing negative results. However, the PCR of the *aac(3)-Id* using chromosomal DNA extracted from an agarose gel as a DNA template was positive. The amplification of the *gyrA* gene was used as a control (data not shown). Therefore, our results suggest the chromosomal location of the integron.

The phenotypic characteristics of the strains analyzed (decreased susceptibility to gentamicin and susceptibility to sisomicin) suggested the presence of a new aminoglycoside acetyltransferase gene. Nevertheless, the genetic study show the presence of AAC(3)-Id enzyme, before described in *Salmonella enterica* serovar Newport.

A *Salmonella enterica* serovar Haifa carrying a *aac(3)-Id* gene was identified in a class 1 integron for the first time. This result shows the potential of integrons to carry and spread resistance genes.

Acknowledgments

This study was funded by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III – FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), FIS 04/0068, and grant 2005 SGR 0444 from the Departament d' Universitats, Recerca i Societat de la informació de la Generalitat de Catalunya, Spain to J.V. and by the DGA/Group of Ecology of Bacterial resistance, Spain. R.C. has a fellowship from Fundación Carolina and BBVA, Spain. J.R. research is supported by project CP05/0130.

References

1. Ahmed A, Nakagawa MT, Arakawa E, Ramamurthy T, Shimoda S, Shimamoto T. New aminoglycoside acetyl transferase gene, *aac(3)-Id*, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 month. J Antimicrob Chemother 2004;53: 947-51.
2. Bissonette L, Roy PH. Characterization of InO of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. J Bacteriol 1992;174: 1248-57.
3. Cabrera R, Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Arroyo M, Aladueña A, et al. Characterization of the mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. Antimicrob Agents Chemother 2004;48: 3934–39.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
5. Doublet B, Weill FX, Fabre L, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a 3'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac(3)-Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. Antimicrob Agents Chemother 2004;48: 3806-12.

6. Hall RM, Collis CM, Kim M J, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci* 1999;18: 68-80.
7. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol* 2006;17: 111-24.
8. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981;145: 1365-73.
9. Levings RS, Partridge SR, Lightfoot D, Hall RM, Djordjevic SP. New integron-associated gene cassette encoding a 3-*N*-aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1238-41.
10. Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, et al. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms—changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis* 1997;24: S46-S62.
11. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical Microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington, DC; 1995.
12. Navia MM, Ruiz J, Sánchez-Céspedes J, Vila J. Dispersión de una cepa de *Shigella flexneri* resistente a trimethoprim. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21: 401-3.
13. Navia MM, Ruiz J, Vila J. Molecular Characterization of the integrons in *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhoea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:175-9.

14. Riccio ML, Docquier JD, Dell'Amico E, Luzzaro F, Amicosante G, Rossolini GM. Novel 3-N-Aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1746-8.
15. Roe MT, Vega E, Pillai SD. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis* 2003;9: 822-6.
16. Sabaté M, Prats G. Structure and function of integrons. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:341-5.
17. Schwocho LR, Schaffner CP, Miller GH, Hare RS, Shaw KJ. Cloning and characterization of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ib*, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1790-6.
18. Shaw KJ, Rather PN, Sabatelli FJ, Mann P, Munayer H, Mierzwa LR, et al. Characterization of The Chromosomal *aac(6')-Ic* Gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36: 1447-55.
19. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*. 2006;34:3-10.
20. Tolmasky ME. Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: The Tn1331. Transposon paradigm. *Front Biosci* 2000;5:20-9.

21. Vila J, Gascón J, Abdalla S, Gómez J, Moreno A, Corachán M, et al. Antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* isolates in Traveler's Diarrhea. *J Travel Med* 1995;2: 45-7.

22. Wohlleben W, Arnold W, Bissonnette L, Pelletier A, Tanguay A, Roy PH, et al. On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (*aacC1*) for gentamicin acetyltransferase-3-I (AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol Gen Genet* 1989;217: 202-8.

23. Wolf E, Vassilev A, Makino Y, Sali A, Nakatani Y, Burley SK. Crystal structure of a *gcn5*-related n-acetyltransferase: *Serratia marcescens* aminoglycoside 3-n-acetyltransferase. *Cell*. 1998;94: 439–49.

Table 1. Antimicrobial susceptibility of *S. Haifa*.

Strain	Gm C1a	GmC1	Sisomicin	Dactimicin	Streptomycin	Spectinomycin
<i>E. coli</i> ATCC	27*	26	25	18	20	15
BL21	28	29	32	19	23	16
<i>S. Haifa</i>	13	15	25	0	0	0
AAC(3)-Id**	0	0	27	0	20	17

* Diameter of the inhibition zone in mm.

** BL21 *E. coli* strain transformed with the vector carrying the *aac(3)-Id* gene.

3.4. ARTÍCULO 4

Diseminación de *Salmonella entérica* serotipo Agona y *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium multiresistente en Cuba.

Tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados la gastroenteritis aguda causa altos niveles de morbilidad y mortalidad. Uno de los principales agentes etiológicos causantes de esta enfermedad es *Salmonella spp.* que en Cuba constituye la tercera causa de gastroenteritis aguda en niños y adultos. Además, muchos estudios en el país reportan altos porcentajes de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella spp.*

El objetivo de este estudio fue determinar la epidemiología molecular, susceptibilidad antimicrobiana, y los mecanismos de resistencia de 34 cepas de *Salmonella spp.* causantes de gastroenteritis aguda, aisladas en diferentes provincias de Cuba.

El 64% de las cepas mostraron multiresistencia. *S. Typhimurium* fue el serotipo más frecuente con 15 cepas (44%), 13 de las cuales pertenecieron al fagotipo 104, y presentaron similar perfil genético en un gel de electroforesis en campo pulsado. Se encontraron altos niveles de resistencia a tetraciclina (53%), espectinomicina (50%), ampicilina (44%), y cloranfenicol (41%). La resistencia a tetraciclina estuvo asociada con los genes *tetG* y *tetA*. La resistencia a ampicilina estuvo causada por la presencia de β -lactamasas, principalmente tipo CARB y el gen *floR* fue el principal mecanismo de resistencia a cloranfenicol. Los resultados obtenidos mostraron un clon sensible *Salmonella entérica* serotipo Agona en dos regiones separadas, y el primer reporte de la diseminación de un clon multiresistente de *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium fagotipo DT 104 en Cuba.

DISSEMINATION OF *SALMONELLA ENTERICA* SEROTYPE AGONA AND MULTIDRUG-RESISTANT *SALMONELLA ENTERICA* SEROTYPE TYPHIMURIUM IN CUBA

ROBERTO CABRERA, JOAQUIM RUIZ, MARGARITA RAMÍREZ, LAURA BRAVO, ANABEL FERNÁNDEZ,
ANA ALADUEÑA, AURORA ECHEÍTA, JOAQUIM GASCÓN, PEDRO L. ALONSO, AND JORDI VILA*

Servicio de Microbiología, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; Centro de Salud Internacional, Universidad de Barcelona, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí,” Ciudad Habana, Cuba; Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

Abstract. The molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility, and mechanisms of resistance of 34 *Salmonella* spp. strains causing acute gastroenteritis, isolated from different provinces in Cuba, were determined. Sixty-four percent of the strains showed multiresistance. *Salmonella typhimurium* was the most frequent with 15 strains (44%), 13 of which belonged to phagotype 104 and presented similar genetic profiles of pulsed field gel electrophoresis. High levels of resistance to tetracycline (53%), spectinomycin (50%), ampicillin (44%), and chloramphenicol (41%) were found. Resistance to tetracycline was associated with the *tet G* and *tet A* genes. Resistance to ampicillin was caused by the presence of β -lactamases, mainly the CARB type. The *floR* gene was the main mechanism of resistance to chloramphenicol. Our results showed an antimicrobial susceptible clone of *Salmonella enterica* serotype Agona in two separate regions. This is the first report of the widespread dissemination of a multiresistant clone of *S. enterica* serotype Typhimurium definitive phage type 104 in Cuba.

INTRODUCTION

In both developing and developed countries, acute gastroenteritis causes high levels of morbidity and mortality.¹ One of the main etiological agents of this disease is *Salmonella* spp. The *Salmonella* genus is composed of approximately 2,400 serotypes with different phenotypic and genotypic characteristics.² One of these characteristics is antimicrobial resistance. The *Salmonella* genus has been traditionally susceptible to antimicrobial agents, but an increase in the levels of resistance worldwide has been observed.^{3,4} *Salmonella* infections in Cuba is the third more frequent causes of acute gastroenteritis in adults and children after rotavirus and *Entamoeba histolytica*.^{5,6}

In Cuba, several studies have reported a high percentage of *Salmonella* spp. strains resistant to several antimicrobial agents such as ampicillin, chloramphenicol, nalidixic acid, and trimethoprim/sulphamethoxazole.⁷

An efficient route of acquisition of resistance is through genetic elements including plasmids, transposons, and integrons. Currently, nine classes of integrons have been described, with the class 1 integron being the most frequently detected in clinical strains.⁸ Integrons have been described as an important cause of the spread of antimicrobial resistance in a variety of enteric bacteria including *Salmonella*.^{9,10} Two scenarios can be envisaged in antimicrobial resistance: 1) dissemination of an antimicrobial-resistant clone or 2) dissemination of a resistant gene carried in a genetic element. Integrons have also been considered as a tool for studying molecular epidemiology.¹¹

The aim of this study was to determine the antimicrobial susceptibility and the molecular mechanisms of resistance of *Salmonella* spp. strains causing acute gastroenteritis in Cuba and to determine the potential dissemination of a resistant clone.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. A total of 34 sporadic *Salmonella* strains isolated from feces of patients with acute gastroenteritis isolated from different regions of Cuba in 2002 were analyzed. The strains were isolated by the different Provincial Reference Laboratories of each region of the country (the laboratories belong to a National Surveillance Network) and sent to the National Reference Laboratory of Cuba. The strains were further studied in the Laboratory of Clinical Microbiology at the Clínic Hospital in Barcelona, Spain. The strains were isolated and identified by conventional methods.¹²

Serotyping and phage typing. Serotyping and phage typing were performed in the Carlos III Institute (Madrid, Spain), taking into account the Manual of Kauffman and White and following the recommendations of Edward and Ewing.^{2,12}

Antimicrobial susceptibility testing. The antimicrobial susceptibility test to nine antimicrobial agents, ampicillin (AMP), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), nalidixic acid (NAL), tetracycline (TET), trimethoprim/sulphamethoxazole (SXT), chloramphenicol (CHL), gentamicin (GEM), ciprofloxacin (CIP), and spectinomycin (SPT), was performed using the Kirby-Bauer method. Interpretation of results was carried out according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) guidelines.¹³ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as controls. Multiresistance was defined as resistance to four or more unrelated antimicrobial agents.

