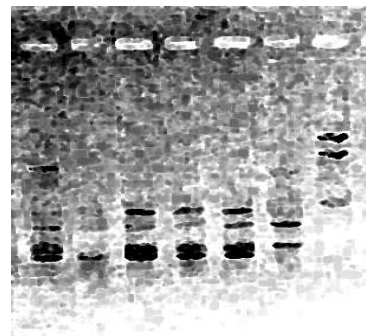
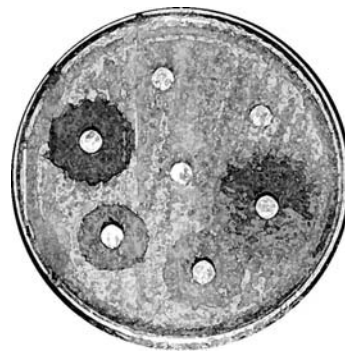
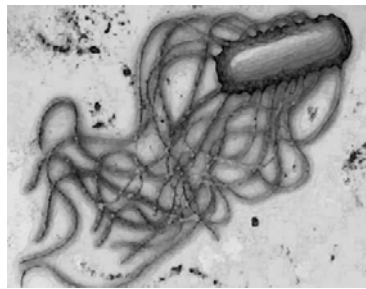


Epidemiología molecular y mecanismos
de resistencia antimicrobiana en cepas de
Salmonella spp aisladas en el Nordeste Argentino



Luis A. Merino



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura
Carrera de Doctorado de la U.N.N.E. en la especialidad Bioquímica

Tesis para acceder al Grado de
Doctor en Bioquímica

Autor

Bioq. Luis A. Merino

Director

Dr. Jordi Vila Estape
(Universidad de Barcelona - España)

Co-Director

Bioq. José Mario Alonso
(Universidad Nacional del Nordeste - Argentina)

Corrientes - Argentina
Año 2006

Copyright © 2006 por Luis A. Merino
Todos los derechos reservados

Todas las fotografías son propiedad del autor y podrán ser utilizadas sin autorización previa
mencion de la fuente.

Dedicado a:

mis padres

mi esposa

mis hijos

Mi sincero y profundo agradecimiento a ...

... Adriana Cacciamani, Norma B. Cech, Graciela P. Esquivel, Norma S. Lodeiro, Liliana S. Lösch, María C. Monzón, Ana María Pato y Silvia B. Pellegrino por facilitarme de manera desinteresada los aislamientos utilizados en esta tesis,

... Fundación "Alberto J. Roemmers", Secretaría General de Ciencia y Técnica de la U.N.N.E. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica por brindarme apoyo económico sin el cual nada de esto hubiera sido posible.

... Jordi Vila Estape por su apoyo y por haber aceptado la dirección de esta tesis desde el otro lado del Atlántico.

... José M. Alonso por sus consejos oportunos y su paciencia en la lectura y corrección de todos y cada uno de los renglones de esta tesis.

... Joaquim Ruiz, Josep M. Sierra y Margarita M. Navia del Hospital Clínic i Provincial (Barcelona) por acogerme en su lugar de trabajo y hacerme sentir como en mi propia casa.

... María I. Caffer, Mariana Pichel, Norma Binsztein, Marcelo Galas y Roberto Melano del Instituto "Carlos G. Malbrán" por brindarme apoyo técnico con la cordialidad que siempre los caracterizó,

... Jorge O. Gorodner, Gerardo D. Deluca, María C. Ronconi, Liliana S. Lösch, Myriam L. Medina, Horacio R. Lucero y Lidia N. Acevedo del Instituto de Medicina Regional de la U.N.N.E. por su amistad y su apoyo técnico y moral.

... y a todos aquellos quienes directa o indirectamente contribuyeron a que esta ilusión se haga realidad.

INDICE

1. ESTADO DEL CONOCIMIENTO	Pág 1
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>Salmonella</i>	Pág 2
1.2. TAXONOMIA DE <i>Salmonella</i>	Pág 3
1.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y CULTURALES	Pág 4
1.4. TIPIFICACIÓN DE <i>Salmonella</i>	Pág 7
1.4.1. Métodos fenotípicos de tipificación epidemiológica	Pág 9
A. Serotipificación	Pág 9
B. Tipificación por fagos	Pág 13
C. Biotipificación	Pág 14
D. Tipificación mediante el antibiograma	Pág 14
E. Bacteriocinotipia	Pág 15
1.4.2. Métodos genotípicos para la tipificación epidemiológica	Pág 16
A. Estudio de la dotación plasmídica	Pág 17
B. Análisis del ADN mediante electroforesis en campo pulsátil	Pág 18
C. Polimorfismo de los fragmentos de restricción	Pág 20
D. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de locus específicos	Pág 21
E. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados	Pág 22
F. Polimorfismo del ADN amplificado al azar	Pág 22
G. Amplificación de secuencias repetitivas	Pág 23
H. IS200-PCR	Pág 24
I. Ribotipificación mediante PCR	Pág 24
J. Secuenciación nucleotídica	Pág 25
K. Chips o arrays de ADN	Pág 26
1.5. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN <i>Salmonella</i>	Pág 26
1.5.1. Resistencia antimicrobiana natural en <i>Salmonella</i>	Pág 27
1.5.2. Resistencia antimicrobiana adquirida en <i>Salmonella</i>	Pág 28
A. Resistencia a betalactámicos	Pág 29
B. Resistencia a quinolonas	Pág 34
C. Resistencia a trimetoprima	Pág 37
1.5.3. Transferencia de la resistencia antimicrobiana en <i>Salmonella</i>	Pág 38
1.5.4. Resistencia múltiple a los antimicrobianos	Pág 39
1.6. PATOGÉNESIS DE LA SALMONELOSIS	Pág 41
1.7. EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS	Pág 43
1.8. PROGRAMAS DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LA SALMONELOSIS	Pág 45
2. FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN	Pág 47
3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	Pág 49

4. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág 51
4.1. CEPAS ESTUDIADAS	Pág 52
4.2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y SEROLÓGICA	Pág 52
4.3. ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	Pág 53
4.3.1. Antibiograma mediante difusión con discos	Pág 53
4.3.2. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas	Pág 54
4.4. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA	Pág 54
4.4.1. Resistencia a betalactámicos	Pág 54
A. Prueba del doble disco	Pág 55
B. Detección de betalactamasas por isoelectroenfoque	Pág 55
C. Detección de genes de resistencia mediante PCR	Pág 56
D. Estudio de la presencia de integrones	Pág 57
E. Ensayos de conjugación	Pág 57
4.4.2. Resistencia a quinolonas	Pág 58
A. Detección de bombas de eflujo	Pág 57
B. Detección de mutaciones en <i>gyrA</i>	Pág 58
4.5. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS	Pág 59
4.5.1. Estudio de la dotación plasmídica	Pág 59
4.5.2. Amplificación de segmentos repetitivos mediante PCR	Pág 59
4.5.3. Análisis del ADN mediante electroforesis en campo pulsátil	Pág 61
5. RESULTADOS	Pág 63
5.1. ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS	Pág 64
5.2. SEROTIPIFICACIÓN	Pág 64
5.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA GLOBAL	Pág 65
5.4. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR EN <i>S. Infantis</i>	Pág 66
5.5. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR EN <i>S. Newport</i>	Pág 72
5.6. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR EN <i>S. Enteritidis</i>	Pág 72
6. DISCUSIÓN	Pág 75
6.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE <i>Salmonella</i>	Pág 76
6.2. SEROTIPOS DE <i>Salmonella</i>	Pág 77
6.3. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	Pág 78
6.3.1. Resistencia a betalactámicos	Pág 79
6.3.2. Resistencia a fluoroquinolonas	Pág 82
6.3.3. Resistencia a trimetoprima	Pág 85
6.3.4. Resistencia a nitrofurantoína	Pág 86
6.3.5. Multirresistencia antimicrobiana	Pág 87

6.4. TIPIFICACIÓN EPIDEMIOLOGICA	Pág 88
6.4.1. Tipificación mediante antibiograma	Pág 89
6.4.2. Estudio de la dotación plasmídica	Pág 90
6.4.3. Amplificación de secuencias repetitivas	Pág 91
6.4.4. Análisis del ADN mediante electroforesis en campo pulsátil	Pág 93
7. CONCLUSIONES	Pág 95
8. BIBLIOGRAFÍA	Pág 97
9. ANEXO	Pág 114
9.1. Publicaciones	Pág 115
9.2. Presentaciones en eventos científicos	Pág 116

1. ESTADO DEL CONOCIMIENTO

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Salmonella*

La denominación del género *Salmonella* se efectuó en honor a Daniel E. Salmon, un médico veterinario de los Estados Unidos, quien en 1885 describió el primer aislamiento de esta bacteria¹⁶⁵.

Las bacterias incluidas en este género son bacilos gramnegativos pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae* que, al igual que la mayoría de los miembros de la familia, son móviles mediante flagelos peritricos (con excepción de unos pocos serotipos inmóviles), no esporulados, anaerobios facultativos, reductores de nitratos a nitritos, fermentadores de la glucosa y carentes de citocromooxidasa²⁷.

En cuanto a la filogenética de estas bacterias, se estima que *Salmonella* y *Escherichia coli* provienen de un ancestro común de hace unos 100 millones de años atrás y que originalmente fue un organismo comensal que devino en patógeno luego de la adquisición de grupos de genes de virulencia los cuales le permitieron adaptarse a diferentes hospederos⁷³.

Salmonella es ubicua entre las poblaciones animales a quienes se consideran reservorios de la bacteria y la mayoría de los casos de salmonelosis humanas son producidos por consumo de alimentos de origen animal, aunque también se reconocen casos secundarios a la ingesta de agua y vegetales contaminados directa o indirectamente y ocasionalmente por el contacto directo entre personas²⁷.

Desde hace unos años, *Salmonella* es considerada un patógeno emergente debido a los cambios ocurridos en las características demográficas de los países y a las modificaciones en las actividades humanas, industriales y a las nuevas tecnologías⁷.

Se estima que en los Estados Unidos anualmente se producen de 1 a 4 millones de casos de salmonelosis, de los cuales 1000 son fatales³⁴.

Entre los años 2000 y 2002, *Salmonella* ocupó el primer lugar entre los agentes etiológicos de casos de enfermedades transmitidas por alimentos denunciados en Argentina, estando presente en el 43,1% de los brotes¹⁹².

1.2. TAXONOMÍA DE *Salmonella*

La clasificación de las especies que integran el género *Salmonella* ha sufrido numerosos cambios a través del tiempo, siendo históricamente clasificada en base a la epidemiología, tipo de hospedador, reacciones bioquímicas, patrones de antígenos de superficie y a las manifestaciones clínicas producidas⁵⁴. Esta nomenclatura se volvió muy confusa debido en parte a que los términos **especie** y **serotipo** se utilizaban de forma indistinta³². Por ello a principios de la década del 70 y con la incorporación del análisis molecular se pudo demostrar que todas las salmonellas estaban relacionadas en un 85-100%³¹, lo cual es bastante diferente a lo que ocurre en otros géneros de la Familia *Enterobacteriaceae*.

Debido a la estrecha relación genética existente, se propuso que el Género incluya una sola especie, *Salmonella choleraesuis*⁴⁴. Sin embargo, este nombre causó confusión debido a que *choleraesuis* era usado tanto para designar especie como para designar serotipo. Además, debido a que el serotipo Choleraesuis no es representativo de la mayoría³², en 1999 se propuso la denominación *Salmonella enterica* en reemplazo de *Salmonella choleraesuis*⁵³. Aunque esta propuesta aún no ha sido aceptada

por la Comisión Judicial del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática, está siendo ampliamente usada por el Centro de Referencia e Investigación sobre *Salmonella* perteneciente a la Organización Mundial de la Salud con sede en el Instituto Pasteur de París¹⁶⁵ y por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) con sede en Atlanta, Georgia³².

Actualmente se reconocen dos especies dentro del género: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*¹⁶⁵.

Salmonella enterica contiene seis subespecies: *S. enterica* subesp. *enterica* (I), *S. enterica* subesp. *salamae* (II), *S. enterica* subesp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subesp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subesp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subesp. *indica* (VI). Esta clasificación en subespecies está basada principalmente en hibridación del ADN y en la electroforesis de multilocus enzimático⁵³.

Salmonella bongori posee 21 serotipos los cuales son frecuentemente aislados de animales de sangre fría o del medio ambiente pero raramente de mamíferos, incluyendo a los humanos³².

1.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y CULTURALES

Aunque *Salmonella* desarrolla con facilidad en cualquier medio de cultivo utilizado para el aislamiento primario a partir de muestras clínicas (humanas o animales), ambientales o de alimentos, en la práctica diaria se utilizan medios selectivos para su recuperación, principalmente aquellos que inhiben a las bacterias grampositivas y a

otros miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*, por su contenido de sales biliares y/o colorantes²⁷.

Se desarrollaron diferentes medios de cultivo aprovechando ciertas características bioquímicas de las *Salmonella* como ser la falta de fermentación de lactosa y la producción de sulfuro de hidrógeno, lo cual los transforma en medios indicadores²⁷. Entre los más utilizados se encuentran el Agar *Salmonella-Shigella* (SS), Agar Verde Brillante-Bilis (VBB), Agar Xilosa-Lactosa-Desoxicolato (XLD), Agar Entérico Hektoen (EH) y CHROMagar *Salmonella*®. En la Figura 1 se presentan las características de las colonias producidas por *Salmonella* en estos medios diferenciales.

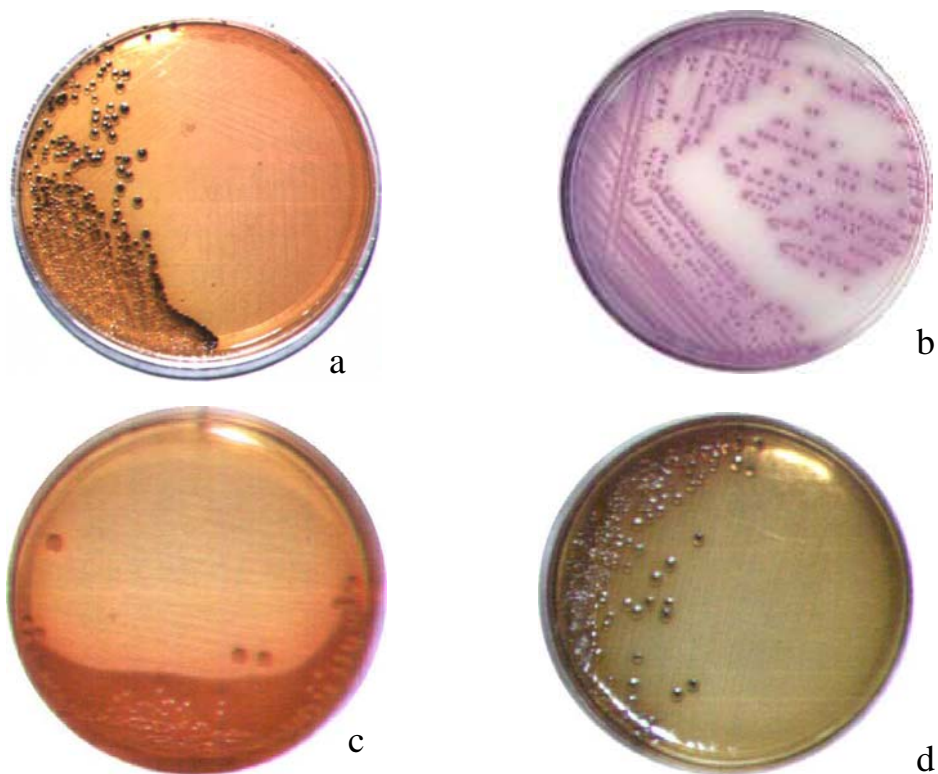


Fig. 1: Aislamiento de *Salmonella* en distintos medios selectivos y diferenciales. a: Agar *Salmonella-Shigella*; b: CHROMagar *Salmonella*; c: Agar Verde Brillante-Bilis; d: Agar Enterico Hektoen.

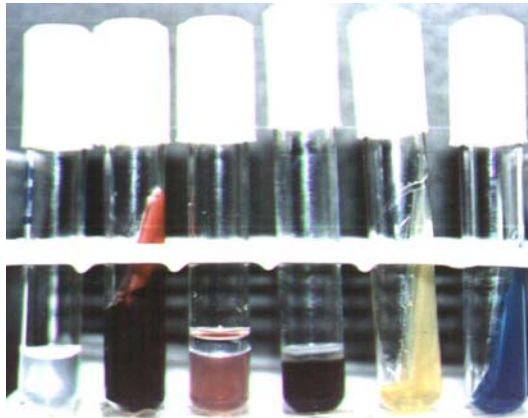


Fig. 2: Identificación bioquímica de *Salmonella*. De izquierda a derecha: ONPG, Agar Triple Azúcar Hierro, Lisina decarboxilasa, SIM (Sulfhídrico, Indol, Movilidad), Ureasa, Citrato.



Fig. 3: Identificación de *Salmonella* mediante el uso de la galería comercial API20E

La identificación bioquímica tampoco representa dificultades mayores debido a su gran homogeneidad genética y a que puede llevarse a cabo mediante las pruebas clásicas de identificación del resto de los miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*, ya sea por métodos artesanales (Figura 2) como por medio de galerías comerciales (Figura 3)²⁷.