Detection of the mechanisms of resistance. To determine the quinolone-resistance mechanisms, mutations in the quinolone-resistant determining region (QRDR) of the *gyrA* gene were detected by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. A previously described colorimetric assay was performed to detect the presence of chloramphenicol acetyl transferase activity (CAT).¹⁴ The presence of the *cmlA* and *floR* genes associated with chloramphenicol resistance, the genes encoding β -lactamases (*tem*-like, *carb*-like, *shv*-like, and *oxa* 1-like), and the *tet A*, *tet B*, and *tet G* genes related to tetracycline resistance acquisition were detected by PCR. To

* Address correspondence to Jordi Vila, Servicio de Microbiología, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: jvila@ub.edu

determine the mechanism of trimethoprim resistance, the presence of dihydrofolate reductases was detected by PCR with generic primers and posterior restriction fragment length polymorphism (RFLP) with the appropriate restriction enzyme according to previously described methodology.¹⁵ The PCR products were detected by electrophoresis in 2% agarose gels. All the primers and PCR conditions used in this study have been previously described.³

Detection of integrons. In all the resistant *Salmonella* strains, the presence of Class 1 integrons was detected by PCR with specific primers described previously.¹⁴

DNA sequencing of the PCR products. The purified PCR products visualized in gels were processed for DNA sequencing and analyzed in an automatic DNA sequencer (ABI 377; Perkin Elmer, Emeryville, CA) using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer).

Low-frequency restriction analysis of chromosomal DNA and pulsed field gel electrophoresis. The analysis of chromosomal DNA by digestion with low frequency of cleavage restriction enzymes and separation of the fragments by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was performed as follows. *Salmonella* strains were cultivated in brain-heart infusion (BHI) and incubated overnight. They were resuspended in buffer TE-1. The plugs containing the DNA were elaborated with agarose insert 1.8%.¹⁶ Chromosomal DNA contained in the agarose plugs was digested with *Xba*I (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), and PFGE was performed with the CHEF DR II system (Biorad Laboratories, Hercules, CA) in 0.5× Tris-Borate-EDTA buffer (Severn Biotech, Kidderminster, UK). DNA restriction fragments were resolved in agarose (Bio-Rad) 1% wt/vol gels, and a low-range PFGE marker (New England Biolabs, Beverly, MA) was used as a size standard. Electrophoresis conditions were of 2.0–64 seconds for 20 hours.¹⁷

RESULTS

Of the 34 *Salmonella* strains studied from different regions around the country, *Salmonella typhimurium* was the most frequent, with 15 strains (44%), 13 of which belonged to phagotype 104, with 2 strains showing a non-recognized phagotype pattern. *Salmonella agona* was the second most frequently isolated serotype with eight strains (23%), followed by *Salmonella hadar* with two strains. Only one strain was found in other serotypes, such as *Salmonella senftenberg*, *Salmonella infantis*, *Salmonella brandenburg*, *Salmonella orion*, *Salmonella saintpaul*, and one monophasic. Three strains were non-typable.

In the 34 *Salmonella* strains studied, 22 strains presented resistance to at least one antimicrobial agent, with *S. typhimurium* with 15 strains (68%) being the most prevalent among the resistant *Salmonella*. High levels of resistance were found mainly to tetracycline in 18 strains (53%), spectinomycin in 17 strains (50%), ampicillin in 15 strains (44%), and to chloramphenicol in 14 strains (41%). In addition, three strains presented resistance to amoxicillin/clavulanic acid, and eight strains (24%) showed intermediate resistance to amoxicillin/clavulanic acid (Table 1).

Molecular epidemiologic analysis was performed in *S. typhimurium* and *S. hadar* because of their multiresistance and in *S. agona* because of the fact that it was the second most prevalent serotype isolated. *S. typhimurium* showed five pat-

TABLE 1
Antimicrobial susceptibility of the *Salmonella* clinical isolates

Antimicrobial agent	Resistant		Intermediate		Susceptible	
	N	%	N	%	N	%
Ampicillin	15	44	0	0	19	56
Amoxicillin/clavulanic acid	3	9	8	24	23	67
Spectinomycin	17	50	0	0	17	50
Nalidixic acid	0	0	1	3	33	97
Ciprofloxacin	0	0	0	0	34	100
Gentamicin	2	6	0	0	32	94
Trimethoprim-sulphamethoxazole	1	3	0	0	33	97
Tetracycline	18	53	0	0	16	47
Chloramphenicol	14	41	0	0	20	59

N, number of strains.

terns of PFGE, being the pattern number 1 the most frequent with 11 isolates of 15 (Table 2; Figure 1). Although showing a different phagotype, the two strains corresponding to serotype Hadar presented an identical pattern of PFGE (Table 2). Among the eight *Salmonella* strains belonging to serotype Agona, six of the seven susceptible isolates belonged to the same PFGE pattern, whereas the remaining susceptible isolate and the resistant isolate each showed a different pattern. The geographical distribution of the resistant clones is shown in Table 2, which shows that the main *S. typhimurium* clone (clone 1) was detected in eight different provinces, distributed throughout the island, and the *S. agona* clone was disseminated in two provinces: Cienfuegos and Holguín.

Analysis of the molecular mechanisms of resistance showed that resistance to tetracycline was caused by the presence of the *tet G* gene (13 of 18 tetracycline-resistant strains) and the *tet A* gene (6 of 18 tetracycline-resistant strains). One strain presented both resistant determinants. The main mechanism of ampicillin resistance was the presence of CARB type β -lactamases, observed in 13 of 15 ampicillin-resistant strains, with

TABLE 2
Serotype, phagotype, and PFGE pattern of the resistant *Salmonella* strains analyzed

Strain	Province	Serotype	Phagotype	PFGE
1320	Granma	Typhimurium	104	I
1837	Holguín	Typhimurium	104	I
2667	Santiago de Cuba	Typhimurium	104	I
1273	Camagüey	Typhimurium	104	II
2834	Holguín	Typhimurium	104	I
3098	La Habana	Typhimurium	104	I
47	Camagüey	Typhimurium	104	I
1822	Holguín	Typhimurium	104	I
1270	Camagüey	Typhimurium	104	I
410	Las Tunas	Typhimurium	104	I
2841	Holguín	Typhimurium	104	III
1946	Pinar del Río	Typhimurium	104	I
3147	Sancti Spiritus	Typhimurium	104	I
885	Matanzas	Typhimurium	PNR	IV
1958	Holguín	Typhimurium	PNR	V
2821	Holguín	Hadar	17	VI
2033	Matanzas	Hadar	22	VI
1764	Santiago de Cuba	Agona	NT	VII
1708	Camagüey	Senftenberg	NT	NP
1818	Holguín	4.12	NT	NP
1829	Holguín	4.12	NT	NP
1989b	Pinar del Río	4.12	NT	NP

PNR, pattern not recognized; NT, non-typable; NP, non-performed.

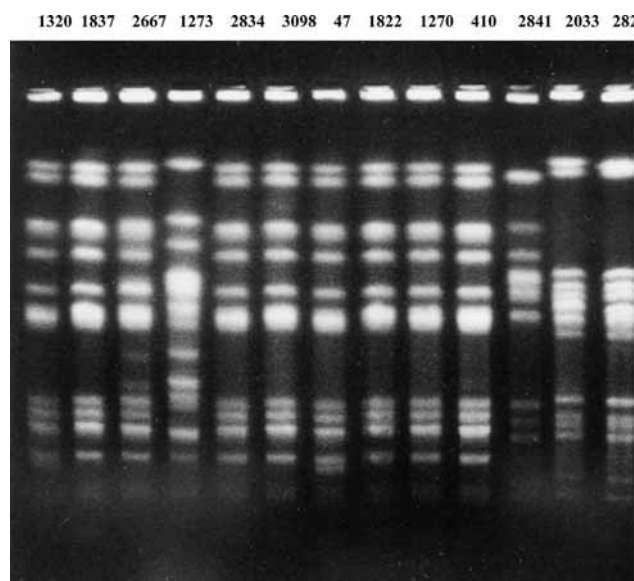


FIGURE 1. Analysis of resistant *Salmonella* strains by PFGE. DNA was digested with *Xba*I and separated by PFGE on a 1% agarose gel. The designation number of strains tested are reported above each lane. Lane 1320–2841: *S. typhimurium* DT104; 2033–2821: *S. hadar*.

only one strain of *S. hadar* showing a TEM type β -lactamases. No strain presented OXA type and SHV type β -lactamases. All chloramphenicol-resistant isolates presented the *floR* gene, and only the *S. senftenberg* strain showed CAT activity. None of the isolates presented the *cmlA* gene. One strain presented resistance to trimethoprim/sulphamethoxazole because of the presence of the *dfrA1* gene (Table 3). The strain with intermediate susceptibility to nalidixic acid did not show any mutation in the *gyrA* or *parC* genes.

TABLE 3
Mechanisms of resistance of the resistant *Salmonella* spp.

Strain	Serotype	Mechanism of resistance				
		SPT	CHL	AMP	TET	SXT
2033	<i>S. hadar</i>			<i>tem</i>	<i>tet A</i>	
1818	4, 12	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
1320	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
1829	4, 12	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
1837	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
2667	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
1273	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet A, tet G</i>	
2834	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
3098	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
47	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
1989b	4, 12				<i>tet A</i>	
1708	<i>S. senftenberg</i>	<i>aadA2</i>	CAT			<i>dfrA1</i>
1958	<i>S. typhimurium</i>				<i>tet A</i>	
1822	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
1270	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
2821	<i>S. hadar</i>				<i>tet A</i>	
885	<i>S. typhimurium</i>				ND	
410	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
2841	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	<i>floR</i>	<i>carb2</i>	<i>tet G</i>	
1946	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>				
3147	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>				
1764	<i>S. agona</i>	<i>aadA2</i>				

ND, not determined; SPT, spectinomycin; CHL, chloramphenicol; AMP, ampicillin; TET, tetracycline; SXT, trimethoprim/sulphamethoxazole.

Two Class 1 integrons were present in 11 of the 22 resistant strains (Table 4): one integron of 1,200 bp containing the *carb2* gene, and the other with a size of approximately 1,000 bp containing the *aadA2* gene. Another Class 1 integron (1,500 bp) was detected in the *S. senftenberg* strain and contained the *aadB* and *aadA2* genes. Finally, two *S. typhimurium* and one *S. agona* with resistance to spectinomycin showed one Class 1 integron with a size of 1,000 bp containing the *aadA2* gene.

DISCUSSION

Although *S. typhimurium* definitive phage type (DT) 104 has been detected in human infections in England and Wales since the early 1960s, multidrug-resistant strains of this phage type were not identified until the early 1980s.¹⁸ In this study, despite only 34 *Salmonella* strains analyzed, we could detect the dissemination of *S. typhimurium* DT 104 in different provinces of Cuba. In addition, isolates belonging to the same clone were detected in the same geographical area, suggesting a local outbreak. The same scenario was reported in previous studies performed in Canada, United States, and Europe.^{19–21} This phage type is commonly resistant to ampicillin, chloramphenicol/flufenisal, spectinomycin/streptomycin, sulfonamides, and tetracyclines.²¹ In addition of this typical resistance pattern, some strains of *S. typhimurium* DT 104 also presented resistance to fluoroquinolones and trimethoprim. The high percentage of intermediate resistance to amoxicillin/clavulanic acid found among our strains is worthy of mention. Different reports have shown a decrease in the susceptibility of *S. typhimurium* and other serotypes to this antimicrobial agent. Espinase et al.²² reported a decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid in three *S. typhimurium* strains isolated from patients in Rumania. Similarly, in a French university hospital, many *S. typhimurium* strains with reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid were isolated.¹⁵ This fact has also been shown in *S. hadar* and *S. bsilla*.^{23,24} Theoretically, several mechanisms may explain this reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid, including a decrease in permeability to β -lactams, as is known for *Escherichia coli*, or the over-expression of specific β -lactamases.²⁵ In our study, all strains with reduced susceptibility carried the β -lactamases type CARB, whose over-expression may explain the origin of this reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid.