Como se muestra en la Tabla 1, los aislamientos pueden diferenciarse con facilidad de otros géneros de enterobacterias relacionados y las subespecies diferenciarse entre sí también mediante pruebas bioquímicas (Tabla 2)²⁷.

Tabla 1: Pruebas que permiten diferenciar *Salmonella* de otros géneros relacionados

Prueba	<i>Salmonella</i>	<i>C. freundii</i>	<i>Proteus</i>	<i>E. coli</i> SH ₂ +	<i>Edwardsiella</i>
SH ₂	+	+	+	+	+
Urea	-	V	+	-	-
LDC	+	-	-	+	-
FEA	-	-	+	-	-
ONPG	-	+	-	+	-
Citrato	+	+	V	-	-
Indol	-	V	V	+	+

Tabla 2: Características bioquímicas diferenciales entre subespecies de *Salmonella*

Prueba	Subespecie						
	I	II	IIIa	IIIb	IV	V	VI
Dulcita	+	+	-	-	-	+	+/-
ONPG	-	-	+	+	-	+	+/-
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Sorbita	+	+	+	+	+	+	-
Gelatina	-	+	+	+	+	-	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-

Aunque una prueba negativa para la fermentación de lactosa es una de las características iniciales para considerar al aislamiento como perteneciente al Género, existen numerosos informes acerca de aislamientos capaces de fermentar este azúcar (Lac⁺), lo cual haría que se pierdan si solo se seleccionaran las colonias no fermentadoras para su identificación bioquímica a partir de los medios de aislamiento primario que contienen lactosa^{54,125}.

1.4. TIPIFICACIÓN DE *Salmonella*

Epidemiológicamente es de creciente importancia diferenciar entre aislamientos de *Salmonella* debido a que la tipificación definitiva de los mismos puede ayudar en el trazado de la fuente de un brote y en el monitoreo de las tendencias en la resistencia antimicrobiana asociadas con cada tipo en particular²³³.

Los métodos de tipificación se dividen en dos grandes grupos: a) fenotípicos o basados en características fisiológicas o bioquímicas y b) genotípicos o basados en el estudio del material genético de la bacteria²²⁵.

Los criterios de evaluación de un método de tipificación son los siguientes¹⁰:

Tipabilidad: es la capacidad de obtener un resultado positivo, no ambiguo, para cada aislamiento; las cepas no tipificables son aquellas que dan resultados negativos o no interpretables con el método aplicado.

Reproducibilidad: capacidad del método de dar el mismo resultado cuando la misma cepa es estudiada repetidamente. Este criterio puede verse afectado por variaciones en los resultados de un día para otro o por variaciones en la estabilidad de las características bacterianas estudiadas.

La reproducibilidad es muy importante para la creación de bases de datos que permitan comparar extemporáneamente diferentes aislamientos bacterianos.

Poder discriminatorio: es la capacidad de identificar como diferentes a aquellos aislamientos no emparentados.

En la práctica, un método puede ser considerado útil cuando la probabilidad de que dos cepas no relacionadas pertenezcan a un mismo tipo sea inferior al 5%. A medida que el poder discriminatorio aumenta, el método tendrá mayor capacidad para detectar variaciones mínimas o menos frecuentes.

Un sistema ideal de tipificación deberá estar estandarizado, podrá aplicarse a la mayoría de los aislamientos, será rápido, de realización sencilla y económica y deberá ser de fácil interpretación.

Desafortunadamente, no existe un método de tipificación ideal, por lo que generalmente debe recurrirse a más de uno para lograr la tipificación definitiva de los aislamientos en estudio.

1.4.1. Métodos fenotípicos de tipificación epidemiológica

A. Serotipificación

El serotipado de *Salmonella* es el método convencional más usado para diferenciar cepas, las cuales son consideradas epidemiológicamente como la menor unidad bacteriana cuyos aislamientos comparten las mismas características fenotípicas y genotípicas. El serotipado separa a las cepas en diferentes serotipos en base a sus antígenos somático (O), capsular (Vi, si está presente) y flagelar (H, si está presente)²⁷.

Los **antígenos O** son carbohidratos o polisacáridos que constituyen el componente más externo del lipopolisacárido de la superficie celular, son designados con números y están divididos en serogrupos o grupos O.

En la mayoría de los laboratorios de bacteriología clínica la serotipificación inicial se realiza usando antisueros anti O polivalentes. Algunos grupos O de *Salmonella* y los antígenos O adicionales que pueden estar presentes en serotipos de esos grupos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Algunos Serogrupos O y antígenos O de *Salmonella* (Modif. de Brenner *et al.*³²)

Grupo O Designación numérica	Grupo O Designación por letras	Antígenos presentes en todos los serotipos	Antígenos adicionales que pueden estar presentes en algunos serotipos
2	A	2,12	1
4	B	4,12	1;5;27
7	C1	6,7	14;(Vi)
8	C2	8	6;20
9	D1	6	9,12
9,46,27	D3	9,12,46,27	1
3,10	E1	3,10	15; 15,34
1,3,19	E4	1,3,19	10;15
11	F	11	Ninguno
13	G	13	1;22;23
6,14	H	6,14	1;24;25
16	I	16	Ninguno
17	J	17	Ninguno

El **antígeno H** es la porción filamentosa del flagelo bacteriano y está formado por subunidades proteicas llamadas flagelina cuyos extremos son conservados y otorgan al filamento su estructura característica. La porción antigénicamente variable de flagelina es la porción media de la proteína, que está expuesta en la superficie. *Salmonella* es única entre las enterobacterias en la cual pueden expresarse dos tipos diferentes de antígenos H, los cuales están codificados por dos genes diferentes cuya expresión está coordinada de manera tal que sólo uno de los antígenos flagelares se exprese a la vez en la misma bacteria³⁴. Los dos antígenos flagelares distintos son denominados como Fase 1 y Fase 2, denominándose aislamientos monofásicos a aquellos que expresan solamente un tipo de flagelina. Algunos antígenos H de *Salmonella* se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Algunos antígenos H (flagelares) de *Salmonella*.
(Modif. de Brenner *et al.*³²)

Complejo 1	Otros antígenos que no forman parte de un complejo
1,2	a
1,5	b
1,6	c
1,5,7	d
Complejo en	e,h
e,n,x	i
e,n,x,z15	k
e,n,z15	(k)
Complejo g	r
f,g	r,i
f,g,m,t	y
g,t	z
g,z85	z10
Complejo l	z29
l,v	z35
l,w	z36
lz13,z28	z38
l,z28	z39
Complejo z4	z83
z4, z23	z87
z4,z24	z88
z4,z32	

El **antígeno Vi** es un antígeno termolábil perteneciente a la cápsula bacteriana, presente comúnmente en *Salmonella* Typhi siendo muy útil para la identificación de ese serotipo²⁷. Ocasionalmente puede presentarse en otros serotipos como *Salmonella* Dublin, *S. Paratyphi C* y algunos aislamientos de *Citrobacter*.

Clásicamente, la serotipificación sirvió para dividir a *Salmonella* en diferentes especies, dando lugar a una especie por serotipo o serovariedad (ambos abreviados como "ser") los cuales fueron usados indistintamente. A a partir del año 2000 se recomendó usar el término serotipo en lugar de serovar³².

Para evitar confusiones con las especies, la designación del serotipo se realiza en letra Roman (no en itálica) y con la primer letra en mayúsculas³². Por ejemplo, el serotipo Enteritidis de la subespecie *enterica* se expresa como: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* ser Enteritidis o simplemente, *Salmonella* Enteritidis.

Todos los serotipos de *Salmonella* pueden ser designados por una fórmula antigénica. Recientemente el CDC adoptó un sistema de informe de serotipo por el cual en aquellos aislamientos correspondientes a la subespecie I se continúa con los nombres de los serotipos mientras que en las demás subespecies se utilizan las fórmulas antigénicas³⁴.

El formato típico de una fórmula antigénica es:

Subespecie [espacio] antígenos O [dos puntos] antígeno H Fase 1 [dos puntos] antígeno H Fase 2

En la Tabla 5 se presentan algunas fórmulas antigénicas y su denominación correspondiente, en la cual se aprecia que cuando una fase del antígeno H no se encuentra presente, se indica con un guión en el lugar correspondiente al mismo.

Tabla 5. Serotipos de *S. enterica* subespecie *enterica* y sus respectivas fórmulas antigénicas. (Modif. de Brenner *et al.*³²)

I 4,12:i:1,2	<i>Salmonella</i> Typhimurium
I 4,5,12:f,g:-	<i>Salmonella</i> Derby
I 6,7:d:l,w	<i>Salmonella</i> Livingstone
I 6,7:g,m,s:-	<i>Salmonella</i> Montevideo
I 6,7:m,t:-	<i>Salmonella</i> Oranienburg
I 6,7:r:1,5	<i>Salmonella</i> Infantis
I 6,8:e,h:1,2	<i>Salmonella</i> Newport
I 6,8:z10:e,n,x	<i>Salmonella</i> Hadar
I 9,12:g,m:-	<i>Salmonella</i> Enteritidis
I 6,8:d:1,2	<i>Salmonella</i> Muenchen
I 6,7:c:1,5	<i>Salmonella</i> Choleraesuis var. Kuzendorf
I 8,20:z ₄ ,z ₂₃ :-	<i>Salmonella</i> Corvalis
I 3,10:e,h:l,w	<i>Salmonella</i> Meleagridis

Más del 99% de los serotipos descritos hasta el momento corresponden a la especie *Salmonella enterica* y aproximadamente el 60% de ellos pertenecen a la subespecie *enterica* (subespecie I)³².

Debido a su amplia aceptación en la clasificación de cepas de *Salmonella*, el serotipado constituye una importante herramienta en salud pública y aunque provee información esencial acerca de los aislamientos presenta limitaciones por lo que es necesario aplicar técnicas adicionales de tipificación²³³.

Los serotipos varían en su prevalencia según el origen de las muestras, lo que permitiría reconocer el probable origen de un brote. Por ejemplo, en un estudio realizado en Holanda, los serotipos más prevalentes en humanos, cerdos, aves y bovinos fueron respectivamente, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Dublin*²²¹. El origen de esta diversidad entre las especies no ha podido ser definida pero se ha postulado que puede estar relacionada con el tipo de alimentación que reciben los animales.

Actualmente se conocen más de 2500 serotipos de *Salmonella* y el número sigue incrementándose¹⁶⁵.

B. Tipificación por fagos

La fagotipificación utiliza la capacidad selectiva de los bacteriófagos para infectar ciertas cepas de *Salmonella* lo cual permite al usuario diferenciar aislamientos singulares¹⁸⁷. La mayoría de los fagos es de origen salvaje, siendo aislados de aguas servidas. Con ellos se prepara una colección para ser usada en tipificación epidemiológica, mediante esquemas como los de Colindale en Londres o los del Instituto Pasteur de París¹²⁹.

Cuando sobre la superficie de la célula bacteriana se localiza un receptor apropiado para un fago, éste infectará la bacteria produciendo su lisis. Así, un fagotipo o lisotipo será asignado a una cepa específica de la bacteria en base al conjunto de fagos que son capaces de lisar las células y formar placas en el cultivo bacteriano⁸³.

El lisotipo puede ser modificado por adquisición de plásmidos, de un fago, o por modificación del lipopolisacárido de la pared¹²⁹.

La fagotipificación ha sido aplicada para determinar la relación entre aislamientos de *S. Enteritidis* obtenidos de diferentes orígenes¹⁶⁸ y para describir clones pandémicos de *Salmonella* como el de *S. Typhimurium* DT104 que causa enfermedad gastrointestinal severa y es típicamente resistente a múltiples antimicrobianos³³. Debido a que es una técnica que requiere el mantenimiento de colecciones de múltiples

fagos biológicamente activos, la fagotipia es llevada a cabo solamente por laboratorios de referencia y de salud pública.

C. Biotipificación

Es la subtipificación de aislamientos en base a diferentes reacciones bioquímicas y ha sido de utilidad con ciertos serotipos como Typhimurium, Agona y Enteritidis, que han podido dividirse en una gran variedad de biotipos en base los resultados obtenidos frente a la utilización de xilosa, m-inositol, L-ramnosa, d-tartrato y m-tartrato^{51,56}.

Diversos autores han utilizado de 16 a 30 pruebas bioquímicas para diferenciar cepas y muchas veces no se las ha podido separar en más de tres biotipos^{129,152}.

La técnica es simple, las aproximaciones son empíricas y muchas veces la discriminación aportada por la biotipificación no es muy importante. Además, el biotipo no es una propiedad estable debido a que puede ser influenciado por una gran variedad de factores técnicos y ambientales y por la ganancia o pérdida de plásmidos¹²⁹.

D. Tipificación mediante el antibiograma

El antibiograma también ha sido utilizado como una herramienta de tipificación en epidemiología y se basa en la determinación de la susceptibilidad de una bacteria frente a una gran variedad de agentes antimicrobianos, inclusive muchos que no poseen utilidad clínica. Este método es sencillo de realizar e interpretar pero posee

bajo poder discriminativo, principalmente entre aquellas cepas que presentan escasa o nula resistencia frente a los antibióticos ensayados²³³.

Por otra parte, como la resistencia adquirida en *Salmonella* es con frecuencia de codificación plasmídica, la ganancia o pérdida de un plásmido puede alterar el fenotipo cuando se desean comparar cepas obtenidas con mucha diferencia de tiempo entre sí¹²⁹. Sin embargo, puede resultar de utilidad cuando se trate de aislamientos obtenidos en un corto período y que presenten el mismo perfil de resistencia antimicrobiana. Adicionalmente, la realización rutinaria del antibiograma frente a numerosos antimicrobianos, algunos de uso clínico y otros sólo con carácter epidemiológico, puede alertar acerca de la aparición de nuevos fenotipos de resistencia con importancia para la salud pública¹⁵⁰.

E. Bacteriocinotipia

Las bacteriocinas son sustancias bactericidas producidas por ciertas bacterias con actividad selectiva sobre otras, del mismo o diferente género. La bacteriocinotipia se basa tanto en el estudio de la producción de bacteriocinas como en la sensibilidad a ellas¹²⁹.

En el caso de *Salmonella*, lo más utilizado es la sensibilidad frente a bacteriocinas producidas por una colección de cepas de *Escherichia coli* (colicinas), habiendo sido aplicada con éxito en aislamientos de *S. Agona* y *S. Typhimurium*, de origen clínico, animal, ambiental y alimentario en Brasil⁵⁶.

1.4.2. Métodos genotípicos para la tipificación epidemiológica

La diferenciación de aislamientos de *Salmonella* y la identificación de la fuente de brotes de origen alimentario debe ser realizada además mediante técnicas moleculares o genotípicas. Estos métodos utilizan enzimas de restricción, amplificación de ácidos nucleicos o técnicas de secuenciación nucleotídica para analizar el genoma de la bacteria, y la selección de la metodología más apropiada se realiza en base al tamaño de la muestra, el tiempo de desarrollo de la técnica y los recursos disponibles para realizar la tipificación⁵⁷.

Entre los factores a tener en cuenta al elegir una técnica de tipificación molecular están, además, su poder discriminativo y la reproducibilidad¹⁵³.

La comparación entre las diferentes técnicas más comúnmente utilizadas se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de las técnicas de tipificación molecular de *Salmonella*. (Modif. de Olive et al¹⁵³)

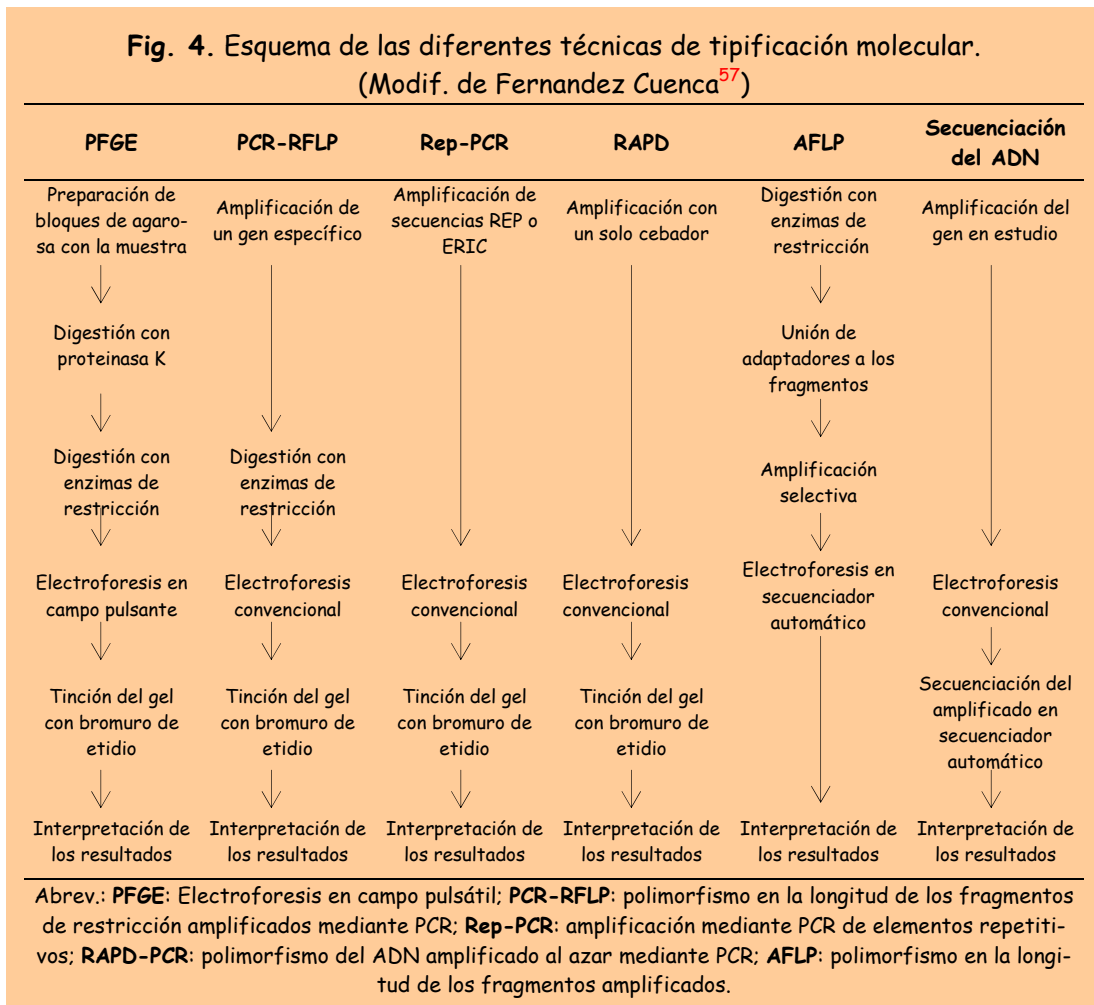
	Poder discriminativo	Reproducibilidad	Dificultad técnica	Tiempo y costo
PFGE	Alto	Alta	Alta	Medio
RFLP/Ribotipo	Medio	Alta	Media	Medio
AFLP	Alto	Alta	Alta	Medio
AP-PCR/RAPD-PCR	Alta	Baja	Media	Bajo
Rep-PCR	Alta	Baja	Media	Bajo
MLST	Media/Alta	Alta	Alta	Alto

Abrev.: **PFGE**: Electroforesis en campo pulsátil; **RFLP**: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción; **AFLP**: polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados; **AP-PCR**: reacción en cadena de la polimerasa con primers arbitrarios; **RAPD-PCR**: polimorfismo del ADN amplificado al azar mediante reacción en cadena de la polimerasa; **Rep-PCR**: amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa de elementos repetitivos; **MLST**: tipificación de secuencia multilocus.

Debido a que la mayoría de las técnicas poseen etapas comunes y otras específicas, en la Figura 4 se presenta un esquema de los principales pasos de las metodologías

as más comúnmente utilizados en la tipificación molecular de aislamientos de *Salmonella*.

Fig. 4. Esquema de las diferentes técnicas de tipificación molecular.
(Modif. de Fernandez Cuenca⁵⁷)



A. Estudio de la dotación plasmídica

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se replican independientemente y pueden ser adquiridos o transferidos mediante conjugación a través de los pili sexuales¹¹⁹.

El análisis plasmídico ha sido una de las primeras técnicas de biología molecular aplicadas en epidemiología y aún presenta gran utilidad cuando se combina con otras

permitiendo conocer en forma rápida la similitud existente entre diferentes aislamientos correspondientes a un brote epidémico¹¹².

Las salmonellas pueden albergar plásmidos de tamaños muy diferentes, de entre 1 y 200 Kb (Kilobases)¹⁶³; la caracterización del perfil plasmídico de una cepa comprende la determinación del número y del tamaño de sus plásmidos¹²⁹.

El análisis del perfil plasmídico ha sido aplicado en diferentes brotes de salmonelosis como herramienta epidemiológica, generalmente en forma conjunta con el antibiograma y/o alguna otra técnica fenotípica o genotípica^{112,121,128,178}.

En aquellas cepas que presentan un número reducido de plásmidos de igual tamaño, puede recurrirse a la digestión de los mismos mediante enzimas de restricción y posterior análisis de las bandas obtenidas por electroforesis, ya que plásmidos de igual tamaño pueden poseer diferente secuencia de bases¹²⁹.

B. Análisis del ADN mediante electroforesis en campo pulsátil

La digestión del genoma bacteriano con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte genera fragmentos de ADN de elevado peso molecular. Para la separación de dichos fragmentos de ADN, que no pueden ser separados en una electroforesis de agarosa convencional, se utiliza la electroforesis en campo pulsátil. Bajo condiciones de polaridad alternante permite la resolución de fragmentos de ADN de elevado peso molecular¹⁵³. Esta metodología provee una huella digital o "fingerprint" del genoma bacteriano.

Diferentes enzimas de restricción han sido utilizadas para la digestión del ADN de cepas de *Salmonella*, incluyendo *XhoI*, *XbaI*, *NotI*, *SpeI* entre otras^{100,138,178,206,212}. Sin embargo, la digestión con *NotI*, resulta en 40 a 50 fragmentos lo que hace muy dificultosa la interpretación de los perfiles obtenidos¹⁰⁶, mientras que *XbaI* es la enzima más usada ya que produce pocos fragmentos que pueden ser interpretados con facilidad^{23,122,209}.

Aunque la metodología clásica para la realización de una tipificación mediante PFGE puede llevar 5 a 6 días, han sido descritas técnicas cortas que pueden desarrollarse en 1 a 3 días^{65,123}.

La tipificación mediante PFGE está reconocida como superior a otros métodos y por ello se la considera el "patrón de oro" para comparar otros métodos de tipificación²¹.

Una considerable cantidad de perfiles de bandas obtenidos mediante PFGE a partir de cepas de *Salmonella*, ha sido acumulada en el programa "PulseNet", que es una Red Nacional de Subtipificación Molecular para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos que depende del CDC, por el cual se determinan las "huellas digitales" del ADN de bacterias que producen toxiinfecciones alimentarias²⁰⁷.

Esta red permite una rápida comparación de esos patrones a través de una base de datos electrónica para el reconocimiento precoz y la investigación oportuna de los brotes.

C. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El RFLP se realiza usando enzimas de restricción de corte frecuente en el ADN, y debido al elevado número de fragmentos que se producen la electroforesis es habitualmente seguida por un southern blot, usando sondas para elementos repetidos de ADN¹⁵. Los blancos más comúnmente elegidos para el blotting incluyen las secuencias de los genes del ARN ribosómico (ribotipificación) y diferentes secuencias de inserción (IS) en el genoma bacteriano (Isotipificación o tipado por secuencias de inserción)³⁹.

La naturaleza muy conservada de los genes que codifican para el ARN ribosomal (ARNr) permite que una sola sonda constituida por ARN 16+23S de *Escherichia coli* hibride con los genes correspondientes a cualquier bacteria, aún aquellas filogenéticamente alejadas⁷¹.

Para aumentar el poder discriminativo de la ribotipificación pueden usarse dos o más enzimas de restricción combinadas, siendo las más utilizadas *SmaI*, *SphI*, *PvuII*, *AccI* y *HincII*^{15,129}.

Esta técnica ha sido aplicada con éxito en Brasil para caracterizar aislamientos de *Salmonella* Enteritidis de diferente origen geográfico⁵⁵.

Por otra parte, las secuencias de inserción (IS) forman parte de los elementos transponibles del genoma de los procariotas y son regiones del genoma menos conservadas que los ARNr mencionados anteriormente²⁰¹.

En *Salmonella*, las secuencias de inserción denominadas IS200 están localizada en el cromosoma aunque adicionalmente pueden existir copias plasmídicas, pueden

estar ausentes en algunos serotipos como Agona, Hadar y Typhisuis y estar presentes en varias copias variando su número en función del serotipo¹²⁷.

Para que la aplicación de las sondas al realizar el southern blot puedan hibridizar con las IS200, las enzimas de restricción utilizadas no deben cortar en dichas secuencias, siendo por ello las más utilizadas *Pst*I, *Bgl*II y *Pvu*II¹²⁸.

D. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de locus específicos

El estudio del Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de locus específicos amplificados mediante PCR (RFLP-PCR) difiere del RFLP descrito anteriormente en que en lugar de estudiar los fragmentos que resultan de la digestión enzimática del ADN total, se estudian los fragmentos de la digestión enzimática luego de amplificar un gen determinado.

En caso de existir diferencias puntuales en la secuencia nucleotídica del gen amplificado de cada aislamiento, se observan bandas de diferentes tamaños que producen patrones característicos¹⁵³.

Esta técnica es muy útil cuando se trata de diferenciar serotipos mediante PCR, aunque no es tan útil para tipificar aislamientos pertenecientes a un mismo serotipo¹³⁹.

E. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados

La técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) combina la amplificación mediante PCR con la digestión mediante enzimas de restricción¹⁵³.

Luego de la digestión del ADN con una o más enzimas, fragmentos ADN de cadena simple son ligados a los extremos libres del ADN digerido^{137,227}. Estos fragmentos o ligandos sirven como sitios para que se unan los iniciadores y permiten la amplificación de los fragmentos de restricción. Los amplicones son sometidos a electroforesis y los perfiles característicos de bandas que se generan sirven para comparar cepas.

F. Polimorfismo del ADN amplificado al azar

Otros métodos de tipificación se basan en los perfiles o patrones que se obtienen luego de la amplificación del ADN, sin restricción enzimática, como es el caso de la RAPD-PCR (polimorfismo del ADN amplificado al azar) también denominada AP-PCR (amplificación con iniciadores arbitrarios)^{90,230}.

Estas técnicas utilizan iniciadores de secuencias elegidas al azar que cuando se unen con suficiente proximidad uno de otro, se amplifica la porción interna del genoma creando amplicones de tamaño variable³⁸.

El RAPD no requiere de un conocimiento previo de la secuencia nucleotídica y se utiliza un solo iniciador, es un método simple y rápido de realizar aunque carece de reproducibilidad pues se ve afectado por numerosos factores reactivos y técnicos¹²⁹.

Esta metodología, en conjunción con la PFGE y la tipificación por fagos fue usada en el análisis de un brote hospitalario debido a *Salmonella* Enteritidis⁷⁶, demostrándose que es una herramienta valiosa y complementaria en la investigación de este tipo de situaciones epidemiológicas.

Debido a que el RAPD es un método simple, rápido y poco costoso, sirve en forma individual cuando se requiere un resultado preliminar rápido³⁸.

La selección de los cebadores es de crucial importancia pues debe obtenerse un número suficiente de bandas para que los patrones obtenidos resulten fácilmente interpretables, y en ocasiones deben utilizarse dos cebadores para obtener mayor discriminación y reproducibilidad¹²⁹.

G. Amplificación de secuencias repetitivas

Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC) son algunas de las secuencias repetitivas (*rep*) que más se han utilizado en estudios epidemiológicos infecciosos.

La REP-PCR y ERIC-PCR amplifican sitios genéticos conocidos previamente y descritos en diferentes especies bacterianas con iniciadores diseñados para unirse a segmentos repetitivos²²⁴.

Cuando dos elementos repetidos están localizados muy cerca uno de otro, será amplificada la región localizada entre ambos.

La variabilidad en la secuencia del ADN puede conducir a diferencias en el tamaño de los fragmentos que se amplifican, produciéndose diferentes patrones de bandas cuando son sometidos a electroforesis en gel.

Los perfiles de amplificación obtenidos mediante ERIC-PCR han sido aplicados con gran éxito en estudios epidemiológicos, llegando algunos autores a sugerir la existencia de perfiles "serotipo-específicos", aunque no todos los serotipos pueden ser tipificados mediante esta metodología^{129,222}.

H. IS200-PCR

Este método se basa en la amplificación y el análisis por electroforesis del polimorfismo de las regiones entre dos secuencias de inserción y ha sido exitosamente aplicado en la tipificación de *Salmonella* Infantis¹⁵⁸ y de *Salmonella* Typhimurium en combinación con otras técnicas de genotipificación¹²⁷.

Como se ha mencionado anteriormente, estas secuencias se encuentran en número variable según el serotipo de *Salmonella*, pero como en algunos están ausentes, se ve limitada su aplicación universal en la tipificación de cepas²²⁹.

I. Ribotipificación mediante PCR

Esta técnica se basa en la amplificación de las secuencias espaciadoras presentes entre los genes 16S y 23S de las unidades transcripcionales para el ARN ribosomal (ARNr); el loci ARNr está presente con 2 a 11 copias en el cromosoma bacteriano y la variación en la extensión de los fragmentos obtenidos mediante amplificación

permite caracterizar las cepas¹²⁹. Esta técnica ha sido de utilidad para diferenciar aislamientos de diferentes serotipos, mostrando alta reproducibilidad y poder discriminativo⁹⁸.

J. Secuenciación nucleotídica

Recientes avances en la tipificación bacteriana utilizan para diferenciar cepas el polimorfismo en la secuencia del ADN dentro de sitios específicos. Una de estas técnicas incluye el análisis de la secuencia de multilocus (MLST), basada en que diferentes cepas de una bacteria poseen frecuentemente variabilidad en la secuencia de genes particulares, normalmente genes "housekeeping", debido a mutaciones o a eventos de recombinación. Este hecho puede ser utilizado para determinar la relación entre bacterias¹¹⁵. Con la MLST son secuenciados múltiples genes de un aislamiento bacteriano. Las diferentes secuencias presentes en cada gen de una especie bacteriana son asignadas como alelos distintos; los alelos en cada locus definen el perfil alélico o secuencia tipo y los resultados, comparados con las secuencias de otra cepa son usados para determinar los cambios en las bases nucleotídicas entre aislamientos¹⁹⁹.

Las diferencias en las secuencias nucleotídicas en genes individuales son combinadas y usadas para generar una secuencia de multilocus tipo, la cual es subsecuentemente utilizada para determinar la relación entre diferentes cepas.

Cuando la MLST fue usada en la evaluación de aislamientos de *Salmonella* los resultados sugirieron que su poder discriminatorio para la tipificación de las cepas ofrecía ventajas sobre la serotipificación y la PFGE⁹⁵.

K. Chips o arrays de ADN

Un chip o array de ADN es un conjunto de sondas moleculares fijadas sobre un soporte sólido en una disposición regular y prefijada⁵⁰; la ventaja que presenta frente a las técnicas de amplificación mediante PCR es que se pueden detectar miles de genes en un único procedimiento y en el caso de *Salmonella*, ha sido utilizado con éxito para la genotipificación^{37,63}.

1.5. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *Salmonella*

En la década de los '80, las especies no tifoideas de *Salmonella* eran organismos completamente sensibles, pero una década más tarde ya se evidenciaba un incremento en la resistencia a ampicilina, cloranfenicol y trimetoprima/sulfametoxazol⁸⁴.

Los datos de vigilancia sobre resistencia antimicrobiana en los Estados Unidos indican un incremento en la prevalencia de aislamientos de *Salmonella* resistentes al menos a un antimicrobiano del 16% durante el período 1979-1980 al 29% durante 1989-1990^{114,141}. Es por ello que la resistencia antimicrobiana en estas bacterias ha recibido considerable atención en los últimos años y actualmente se la considera un problema de salud pública emergente²⁰⁰.

El tratamiento antimicrobiano de rutina de la salmonelosis no está indicado en pacientes jóvenes con gastroenteritis leve a moderada sin otra enfermedad de base⁸⁴; sin embargo, la administración de antibióticos es crucial para los casos severos o en pacientes con riesgo aumentado de infección metastásica⁴³. Estos pacientes incluyen a neonatos, ancianos, transplantados, pacientes con enfermedad linfoproliferativa

o con importantes enfermedades articulares, portadores de prótesis, infectados con el VIH o pacientes con enfermedad de células falciformes subyacente¹⁰¹.

Actualmente, los antimicrobianos de elección para el tratamiento de la salmonelosis son las fluoroquinolonas, trimetoprima/sulfametoxazol o cefalosporinas de tercera generación (por ejemplo, ceftriaxona o cefixima, si la administración por vía oral es posible) aunque deben tenerse en cuenta los perfiles regionales de resistencia frente a dichos antibióticos⁸⁴.

1.5.1. Resistencia antimicrobiana natural en *Salmonella*

No obstante sus implicancias clínicas, existe escasa información acerca de la susceptibilidad antibiótica natural de *Salmonella enterica*, lo cual contrasta con numerosos estudios "in vitro" acerca del desarrollo de resistencia antimicrobiana adquirida.

En el año 2000, Stock y cols. realizaron un estudio orientado a establecer una base de datos sobre la susceptibilidad natural de *S. enterica* frente a un amplio rango de antimicrobianos y observar si existen diferencias de susceptibilidad entre las subespecies más importantes y los serotipos²⁰⁵. Estos autores encontraron que *Salmonella*, al igual que otras enterobacterias, son naturalmente sensibles "in vitro" a los aminoglucósidos, trimetoprima/sulfametoxazol, cloranfenicol, nitrofuranos, quinolonas, tetraciclinas, azitromicina y a los betalactámicos (exceptuando a oxacilina y benzilpenicilinas), siendo *Salmonella enterica* la única especie dentro de la Familia *Enterobac-*

teriacae que naturalmente carece de betalactamasas codificadas cromosómicamente.