The PFGE patterns generated with the *Xba*I enzyme found in our *S. typhimurium* DT 104 strain were similar to other described before by several authors using the same conditions.^{19,26,27} Baggesen et al.¹⁹ compared the PFGE profile of Danish *S. typhimurium* DT 104 strains with the profile of PFGE obtained in strains isolated in five different countries

TABLE 4
Class 1 integrons observed

Strains	Serotype	Composition	Size
11	<i>S. typhimurium</i>	<i>carb2/aadA2</i>	1,200, 1,000 bp
2	<i>S. typhimurium</i>	<i>aadA2</i>	1,000 bp
2	4, 12	<i>carb2/aadA2</i>	1,200, 1,000 bp
1	<i>S. agona</i>	<i>aadA2</i>	1,000 bp
1	<i>S. senftenberg</i>	<i>aadB, aadA2</i>	1,500 bp

and found highly homogeneous profiles, indicating that the multidrug-resistant *S. typhimurium* DT 104 had probably been spread clonally in these countries.

All the strains analyzed belonging to *S. typhimurium* DT 104 presented the *floR* and *tet G* genes, being responsible for resistance to chloramphenicol and tetracycline, respectively. These genes have been previously described to be located in the *Salmonella* genomic island 1 (SGI1).^{26,28} In this island, resistance genes are clustered and are bracketed by two integron structures,¹⁸ identical to those found in our study. The first integron carried the *aadA2* gene, which confers resistance to spectinomycin and streptomycin, and the second integron contained the *carb2* gene, conferring resistance to ampicillin.²⁸ All the *S. typhimurium* DT 104 strains but two analyzed in our study presented these two integrons. The two strains presenting only the integron carrying the *aadA2* gene may have a truncated resistance island. Therefore, *S. typhimurium* strains with the same pattern by PFGE can present different integrons, suggesting that this is not a discriminate tool to be used in epidemiologic analysis, as has been suggested.¹¹

Three strains were not typable using the traditional serotyping techniques. Two of these three strains presented a similar mechanism of resistance profile as *S. typhimurium* DT 104. Other serotypes that showing a multiresistant phenotype were *S. hadar* and *S. senftenberg*, the latter of which is not frequently found. However, in some countries such as Brazil, it is a frequent serotype, occupying the third place of *Salmonella* isolates (10.3%) behind *S. typhimurium* and *S. enteritidis*.²⁹ According to the network of human *Salmonella* surveillance in Europe, *S. hadar* is widely distributed across the European continent.²⁴ Cruchaga et al.³⁰ reported high levels of resistance, mainly to spectinomycin, ampicillin, tetracycline, and nalidixic acid, in strains of *S. hadar* isolates from humans and food, respectively. Analysis of PFGE profiles of the two resistant *S. hadar* was similar, but the PFGE in this serotype is of limited value, and the combination of different epidemiologic methods is recommended depending of the phage type studied.²³ In our study, these two strains belonged to two different phage types and also showed different resistance phenotypes. Therefore, they may be considered two different clones, although those differences in the resistant phenotypes and phagotypes might reflect the geographical distribution of a single clonal type.

Epidemiologic analysis by PFGE of the *S. agona* strains showed a predominant clone disseminated mainly in two separate provinces: Cienfuegos and Holguín. In fact, although no molecular epidemiologic analysis have been performed, previous reports described this serotype among one of the main *Salmonella* serotypes isolated throughout the country and in several countries of American continent.^{4,31–33} In 1998 in the United States, a total of 11 states reported an increase in cases of *S. agona*.³¹ In Argentina and Mexico, several authors reported this serotype among the most frequent *Salmonella* isolated.^{32,33} The presence of antimicrobial-resistant strains of this serotype has previously been reported.³⁴ However, the prevalence of antimicrobial-resistant strains is lower than the antimicrobial resistance observed in *S. typhimurium*. In some *S. agona*-resistant strains, the same resistant island, SGI1, has been shown.³⁴ However, in our study, the multiresistant *S. agona* strain did not show the resistant determinants

located in this island, although the integron, carrying the *aadA2* gene, was found.

Our results show the dissemination of a multiresistant clone of *S. typhimurium* DT 104 and an antimicrobial susceptible clone of *S. agona* in two separate regions in Cuba. This work presents the first description in Cuba of the multiresistant clone of *S. typhimurium* DT 104 since first being identified in the United Kingdom in the late 1980s.¹⁸

Received October 6, 2005. Accepted for publication December 1, 2005.

Financial support: This study was funded by grant FIS02/0353 from the Spanish Ministry of Health, by grant 2005 SGR 00444 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain. R. Cabrera has a fellowship from Fundación Carolina and BBVA, Spain, and J. Ruiz has a fellowship from RICET.

Authors' addresses: Roberto Cabrera and Jordi Vila, Servicio de Microbiología, IDIBAPS, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona, Spain; Joaquim Ruiz, Joaquim Gascón, and Pedro L. Alonso, Centro de Salud Internacional, Universidad de Barcelona, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; Margarita Ramírez, Laura Bravo, and Anabel Fernández, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista Novia del Medio día, Km 6, CP 601, Marianao 13, Ciudad Habana, Cuba. Ana Aladueña and Aurora Echeíta, Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Majadahonda-Pozuelo Km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

Reprint requests: Jordi Vila, Servicio de Microbiología, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: jvila@ub.edu.

REFERENCES

- Murray CJL, López AD, 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study. *Lancet* 349: 1969–1976.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press.
- Cabrera R, Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Arroyo M, Aladueña A, Usera MA, Jiménez de Anta MT, Gascón J, Vila J, 2004. Characterization of the mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3934–3939.
- Stock I, Wiedemann B, 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* strains. *Int J Antimicrob Agents* 16: 211–217.
- Cabrera R, Ramírez M, Bravo L, García B, Fernández A, 1998. Serotipaje de los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella*. *Enf Infecc Microbiol* 18: 150–152.
- Estevez Touzard M, Díaz González M, Monte Boada RJ, Toledo Rodríguez I, Ramón Bravo J, 1993. The infectious etiology of acute diarrheal diseases in the Republic of Cuba, 1991. *Rev Cub Med Trop* 45: 139–145.
- Llop A, 2002. Antimicrobial resistance and microbiological surveillance in Cuba. In: Salvatierra-Gonzalez R, Benguigui Y, eds. *Antimicrobial Resistance in the Americas: Magnitude and Containment of the Problem*. Washington, DC: Pan American Health Organization; 111–118.
- Sabaté M, Prats G, 2002. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol* 20: 341–345.
- Guerra B, Soto S, Cal S, Mendoza MC, 2000. Antimicrobial resistance and spread of Class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2166–2169.
- Roe MT, Vega E, Pillai SD, 2003. Antimicrobial resistance markers of Class 1 and Class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis* 9: 822–826.
- Severino P, Magalhaes VD, 2004. Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect* 10: 156–162.
- Boop CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine NA, 1999. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: Murray PR, Baron EJ,

- Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC: ASM Press; 459–474.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 9th ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
 14. Guerra B, Malorny B, Schroeter A, Helmuth R, 2003. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2059.
 15. Navia MM, Ruiz J, Sánchez Céspedes J, Vila J, 2003. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis* 46: 295–298.
 16. Gautom RK, 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.
 17. Lawson AJ, Desai M, O'Brien SJ, Davies RH, Ward LR, Threlfall EJ, 2004. Molecular characterization of an outbreak strain of multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the UK. *Clin Microbiol Infect* 10: 143–147.
 18. Threlfall EJ, 2000. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104—a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother* 46: 7–10.
 19. Baggesen DL, Sandvang D, Aarestrup FM, 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* 38: 1581–1586.
 20. Martin LJ, Fyfe M, Dore K, Buxton JA, Pollari F, Henry B, Middleton D, Ahmed R, Jamieson F, Ciebin B, McEwen SA, Wilson JB, 2004. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. *J Infect Dis* 189: 377–384.
 21. Meunier D, Boyd D, Mulvey MR, Baucheron S, Mammina C, Nastasi A, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A, 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 antibiotic resistance genomic island I in serotype paratyphi B. *Emerg Infect Dis* 8: 430–433.
 22. Espinase F, Gheorghiu R, Poiata A, Labia R, Nicolas-Chanoine MH, 1997. Reduced susceptibility to co-amoxiclav in *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in Romania between 1985 and 1993. *J Antimicrob Chemother* 39: 103–106.
 23. Ruiz J, Navia MM, Marco F, Vila J, 2004. Mecanismos de resistencia a betalactámicos y ácido nalidíxico en aislados clínicos de *Salmonella enterica* serotipo Hadar y Bsilla. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22: 252–253.
 24. Valdezate S, Echeíta A, Díez R, Usera MA, 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic markers for characterization of the emerging gastroenteritis pathogen *Salmonella* Hadar. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 275–281.
 25. Reguera JA, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Martínez JL, 1991. Factors determining resistance to β -lactam combined with β -lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 27: 569–573.
 26. Carattoli A, Filetici E, Villa L, Dionisi AM, Ricci A, Luzzi I, 2002. Antibiotic resistance genes and *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2821–2828.
 27. 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 DT 104 from French patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1098–1104.
 28. Doublet B, Lailier R, Meunier D, Brisabois A, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A, 2003. Variant *Salmonella* genomic island 1 resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerg Infect Dis* 5: 585–591.
 29. Tavechio AT, Ghilardi AC, Peresi JT, Fuzihara TO, Yonamine EKM, Fernández SA, 2002. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in *Salmonella* in Brazil, from 1996 through 2000. *J Food Prot* 65: 1041–1044.
 30. Cruchaga S, Echeíta A, Aladueña A, García-Peña J, Frias N, Usera MA, 2001. Antimicrobial resistance in *Salmonella* from humans, food and animals in Spain in 1998. *J Antimicrob Chemother* 47: 315–321.
 31. Centers for Disease Control, 1998. Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Agona infections linked to toasted oats cereal—United States. *JAMA* 280: 411.
 32. Eigner T, Butta N, 1983. Annual distribution of serotypes of *Salmonella*, *Shigella*, and infantile enteropathogenic *Escherichia coli* in the Republic of Argentina 1979–1981. *Rev Argent Microbiol* 15: 19–24.
 33. Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC, 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública Méx* 42: 490–495.
 34. Boyd D, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey MR, 2002. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1714–1722.

4) DISCUSIÓN

Mecanismos de resistencia a diferentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella* causante de diarrea del viajero. (artículo 1)

La diarrea del viajero (DV) constituye uno de los principales problemas de salud en viajeros a países en desarrollo. Esta enfermedad es causada por un amplio rango de agentes infecciosos, donde las bacterias ocupan el primer lugar. Sin embargo, los porcentajes de cada patógeno varían en muchos estudios debido principalmente a las diferentes técnicas utilizadas para la identificación microbiológica, las variaciones del tiempo y las áreas geográficas estudiadas. Los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad.

En el estudio de la diarrea del viajero es muy importante tener en cuenta el destino del viajero, se considera el factor de riesgo más importante. Entre los principales destinos con alta prevalencia de DV se encuentran Latinoamérica, Asia y África. En la actualidad los viajes a estas regiones son muy populares, 20 millones de viajeros visitan cada año países poco desarrollados, donde entre un 20%-50% de los viajeros a estas áreas enferman debido a la ingestión de agua y alimentos contaminados (94).

En nuestro trabajo teniendo en cuenta el origen geográfico, la mayoría de los aislamientos se detectaron en el continente africano (25.8%) y en el subcontinente indio (12.9%). También aunque en un menor porcentaje se aislaron cepas de Latinoamérica y de otras regiones del mundo. Resultados similares fueron obtenidos por Vila y colaboradores (1993), en cuanto a la distribución geográfica. Este trabajo plantea que la distribución geográfica de *Salmonella* en viajeros es similar en Latinoamérica, Asia y África, con unos porcentajes de aislamiento de

1.5%, 5% y 5% respectivamente, y cuando analizan áreas más específicas concluyen que el sur y centro de África son las zonas donde se aíslan cepas de *Salmonella* con mayor frecuencia (95).

En varios de los pacientes estudiados, además de las cepas de *Salmonella* se aislaron otros microorganismos: *E. coli* diarreogénica, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* y *Giardia lamblia*. Este hallazgo no es de extrañar según lo reportado en artículos anteriores: Las bacterias son los enteropatógenos más frecuentemente incriminados (50-80%). *E. coli* es la causa predominante de DV en Latinoamérica, el Caribe y África. *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enteroagregativa son responsables del 71% de los casos de diarrea del viajero en México. Patógenos invasivos como *Campylobacter* y *Shigella* son relativamente comunes dependiendo de la región. Por ejemplo: *Campylobacter* es la principal causa de DV en Tailandia y también es común en Nepal. *Aeromonas* y *Vibrio* son menos frecuentes. También existen variaciones regionales en cuanto a la DV causada por parásitos. *Giardia lamblia* es una de las causas menos frecuente de DV aunque en algunos lugares es muy común. Los virus han sido los menos estudiados excepto los fáciles de diagnosticar como los rotavirus (2,96).

El serotipo más frecuente en nuestro estudio fue *Salmonella entérica* serovar Enteritidis seguido de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. La mayoría de los estudios a nivel mundial coinciden en reportar a estos serotipos como los más frecuentes. En las últimas dos décadas se ha constatado un aumento de la salmonelosis causada por *S. Enteritidis*, que ha ido desplazando a *S. Typhimurium* a un segundo lugar (97). En Estados Unidos y el Reino Unido el serotipo Enteritidis ha sido el más común seguido de *S. Typhimurium*. Específicamente en un estudio realizado en viajeros provenientes de Asia, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los más frecuentes con un 36.2% y un 7.8% respectivamente (98). En un estudio realizado por Choi y cols. en Korea (97) *S. Enteritidis* fue la más frecuente con un 58.6%, seguida de *S. Typhimurium* con un 12.6%. En España *S. Enteritidis* es la causa más frecuente de alimentos contaminados

(98). Sin embargo, se han reportado diferencias geográficas en cuanto a la prevalencia de los serotipos de *Salmonella* en otros estudios en Latinoamérica (99). En Argentina y México *S. Typhimurium* fue la más frecuente. En México Gutiérrez-Cogco (100) muestra como *S. Enteritidis* tuvo un aumento gradual a partir del año 1991. En un estudio hecho por Tavechio y cols. (101), se reporta que *S. Enteritidis* es el serotipo más prevalente en Brasil.

Diseminación de *Salmonella entérica* serotipo Agona y *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium multiresistente en Cuba. (artículo 4)

Tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados la gastroenteritis causa altos niveles de morbilidad y mortalidad. Uno de los principales agentes etiológicos causantes de esta enfermedad es el género *Salmonella*. En nuestro estudio encontramos que los serotipos *S. Typhimurium* (44%) y *S. Agona* (23%) eran los principales responsables de esta enfermedad en varias regiones del país. El serotipo *S. Typhimurium* DT 104 se identificó por primera vez en Inglaterra y Gales en los años 60. En los años 90 se diseminó a otras partes del mundo y es ahora muy común en muchos países, entre los que se incluyen Estados Unidos, El Reino Unido, Alemania, Canadá, Dinamarca y Francia. Este serotipo es comúnmente resistente a 5 antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina (ACSSuT) y se ha convertido en motivo de preocupación debido a su rápida diseminación y su habilidad para adquirir resistencia adicional a diferentes clases de antimicrobianos de importancia clínica tales como, quinolonas, trimetoprim y cefalosporinas (102,103,104,105). El serotipo Agona también ha sido reportado como uno de los principales serotipos en el continente americano. En los EUA en 1998 un total de 11 estados reportaron un aumento de los casos por *S. Agona*. En Argentina y México muchos autores reportan este serotipo dentro de los más

frecuentes. La presencia de cepas resistentes a antimicrobianos en este serotipo ya ha sido reportada. Sin embargo, esta resistencia es mucho menor que la observada en *S. Typhimurium*. (106). *Salmonella entérica* serovar Hadar también fue identificada en este estudio como uno de los serotipos más frecuentes por detrás de *S. Typhimurium* y *S. Agona*. Este serotipo se encuentra ampliamente distribuido en América y Europa. Además, se han reportado altos niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos de importancia clínica en este serotipo (107,108).

Un análisis epidemiológico molecular fue realizado a estos serotipos. En particular analizamos la epidemiología molecular de los serotipos Typhimurium y Hadar debido a los niveles de multiresistencia encontrados y en *S. Agona* por ser el segundo serotipo aislado con más frecuencia. En *S. Typhimurium* se identificaron 5 patrones genéticos diferentes, estos patrones generados con la técnica de PFGE se correspondieron con los descritos por varios autores bajo las mismas condiciones (103,109,110). El patrón 1 fue el más frecuente y se aisló en 8 provincias distribuidas a todo lo largo de la isla. Las dos cepas de *S. Hadar* analizadas mostraron un mismo patrón genético de PFGE aunque presentaron un fagotipo diferente, demostrando que esta técnica tiene un valor limitado en este serotipo, requiriéndose para su estudio la combinación de diferentes métodos epidemiológicos. El clon de *S. Agona* estuvo formado por dos patrones también y solo se diseminó en dos provincias: Cienfuegos y Holguín. En resumen nuestros resultados mostraron la clara diseminación de *S. Typhimurium* DT 104 a través de todo el país, dato muy importante debido a que es la primera vez que se reporta este serotipo en Cuba desde su descubrimiento en los años 80 en el Reino Unido y porque siempre viene acompañado de altos niveles de multiresistencia a antimicrobianos de primera línea (102).

Artículos 1 y 4

En primer lugar analizaremos y discutiremos la multiresistencia en general en las cepas de *Salmonella* estudiadas. En las cepas causantes de DV, se encontró que el 25% de las cepas resistentes presentaron resistencia a tres o más antimicrobianos no relacionados, considerándose las mismas como cepas multiresistentes. Esta multiresistencia afectó principalmente a 5 agentes antibacterianos: tetraciclina, ampicilina, ácido nalidíxico, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol. Resultados similares han sido reportados con anterioridad en países en vías de desarrollo (43,111,112,113,114). Los niveles de resistencia más altos fueron frente a tetraciclina, ampicilina y ácido nalidíxico. También en países desarrollados se reportan altos niveles de multiresistencia; en un estudio realizado por Soler y cols. (115) en el periodo 2001-2003 en España, destaca la resistencia a 4 o más antimicrobianos en los serotipos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Hadar*. En otro trabajo realizado en Polonia entre los años 1998 y 1999 se reportan altos porcentajes de multiresistencia en cepas de *S. Typhimurium*, *S. Hadar* y *S. Virchow* (116). En Alemania, Miko y cols. (117) estudiaron la resistencia antimicrobiana en 25 serotipos de *Salmonella* diferentes, donde la resistencia más frecuente entre las cepas multiresistentes fue a estreptomina, tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim. En un trabajo reciente en Asia (Vietnam), más del 40% de las cepas de *Salmonella* estudiadas presentaron multiresistencia (144). Los altos niveles de multiresistencia reportados en estos estudios en diferentes regiones a nivel global demuestran la necesaria vigilancia de las cepas de *Salmonella* causantes de DV.

Los aislamientos de *Salmonella* causantes de gastroenteritis aguda también presentaron altos y similares niveles de multiresistencia. Pero en este trabajo debemos resaltar que la mayoría de las cepas correspondieron al serotipo *Typhimurium* DT 104, serotipo multiresistente cuyo patrón de resistencia encontrado ha sido descrito ampliamente (102,103,118,119). Este serotipo ha

emergido rápidamente en el mundo y se caracteriza por poseer resistencia cromosomal frente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamida y tetraciclina. Esta resistencia antimicrobiana encontrada en nuestras cepas fue analizada de forma más específica con la determinación de los mecanismos moleculares de resistencia frente a cada tipo de antimicrobiano:

fue analizada la resistencia a quinolonas en los aislamientos de *Salmonella* causantes de DV y los aislamientos de *Salmonella* causantes de gastroenteritis en Cuba. De este punto es importante destacar que además del aumento de los aislamientos de *S. Enteritidis* con respecto a *S. Typhimurium*, la resistencia al ácido nalidíxico en la mayoría de los estudios realizados hasta la actualidad es mayor también en *S. Enteritidis* que en *S. Typhimurium*. El aumento de los aislamientos de *S. Enteritidis* está relacionado con el consumo de alimentos contaminados, principalmente de aves y huevos donde este serotipo se aísla con frecuencia; y también con los viajes internacionales. Es frecuente el consumo de alimentos contaminados en viajeros cuyo destino son países en vías de desarrollo.