La sensibilidad reconocida "in vitro" no significa que el antibiótico en cuestión sea útil "in vivo", y esto es típico en el caso de las cefalosporinas de primera y segunda generación y los aminoglucósidos, antimicrobianos que no son efectivas para el tratamiento de la salmonelosis¹⁴⁶.

Los datos obtenidos por Stock y cols. muestran además que *Salmonella enterica* es naturalmente resistente a benzilpenicilinas, oxacilina, macrólidos (exceptuando azitromicina), rifampicina, lincosaminas, glicopéptidos y ácido fusídico²⁰⁵; los mecanismos de resistencia frente a estos antimicrobianos no han sido claramente dilucidados pero se cree que se deben a la exclusión de la droga por la pared celular.

1.5.2. Resistencia antimicrobiana adquirida en *Salmonella*

Además de la resistencia natural que ya se ha comentado en el punto anterior, en *Salmonella* se observan numerosos mecanismos de resistencia adquirida a diferentes antimicrobianos, ya sea por mutaciones o por adquisición de genes de resistencia.

Según la Alianza para el Uso Prudente de los Antimicrobianos (APUA) y el Instituto de Medicina de los Estados Unidos, el uso muy difundido de agentes antimicrobianos en animales de granja se asocia con un incremento en la resistencia antimicrobiana de patógenos de transmisión alimentaria, los cuales pueden subsecuentemente ser transferidos a los humanos⁹. Para atacar este problema de salud pública, se aconseja reducir el uso irracional de antimicrobianos en animales de granja y en humanos.

Generalmente, los mecanismos de resistencia encontrados en otras bacterias son aplicables también en *Salmonella*, incluyendo producción de enzimas inactivantes, bombas activas de expulsión (Eflujo), reducción de la permeabilidad en la membrana celular y modificación del sitio blanco del antimicrobiano¹⁹⁰.

Debido a que las drogas de elección para el tratamiento de los casos graves de salmonelosis son las cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y trimetoprima/sulfametoxazol⁸⁴, se revisarán más exhaustivamente los mecanismos de resistencia frente a estos antimicrobianos.

A. Resistencia a betalactámicos

Aunque la resistencia a los betalactámicos puede deberse a la producción de enzimas inactivantes, alteraciones de la permeabilidad, alteración del sitio diana y presumiblemente, a la expresión de bombas de expulsión activa, la producción de betalactamasas es el mecanismo de resistencia más frecuente en Enterobacterias, incluyendo al Género *Salmonella*¹⁵⁰.

Varios tipos de betalactamasas han sido identificadas en *Salmonella*, cuya capacidad para hidrolizar betalactámicos abarca en algunos casos sólo a la ampicilina y en otros llega incluso hasta cefalosporinas de tercera generación^{19,111,156}. Estas enzimas están asociadas con plásmidos e integrones, muchas veces transferibles a otras bacterias mediante conjugación⁵⁹.

Entre las betalactamasas encontradas en *Salmonella* pueden citarse las betalactamasas de amplio espectro (BLEA) y las de espectro extendido (BLEE)¹⁵⁰.

Las BLEA están representadas principalmente por las enzimas OXA-1, TEM-1, TEM-2 y SHV-1, de codificación plasmídica, cuya producción confiere resistencia a ampicilina y cefalosporinas de primera generación, pero no a oximinocefalosporinas, cefamicinas, monobactamas y ni a carbapenemes¹⁷¹. Las enzimas del tipo TEM-1 son las más ampliamente distribuidas en los aislamientos de *Salmonella* y le confieren resistencia a ampicilina. Aunque este grupo de enzimas son inhibidas por ácido clavulánico, se han descritos cepas con sensibilidad reducida a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico, debido a la hiperproducción de las mismas⁵².

Otro grupo de β -lactamasas presentes en *Salmonella* son aquellas del tipo OXA⁶², pertenecientes a la Clase D de Ambler. Estas enzimas poseen acción sobre penicilinas y cefalosporinas de primera generación, son pobremente inhibidas por el ácido clavulánico y en su mayoría se encuentran codificadas por genes localizados en plásmidos, transposones o integrones, lo cual favorece una amplia distribución entre cepas.

Las BLEE están incluidas en la clase A del esquema de Ambler, e incluyen a las neoenzimas derivadas de mutaciones de las enzimas TEM y SHV, a la familia de CTX-M y al grupo de enzimas PER y KPC¹⁵⁶.

Las BLEE más frecuentemente descritas a nivel mundial en el Género *Salmonella* derivan de mutaciones de las TEM y SHV¹³¹, considerándose que el mayor reservorio de este tipo de β -lactamasas está constituido por cepas nosocomiales de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

En un estudio multicéntrico realizado en el año 2001, se encontró una distribución variable de *Salmonella* productoras de BLEE según las regiones estudiadas: Región del Pacífico Oriental (3,4%), Latinoamérica (2,4%), Europa (0,8%) y Estados Unidos (0,0%)²³².

A modo de ejemplo, en la Tabla 7 se presenta la distribución de algunas de estas BLEE derivadas de TEM y SHV en diferentes países.

Tabla 7: β -Lactamasas de espectro extendido del tipo TEM y SHV encontradas en *Salmonella* spp.

País	Serotipo	β -lactamasa	Año	Referencia
Túnez	Wien	SHV-2, TEM-4	1988	78
Francia	Mbandaka	TEM-25	1990	167
Italia	Enteritidis	SHV-12	1994	226
Marruecos	Typhimurium	TEM-3	1994	5
España	Othmarschen	TEM-27	1994	136
Corea	Enteritidis, Sainpaul, Agona, Stanley	TEM-52	1995-1997	99
India	Senftenberg	SHV-5	1998	177
Polonia	Typhimurium	SHV-2 ^a	2000	208

Aunque se han encontrado cepas de *Salmonella* productoras de estas BLEE "clásicas" en diferentes países de Europa y África, aislamientos de este tipo son raros en Norteamérica¹³¹.

Las enzimas de la familia CTX-M son cefotaximasas plasmídicas, que están ampliamente distribuidas entre las enterobacterias¹⁴⁸, pero sólo algunas de ellas han sido encontradas en *Salmonella*²⁶. En la tabla 8 se presentan algunas características de las enzimas de esta familia encontradas en *Salmonella*.

Tabla 8. Características de algunas enzimas de la familia CTX-M descritas en *Salmonella* spp

Enzima	PI	Serotipo	CIM CTX ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CIM CAZ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	País (Año)	Referencia
CTX-M-2	7.9	<i>S. Typhimurium</i>	512	32	Argentina (1990)	19
CTX-M-4	8.4	<i>S. Typhimurium</i>	128	8	Rusia (1996)	66
CTX-M-3	8.4	<i>S. Typhimurium</i>	64	4	Polonia (1999)	16
CTX-M-5	8.8	<i>S. Typhimurium</i>	128	8	Latvia (1991)	30
CTX-M-6	8.4	<i>S. Typhimurium</i>	>256	8	Grecia (1997)	67

Estas enzimas fueron descritas por primera vez en 1989 en Alemania, pero más tarde se han encontrado otros miembros que difieren entre sí por unas pocas secuencias aminoacídicas²⁶. Aunque las enzimas del tipo CTX-M-2 se han hallado principalmente en *S. Typhimurium*, también han sido descritas en otros serotipos como Infantis, Anatum, Agona, Enteritidis y Oranienburg, entre otros¹³¹.

La presencia de una BLEE del tipo TEM, SVH o CTX-M puede ser sospechada cuando se observa un achicamiento en el halo de cefotaxima, ceftazidima y/o cefpodoxima¹⁴⁴. Debido a que estas enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico, debe realizarse la confirmación mediante alguno de los siguientes métodos: a) aparición de efecto sinérgico al enfrentar discos de cefalosporinas de tercera generación con discos conteniendo amoxicilina más ácido clavulánico, b) observando el agrandamiento del halo cuando se prueban discos de una cefalosporina de tercera generación sola y en combinación con ácido clavulánico o c) utilizando tiras de E-test que contienen en un extremo la cefalosporina de tercera generación y en el otro la misma droga combinada con ácido clavulánico¹¹⁰.

Las BLEE del tipo PER (PER-1, PER-2 y PER-3) son β -lactamasas pertenecientes a la clase A de Ambler, de descendencia genética desconocida, que hidrolizan preferentemente a ceftazidima y con una distribución geográfica muy particular¹³¹.

En aislamientos nosocomiales de *S. Typhimurium* multirresistentes se detectó la producción de la enzima PER-1 en Turquía²²⁰ y de PER-2 en aislamientos de *S. Infantis*, Agona, Enteritidis y Oranienburg en Argentina^{155,49}.

Una betalactamasa de Clase A de reciente emergencia es la tipo KPC encontrada en Estados Unidos en aislamientos de *S. Cubana*¹³². Esta enzima, también encontrada en *Klebsiella pneumoniae*, exhibe un amplio espectro de actividad hidrolítica, incluyendo cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes¹³¹.

La mayoría de las cepas de *Salmonella* resistentes a cefalosporinas de tercera generación producen betalactamasas de Clase A inhibibles por el ácido clavulánico o sulbactama. Sin embargo, en años recientes numerosos informes han demostrado que algunos aislamientos poseían un plásmido portador de los genes codificantes de β -lactamasas tipo AmpC (cefalosporinasas). Estas enzimas pertenecientes a la clase C de Ambler, confieren resistencia a varias cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico¹⁵⁹.

Como se mencionara previamente, en diferentes géneros de enterobacterias las enzimas de este tipo están codificadas cromosómicamente, pero *Salmonella* es considerada AmpC⁻ ya que el gen codificante de la enzima no aparece en serotipos cuyos genomas han sido mapeados¹⁵⁹. En la tabla 9 se muestra la distribución de este tipo de betalactamasas en *Salmonella* aisladas en diferentes países.

Tabla 9: BLEE del tipo AmpC encontradas en *Salmonella* spp.

País	Serotipo	β -lactamasa	Año	Referencias
Arab. Saudita	Enteritidis	DHA-1	1992	61
Argelia	Senftenberg	CMY-2	1994	94
Túnez	Livingston, Mbandaka, Wien	AAC-1, CMY4	1995-1999	12,116
Australia	Typhimurium	CMY-7	2000	79

Dentro de este grupo, la enzima CMY-2 parece ser la más distribuida mundialmente ya que se la ha encontrado en aislamientos en Estados Unidos, España y Francia, predominando en los serotipos Typhimurium y Newport^{162,147,232}.

Barnaud y cols. también describieron la presencia de la cefalosporinasa plasmídica inducible (DHA-1) en aislamientos de *S. Enteritidis*, la cual está emparentada con la enzima codificada cromosómicamente por *Morganella morganii*¹⁷. Esta enzima del tipo Amp-C presentó inducción por cefoxitina e imipenem y no era inhibida por el ácido clavulánico.

Poirel y cols. detectaron la producción de la enzima PSE-1 (también denominada CARB-2) en aislamientos de *S. Typhimurium* DT104 que presentaron reducida sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico debido a que su afinidad por la amoxicilina es más baja que la de otras enzimas plasmídicas como TEM-1¹⁶⁴.

La presencia de los genes codificantes de las diferentes β -lactamasas puede ser detectada por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizándose iniciadores específicos para cada enzima, aunque en otros casos sólo se puede determinar la familia de enzimas y entonces se hace necesario estudiar la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado a fin de determinar cuál es la enzima codificada⁴².

B. Resistencia a quinolonas

El incremento mundial de la resistencia a quinolonas en los serotipos más comunes de *Salmonella* es un serio problema para la salud pública y parece relacionarse más con el uso de quinolonas en animales que con su empleo en el tratamiento de infecciones humanas¹³⁴.

Los mecanismos de resistencia a las quinolonas en *Salmonella* incluyen mutaciones en los genes que codifican las subunidades de la ADN girasa (*gyrA* o *gyrB*) y/o la topoisomerasa IV (*parC* o *parE*), bombas de expulsión activa (eflujo) y permeabilidad disminuida de la membrana externa¹⁸³.

El mecanismo de resistencia antibiótica mediante bombas de expulsión fue informado por primera vez a comienzos de la década de los 80 para las tetraciclinas. Desde entonces la resistencia antimicrobiana mediada por este mecanismo fue encontrada en diferentes especies y para distintos antimicrobianos, incluidas las fluoroquinolonas, siendo el predominante entre las enterobacterias el codificado por los genes *acrAB-tolC*¹¹³.

Aunque la función natural de las bombas de expulsión en las bacterias gramnegativas es aún tema de debate, algunos autores han demostrado su participación en la resistencia bacteriana a las sales biliares y detergentes y resulta claro que juegan un rol muy importante en la resistencia intrínseca y adquirida frente a fluoroquinolonas⁹⁷.

En *Salmonella Typhimurium* se ha demostrado que la sobreexpresión de mecanismos de eflujo del tipo AcrAB aumenta los niveles de resistencia a las quinolonas hasta hacerlos comparables a aquellos debido a mutaciones en el gen *gyrA*⁷⁰. Estos sistemas de expulsión activa pueden ser inhibidos por un compuesto denominado fenilarginil-beta-naftilamida (FABNA) por lo que se ha planteado la posibilidad de ser usado terapéuticamente en combinación con las fluoroquinolonas¹⁸.

Por otra parte, simples mutaciones en el gen *gyrA* que codifica la subunidad A de la ADN girasa se traducen en resistencia al ácido nalidíxico. Estas mutaciones generalmente son cambios en Ser-83 o en Asp-87⁴¹. En *Salmonella* las mutaciones en *gyrB* y en *parC* son raras y no han sido descritas mutaciones en *parE*¹⁶⁰. Si bien estas mutaciones solitarias no se manifiestan como una resistencia a ciprofloxacina, ha sido demostrado que las cepas presentan una sensibilidad disminuida frente a las fluoroquinolonas, lo que podría resultar en un fallo terapéutico, principalmente en las infecciones extraintestinales por *Salmonella*⁸. Adicionalmente, una doble mutación en ambos residuos, 83 y 87, se traduciría en una resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas (p. ej. C.I.M. de 32 µg/ml para ciprofloxacina)⁴¹.

Diversos autores han demostrado que aquellas cepas resistentes "in vitro" al ácido nalidíxico poseen una sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas, que no es detectada mediante el uso del disco de ciprofloxacina pero si mediante la determinación de la CIM para este antimicrobiano^{134,77}. Esto ha llevado a que en el año 2003 el NCCLS recomiende el uso del disco de ácido nalidíxico frente a aislamientos de *Salmonella*¹⁴⁵ y a que actualmente se plantee la necesidad de modificar los puntos de corte para la interpretación de las pruebas de susceptibilidad frente a quinolonas¹.

En ciertos aislamientos se han encontrado mecanismos múltiples de resistencia a las quinolonas, como ser doble mutaciones en *gyrA*, mutación simple en *gyrB* y sobre-expresión de un sistema de expulsión del tipo AcrAB-TolC, lo cual conduciría a un alto nivel de resistencia con CIMs mayores a 32 µg/ml¹⁸.

Aunque algunos estudios han informado sobre alteraciones en la expresión de las proteínas de membrana externa como implicadas en la resistencia a quinolonas en *Salmonella*, no aparece claramente en esos estudios si tales alteraciones contribuyen significativamente a disminuir la permeabilidad de la membrana y a la subsecuente resistencia al antimicrobiano^{70,161}. Se postula que quinolonas hidrofílicas como la ciprofloxacina usan preferencialmente la vía de las porinas para penetrar en la célula, y en relación con esto se ha informado la falta de expresión de la porina OmpF en cepas de *Salmonella* resistentes a quinolonas. Sin embargo, no queda claro si este hecho contribuye a disminuir los niveles de acumulación intracelular de la droga⁴¹.

C. Resistencia a trimetoprima

Trimetoprima es un antibacteriano sintético que posee una estructura similar al dihidrofolato e inhibe la síntesis de ácido fólico por unión competitiva e irreversible con la dihidrofolato reductasa (DHFR). Este antimicrobiano se administra junto a sulfametoxazol debido al efecto sinérgico de dicha combinación⁸⁷.

La resistencia a trimetoprima en *Salmonella* está relacionada con la incorporación de plásmidos que codifican una DHFR supernumeraria que posee menor afinidad por el fármaco que la DHFR producida naturalmente por la bacteria¹⁷¹.

Se conocen aproximadamente 17 genes plasmídicos que codifican resistencia para la trimetoprima, 16 de los cuales han sido encontrados en bacilos gramnegativos⁸⁷. Estos genes se encuentran asociados a un transposón (Tn7) que forma parte de un cassette de resistencia antimicrobiana.

La determinación del tipo de enzima implicada en la resistencia a trimetoprima podría ayudar a entender la epidemiología de las cepas resistentes a dicho antibacteriano. Esta caracterización se realiza normalmente por hibridización mediante sondas de ADN específicas para cada tipo de gen *dfp* o por amplificación mediante PCR con iniciadores específicos de familia de genes *dfp* y posterior digestión de los amplicones con diferentes enzimas de restricción¹⁴⁷.