En las cepas de *Salmonella* causantes de DV estudiadas se encontraron 9 cepas resistentes al ácido nalidíxico, 7 de estas pertenecían al serotipo *Enteritidis* y las dos restantes fueron identificadas como *S. Virchow* y *S. Haifa*. En ocho de ellas, incluyendo todas las *S. Enteritidis*, presentaron una mutación en el codón 87 (Asp a Tyr), mientras, la otra cepa (*S. Haifa*) presentó la mutación en el codón 83 (Ser a Tyr). En las cepas de origen cubano no se detectó resistencia a quinolonas, sólo una cepa presentó resistencia intermedia y no se detectó ninguna mutación en la misma. En varios estudios se describe la gran cantidad de cepas de *S. Enteritidis* resistentes a quinolonas, principalmente al ácido nalidíxico. En un estudio hecho entre los años 1996 y 2003

por Stevenson y cols. (120) *S. Enteritidis* presentó el mayor porcentaje de resistencia frente al ácido nalidíxico, destacándose la preocupación por la resistencia al ácido nalidíxico del serotipo Enteritidis al relacionársele con los viajes internacionales. En este trabajo se encontraron mutaciones en el codón 83 de la QRDR *gyrA* (120). En otro estudio hecho en Dinamarca se informa del aumento de la resistencia a quinolonas por *S. Enteritidis* y se relaciona esta resistencia con los viajes al extranjero, debido a que se encuentra una mayor resistencia en las cepas aisladas de viajeros que en las cepas domésticas (121). En Korea, Choi y cols. (97) en el año 2005 reportan una mayor resistencia a quinolonas en cepas de *S. Enteritidis* de acuerdo con los resultados obtenidos en España y en los países de la comunidad europea. En nuestro trabajo también se detecta este aumento principalmente a partir del año 2000 en cepas de *S. Enteritidis* causantes de DV. Una de las causas de este aumento podría ser el amplio uso de las quinolonas en regiones como la India y América Central. Por otro lado contrastan los datos obtenidos en Finlandia donde la resistencia al ácido nalidíxico es más frecuente en *S. Typhimurium* (97). Choi y cols. (97) al analizar los mecanismos de resistencia detectaron mutaciones en los codones 87 (39 cepas) y 83 (4 cepas) de la QRDR de *gyrA*. En nuestro estudio obtuvimos resultados similares ya que la mayoría de las cepas resistentes presentaron una mutación en el codón 87. De todas las mutaciones relacionadas con la resistencia a quinolonas en microorganismos gram-negativos las más frecuentes son las que afectan al codón 83 del gen *gyrA*, sin embargo existen estudios realizados en *Salmonella spp.* donde han sido más frecuentes las mutaciones en el codón 87 del gen *gyrA* (40), como ha sucedido en nuestro trabajo.

Un aspecto a destacar es la sensibilidad disminuida a ciprofloxacina encontrada en las cepas resistentes al ácido nalidíxico, que coincide con muchos trabajos realizados anteriormente (97,98). Se conoce que la presencia de una sola mutación en el gen *gyrA* está asociada a un alto nivel de resistencia al ácido nalidíxico y tan solo una sensibilidad disminuida a las

fluoroquinolonas. Este dato también es muy importante si tenemos en cuenta que otra mutación tanto en *gyrA* como en otra diana (*parC*) puede llevar a una resistencia completa a fluoroquinolonas (40).

Tanto en las cepas causantes de DV, como en las cepas causantes de gastroenteritis se reportó resistencia a la ampicilina, β -lactámico de gran importancia clínica. Esta resistencia estuvo marcada por la presencia de β -lactamasas. Se detectó la presencia de β -lactamasas tipo CARB, TEM y OXA. En las cepas causantes de DV las responsables fueron las β -lactamasas tipo TEM principalmente y en las cepas cubanas las β -lactamasas tipo CARB. Varios estudios anteriores están de acuerdo con nuestros resultados (122,123,124,125). Las β -lactamasas tipo CARB se encontraron principalmente en cepas de *S. Typhimurium* DT 104, de este serotipo se conoce que la resistencia a ampicilina forma parte de su patrón de resistencia (ACSSuT) y que el gen que codifica para esta β -lactamasa es parte de una isla genómica de resistencia (SGII) (109,126).

En ambos grupos de cepas estudiadas es de destacar el alto porcentaje de resistencia intermedia encontrada frente a amoxicilina/ácido clavulánico. Muchos estudios realizados en diferentes países, confirman este hallazgo (107,127,128,129). Muchos mecanismos pueden explicar este fenómeno, entre los que se incluyen la disminución en la permeabilidad a los β -lactámicos como se ha demostrado en *E. coli* y la sobreexpresión de β -lactamasas en principio sensibles al ácido clavulánico. En este caso sucede que el ácido clavulánico no es suficiente para la gran concentración de diana, no pudiendo inhibirla por completo (130).

Los responsables de la resistencia a tetraciclina fueron los genes *tetA*, *tetB* y *tetG*. En las cepas causantes de DV la mayoría de los aislamientos resistentes a este antimicrobiano presentaron el gen *tetA*, mientras que en las cepas cubanas predominó el gen *tetG*. Este hecho se puede

relacionar con la gran variedad de serotipos en las cepas de DV, teniendo en cuenta el amplio origen geográfico de las muestras y el hecho de que las cepas cubanas la mayoría pertenecen al serotipo typhimurium DT 104. Así *tetA* estaría ampliamente distribuída entre diferentes serotipos y *tetG* se circunscribiría a *S. Typhimurium* DT 104. El grupo de genes detectados se ha descrito con anterioridad y están relacionados con mecanismos de bombas de expulsión (131). En comparación con estudios realizados en otros microorganismos como *Shigella* y *E. coli* de diferentes orígenes geográficos nuestros resultados no coinciden, debido a que en estos agentes el principal gen de resistencia a tetraciclina encontrado fue *tetB* (132). Otro estudio realizado por Soto y cols. (133) en España también reporta al gen *tetB* como el principal responsable de la resistencia a tetraciclina en *Salmonella* Wien. En un estudio realizado en cepas de *S. Typhimurium* DT 104 en Canadá se describe al gen *tetG* como el principal responsable de la resistencia a tetraciclina (131), coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestras cepas estudiadas de *S. Typhimurium* DT 104 causantes de gastroenteritis en Cuba. En este trabajo al igual que en el nuestro, el mecanismo de resistencia detectado se asocia con el perfil de resistencia característico de este serotipo, ubicado en una isla genómica de resistencia. (131)

La resistencia al cloranfenicol se debió a diferentes mecanismos: la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y la presencia de los genes de resistencia *floR* y *cmlA*. Aunque, en las cepas de origen cubano no se detectó la presencia de genes *cmlA*. En un estudio realizado por Arcangioli y cols. (134) en 86 cepas de *S. Typhimurium* DT 104 aisladas entre los años 1985-1995, se detectó resistencia a cloranfenicol en todas las cepas, 38 de ellas también mostraron resistencia a florfenicol. Los principales mecanismos involucrados en esta resistencia fueron la actividad enzimática CAT, característica de la familia *Enterobacteriaceae* y el gen *floR* relacionado con las bombas de expulsión.

Las cepas de *S. Typhimurium* DT 104 analizadas en nuestro trabajo también mostraron altos niveles de resistencia a cloranfenicol. En las cepas causantes de DV se encontró resistencia a cloranfenicol pero en un bajo porcentaje. Los resultados obtenidos en *S. Typhimurium* DT 104 con respecto al gen *floR* se corresponden con la literatura revisada. Este gen es muy importante en la resistencia a cloranfenicol. Si bien muchas cepas de *Salmonella* que presentan los genes de resistencia *CAT* o *cml* conllevan resistencia a cloranfenicol y no a florfenicol, el gen *floR* en *S. Typhimurium* DT 104 confiere resistencia a ambos antimicrobianos. Debido a esto, el uso veterinario de florfenicol puede comprometer el uso clínico del cloranfenicol en un tratamiento (135).

El gen *floR* en *S. Typhimurium* DT 104 se encuentra en una isla genómica de resistencia llamada SGI1. Esta isla así como variantes de la misma han sido descritas en *S. Typhimurium* fagotipo DT 120 y en otros serotipos, entre los que se encuentran; *S. Agona*, *S. Paratyphi*, *S. Albany* y *S. Newport*. En nuestras cepas causantes de DV se detectó la presencia de este gen en un aislamiento de *Salmonella* Kiambu. Lo que indica posiblemente la presencia de esta isla y confirma el potencial de transferencia horizontal de la misma en *S. Typhimurium* DT 104. El gen *floR* también ha sido identificado en plásmidos en cepas de *E. coli* (136).

En la actualidad se conocen diferentes mecanismos capaces de conferir resistencia al trimetoprim, siendo el más difundido la presencia de dihidrofolato reductasas resistentes a trimetoprim. Así hasta la actualidad se han descrito más de 20 enzimas diferentes. La mayoría de ellas codificadas en genes que se localizan en integrones con un mayor o menor grado de diseminación (137). En nuestro trabajo, en las cepas causantes de gastroenteritis en Cuba solo se detectó una cepa resistente a trimetoprim debido a la presencia del gen *dfrA1*. Sin embargo, en las cepas causantes de DV se detectaron 4 cepas resistentes. Esta resistencia se debió a los genes, *dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA14* y *dfrA17*. En un estudio realizado por Randall y cols. (138) se encuentran

resultados similares al no detectar ningún gen de resistencia a trimetoprim en cepas de *S. Typhimurium* y si en otros serotipos.

Es importante destacar que a pesar del amplio uso del trimetoprim en países en vías de desarrollo se encontró poca resistencia a este antimicrobiano, resultado que contrasta con los altos porcentajes de resistencia a trimetoprim encontrados en *Shigella* y *E. coli* diarreogénica (43,139,140).

En diferentes trabajos realizados con anterioridad por varios investigadores a nivel global tanto en cepas de *Salmonella* como en otras Enterobacterias, se describen una amplia variedad de genes *dfr* responsables de la resistencia a trimetoprim, entre los que podemos mencionar un estudio hecho por Guerra y cols. (141) donde describieron la presencia de los genes *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA14* y *dfrA17* en cepas de *S. Typhimurium* resistentes, genes que se encontraron en integrones ubicados en el DNA cromosomal y en integrones dentro de plásmidos transferibles y no transferibles. En otro estudio realizado por Guerra y cols. (142) en diferentes serotipos de *Salmonella* se reportan los genes *dfrA1* y *dfrA14*. Navia y cols. (137) reportan la dispersión intercontinental de una cepa de *Shigella flexneri* resistente a trimetoprim, portadora del gen *dfrA7*. Lee y cols. (143) en Korea describen a los genes *dfrA12* y *dfrA17* como los más frecuentes en cepas de *E. coli* resistentes.

Artículos 2, 3 y 4. La resistencia a aminoglicósidos es muy común también en las cepas de *Salmonella* y está asociada en gran medida a la resistencia al trimetoprim, debido a que los genes de resistencia a estos antimicrobianos a menudo están juntos en un mismo integrón. En las cepas causantes de diarrea del viajero encontramos 5 genes de resistencia a aminoglicósidos, *aadA2*, *aadA5*, *aadB*, *aadA7* y *aac(3)-Id*. Mientras que en las cepas cubanas causantes de gastroenteritis se detectó la presencia del gen *aadA2* en la mayoría de las cepas, y solo en una cepa se encontraron a la vez los genes *aadB* y *aadA2*. Analizando la gran variedad de genes de

resistencia a aminoglicósidos descritos en la bibliografía (141,142,144,145) observamos que no hay una clara prevalencia de uno u otro, aunque en referencia al gen *aadA2* que se encontró en la totalidad de las cepas de *S. Typhimurium* podemos destacar que tanto en Asia (Vietnam), como en países europeos y en Estados Unidos se reporta como el más frecuente (138,144).

Se realizó el análisis del gen *aac(3)-Id* detectado dentro de un integrón Clase 1 en una cepa de *S. Haifa* con sensibilidad disminuida a gentamicina. Este gen fue clonado y expresado, y los resultados obtenidos a partir de este experimento demostraron que confería resistencia a gentamicina C_{1a}, gentamicina C₁ y dactimicina correspondiéndose con la presencia de una enzima tipo AAC(3)I, aunque, fue sensible a sisomicina un aminoglicósido considerado un sustrato de este tipo de enzimas. Hasta la actualidad se han descrito 5 genes que codifican para acetilasas tipo AAC(3)I (*aac(3)-Ia*, *aac(3)-Ib*, *aac(3)-Ic*, *aac(3)-Id* y *aac(3)-Ie*). Al comparar las enzimas que conforman este grupo comprobamos que existe cierta homología aminoacídica entre ellas. AAC(3)-Id presenta una homología del 50%, 45% y 44% con AAC(3)-Ic, AAC(3)-Ia y AAC(3)-Ib, respectivamente (146). Riccio y cols. (147) describieron una homología en la enzima AAC(3)-Ic del 59% y el 57% con respecto a las enzimas AAC(3)-Ia y AAC(3)-Ib. En nuestro trabajo encontramos que la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la acetilasa analizada en la cepa de *S. Haifa* tenía una homología del 100% con las enzimas AAC(3)-Id y AAC(3)-Ie, mientras que con las demás fue menor. Las características fenotípicas de la cepa analizada (sensibilidad disminuída a gentamicina y sensibilidad a sisomicina) en un principio nos hicieron sospechar de la presencia de un nuevo de gen de resistencia a aminoglicósidos. Sin embargo, el estudio genético nos desveló que estábamos en presencia de una enzima AAC(3)-Id que ha sido descrita con anterioridad en *Salmonella entérica* serovar Newport. Finalmente, destacamos de este estudio el hecho de haber sido encontrado el gen *aac(3)-Id* en *S. Haifa* a nuestro parecer descrito por primera vez en este serotipo y la importancia de estar ubicado en un integrón clase

1, debido a la importancia de estos elementos genéticos en la adquisición y diseminación de genes de resistencia.

Precisamente un aspecto importante de nuestro trabajo fue la identificación de integrones clase 1 en ambos grupos de cepas. Los integrones no son móviles por si mismos pero con frecuencia se hayan en transposones que a su vez se encuentran en plásmidos conjugativos, por lo que su movilidad horizontal está asegurada, como se constata por su amplia difusión en las bacterias. (31). En estudios previos realizados en diferentes regiones se reportan altos porcentajes de cepas de *Salmonella* con integrones, similares a los descritos en España, Reino unido y China (142,148,149). Independientemente del serotipo de *Salmonella* a analizar, en la bibliografía revisada hasta la actualidad hemos observado que los genes de resistencia más frecuentes en integrones son aquellos que originan resistencia a trimetoprim, aminoglicósidos y β -lactámicos. De las cepas de *Salmonella* causantes de DV, cuatro portaban integrones clase 1, que contenían principalmente genes de resistencia a aminoglicósidos y trimetoprim. Lo cual se corresponde con la literatura consultada. Los serotipos que presentaban estos genes fueron *S. Kiambu*, *S. Goldcoast*, *S. Virchow* y *S. Haifa*. Aquí debemos resaltar en primer lugar la cepa de *S. Kiambu* que portaba dos integrones conteniendo los genes *aadA2* y *carb2*, que han sido descritos en diferentes serotipos de *Salmonella*, tales como, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Paratyphi B* y *S. Albany* como se ha indicado anteriormente. Estos integrones han sido localizados en la isla genómica de resistencia SGI1 (75,105,126), lo cual sugiere que nuestra cepa también porta esta isla genómica. En segundo lugar la cepa de *S. Haifa* en la cual se describe por primera vez el gen *aac(3)-Id* que porta resistencia a aminoglicósidos y en tercer lugar el hecho de que por primera vez se detecta la presencia de integrones clase 1 en *S. Goldcoast*, resultado confirmado al no encontrar en la literatura científica ninguna mención al respecto. En las cepas cubanas causantes

de gastroenteritis detectamos integrones clase 1 en 17 cepas que pertenecieron a los serotipos *S. Typhimurium*, *S. Agona* y *Salmonella* Senftenberg. Los principales genes de resistencia encontrados fueron *aadA2* y *carb2*. Al ser la mayoría de las cepas *S. Typhimurium* DT 104 es fácil justificar este hallazgo debido a que como habíamos comentado con anterioridad estos genes forman parte de SGI1 típica de *S. Typhimurium* DT 104. El hecho de que nuestras cepas fueron aisladas de diferentes orígenes geográficos y la gran cantidad y variedad de integrones encontrados en ellas demuestran la amplia diseminación de estos elementos genéticos, convirtiendo a los mismos en un gran problema en el tratamiento de las infecciones bacterianas. Una vez analizados y discutidos los resultados de este estudio podemos concluir que la vigilancia de las cepas de *Salmonella* resistentes es muy importante porque nos permite contar con información actualizada de los niveles de resistencia y los mecanismos moleculares de resistencia presentes en las mismas y así, poder mejorar el tratamiento y desarrollar nuevas estrategias para prevenir y limitar su diseminación.

5) Conclusiones

1. *Salmonella* Enteritidis es el serotipo más frecuentemente aislado como causa de DV.
2. En las cepas causantes de gastroenteritis en Cuba el serotipo más frecuentemente aislado fue *Salmonella* Typhimurium DT 104, describiéndose por primera vez en Cuba la presencia de este serotipo.
3. Nuestros resultados mostraron la diseminación de un clon multiresistente de *S. Typhimurium* DT 104 en todo el país, así como la diseminación de un clon sensible de *S. Agona* en dos regiones diferentes.
4. Se encontraron altos niveles de resistencia a: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y espectinomicina. Los mayores porcentajes de resistencia obtenidos fueron frente a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol.
5. En la mayoría de aislamientos clínicos la resistencia a quinolonas (ácido nalidíxico) se debió a mutaciones en el gen *gyrA*, específicamente en el codón 87.

6. La resistencia a β -lactámicos (ampicilina) estuvo marcada por la presencia de β -lactamasas, tipo CARB y TEM. En las cepas causantes de DV predominaron las β -lactamasas tipo TEM y en las cepas cubanas predominaron las β -lactamasas tipo CARB.

7. La resistencia a tetraciclina implicó a varios genes de resistencia: *tetA*, *tetG* y *tetB*. En las cepas causantes de DV predominó el gen *tetA* y en las cepas de origen cubano el gen *tetG*.

8. Las cepas resistentes al cloranfenicol en general mostraron diferentes mecanismos de resistencia tales como, actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y la presencia de los genes de resistencia *cmIA* y *floR*. En las cepas causantes de gastroenteritis en Cuba el gen *floR* fue el principal responsable.

9. Los genes *dfp* fueron los responsables de la resistencia a trimetoprim. No se observó predominio de ninguno, tanto en las cepas causantes de DV, como en las cepas cubanas.

10. Se detectó la presencia de integrones clase 1 en ambos grupos de cepas estudiadas. Estos contenían principalmente genes de resistencia a

aminoglicósidos y trimetoprim. Se detectó por primera vez la presencia de integrones en *S. Goldcoast*.

11. Se detectó por primera vez la presencia de la enzima AAC(3)-Id en una cepa de *S. Haifa*.

12. El elevado número de cepas de diferentes orígenes geográficos que contienen integrones, demuestra la amplia diseminación de estos elementos genéticos. En la actualidad, la gran variedad de viajes internacionales facilita la diseminación de cepas multiresistentes lo que conlleva un gran problema para la salud pública.

13. Se debe mantener la vigilancia de estos microorganismos para tener información de los niveles de resistencia ayudando así a mejorar el tratamiento y desarrollar estrategias para prevenir la diseminación de la resistencia.

6) Bibliografía

1. **WHO.** 2005. Drug-resistant *Salmonella*. No 139: 1-4.
2. **Gascón J.** 2006. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion.* 73: 102-108.
3. **Mandel, G.L., J.E. Bennett, R. Dolin.** Principle and practice of infections diseases. 6 edition. Vol 2. 2005. Elsevier Inc. 2636-2650.
4. **Murray, P.R., E.J. Baron, J.H., Jorgensen, M.A. Pfaller, R.H. Tenover, T.H. Tenover.** Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. ASM Press. Washington DC. 2003: 663-667.
5. **Popof, M.Y.** Institute Pasteur/Elsevier. Supplement 1995 (no.39) to the Kauffmann-White scheme. *Rev. Microbiol.* 1996; 147: 765-769.
6. **Kanjilal, S.D., A. Dutta, R.K. Mondal, S. Chakravorti.** 2006. Uncomplicated falciparum malaria complicated by *Salmonella* septicaemia: cause not coincidence. *J. Indian Med. Assoc.* 104: 646-648.
7. **Hung, C. C., M.N. Hung, P.R. Hsueh, S.Y. Chang, M.Y. Chen, S.M. Hsieh, W.H. Sheng, H.Y. Sun, Y.T. Huang, Y.C. Lo, C.F. Hsiao, S.C. Chang.** 2007. Risk of recurrent nontyphoid *Salmonella* bacteremia in HIV-infected patients in the era of highly

active antiretroviral therapy and an increased trend of fluoroquinolone resistance. Clin. Infect. Dis. 45: 60-67.

8. **Lambertucci, R.C., J.C. Serufo, R. Gerspacher-Lara, A.A.M. Rayes, R. Teixeira, V. Nobre, C.M.F. Antunes.** 2000. *Schistosoma mansoni*: assesment of morbidity before and after control. Acta. Trop. 77: 101-109.
9. **Mootsikapum, P.** 2007. Bacteriemia in adult patients with acquired immunodeficiency syndrome in the northeast of thailand. Int. J. Infect. Dis. 11: 226-231.
10. **Casado, J.L, S. Valdezate, C. Calderón, E. Navas, B. Frutos, A. Guerrero, J. Martínez-Beltrán.** 1999. Zidovudine therapy protects against *Salmonella* bacteremia recurrence in human immunodeficiency virus-infected patients. J. Infect. Dis. 179: 1553-1556.
11. **Nataro, J.P., J.B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-201.
12. **Snyder, L., and W. Champness.** 1997. Molecular genetics of bacteria. Washington DC: ASM Press.
13. **Grinsted, J. and P.M. Bennet.** 1988. Plasmid technology. Londres. Academic Press.

14. **Rice, L.B. and L.L. Carias.** 1998. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 180: 714-721.
15. **Hardy, K.** 1986. *Bacterial plasmids*. Washington DC: ASM Press.
16. **Koehler, T.M.** 2002. *Bacillus anthracis* genetics genetics and virulence gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 271: 143-164.
17. **Novick, R.P.** 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51: 381-395.
18. **Chalmers, S. N. and N. Kleckner.** 1994. Tn10/IS10 transposase purification, activation, and in vitro reaction. *J. Biol. Chem.* 269: 8029-8035.
19. **Refnikoff W. S.** 1993. The Tn5 transposon. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 945-963.
20. **Mahillon J. and Chandler M.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 725-774.
21. **Courvalin, P. and C. Carlier.** 1987. Tn1545: A conjugative shuttle transposon. *Mol. Gen. Genet.* 206: 259-264.
22. **Sabaté, M, F. Navarro, E. Miró, S. Campoy, B. Mirelis, J. Barbé, G. Prats.** 2002. novel complex Sull1-type integron in *Escherichia coli* carrying bla_{CTX-M-9}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2656-2661.