1.5.3. Transferencia de la resistencia antimicrobiana en *Salmonella*

El cromosoma bacteriano representa un mosaico de información genética en constante cambio ya que plásmidos, bacteriófagos y otros elementos extracromosomales móviles pueden ser incorporados al cromosoma, vueltos a separar, reinsertados, multiplicados, borrados e intercambiados, aún entre especies no relacionadas entre sí¹⁶⁶.

Los genes de resistencia pueden ser adquiridos por las bacterias a través de diferentes vías como son la conjugación (a través de pili sexuales), transformación (por captación de ADN libre) y la transducción (a través de bacteriófagos)¹⁹⁰.

Cada genoma de *Salmonella* podría contener entre 30 y 75 genes de transposasa, los cuales pueden promover la transposición, integración o escisión de fragmentos de ADN¹⁶⁶. Estos genes pueden haber sido introducidos a través de fagos, transposones o secuencias de inserción (IS), regiones cortas que codifican transposasas y permiten el reacomodamiento y la duplicación genómica, existiendo en *Salmonella* entre 3 y 11 elementos denominados IS200¹⁶⁶.

Un importante vehículo por el cual *Salmonella* y otras bacterias adquieren resistencia antimicrobiana son los integrones los cuales son elementos genéticos móviles que han sido encontrados en plásmidos, en transposones e integrados al cromosoma bacteriano²². Los integrones están constituidos por múltiples genes que incluyen: a) un gen que sintetiza la integrasa (*intI*) la cual permite que el integrón se inserte y se escinda del ADN diana (plásmido, transposón o cromosoma), b) promotores para la expresión de los genes de resistencia con un sitio de inserción (*attI*) para los cassettes de resistencia, c) genes que codifican la resistencia a sulfonamidas (*SulI*) y detergentes (QacEΔ1) y d) un marco de apertura de lectura con función desconocida (Orf5)⁵⁹.

Los cassettes de genes de resistencia, constituidos por un gen de resistencia y un sitio de recombinación conocido de 59 bases, están insertados en el sitio *attI*¹⁷⁵. La transferencia de estos genes puede ocurrir entre diferentes especies y esta diseminación interespecies puede alcanzar gran importancia epidemiológica y sanitaria debido a que genes derivados de un variado número de fuentes pueden ser transferidos a cepas de *Salmonella*²².

1.5.4. Resistencia múltiple a los antimicrobianos

En los últimos años se ha registrado un incremento en la resistencia múltiple en algunos serotipos de *Salmonella*, principalmente frente a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclinas^{68,209,214,234}. También se han reportado aislamientos de *Salmonella* resistentes a cefalosporinas de tercera gene-

ración y a quinolonas lo cual resulta de particular importancia ya que estos antimicrobianos se consideran de elección para el tratamiento de las formas invasivas de las salmonelosis^{58,181,213}.

Las cepas de *S. Typhimurium* tipo definitivo 104 (DT104) son frecuentemente resistentes a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol y tetraciclina (ACSSuT)¹²², mientras que los aislamientos de *S. Typhimurium* DT193 muestran resistencia a ampicilina, kanamicina, estreptomicina, sulfametoxazol y tetraciclina (AKS-SuT)⁶⁹. Las primeras poseen un grupo de genes cromosómicos para la pentarresistencia ACSSuT²¹⁴, mientras que los genes que codifican la pentarresistencia AKSSuT fueron encontrados en plásmidos⁶⁸. Estos aislamientos contienen dos integrones, uno que confiere resistencia a estreptomicina (*aadA2*) y sulfametoxazol (*suI*) y el otro a ampicilina (*bla_{PSE-1}*) y sulfametoxazol (*suI*) y ubicados entre esos integrones en el cromosoma DT104 están los genes que codifican la resistencia para cloranfenicol (*cmI*) y tetraciclina (*tetR* y *tetA*)³³.

Además, están apareciendo cepas DT104 con resistencia frente a otras drogas incluyendo cefalosporinas y fluoroquinolonas⁴⁵.

Por otra parte, actualmente *Salmonella* Newport constituye un problema emergente de salud pública ya que son frecuentes los aislamientos resistentes a ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol, tetraciclina y resistencia completa o intermedia a ceftriaxona^{60,174,191,234}.

En cepas de *Salmonella* resistentes a las cefalosporinas de tercera generación se encontraron integrones que además de los genes *bla*_{CMY-2} codificaban resistencia a cloranfenicol, sulfametoxazol, tetraciclinas y estreptomina¹⁷⁴.

La multirresistencia no se limita a aislamientos humanos de *Salmonella*. Durante un programa de vigilancia realizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, se detectó que la principal fuente de cepas resistentes provenía de vegetales y que presentaba variaciones entre los diferentes serotipos⁹³.

1.6. PATOGÉNESIS DE LA SALMONELOSIS

Las infecciones producidas por *Salmonella* pueden clasificarse primariamente en fiebre tifoidea (o fiebre entérica) y en salmonelosis (o infecciones no tifoideas). En los Estados Unidos se estima que anualmente ocurren aproximadamente 1,5 millones de casos nuevos de salmonelosis¹³⁰, pero en nuestro país estas cifras son inciertas debido a que esta patología no es de notificación obligatoria como tal, sino que se incluye dentro de las gastroenteritis bacterianas.

Aunque la presentación clínica más común de la salmonelosis es la gastroenteritis con náuseas, vómitos y diarrea con o sin fiebre, un pequeño porcentaje (<5%) de los pacientes desarrolla infecciones invasivas pudiendo en algunos casos evolucionar a infecciones extraintestinales incluyendo bacteriemias, y entre el 5 al 10% pueden desarrollar una infección localizada como ser abscesos e infecciones urinarias¹⁰¹.

La enfermedad invasiva por *Salmonella* puede ser causada por varios serotipos y se inicia con una serie de eventos caracterizados por la adhesión de la bacteria al epitelio y su ingreso al interior de la célula⁷³, tal como se muestra en la Figura 6.

La adhesión de la bacteria al epitelio intestinal del huésped es la etapa fundamental para el inicio de la infección y está mediada por diferentes fimbrias cuya especificidad de hospedero depende de la relación con los diversos receptores presentes en las células epiteliales⁴⁶.

Salmonella es capaz de invadir células no fagocíticas de la mucosa intestinal debido a un aparato de secreción de Tipo III que induce la endocitosis por reordenamiento del citoesqueleto y posteriormente causar gastroenteritis por multiplicación dentro del tejido linfoide asociado (Placas de Peyer)¹⁸⁵.

La progresión a infección diseminada requiere un acceso adicional a los nódulos linfáticos mesentéricos seguido de la captación de las bacterias por parte de las cé-

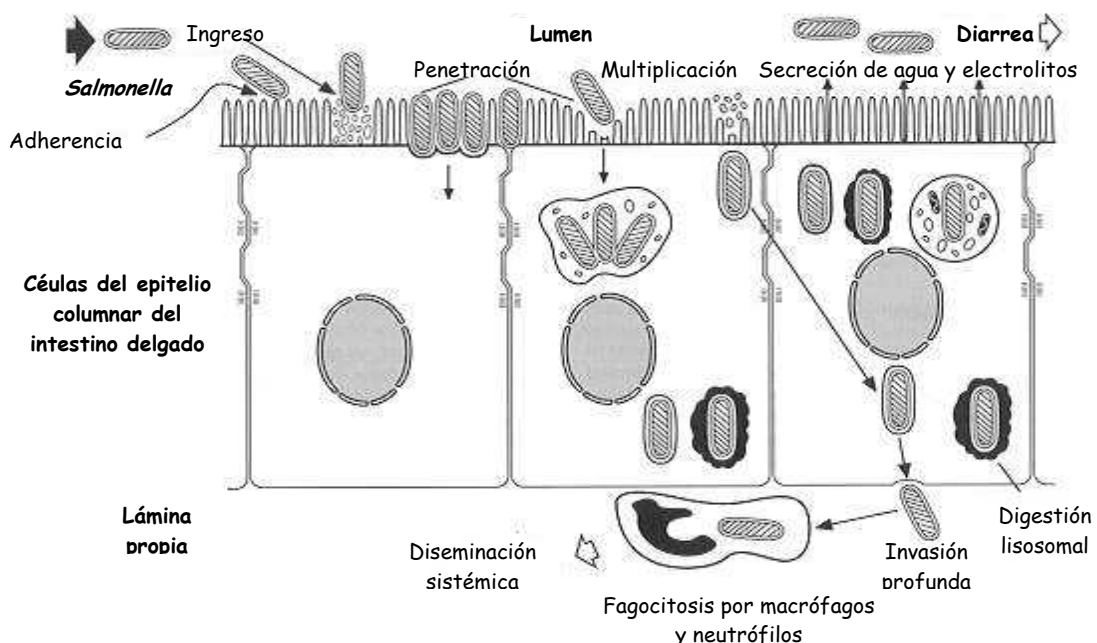


Fig. 6: Esquema del proceso patogénico de *Salmonella*

lulas fagocíticas para ser transportadas al hígado y al bazo.

La inmunidad frente a la infección por salmonelas es bastante compleja y está aún en estudio pero se sabe que la respuesta de anticuerpos frente a la infección está dirigida principalmente hacia el lipopolisacárido de la pared celular bacteriana. Se ha demostrado que pequeños cambios estructurales en el lipopolisacárido de ciertas cepas de *Salmonella* provocan cambios en la interacción con el sistema inmune del huésped, lo que podría hacer variar el comportamiento de éste frente a los diferentes serotipos¹⁹⁴.

La complejidad de genes necesarios para que *Salmonella* ejerza su poder patógeno ha sido ampliamente estudiada en *Salmonella* Typhimurium, habiéndose encontrado que estos genes forman parte de "islas de patogenicidad" de las que se han encontrado al menos cinco y se ha demostrado que pueden haber sido adquiridos por transferencia horizontal a partir de otros organismos¹²⁰.

1.7. EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS

El rango de hospederos de *Salmonella* es variado; algunos serotipos son patógenos exclusivos del hombre, como *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, mientras que otros pueden afectar hospederos de diferentes especies, como ser *S. Typhimurium* y *S. Newport*^{121,185}.

La etiología de los casos de salmonelosis humana está frecuentemente asociada a una veintena de serotipos, lo que sugiere que no todos los serotipos serían patógenos para el hombre^{188,189}. Sin embargo, cada vez son más los serotipos que se identifi-

can a partir de casos humanos de salmonelosis, especialmente entre aquellos pacientes inmunocomprometidos.

Un factor clave que define un serotipo particular de *Salmonella* como patógeno exitoso es su habilidad para inducir la captación de la bacteria por parte del enterocito, su capacidad para ingresar en células no fagocíticas del huésped y su adaptación a un amplio rango de hospedadores^{64,86}.

Varias especies animales han sido identificadas como hospedadoras de *Salmonella* y pueden actuar como reservorios para las infecciones humanas^{3,85} por lo que esta bacteria puede ingresar a la cadena alimenticia por contaminación de las carnes con heces animales en los mataderos, durante el procesamiento o a través de los manipuladores de alimentos^{91,135,231}. Es por ello que las infecciones humanas por *Salmonella* no Typhi se asocian más frecuentemente con el consumo de productos alimenticios, especialmente aquellos de origen animal como aves, huevos, carne y productos de granja^{34,91,219}, aunque también se han registrado brotes debido al consumo de agua contaminada con heces de mascotas³. Las medidas que se tomen para controlar estas rutas de transmisión son formas efectivas para prevenir la salmonelosis.

Los datos sobre colonización e infección por *Salmonella* en cada especie animal individual varían ampliamente según el tiempo, región, estación del año y metodología aplicada para el estudio^{108,202}.

Los prevalencia de serotipos y cepas de *Salmonella* para cada especie animal es un componente importante de un programa de vigilancia epidemiológica, debido a que algunos serotipos derivan casi exclusivamente de ciertas fuentes particulares; por

ejemplo, *S. Enteritidis* es más frecuentemente aislado a partir de huevos²⁰⁴, mientras que los serotipos Choleraesuis, Derby, Typhimurium, Heidelberg, Worthington y Mbandaka fueron encontrados más comúnmente en porcinos^{47,218} y Heidelberg, Kentucky, Hadar, Typhimurium y Thompson fueron los 5 más frecuentes en pollos¹⁸⁶. Existe además una considerable coincidencia en los serotipos más frecuentemente hallados en animales o ambientes y aquellos hallados en los seres humanos de la misma región geográfica²¹⁹.

1.8. PROGRAMAS DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LA SALMONELOSIS

El impacto económico de las infecciones por *Salmonella* es muy importante y ha sido seriamente analizado en países desarrollados porque los gastos no se asocian solamente con el tratamiento, la prevención y la investigación, sino también porque afectan a la cadena de producción alimenticia y a la pérdida de horas/hombre de trabajo¹⁸². Es por ello que los programas de vigilancia que registran la prevalencia y la susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* de origen humano y animal son puntos críticos en el gerenciamiento de la salud pública²³³.

A pesar de ser un antiguo patógeno, *Salmonella* continúa presentando desafíos en cuanto a su vigilancia y control¹⁵¹. El primero de ellos es la enorme amplitud que actualmente presenta la distribución mundial del mercado de los alimentos, por lo cual productos contaminados procedentes de un país pueden causar infecciones en otro sitio alejado. Por esto mismo, un segundo desafío lo constituye la trazabilidad de un brote debido a la complejidad de las cadenas de distribución de un alimento y/o la

falta de marcadores identificatorios que permitan determinar el origen exacto de los alimentos. El tercer desafío se vincula con la resistencia antimicrobiana debido al aumento de cepas multirresistentes en la última década.

Programas de vigilancia a nivel local, regional, nacional e internacional están siendo establecidos en diferentes países para trazar los brotes por *Salmonella* y su distribución geográfica y conocer los patrones de resistencia^{118,213}.

En 1996, el CDC, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos establecieron el Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana (NARMS) con el objetivo de conocer prospectivamente los cambios en la susceptibilidad antimicrobiana de patógenos zoonóticos^{118,217}. Para ello se analizan los datos de aislamientos obtenidos a partir de muestras clínicas humanas y animales, animales sanos de granja, así como de reses y carcasas de animales en plantas de faenamiento.

En Argentina, recién en junio de 1999 se incorporó la vigilancia de los brotes de toxiinfección alimentaria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica²⁵.

Otros ejemplos de programas instalados para la vigilancia de patógenos de transmisión alimentaria y/o susceptibilidad incluyen FoodNet⁹², DANMAP¹⁴ y EnterNet¹⁹⁶. Estos programas y redes de monitoreo proveen los más extensos datos disponibles en la actualidad para ayudar a la toma de decisiones en políticas de salud en relación a este tema²³³.

2. FUNDAMENTACIÓN

El Nordeste de Argentina presenta uno de los peores índices de pobreza y de morbi-mortalidad de todo el país, lo que señala profundas carencias socio-sanitarias en su población.

El elevado número de casos de enfermedades gastrointestinales registrados anualmente y la escasez de datos sistematizados y disponibles acerca de la etiología y epidemiología de los mismos han despertado el interés por estudiar exhaustivamente los aislamientos de *Salmonella*, con el propósito final de aportar información que permita conocer mejor la epidemiología de la salmonelosis en nuestra región y de esta manera contribuir a su prevención y control.

3. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos para el presente trabajo de tesis fueron los siguientes:

1. Estudiar la resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* aisladas de diversos orígenes en las provincias de Chaco y Corrientes (Argentina).
2. Determinar los mecanismos y factores genéticos que median dichas resistencias.
3. Investigar la relación clonal existente entre los aislamientos de *Salmonella* circulantes en la región.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CEPAS ESTUDIADAS

Se analizaron 172 aislamientos de *Salmonella* spp recuperadas entre 1997 y 2003 a partir de 170 muestras clínicas de pacientes atendidos en centros asistenciales privados y estatales de las provincias de Chaco y Corrientes (Argentina). Se incluyeron además 2 aislamientos de origen animal y ambiental.

Los aislamientos identificadas presuntamente como *Salmonella* spp en cada laboratorio de origen fueron inoculadas en agar conservación y remitidas al Departamento de Bacteriología del Instituto de Medicina Regional (Universidad Nacional del Nordeste) para su estudio posterior.

A cada cepa se le asignó un código alfanumérico que incluía las iniciales del laboratorio o profesional que envió el aislamiento y el correspondiente número de ingreso (por ejemplo, la cepa HV234 fue el aislamiento número 234 del Hospital J R. Vidal).

Como control de diversidad clonal en diferentes técnicas de biología molecular se incluyeron 4 cepas de *Salmonella* pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con sede en Valencia (España) y 7 aislamientos provenientes de diferentes regiones de Argentina cedidas por el Departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" (Buenos Aires, Argentina).

4.2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y SEROLÓGICA

Los aislamientos recibidos en agar conservación fueron resemebrados en agar

verde brillante bilis y luego de 24 hs de incubación a 37°C se procedió a reconfirmar la identidad de las cepas mediante las pruebas bioquímicas clásicas, entre las cuales se incluyeron la fermentación de glucosa y lactosa, producción de sulfuro de hidrógeno, producción de indol, motilidad, utilización del citrato, producción de ureasa, hidrólisis del orto-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG) y presencia de citocromooxidasa²⁷.

Una vez realizada la identificación bioquímica, se efectuó una identificación serológica inicial mediante técnica de aglutinación en placa²⁷ con antisueros polivalentes dirigidos contra el antígeno somático O (OMA y OMB, Instituto Pasteur, París, Francia).

Posteriormente, cumpliendo con los precedimientos vigentes en el marco de la Red Nacional de Laboratorios, las cepas fueron enviadas al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" en la ciudad de Buenos Aires donde se determinó la serovariedad mediante aglutinación con sueros anti O y anti H.

Las cepas fueron mantenidas en agar conservación a temperatura ambiente y en caldo glicerinado al 15% a -20°C hasta la realización de estudios posteriores.

4.3. ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

4.3.1. Antibiograma mediante difusión con discos

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron mediante el método de difusión con monodiscos según recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹⁴²⁻¹⁴⁶ frente a ampicilina 10 µg, ampicilina/sulbactama 10/10 µg, cefalotina 30 µg, gentamicina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg,

ácido nalidíxico 30 µg, colistina 10 µg, fosfomicina 200 µg, tetraciclina 30 µg, furazolidona 100 µg, trimetoprima/sulfametoxazol 1,25/23,75 µg, neomicina 30µg, cloramfenicol 30 µg y sulfisoxazol 300 µg.

El control de calidad interno para todas las pruebas de sensibilidad se realizó utilizando las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* 29212.

4.3.2. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas

Con el objeto de determinar el nivel de resistencia antimicrobiana frente a los agentes betalactámicos en las cepas resistentes a ampicilina, ampicilina/sulbactama, cefotaxima y ceftazidima se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) frente a dichos antibióticos mediante dilución en agar de acuerdo a las recomendaciones del NCCLS¹⁴⁴.

Las CIMs frente a cefotaxima en los aislamientos resistentes fueron confirmadas mediante el método epsilométrico (E-Test) siguiendo las especificaciones de los fabricantes¹¹⁰.

4.4. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA

4.4.1. Resistencia a betalactámicos

En aquellas cepas que presentaron resistencia frente a cefalotina, se estudió la posible existencia de una betalactamasa de espectro extendido. Para ellos se evaluó la susceptibilidad frente a cefoxitina 30 µg, cefotaxima 30 µg y ceftazidima 30 µg y

se aplicaron diferentes técnicas con el objeto de determinar fenotípicamente el tipo de betalactamasa posiblemente involucrada¹¹⁰.

A. Prueba del doble disco

Cuando los halos de cefotaxima y/o de ceftazidima fueron menores o iguales a 27 y 23 mm respectivamente, se agregó un disco de cefotaxima/ácido clavulánico 30/10 μg con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria de este último sobre la betalactamasa involucrada¹⁴³. Se consideró que la cepa era productora de BLEE cuando la diferencia entre los halos de los discos de cefotaxima y de cefotaxima/ácido clavulánico era mayor a 5 mm.

B. Detección de betalactamasas por isoelectroenfoque

La producción de β -lactamasas se demostró mediante isoelectroenfoque (IEF) aplicando el método descrito por Gallardo y cols⁶². Para ello, los aislamientos fueron cultivados durante 12 horas a 37°C en 10 ml de caldo tripteína soya, conteniendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Un mililitro de cada cultivo fue luego sembrado en 10 ml del mismo medio sin antibiótico e incubado durante 3 horas a 37°C. Las suspensiones bacterianas resultantes fueron sometidas a sonicación dos veces a 20 Hz durante 30 segundos cada vez y luego centrifugadas a 13000 rpm durante 1 hora a 4°C. Los sobrenadantes conteniendo las enzimas fueron sometidos a isoelectroenfoque analítico en un gel de poliacrilamida conteniendo un gradiente de anfólitos con un rango de pH de 3 a 10. La migración se realizó con tres voltajes consecutivos (100V por 15 minutos, 200 V por 15 minutos y 400 V durante 1 hora). Las β -lactamasas fueron reveladas

cubriendo el gel con una solución de cefalosporina cromogénica (Nitrocefín) 1 mM. Los puntos isoeléctricos (pI) fueron determinados por comparación con β -lactamasas de punto isoeléctrico conocido obtenidas de cepas de *Salmonella* pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

C. Detección de genes de resistencia mediante PCR

Para detectar los genes codificantes de β -lactamasas mediante la PCR se obtuvo el ADN bacteriano total (cromosómico y plasmídico) según las técnicas previamente descritas por Barnaud y cols.¹⁷ y Lagatolla y cols.⁹⁸. Para ello se realizó una suspensión de una colonia de 24 hs de cultivo en 25 μ l agua destilada estéril y se la sometió a ebullición durante 10 minutos y a posterior centrifugación a 13000 rpm durante 5 segundos, con el objeto de sedimentar los restos celulares y dejar el material genético en suspensión.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en volúmenes de 50 μ l conteniendo 25 μ l del extracto de ADN bacteriano, 5 μ l de buffer para PCR 10X, 5 μ l de mezcla de trifosfato de desoxinucleótidos (2 mM de cada uno de ellos), 5 μ l de sendos cebadores (2,5 pmol/ml de cada uno) y 5 μ l de agua destilada estéril. Cada mezcla de reacción fue cubierta con aceite mineral y sometida a amplificación en termociclador.

Para la PCR se utilizaron los pares de iniciadores (primers) para los genes *bla*-TEM, *bla*_{SHV}, *bla*_{CARB}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{AMPC}, *bla*_{PER}, *bla*_{CTX-M-2}, cuyas secuencias nucleotídicas se muestran en la Tabla 10, aplicándose en cada caso parámetros de amplificación previamente descritos^{20,172,202}.

Como controles positivos se incluyeron las mismas cepas poseedoras de genes codificantes de β -lactamasas que para el isoelectroenfoco.

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 2%, los que fueron teñidos con bromuro de etidio al 0,5% y fotografiados con película Polaroid en transiluminador de luz UV. El tamaño de las bandas de los amplificadores se determinó por comparación visual con un marcador de pesos de 100 bp.

D. Estudio de la presencia de integrones

Para estudiar la presencia de integrones, 25 μ l de una suspensión bacteriana en agua destilada fue sometida a ebullición durante 10 minutos y posteriormente amplificada según la técnica aplicada por Lévesque y cols¹⁰², utilizando el par de iniciadores IntI cuyas secuencias nuclóticas aparecen en la Tabla 10.

Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, el cual fue teñido con bromuro de etidio al 0,5% y fotografiado con película Polaroid en transiluminador de luz UV. El tamaño de las bandas de los amplificadores se determinó por comparación visual con un marcador de pesos de 100 bp.

E. Ensayos de conjugación

Los ensayos de conjugación se llevaron a cabo según la técnica aplicada por Gaillot y colaboradores⁶¹. Los aislamientos de *Salmonella* resistentes a cefotaxima se enfrentaron con la cepa receptora *Escherichia coli* DHR α (NAL^R CTX^S) en caldo LB. Luego de 24 horas de incubación a 35°C, los transconjugantes fueron seleccionados

sobre agar Mac Conkey suplementado con cefotaxima (2 µg/ml) y ácido nalidíxico (100 µg/ml).

4.4.2. Resistencia a quinolonas

A. Detección de bombas de eflujo

En las cepas resistentes al ácido nalidíxico se estudió la presencia de bombas de expulsión (eflujo) mediante antibiograma por difusión frente al ácido nalidíxico y ciprofloxacina, en presencia y en ausencia de fenil-arginil-beta-naftilamida (Sigma), un inhibidor del sistema de expulsión activa AcrAB¹⁷⁶.

También se determinó la CIM para los mismos antibióticos mediante dilución en agar en presencia y ausencia del inhibidor mencionado.

B. Detección de mutaciones en gyrA

Con el fin de determinar la presencia de mutaciones, se amplificaron los fragmentos correspondientes a la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) del gen *gyrA* mediante PCR, utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 10, siendo posteriormente secuenciados en secuenciador automatizado según técnicas previamente descritas¹⁸.

La secuencia nucleotídica obtenida se comparó con la que se encuentra en la base de datos GenBank a fin de determinar el cambio de base existente.

4.5. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS

4.5.1. Estudio de la dotación plasmídica

La presencia de plásmidos se estudió por el método descrito previamente por Kado y Liu⁸⁹ y modificado por Nakamura y colaboradores¹⁴⁰. Luego de una incubación de 18 hs en 10 ml de caldo LB, los aislamientos fueron centrifugados, resuspendidos en buffer E (Tris-Acetato-EDTA) y sometidos a lisis alcalina (NaOH, TRIS y Dodecil-sulfato de sodio) durante 1 hora a 55 °C. Posteriormente se realizó una extracción con fenol:cloroformo 1:1 vol/vol, mediante mezclado suave por inversión y centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

El sobrenadante conteniendo el material plasmídico fue sembrado y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0,75% durante 1 hora a 75V, teñidos con bromuro de etidio al 0,5% y fotografiados con película Polaroid en transiluminador de luz UV.

Los pesos moleculares aproximados de los plásmidos fueron determinados visualmente por comparación con plásmidos conocidos de *Escherichia coli* V517, gentilmente cedida por personal del Servicio de Antimicrobianos del Instituto "Carlos G. Malbrán" de la ciudad de Buenos Aires.

4.5.2. Amplificación de segmentos repetitivos mediante PCR

Con el fin de determinar la relación clonal de las cepas estudiadas en el presente proyecto, en base a la presencia de elementos repetitivos en su genoma, se utilizaron las técnicas de REP-PCR y ERIC-PCR. Para ello una colonia de cada aislamiento de *Salmonella* fue suspendida en 25 µl de agua destilada estéril y sometida a ebulli-

ción durante 10 minutos para liberar el ADN.

Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 segundos y sobre cada tubo se agregó la mezcla de reacción compuesta por buffer de PCR, 1,5 mM de Cl_2Mg , 200 μ mol de cada DNTP, 10 pmol de cada cebador y 1,5U de Taq DNA polimerasa²²⁴.

La técnica de REP-PCR fue ejecutada de acuerdo al método descrito previamente por Gallardo y cols.⁶², usando los iniciadores REP1 y REP2 (Invitrogen), solos y en forma conjunta (Tabla 10).

La técnica de ERIC-PCR fue utilizada según el método descrito por Beyer y cols.²⁴ con algunas modificaciones: 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 52°C por 1 min, y extensión a 65°C por 8 min, con un paso único de extensión final a 65°C por 16 min. Se utilizaron los primers ERIC1 y ERIC2 en forma conjunta y separadamente (Tabla 10).

Tabla 10: Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados en el presente trabajo.

Sitio diana o propósito	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
Perfiles ERIC	ERIC-1	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	24
	ERIC-2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	
Perfiles REP	REP-1	GCG CCG ICA TGC GGC ATT	62
	REP-2	ACG CCT TAT CCG GCC TAC	
Integrón Clase I	IntI-R	CGA GGC ATA GAC TGT AC	138
	IntI-F	TTC GAA TGT CGT AAC CGC	
Bla CTX-M-2	CTX-M-2R	TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT C	17
	CTX-M-R2F	GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG	
Bla TEM-1	TEM-1R	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA	62
	TEM-1F	GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A	
Bla PER-1	PER-2R	CGC TTC TGC TCT GCT GAT	62
	PER-2F	GGC AGC TTC TTT AAC GCC	
Bla OXA-1	OXA-1R	GGC ACC AGA ATT CAA CTT TCAA	62
	OXA-1F	TTT TTC TTG GCT TTT ATG CTT G	
Bla CARB-1	CARB-1R	GAA TGA CCA ATT TTA ACA ATC GC	164
	CARB-1F	CGC TTT TAA TAC CAT CCG TGG	
Bla SHV-like	SHV-R	GTA TCC CGC AGA TAA ATC A	62
	SHV-F	ATT ACC ATG AGC GAT AAC A	
QRDR	STGYRA-R	TGT CCG AGA TGG CCT GAA GC	70
	STGYRA-F	CGT TGA TGA CTT CCG TCA G	

Para ambas técnicas, se analizaron 20 µl de cada producto final de la PCR sobre gel de agarosa al 1,5% conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Se incluyó un marcador de pesos de 100 bp.

4.5.3. Análisis del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsátil.

Para el estudio de la relación clonal de las cepas se aplicó además el análisis del ADN cromosómico total por electroforesis en campo pulsátil (PFGE). Para ello, el ADN genómico fue preparado según lo descrito previamente por Matushek y colaboradores¹²³.

Las bacterias se incubaron en caldo LB con agitación durante 18 horas a 37°C y luego suspendidas en 1ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, a una temperatura apenas por encima del punto de fusión y enfriado en moldes de plástico durante 20 minutos.

Los bloques de agarosa resultantes fueron incubados a 37°C durante una noche en solución de lisis (lisozima, Tris-HCl, N-lauroilsarcosina, EDTA) y otra noche a 50°C en 2,5 ml de solución desproteinizante (EDTA, N-lauroilsarcosina, Proteinasa K). Los restos celulares y la proteinasa fueron removidos mediante dos lavados con buffer Tris-EDTA. Los bloques conteniendo el ADN bacteriano fueron sometidos a digestión enzimática con *Xba*I durante 15 horas a 37°C.

La electroforesis de los bloques conteniendo el ADN digerido se llevó a cabo en un aparato de campo pulsante (CHEF-DRIII, Bio-Rad Laboratories) en gel de agarosa al 1% en buffer Tris-Borato-EDTA, durante 24 horas a 200 V y 14 ciclos, con un

tiempo de pulso que varió entre 2 y 43,2 segundos.

Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta. Los patrones de ADN obtenidos fueron analizados visualmente e interpretados de acuerdo a los criterios sugeridos por Tenover y cols²¹¹.

Además de un marcador de pesos moleculares se incluyeron 4 cepas españolas de *Salmonella* Infantis para comparación de la diversidad clonal.

El estudio se repitió usando *Xho*I como enzima de restricción, bajo las mismas condiciones mencionadas precedentemente.

5. RESULTADOS

5.1. Origen de los aislamientos

Las muestras clínicas a partir de las cuales se aislaron las 172 cepas estudiadas en el presente trabajo se clasificaron de la siguiente forma: materia fecal (162), orina (4), sangre (3) y esputo (1); además se analizaron 2 cepas ambientales: 1 de agua de perforación y otra de vísceras de ave de corral.

En cuanto al origen geográfico, 55 cepas fueron aisladas en la provincia del Chaco y 117 en la provincia de Corrientes.

5.2. Serotipificación

Las 172 cepas analizadas pudieron clasificarse dentro de 16 serovariedades (serotipos) cuya frecuencia se presenta en la Tabla 11, discriminados según el origen geográfico de los aislamientos. Como puede apreciarse, en el presente trabajo *S. Newport* fue el serotipo más prevalente, seguido por *S. Enteritidis* y *S. Infantis*.

Serovariedad o serotipo	Chaco	Corrientes	TOTAL	
	n	n	n	%
<i>S. Newport</i>	4	57	61	35,5
<i>S. Enteritidis</i>	10	34	44	25,5
<i>S. Infantis</i>	27	8	35	20,3
<i>S. Typhimurium</i>	7	2	9	5,2
<i>S. Oranienburg</i>	2	3	5	2,9
<i>S. Derby</i>	0	4	4	2,3
<i>S. Javiana</i>	1	2	3	1,7
<i>S. Hadar</i>	0	2	2	1,2
<i>S. Panamá</i>	0	2	2	1,2
<i>S. Chester</i>	0	1	1	0,6
<i>S. Corvalis</i>	1	0	1	0,6
<i>S. Livingstone</i>	0	1	1	0,6
<i>S. Meleagridis</i>	1	0	1	0,6
<i>S. Michigan</i>	1	0	1	0,6
<i>S. Montevideo</i>	1	0	1	0,6
<i>S. Muenchen</i>	0	1	1	0,6
Total	55	117	172	100

5.3. Susceptibilidad antimicrobiana global

Los estudios de sensibilidad antimicrobiana mostraron que el 100% de los aislamientos fueron sensibles a ciprofloxacina, colistina, fosfomicina, neomicina y sulfisoxazol. Las drogas frente a las cuales se encontró mayor tasa de resistencia fueron furazolidona, cefalotina, ampicilina, ampicilina/sulbactama y gentamicina (Tabla 12).

Tabla 12: Sensibilidad antimicrobiana global de las cepas de *Salmonella* aisladas en el NEA

Antimicrobiano	Cepas sensibles	
	n	%
Ciprofloxacina	172	100
Colistina	172	100
Fosfomicina	172	100
Neomicina	172	100
Sulfisoxazol	172	100
Trimetoprima/sulfametoxazol	171	99,4
Cloranfenicol	170	98,8
Ácido nalidíxico	167	97,1
Tetraciclina	166	96,5
Gentamicina	137	79,6
Ampicilina/sulbactama	136	79,1
Cefalotina	134	77,9
Ampicilina	124	72,1
Furazolidona	113	65,7

Sin embargo, al analizar el perfil de susceptibilidad en cada una de las 3 serovariedades más frecuentes, se encontró una amplia variación en el número de cepas resistentes (Tabla 13)

Tabla 13: Resistencia antimicrobiana de las serovariedades más frecuentes de *Salmonella* encontradas en el NEA

Antimicrobiano	S. Infantis (N=35)		S. Enteritidis (N=44)		S. Newport (N=61)	
	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%
Ampicilina	29	82,8	2	4,5	0	0
Ampicilina/sulbactama	29	82,8	0	0	0	0
Cefalotina	28	80	0	0	0	0
Furazolidona	28	80	25	56,8	0	0
Gentamicina	28	80	0	0	0	0
Ácido nalidíxico	4	11,4	0	0	0	0
Tetraciclina	1	2,8	0	0	0	0
Trimetoprima/sulfametoxazol	1	2,8	0	0	0	0

5.4. Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular en *Salmonella* Infantis

De las 35 cepas de *S. Infantis* halladas, 28 presentaron resistencia a ampicilina y cefalotina pero fueron sensibles a cefoxitina. De éstas, 10 fueron resistentes a cefotaxima (Halo de inhibición ≤ 27 mm) y también resistentes a gentamicina y furazolidona; solamente 1 de estas cepas fue resistente a trimetoprima/sulfametoxazol.