23. **White, P. A., C. J. McIver, W.D. Rawlison.** 2001. integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 2658-2661.
24. **Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, D. Mazel.** 1999. Super-integrons. *Res. Microbiol.* 150: 641-651.
25. **Rosser, S. J. and H. K. Young.** 1999. Identification and characterization of Class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J. antimicrob. Chemother.* 44: 11-18.
26. **Recchia, G. D. and R. M. Hall.** 1995. Gene cassettes: A new Class of Mobile elements. *Microbiology.* 141: 3015-3027.
27. **Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato, M. Ohta.** 1995. a novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1612-1615.
28. **Clark, C. A., L. Purins, P. Kaewrakon, T. Focareta, P. A. Maning.** 2000. The *Vibrio Cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology.* 146: 2605-2612.
29. **Nield, B. S., A. J. Holmes, M. R. Gillings, G. D. Recchia, B. C. Mabbutt. K. M. Nevalainen, H.W. Stokes.** 2001. Recovery of new integrons classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 59-65.

30. **McIver, C.J., P.A. White, L.A. Jones, T. Karagiannis, J. Harkness, D. Marriott, W.D. Rawlinson.** 2002. Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1538-1540.
31. **Sabaté, M., and G. Prats.** 2002. Structure and function of integrons. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20: 341-345.
32. **Mantri, Y. and K. Williams.** 2004. Islander: a database of integrative islands in prokaryotic genomes, the associated integrases and their DNA site specificities. *Nucleic. Acids. Res.* 32: 55-58.
33. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, H. Tschape.** 1997. Pathogenicity Islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23: 1089-1097.
34. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 414-424.
35. **Osborn, A. M. and D. Boltner.** 2002. When phage, plasmids and transposons collide: genomics islands, and conjugative and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid.* 48: 202-212.
36. **Georgopapadacou, N. H.** 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2045-2053.

37. **Livermore, D. M.** 1996. Beta.-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. A Lorian, V. (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. 4a ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 505-578.
38. **Lescher, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, R. P. Brundage.** 1962. 1,8-naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapy agents. J. Med. Pharm. Chem. 5: 1063-1065.
39. **Acar, J. F. and F. W. Goldstein.** 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. Clin. Infect. Dis. 24: 67-73.
40. **Ruiz, J.** Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia. 55. 2004.
41. **Park, C.H., A. Robicsek, G.A. Jacoby, D. Sahm, D.C. Hooper.** 2006. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 3953–3955
42. **Ruiz, J.** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: targets alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J. Antimicrob. Chemother. 51: 1109-1117.
43. **Vila, J., M. Vargas, J. Ruiz, M. Corachan, M. T. Jiménez de Anta.** 2000. Quinolone resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* causing diarrhea in travelers to India in

comparison with travelers to others geographical areas. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1731-1733.

44. **Nakamura, S., M. Nakamura, T. Kojima, H. Yoshida.** 1989. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 254-255.
45. **Friedman S., T. Lu, K. Drlica.** 2001. Mutation in the DNA gyrase A gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone-resistant determining region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2378-2380.
46. **Griggs, D., K. Gensber, L. J. V. Piddock.** 1996. Mutation in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from human and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1009-1013.
47. **Piddock, L. J. V., V. Ricci, I. McLaren, D. J. Griggs.** 1998. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 635-641.
48. **Cohen, S. P., L. McMurry, D. C. Hoopper, J. S. Wolfson, S. B. Levy.** 1989. Cross resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistance (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane change in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1318-1325.

49. **Nishino, K. and A. Yamaguchi.** 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporters genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183: 5803-5812.
50. **Sáenz, Y., J. Ruiz, M. Zarazaga, M. Teixidó, C. Torres, J. Vila.** 2004. effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. J. antimicrob. Chemother. 53: 544-545.
51. **Martínez-Martínez, L., A. Pascual, G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 351: 797-799.
52. **Tran, J. H. and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanisms of plasmid mediated quinolone resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 5638-5642.
53. **Ince, D. and D. C. Hooper.** 2003. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. J. Bacteriol. 23: 6883-6892.
54. **Waskaman, S. A. 1943.** Production and activity of streptomycin. J. Bacteriol. 46: 299-310.
55. **Rienhart, K. W. J. and T. Suami.** 1980. Aminocyclitol antibiotics. ACS symposium series 125. American chemical Society. 133-144.

56. **Magnet, S., P. Courvalin, T. Lambert.** 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 465-470.
57. **Buckel, P., A. Bucherger, A. Bock, H. G. Witman.** 1977. Alteration of ribosomal protein L6 in mutants *E. coli* resistant to gentamicin. *Mol. Gen. Genet.* 158: 47-54.
58. **Azucena, E. and S. Mobashery.** 2001. Aminoglycoside modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist. Update.* 4: 106-117.
59. **Davies, J. and B. D. Davis.** 1968. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem.* 243: 3312-3316.
60. **Cundliffe E.** 1990. Recognition sites for antibiotic within rRNA. A: Hill, W. E., Moore P. B., Dahlberg A., Schlessinger D., Garret R. A., Warner J. R. (ed.) *The ribosome: structure, function, and evolution.* Washington D. C: American Society for Microbiology. 479-490.
61. **Kotra, L.P., J. Hadad, S. Mobashery.** 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3249-3256.
62. **Pramananam, T., P. Sander, B. A. Brown, K. Frischkorn, G. O. Onyi, Y. Zhang, E. Bottger, R. J. Wallace.** 1998. A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible

for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. J. Infect. Dis. 177: 1573-1581.

63. **Galimand, M., P. Courvalin, T. Lambert.** 2003. Plasmid-mediated high-level resistant to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2565-2571.
64. **Ehrlich, J., Q. R. Bartz, R. M. Smith.** 1947. Chloromycetin; a new antibiotic from a soil actinomycete. Science. 106: 417.
65. **Goldberg, I. H.** 1965. Mode of action of antibiotic. II: Drugs affecting nucleic acid and proteins synthesis. Am. J. Med. 39: 722-752.
66. **Okamoto, S., D. Mizuno.** 1964. Mechanisms of chloramphenicol and tetracycline resistance in *Escherichia coli*. Gen. Microbiol. 35: 125-133.
67. **Okamoto, S. and Y. Suzuki.** 1965. Chloramphenicol dihydrostreptomycin- and kanamycin-inactivating enzymes from multiple drug-resistant *Escherichia coli* carrying episome R. Nature. 208: 1301.
68. **Butaye, P., A. Cloeckaert, S. Schwarz.** 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Int. J. Antimicrob. Agents. 22 : 205-210.

69. **Rubens, C. E., W. F. McNeil, W. E. Farrar Jr.** 1979. Transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequence in *Pseudomonas aeruginosa* which mediates resistance to gentamicin and four other antimicrobial agents. *J. Bacteriol.* 139: 877-882.
70. **Stokes, H. W. and R. M. Hall.** 1991. Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation. *Plasmid.* 26: 10-19.
71. **George, A. M. and R. M. Hall.** 2002. Efflux of chloramphenicol by the CmlA1 protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 209-213.
72. **Kim, E. and T. Aoki.** 1996. Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R plasmid from a fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *Microbiol. Immunol.* 40: 665-669.
73. **Arcangioli, M. A., S. Leroy-Setrin, J. L. Martel, E. Chaslusdancla.** 1999. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene linked to an integron structure in *Salmonella typhimurium* DT 104. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 327-332.
74. **Kim, S.** 2003. Genbank accession no. AY339985.
75. **Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckert, K. Sidi Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, M. R. Mulvey.** 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase

genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J. Bacteriol. 183: 5725-5732.

76. **White, D. G., C. Hudson, J. J. Maurer, S. Ayers, S. Zhao, M. D. Lee, L. Bolton, T. Foley and J. Sherwood.** 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. J. Clin. Microbiol. 38: 4593-4598.
77. **Bischoff, K. M., D. G. White, P. F. McDermott, S. Zhao, S. Gaines, J. J. Maurer and D. J. Nisbet.** 2002. Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. J. Clin. Microbiol. 40: 389-394.
78. **Keyes, K., C. Hudson, J. J. Maurer, S. Thaye, D. G. White and M. D. Lee.** 2000. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* from sick chickens. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 421-424.
79. **Blickwede, M. and S. Schwarz.** 2004. Molecular analysis of florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs. J. Antimicrob. Chemother. 53: 58-64.
80. **McMurray, L. M., A. M. George, S. B. Levy.** 1994. Active efflux of chloramphenicol in susceptible *Escherichia coli* strains and in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 542-546.

81. **Lee, A., W. Mao, M. S. Warren, A. Mistry, K. Hoshimo, R. Okumura, H. Ishida, O. Lomovskaya.** 2000. Interplay between efflux pump may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J. Bacteriol.* 182: 3142-3150.
82. **Edgar, R. and E. Bibi.** 1997. MdfA, and *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J. Bacteriol.* 179: 2274-2280.
83. **Mosher, R. H., D. J. Camp, K. Yang, M. P. Brown, W. V. Shaw, L. C. Vining.** 1995. Inactivation of chloramphenicol by *O*-phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 27: 27000-27006.
84. **Mosher, R. H., N. P. Ranade, H. Schrempf, L. C. Vining.** 1990. Chloramphenicol resistance in *Streptomyces*, cloning and characterization of a chloramphenicol hydrolase gene from *Streptomyces venezuelae*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 293-301.
85. **Schwarz, S., C. Werckenthin, C. Kehrenberg.** 2000. Identification of a plasmid-borne Chloramphenicol/florfenicol resistance gene in *Staphylococcus Sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2530-2533.
86. **Schwarz, S., C. Kehrenberg, B. Doublet, A. Cloeckaert.** 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol.* 28: 519-542.

87. **Greenwood, D.** 2003. Sulphonamides. A: Finch R. G., Greenwood D., Norby S. R. Whitley R. J. Antibiotic and chemotherapy. 8a ed. Filadelfia. Churchill Livingstone. 385-392.
88. **Zinner S. H. and K. H. Mayer.** 2000. sulphonamide and trimethoprim. A: Mandell G. L., Bennet J. E., Dolin R. (ed.) Principles and practice of infectious diseases. 5a ed. Nova York: Churchill Livingstone. 3492-4004.
89. **Jonsson, M., K. Strom, G. Swedberg.** 2003. Mutations and horizontal transmission have contributed to sulphonamide resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Microb. Drug Resist.* 9: 147-153.
90. **Huovinen, P.** 2001. Resistance to trimetoprim-sulphametoxazole. *Clin. Infect. Dis.* 32 : 1608-1614.
91. **Chopra, I. and M. Roberts.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 232-260.
92. **Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe.** 1998. 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1702-1705.