Todas las cepas resistentes a cefotaxima presentaron una diferencia ≥ 5 mm entre los halos de inhibición frente a este antimicrobiano y frente a su combinación con el ácido clavulánico mientras que el efecto sinérgico con el disco de ampicilina/ácido clavulánico se observó en sólo algunas de ellas (Figura 7). En la Figura 8 se muestra el desarrollo de diferentes cepas resistentes a cefotaxima sobre una placa con 2 μ g/ml de ese antibiótico. Los valores de las CIM para β -lactámicos de las 10 cepas resistentes a cefotaxima se muestran en la Tabla 14.

Fig.7: Detección fenotípica de la producción de BLEE en *Salmonella* Infantis mediante el uso de los discos de ampicilina/ácido clavulánico (izquierda abajo), cefotaxima (izquierda arriba) y cefotaxima/ácido clavulánico (derecha)

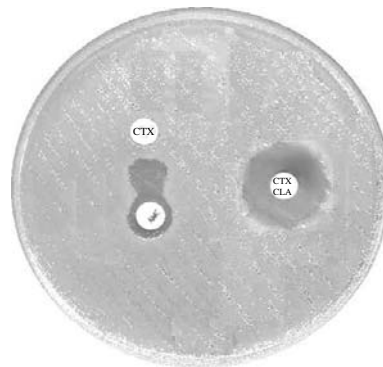


Fig.8: Determinación de la CIM frente a CTX mediante dilución en placa. La placa contiene 2 μ g/ml de CTX y las colonias que desarrollan corresponden a cepas resistentes al antimicrobiano. Como control se incluyó una cepa de resistencia conocida (X)

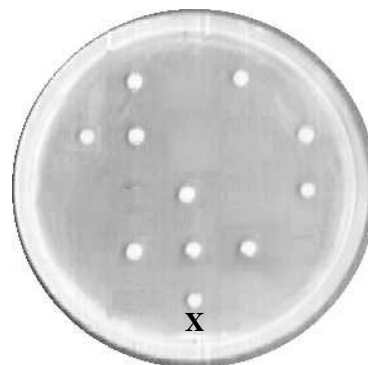
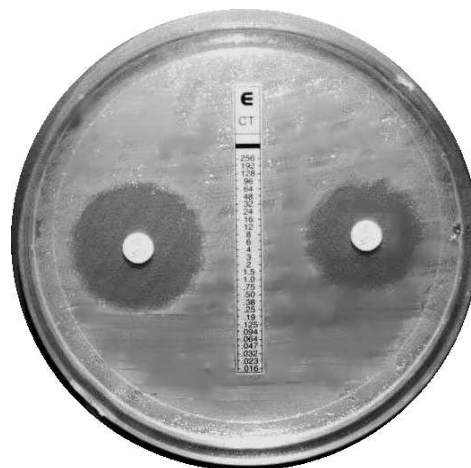


Tabla 14. CIM para β -lactámicos en las 10 cepas de *Salmonella* Infantis resistentes a CTX

CEPAS	CIMs ($\mu\text{g/ml}$)				
	Ampicilina	Ampicilina/sulbactama	Cefoxitina	Cefotaxima	Ceftazidima
HV2	>512	128	2	512	32
SP28	>512	128	2	>512	32
SP30	>512	128	1	>512	16
SP31	>512	128	2	>512	32
SP32	>512	128	1	>512	16
SP33	>512	128	2	>512	32
SP97	>512	128	2	>512	32
SP98	>512	128	1	>512	16
SP100	>512	128	1	>512	16
SP102	>512	128	1	>512	16

Los valores de CIMs para cefotaxima determinadas mediante dilución en agar fueron coincidentes con las determinadas mediante E-test (Figura 9).

Fig. 9: Resultados de pruebas de susceptibilidad antibiótica en una cepa de *Salmonella* Infantis. Izq.: Disco de cefoxitina con halo de sensibilidad (>18 mm). Centro: tira de E-test para cefotaxima con CIM de resistencia (>256 $\mu\text{g/ml}$). Der.: disco de ceftazidima con halo de resistencia (<27 mm).



En 15 cepas de *Salmonella* Infantis resistentes a ampicilina seleccionadas al azar se detectó mediante IEF una β -lactamasa con un pI de 5,4. En las 10 cepas resistentes a cefotaxima se detectó una β -lactamasa adicional con un pI de 8,7. Cuando estas 15 cepas se estudiaron mediante PCR, todas resultaron negativas para bla_{OXA} , bla_{SHV} , bla_{CARB} , bla_{AMP} , y bla_{PER} . En todas se obtuvo un fragmento de 850 bp con bla_{TEM} (Figura 10), mientras que en aquellas resistentes a cefotaxima se obtuvo una banda de 900 bp cuando se amplificó para $bla_{CTX-M-2}$ (Figura 11).

Fig. 10: PCR de las cepas de *S. Infantis* utilizando los iniciadores *bla*_{TEM}. Líneas 1 a 3: cepas en estudio. Línea 4: control positivo. Línea 5: control negativo. Línea 6: Marcador de pesos moleculares de 100 bp.

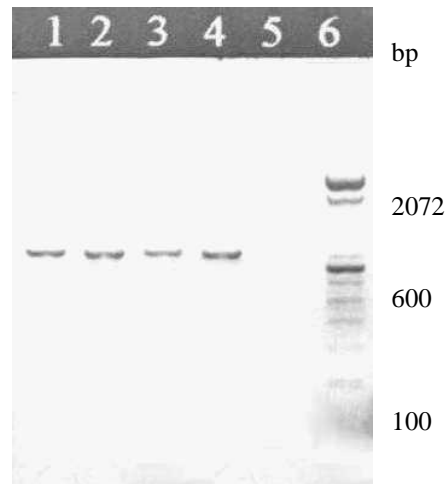
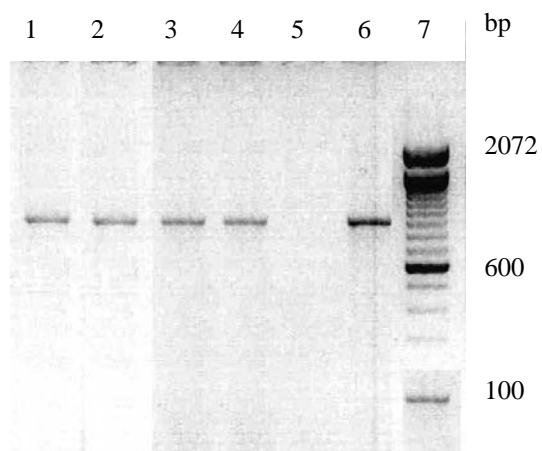


Fig. 11: PCR de las cepas de *S. Infantis* utilizando los iniciadores *bla*_{CTX-M-2}. Líneas 1 a 4: cepas en estudio. Línea 5: control negativo. Línea 6: control positivo. Línea 7: Marcador de pesos.



E

En la Figura 12 se presentan los tres perfiles plasmídicos obtenidos en los 15 aislamientos de *Salmonella* *Infantis*. la relación entre los perfiles de resistencia anti-microbiana y los plásmidos se presentan en la Tabla 15.

Fig. 12: Perfiles plasmídicos representativos de los que se obtuvieron en las cepas de *Salmonella* *Infantis*. Línea 1: cepa SP99; línea 2: cepa SP34; línea 3: cepa SP30

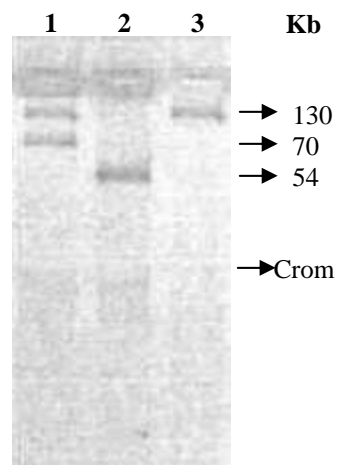
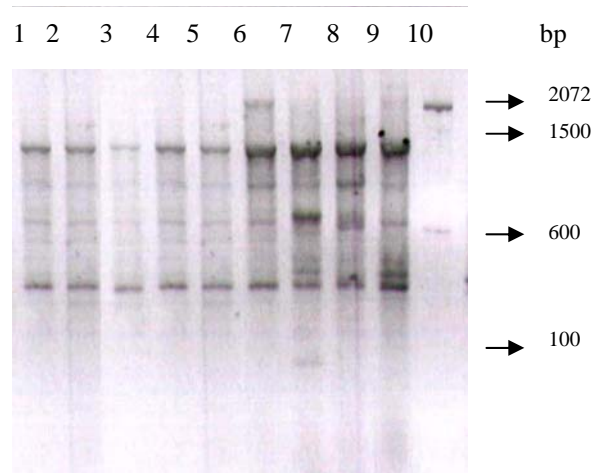


Tabla 15: Relación entre antibiotipos y perfiles plasmídicos en *Salmonella* Infantis aisladas en el NEA

Antibiotipos	Plásmidos (Kb)	Cepas
CTX ^R GEN ^R FUR ^R	130 130, 70	SP30, SP31, SP32, SP33, HV2, SP102 SP97, SP98, SP100
CTX ^S GEN ^S FUR ^S	130	HV141
CTX ^S GEN ^R FUR ^S	130, 70	SP99
CTX ^S GEN ^R FUR ^R	130, 70 54	H61 SP34, SP94, SP103

Los datos de la amplificación de las secuencias REP en esas 15 cepas de *S. Infantis*, revelaron homogeneidad genética entre aislamientos argentinos relacionados y no relacionados epidemiológicamente, mientras que las cepas españolas de igual serotipo que se incluyeron como control de diversidad genética mostraron cuatro patrones de bandas diferentes entre sí y a los de las cepas argentinas (Figura 13).

Fig. 13: Patrones obtenidos mediante REP-PCR en las cepas de *Salmonella* Infantis. Líneas 1 a 5: cepas argentinas. Líneas 6 a 9: cepas españolas. Línea 10: marcador de peso de 100 bp



Además e independientemente de su origen, las 15 cepas argentinas mostraron idénticos patrones de PFGE, aunque diferentes a los de las cepas españolas (Figura 14). Igual fenómeno se observó al digerir el ADN con *XbaI* y con *XhoI*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

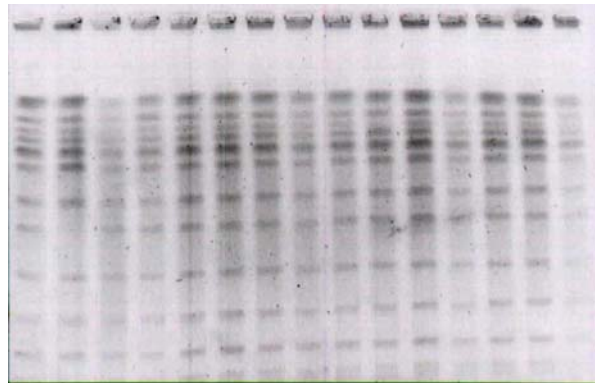


Fig. 14: Patrones de PFGE del ADN total de cepas argentinas digerido con *Xba*I. Líneas 1 a 3: cepas HV141, HV2 y HG1. Líneas 4 a 15: cepas SP30, SP31, SP32, SP33, SP34, SP94, SP97, SP98, SP99, SP100, SP102 y SP103

Otro hallazgo digno de ser mencionado es el encontrado en 6 cepas de *Salmonella* *Infantis* provenientes de un brote de toxiiñfección alimentaria ocurrido en la ciudad de Corrientes en el año 2000. De ellas, 2 fueron sensibles al ácido nalidíxico (Halos = 30 mm y CIMs = 4-8 μ g/ml), 4 resultaron resistentes (Halos = 6 mm y CIMs \geq 256 μ g/ml) y todas presentaron sensibilidad disminuida frente a ciprofloxacina (Halos = 20 mm y CIMs = 2 μ g/ml).

Todas las cepas fueron sensibles al resto de los antimicrobianos ensayados. En presencia del inhibidor de la bomba de expulsión, los halos de inhibición frente a ambos antibióticos presentaron un notable aumento (Figura 15).

Fig. 15: Placas de difusión con discos frente a ácido nalidíxico y ciprofloxacina de una cepa de *Salmonella* *Infantis*. Izquierda: prueba sin inhibidor de la bomba de expulsión del tipo *AcrAB*. Derecha: prueba con inhibidor de *AcrAB*.



Los resultados obtenidos de los halos de inhibición y los valores de CIM frente al ácido nalidíxico y ciprofloxacina en presencia y ausencia del inhibidor del sistema de expulsión tipo *AcrAB* se muestran en la Tabla 16. En ella se incluyen las cepas de *Salmonella* Infantis resistentes al ácido nalidíxico y cepas sensibles de igual serotipo aisladas de otras localidades a fin de comparar los resultados. En la misma puede apreciarse que existe una disminución significativa de la CIM y un aumento también significativo de los halos de inhibición para ambas drogas probadas en presencia del inhibidor.

Tabla 16. Detección de bomba de expulsión para quinolonas en *Salmonella* Infantis

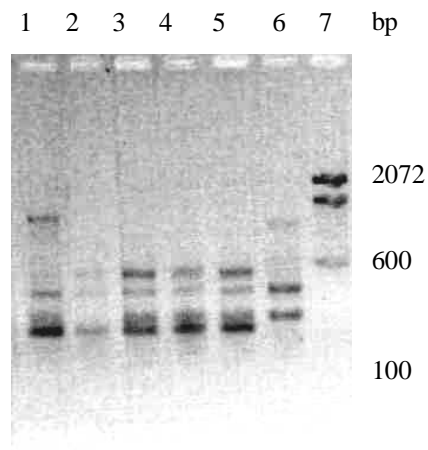
Cepa (Categoría)	ÁCIDO NALIDÍXICO				CIPROFLOXACINA			
	CIM (µg/ml)		Halo (mm)		CIM (µg/ml)		Halo (mm)	
	Sin inhibidor	Con inhibidor	Sin Inhibidor	Con inhibidor	Sin inhibidor	Con inhibidor	Sin inhibidor	Con inhibidor
HLL182 (Nal R)	>256	64	0	18	2	1	20	35
HLL183 (Nal R)	256	64	0	17	2	1	20	34
HLL191 (Nal R)	>256	64	0	16	2	1	20	34
HLL392 (Nal R)	>256	128	0	18	2	1	20	35
HLL220 (Nal S)	8	4	30	32	0,25	0,25	35	40
LB205824 (Nal S)	4	2	30	36	0,25	0,25	33	40
SP102 (Nal S)	2	0,5	26	33	0,25	0,25	33	40
HG1 (Nal S)	4	2	30	33	0,25	0,25	32	40

Abrev. Nal S= sensible a Ácido Nalidíxico, Nal R= Resistente a Ácido Nalidíxico

Al efectuar la secuenciación del fragmento amplificado correspondiente a la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR), se detectó una mutación en el codón del aminoácido Ser-83 del gen *gyrA* (TCC→TTC) que ocasiona una sustitución de Ser por Phe.

La aplicación de la metodología ERIC-PCR en estos aislamientos de *Salmonella* Infantis mostró que eran genéticamente similares y se pudieron diferenciar de las cepas españolas de igual serotipo (Figura 16).

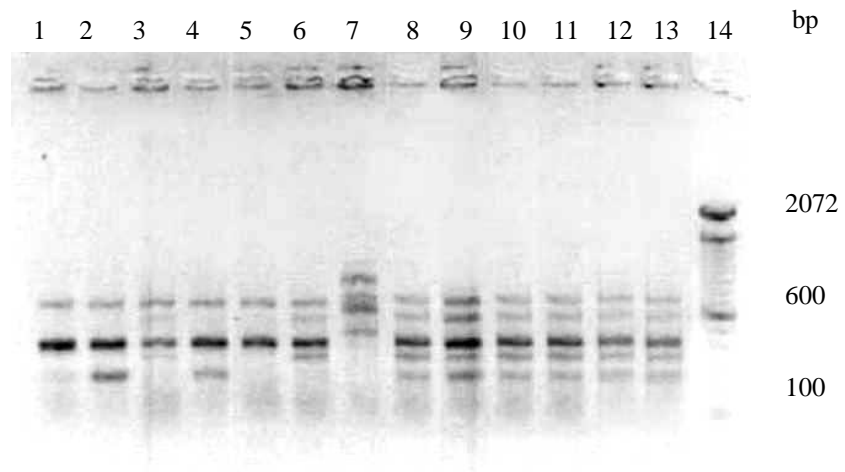
Fig. 16: Patrones de ERIC-PCR de las cepas de *Salmonella* Infantis. Líneas 1, 2 y 6 aislamientos españoles. Líneas 3 a 5: cepas correspondientes al brote de origen alimentario. Línea 7: Marcador de peso de 100 bp



5.5. Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular en *Salmonella* Newport

La aplicación de la técnica ERIC-PCR en 52 cepas de *Salmonella* Newport provenientes de un brote de origen alimentario ocurrido en la ciudad de Corrientes, mostró un 100% de homología entre ellas, mientras que los patrones electroforéticos fueron diferentes a los de cepas de igual serotipo pero recuperadas de casos esporádicos de otras localidades del país alejadas de la ciudad de Corrientes (Figura 17). Estos aislamientos fueron sensibles a todos los antimicrobianos probados.