93. **Trieber, C. A. and D. E. Taylor.** 2002. Mutations in the 16S Rrna genes of *Helicobacter pylori* mediated resistance to tetracycline. *J. Bacteriol.* 184: 2131-2140.
94. **Juckett G.** 1999. Prevention and treatment of traveler's diarrhea. *Am. Fam. Physician.* 60: 119-36.
95. **Vila, J., J. Gascón, S. Abdalla, J. Gómez, A. Moreno, M, Corachán, M.T. Jiménez de Anta.** 1993. Antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* isolates in traveler's diarrhea. *J. Travel Med.* 2: 45-47.
96. **Yates J.** 2005. Tarveler's diarrhea. *Am. Fam. Physician.* 71: 2095-2100.
97. **Choi, SH., J.H. Woo, J.E. Lee, S.J. Park, E.J. Choo, Y.G. Kwak, M.N. Kim, M.S. Choi, N.Y. Lee, B.K. Lee. N.J. Kim, J.Y. Jeong, J. Ryu, Y.S. Kim.** 2005. Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 1111-1114.
98. **Soto, S.M., M.A. González-Hevia, M.C. Mendoza.** 2003. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, intregrons, plasmids and genetic types. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1287-1291.

99. **Hakanen, A., P. Kotilainen, P. Huovinen, H. Helenius, A. Siitonen.** 2001. Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 996-1003.
100. **Gutiérrez-Cogco L., E. Montiel-Vázquez, P. Aguilera Pérez, M.C. González Andrade.** 2000. Serotipos identificados en los servicios de salud de México. *Salud pública de México.* 42: 490-495.
101. **Tavechio, A.T., A.C. Ghilardi, J.T. Peresi, T.O. Fuzihara, E.K.M. Yonamine, S.A. Fernández.** 2002. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in Brazil, from 1996 through 2000. *J. Food Prot.* 65: 1041-1044.
102. **Threlfall, E.J.** 2000. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104-a truly international multiresistant clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 7-10.
103. **Baggesen D.L., D. Sandvang, F.M. Aarestrup.** 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1581-1586.
104. **Martin, L.J., M. Fyfe, K. Dore, J.A. Buxton, F. Pollari, B. Henry, D. Middleton, R. Ahmed, F. Jamieson, B. Ciebin, S.A. McEwen, J.B. Wilson.** 2004. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. *J. Infect. Dis.* 189: 377-384.

105. **Meunier, D., D. Boyd, M.R. Mulvey, S. Baucheron, C. Mammina, A. Nastasi, E. Chaslus-Dancla, A. Cloeckaert.** 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 antibiotic resistance genomic island I in serotype paratyphi B. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 430-433.
106. **Boyd, D., A. Cloeckaert, E. Chaslus-Dancla, M.R. Mulvey.** 2002. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1714-1722.
107. **Valdezate, S., A. Echeíta, R. Díez, M.A. Usera.** 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic markers for characterization of the emerging gastroenteritis pathogen *Salmonella hadar*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 275-281.
108. **Cruchaga, S., A. Echeíta, A. Aladueña, J. García-Peña, N. Frias, M.A. Usera.** 2001. Antimicrobial resistance in *Salmonella* from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 315-321.
109. **Carattoli, A., E. Filetici, L. Villa, A.M. Dionisi, A. Ricci, I. Luzzi.** 2002. Antibiotic resistance genes and *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2821-2828.
110. **Poirel, L., M. Guibert, S. Bellais, T. Naas, P. Nordmann.** 1999. Integron- and Carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates

of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 104 from French patients. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1098-1104.

111. **Graham, S.M., A. L. Walsh, E.M. Molyneux, A.J. Phiri, and M.E. Molineux.** 2000. Clinical presentation of non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia in Malawian children. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94:310-314.
112. **Isenbarger, D.W., C.W. Hoge, A. Srijan, C. Pitarangsi, N. Vithayasai, L. Bodhidatta, K. W. Hickey, and P. Dac Cam.** 2002. Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996–1999. Emerg. Infect. Dis. 8:175-180.
113. **Mwansa, J., K. Mutela, I. Zulu, B. Amadi, and P. Kelly.** 2002. Antimicrobial sensitivity in enterobacteria from AIDS patients, Zambia. Emerg. Infect. Dis. 8:92-93.
114. **Shapiro, R.L., L. Kumar, P. Phillips-Howard, J.G. Wells, P. Adcock, J. Brooks, M. L. Ackers, J.B. Osheng, E. Mintz, S. Wahlquist, P. Waiyaki, and L. Slutsker.** 2001. Antimicrobial resistance bacterial diarrhea in rural Western Kenya. J. Infect. Dis. 183:1701-1704.
115. **Soler, P., R. González-Sanz, M.J. Bleda, G. Hernández, A. Echeíta, M.A. Usera.** 2006. Antimicrobial resistance in non-typhoidal *Salmonella* from human sources, Spain, 2001-2003. J. Antimicrob. Chemother. 58: 310-314.

116. **Szych, J., A. Ciéslik, J. Paciorek, S. Katuzewski.** 2001. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 18: 37-42.
117. **Miko, A., K. Pries, A. Schroeter, R. Helmuth.** 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistance serovars of salmonella enterica isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 1025-1033.
118. **Lawson, A.J., M. Desai, S.J. O'Brien, R.H. Davies, L.R. Ward, E.J. Threlfall.** 2004. Molecular characterization of an outbreak strain of multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 in the UK. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 143-147.
119. **Biendo, M., G. Laurans, D. Thomas, B. Canarelli, F. Hamdad-Daoudi, F. Rousseau, S. Castelain, F. Eb.** 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.
120. **Stevenson, J.E., K. Gay, T.J. Barret, F. Medalla, T.M. Chiller, F.J. Angulo.** 2007. Increase in nalidixic acid resistance among Non-typhi *Salmonella enterica* isolates in the United States from 1996 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 195-197.
121. **Molbak, K., P. Gerner-Smidt, H.C. Wegenert.** 2002. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 514-515.

122. **Bush, K.** 2001. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1085-1089.
123. **Gallardo, F., J. Ruiz, F. Marco, K. J. Towner, and J. Vila.** 1999. Increase in incidence to 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.* 48: 367-374.
124. **Roy, C., A. Foz, C. Segura, M. Tirado, C. Fuster, and R. Reig.** 1983. Plasmid determined β -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 12: 507-510.
125. **Walker, R. A., E. Lindsay, M. J. Wooward, L. R. Ward, and J. Threlfall.** 2001. Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage-type U302 (MR U302) from humans, animals, and foods. *Microb. Drug Resist.* 7: 13-21.
126. **Doublet, B., R. Lailier, D.Meunier, A.Brisabois, D.Boyd, M.R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, A. Cloeckaert.** 2003. Variant *Salmonella* genomic island 1 resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 585-591.
127. **Navia, M.M., J. Ruiz, J. Sánchez Céspedes, J. Vila.** 2003. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46: 295-298.

128. **Espinase, F., R. Gheorghiu, A. Poiata, R. Labia, M.H. Nicolas-Chanoine.** 1997. Reduced susceptibility to co-amoxiclav in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in Romania between 1985 and 1993. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 103-106.
129. **Ruiz, J., M.M. Navia, F. Marco, J. Vila.** 2004. Mecanismos de resistencia a betalactámicos y ácido nalidíxico en aislados clínicos de *Salmonella enterica* serotipo *Hadar* y *Bsilla*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22: 252-253.
130. **Reguera, J.A., F. Baquero, J.C. Pérez-Díaz, J.L. Martínez.** 1991. Factors determining resistance to β -lactam combined with β -lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 569-573.
131. **Ng, L.K., I. Martin, M. Alfa, M. Mulvey.** 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes.* 15: 209-215.
132. **Hartman, A. B., I. I. Essiet, D. W. Isenbarger, and L. E. Linder.** 2003. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. An enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of Tet (A)-1. *J. Clin. Microbiol.* 41:1023-1032.
133. **Soto, S.M., M. Cruz Martín, M. C. Mendoza.** 2003. Distinctive human and swine strains of *Salmonella enterica* serotype Wien carry large self-transferable R-plasmids. A

plasmid contains a class 1-qacE Δ 1-Su11 integron with the dfrA1-aadA1a cassette configuration. **Food Microbiol.** 20: 9-16.

134. **Arcangioli, M.A., S. Leroy-Setrin, J.L. Martel, E. Chaslus-Dancla.** 2000. Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella typhimurium* strains implicates definitive phage type (DT) 104. *J. Med. Microbiol.* 49: 103-110.
135. **Bolton, L.F., L.C. Kelley, M.D. Lee, P.J. Fedorka-Cray, J.J. Maurer.** 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT 104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1348-1351.
136. **Schwarz, S., C. Kehrenberg, B. Doublet, A. Cloeckaert.** 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol.* 28: 519-542.
137. **Navia, M.M., J. Ruiz, J.Vila.** 2003. Intercontinental spread of a trimethoprim-resistant strain of *Shigella flexneri*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21: 401-403.
138. **Randall, L.P., S.W. Cooles, M.K. Osborn, L.J.V. Piddock, M.J. Woodward.** 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 208-216.

139. **Vila, J., J. Gascón, S. Abdalla, J. Gómez, A. Moreno, M. Corachán, and M. T. Jimenez de Anta.** 1994. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates causing traveler's diarrhoea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2668-2670.
140. **Vila, J., M. Vargas, J. Ruiz, M. Espasa, M. Pujol, M. Corachán, M. T. Jiménez de Anta, and J. Gascón.** 2001. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated to traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. *J. Med. Microbiol.* 50:996-1000.
141. **Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth, M.C. Mendoza.** 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug Res.* 10: 83-91.
142. **Guerra, B., S. Soto, S. Cal, M.C. Mendoza.** 2000. Antimicrobial resistance and spread of Class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2166-2169.
143. **Lee, J.C., J.Y. Oh, J.W. Cho, J.C. Park, J.M. Kim, S.Y. Seol, D.T. Cho.** 2001. The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 599-604.
144. **Vo, A.T.T., E. van Duijkeren, A.C. Fluit, W. Gaastra.** 2007. Antimicrobial resistance, class 1 integrons and a novel variant of genomic island in a *Salmonella* isolates from Vietnam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **(En prensa)**

145. **Murphy, B.P., R. O'Mahony, J.F. Buckley, P. Shine, E.F. Boyd. D. Gilroy, S. Fanning.** 2007. Investigation of a global collection of nontyphoidal *Salmonella* of various serotypes cultured between 1953 and 2004 for the presence of class 1 integron. *FEMS Microbiol. Lett.* 266: 170-176.
146. **Ahmed, A. M., T. Nakagawa, E. Arakawa, T. Ramamurthy, S. Shimoda, and T. Shimamoto.** 2004. New aminoglycoside acetyl transferase gene, *aac(3)-Id*, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 month. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 947-951.
147. **Riccio, M. L., J. D. Docquier, E. Dell'Amico, F. Luzzaro, G. Amicosante, and G. M. Rossolini.** 2003. Novel 3-N-Aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1746-1748.
148. **Randall, L. P., S. W. Cooles, M. K. Osborn, L. J. V. Pidock, and M. J. Woodward.** 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:208–216.
149. **Zhang, H., L. Shi, L. Li, S. Guo, X. Zhang, S. Yamazaki, S. Miyoshi, and S. Shinoda.** 2004. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. *Microbiol. Immunol.* 48: 639–645.