Fig. 17: Patrones de ERIC-PCR obtenidos con cepas de *S. Newport*. Líneas 1 a 7: casos esporádicos. Líneas 8 a 13: cepas del brote de la ciudad de Corrientes. Línea 14: marcador de peso de 100 bp



5.6. Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular en *S. Enteritidis*

A continuación se presentan los resultados encontrados al estudiar 24 aislamientos de *Salmonella* Enteritidis provenientes de diferentes orígenes geográficos.

La edad de los pacientes de los cuales se realizaron los aislamientos varió en-

tre 7 y 44 años, con una media de 27,5 años. Un aislamiento fue obtenido de esputo de un paciente inmunosuprimido ingresado en una Unidad de Cuidados Intensivos de la ciudad de Corrientes, otro aislamiento fue recuperado de orina de un paciente del sexo femenino de la ciudad de Corrientes sin síntomas gastrointestinales pero portador de *Salmonella* en heces, y el resto fue obtenido de heces de pacientes con gastroenteritis aguda de las ciudades de Resistencia y Corrientes.

Los estudios de sensibilidad antimicrobiana en estos aislamientos de *Salmonella* Enteritidis mostraron que todos fueron sensibles a ampicilina/sulbactama, cefalotina, colistina, fosfomicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, gentamicina, ácido nalidíxico, trimetoprima/sulfametoxazol y sulfisoxazol, pero presentaron variaciones en la sensibilidad frente a furazolidona y ampicilina.

En las cepas resistentes a ampicilina se obtuvo, mediante amplificación con PCR, un fragmento de 850 bp con los cebadores para genes que codifican una betalactamasa del tipo TEM (bla_{TEM}), pero no para aquellos que permiten detectar una betalactamasa del tipo SHV (bla_{SHV}).

Al aplicar la técnica de REP-PCR entre estos aislamientos, los mejores resultados se obtuvieron con el iniciador REP1 solamente, lográndose 5 perfiles diferentes de bandas a los cuales se los designó con letras de la A a la E (Figura 18).

De esta manera, los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis pudieron ser clasificados en 9 patrones epidemiológicos (I a IX) combinando los perfiles de susceptibilidad a furazolidona y ampicilina con los patrones de banda obtenidos mediante REP-PCR (Tabla 17).

Tabla 17: Relación entre las características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos de *S. Enteritidis*.

Cepa	Muestra	Fecha	AMP	FUR	REP-PCR	Tipos	Ciudad de Origen	Epidemiología
LG4	Heces	20/12/99	R	R	C	I	Resistencia	nr
HLL584	Heces	27/06/01	R	S	C	II	Corrientes	nr
AC1	Heces	15/11/00	S	R	A	III	Corrientes	nr
LB144752	Heces	15/02/00	S	R	C	IV	Corrientes	nr
HLL22	Heces	25/01/01	S	R	C	IV	Corrientes	nr
LB31842	Orina	16/08/01	S	R	C	IV	Corrientes	nr
HLL502	Heces	20/02/02	S	R	C	IV	Corrientes	nr
LB205824	Heces	03/10/02	S	R	C	IV	Corrientes	nr
LB216922	Heces	07/05/03	S	R	C	IV	Corrientes	r
LB216991	Heces	07/05/03	S	R	C	IV	Corrientes	r
PEZ2	Heces	07/05/03	S	R	C	IV	Corrientes	r
LB218679	Heces	09/06/03	S	R	C	IV	Corrientes	r
HP21	Heces	15/12/98	S	S	D	IX	Resistencia	nr
ID4772	Espuito	18/11/99	S	S	D	IX	Corrientes	nr
ID10611	Heces	10/11/00	S	S	D	IX	Corrientes	nr
LG3	Heces	15/12/99	S	R	D	V	Resistencia	nr
LG5	Heces	28/12/99	S	R	E	VI	Resistencia	nr
LB142131	Heces	13/01/00	S	S	B	VII	Corrientes	nr
LB73939	Heces	19/12/97	S	S	C	VIII	Corrientes	nr
SP57	Heces	14/04/98	S	S	C	VIII	P. R. Sáenz Peña	nr
LB103112	Heces	10/05/98	S	S	C	VIII	Corrientes	r
LB103113	Heces	12/05/98	S	S	C	VIII	Corrientes	r
HLL901	Heces	14/07/01	S	S	C	VIII	Corrientes	nr
HLL179	Heces	06/03/02	S	S	C	VIII	Corrientes	nr

Abrev.: AMP: ampicilina, FUR: furazolidona, S: sensible, R: resistente, r: epidemiológicamente relacionada, nr: sin relación epidemiológica

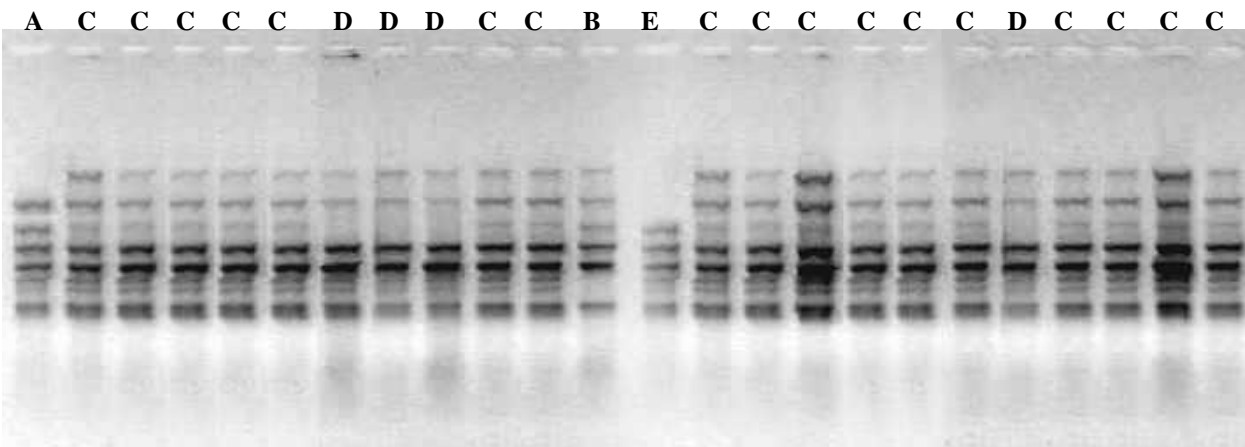


Fig 18. Patrones de ADN de *Salmonella* Enteritidis generados mediante REP-PCR. Las letras asignadas a las líneas corresponden a cada perfil obtenido

6. DISCUSIÓN

6.1. Aspectos epidemiológicos de *Salmonella*

La salmonelosis se manifiesta principalmente como gastroenteritis¹³⁰ y es por ello que la mayor parte de aislamientos estudiados en este trabajo (162/172) provenían de materia fecal. Sin embargo, esta patología puede manifestarse bajo la forma de otras infecciones localizadas, principalmente secundarias a una bacteriemia⁸⁴. Ello podría explicar el origen de aquellos aislamientos provenientes de sangre y esputo.

En el presente trabajo cuatro aislamientos fueron recuperados de muestras de orina de mujeres con síntomas de infección urinaria; en dos de esos pacientes, se recuperó la misma cepa a partir de materia fecal. La infección urinaria por *Salmonella* no Typhi no es muy frecuente habiéndose informado incidencias bajas que van, por ejemplo, del 0,5% a un 3,4%^{2,157}. Es por ello que se considera a *Salmonella* como una verdadera, aunque frecuentemente poco reconocida, causa de infección urinaria. Generalmente los aislamientos urinarios publicados en la literatura provienen de pacientes con algún tipo de inmunodeficiencia, pero aquellos incluidos en el presente trabajo no presentaban ninguna enfermedad subyacente. Un futuro desafío será el estudio de los diferentes factores de patogenicidad y/o de susceptibilidad del huésped que convierten a esta bacteria, preferentemente intestinal, en un patógeno urinario.

Aunque es bien conocida la importancia de *Salmonella* no Typhi en el contexto de brotes epidémicos por infecciones alimentarias tanto a nivel nacional como internacional, se considera que sólo el 10% o menos de los casos de salmonelosis ocurre en brotes⁸⁴. Sin embargo, de acuerdo a lo encontrado en el presente trabajo, se puede

afirmar que generalmente están mejor documentados aquellos casos asociados a brotes de origen alimentario por la dimensión sanitaria y social que alcanzan.

6.2. Serotipos de *Salmonella*

En cuanto a los serotipos de *Salmonella* recuperados de muestras clínicas, un estudio realizado en nuestro país entre 1998 y 1999, mostró a escala nacional que el 45,9% de los aislamientos correspondía a *S. Enteritidis*, el 19,2% a *S. Infantis*, el 16,1 a *S. Agona*, el 15% a *S. Typhimurium* y el 3,8% restante a otros serotipos¹⁷⁹.

En el mismo período, en Francia se encontró que *S. Enteritidis* ocupó el primer lugar con un 33% de prevalencia seguida de cerca por *S. Typhimurium* con un 32%²⁹. En los Estados Unidos de América en el año 1999, el 24% de los aislamientos correspondió a *S. Typhimurium*, el 10% a *S. Enteritidis* y el 9% a *S. Newport*³³. En España se encontró que en el período 1993-1996, el serovar más frecuente fue *S. Enteritidis* (42,5%) seguido por *S. Typhimurium* (30,7%)⁴⁷. Entre 1985 y 1999 se informó que en Brasil *S. Enteritidis* ocupó el tercer lugar (11,3%), luego de *Salmonella* I 4,5,12:i:- (21,2%) y de *Salmonella* Agona (15,8%), mientras que *S. Typhimurium* se ubicó en cuarto lugar de prevalencia (10,0%)¹³. Además, a través de los años también va cambiando el protagonismo de ciertos serotipos en el mismo país. Así, en Estados Unidos *S. Newport* ocupó el quinto, cuarto y tercer lugar en los años 1992, 1997 y 2002, respectivamente³⁴. Todas estas diferencias encontradas en diversos países y en distintos momentos sugieren que es necesaria la realización de estudios regionales a fin de monitorear periódicamente la epidemiología de los distintos serovares, porque la pre-

valencia de cada uno de ellos responde a factores locales, que a su vez son cambiantes. Asimismo, el aumento abrupto de un serotipo poco frecuente puede estar señalando algún cambio importante a nivel del nicho ecológico del mismo en una región en particular.

6.3. Resistencia antimicrobiana

Aunque la resistencia antimicrobiana de *Salmonella* ha ido en aumento en los últimos años, especialmente dentro de ciertos serotipos y frente a algunos antimicrobianos, los datos pueden variar significativamente de un país a otro.

En la Tabla 18 se presentan los porcentajes de resistencia de aislamientos de *Salmonella* spp en distintos países de Latinoamérica, correspondientes al año 2001¹⁵⁴.

Tabla 18. Porcentajes de resistencia antimicrobiana de <i>Salmonella</i> sp en diferentes países latinoamericanos - Año 2001.										
País	Nro. de cepas	Antimicrobiano								
		AMN	CTX	CIP	CMP	GEN	NAL	TMS	NIT	TET
Argentina	568	31	17	0	3,4	20	Sd	18	47	Sd
Bolivia	690	46	4	Sd	8	Sd	7	21	Sd	Sd
Brasil	313	12	2	0	3	2	7	4	27	39
Chile	464	11	0	0	11	1	3,6	1	10	Sd
Colombia	174	18	1,2	0	1	0	6,6	18	Sd	59
Costa Rica	83	11	0	0	2	0	Sd	6	Sd	10
México	1186	6	2	1	5	1	Sd	5	Sd	Sd
Paraguay	126	3	0	0	0	2	7	0	54	28
Este Trabajo	172	22	5,8	0	0,2	20,4	2,9	0,6	34,3	3,5

Como puede apreciarse en Argentina los mayores porcentajes globales de resistencia correspondieron a ampicilina, cefalosporinas de tercera generación, gentamicina y nitrofuranos y principalmente en aislamientos de *Salmonella* Agona y de *Salmonella* Infantis de origen hospitalario. No se encontraron cepas resistentes a cipro-

floxacina¹⁸⁰. Estos valores de resistencia encontrados a nivel nacional son muy similares a aquellos encontrados en el presente trabajo.

Resulta llamativo en la información anterior el reducido porcentaje de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación hallado en otros países latinoamericanos en comparación con Argentina. Ello podría deberse a diferencias en el grado de diseminación de beta-lactamasas de espectro extendido entre cepas hospitalarias.

Las resistencias globales en otros países muestran resultados similares, aunque siempre con variaciones locales, presumiblemente debido a los diferentes matices epidemiológicos y características en el uso de los antimicrobianos en cada país^{29,169,200,214}.

6.3.1. Resistencia a betalactámicos

En las cepas de *Salmonella* Infantis multirresistentes encontradas en el presente trabajo, la presencia de una β -lactamasa del tipo TEM-1 esta sugerida por los resultados obtenidos por IEF y por amplificación mediante PCR. Asimismo, la producción de una β -lactamasa de tipo CTX-M-2 está avalada por los resultados del IEF y por amplificación mediante PCR con los cebadores *bla*_{CTX-M-2}, siendo dichos hallazgos consistentes con los perfiles de resistencia obtenidos⁴⁹.

TEM-1 es la β -lactamasas más frecuentemente asociada con la resistencia a ampicilina y cefalotina en *Salmonella*¹¹¹, mientras que CTX-M-2, otra enzima codificada plasmídicamente, es una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) con actividad de cefotaximasa, con pobre actividad frente a cefoxitina y con mucha más actividad

frente a cefotaxima que sobre ceftazidima o aztreonam¹⁷⁰. Ambas enzimas son inhibidas por aquellos inhibidores de las betalactamasas como sulbactama, tazobactama y ácido clavulánico.

Las β -lactamasas del tipo CTX-M se encuentran ampliamente diseminadas en todo el mundo, con diferencias en la prevalencia de sus subtipos según las regiones geográficas que se consideren²³¹. En Argentina, CTX-M-2 es la β -lactamasa más frecuente y el 15% de los aislamientos nosocomiales de *Salmonella* no Typhi estudiadas entre 1984 y 1998 poseían genes del tipo bla_{TEM} y $bla_{CTX-M-2}$, ambos relacionados con plásmidos R transferibles¹⁵⁵; entre esas cepas, solamente 4 eran *S. Infantis*.

En este trabajo, tanto los experimentos de conjugación como la amplificación de *intI* confirmaron que los genes de resistencia frente a cefotaxima estaban localizados en un plásmido conjugativo que albergaba un integrón de clase I, lo que explicaría la existencia de una elevada probabilidad de transferencia de esta resistencia antimicrobiana.

Los brotes de infecciones hospitalarias por salmonellas multirresistentes se registran en los hospitales argentinos desde hace casi una década, encontrándose que la mayoría de las cepas eran productoras de una BLEE (CTX-M-2) y al menos dos enzimas inactivadoras de los aminoglucósidos (acetilasa 3, tipo II y acetilasa 6, tipo I). Los genes correspondientes se hallaban en un plásmido conjugativo de alto peso molecular¹⁸⁰.

Entre abril de 1997 y agosto de 1998, en la ciudad de Santa Fe (Argentina), se registró un brote hospitalario debido a cepas de *Salmonella* *Infantis* productoras de

BLEE. Seis cepas representativas de las involucradas en el brote fueron estudiadas por Di Conza *et al*⁹, encontrando que eran resistentes a cefalotina, cefotaxima, gentamicina y furazolidona y que portaban genes que codificaban para enzimas del tipo TEM-1 y CTX-M-2, los cuales fueron confirmados por secuenciación de ADN. Estos autores hallaron un nuevo integrón de Clase 1 (InS21) portador de *bla*_{CTX-M-2} el cual pudo ser transferido a una cepa receptora en asociación con la resistencia frente a aminoglucósidos, sulfonamidas y nitrofurantoína.

Adicionalmente, Arduino *et al*, analizando varios aislamientos en Buenos Aires (Argentina), entre las cuales se incluían 10 cepas de *S. Infantis*¹¹; hallaron que *bla*_{CTX-M-2} estaba localizado en un integrón de clase 1 inusual (In35). Esas cepas también fueron resistentes a cefotaxima y gentamicina.

La presencia de *Salmonella* *Infantis* con similares perfiles de resistencia en diferentes áreas geográficas de nuestro país está indicando la diseminación de elementos genéticos móviles entre especies iguales o diferentes, incluyendo aquellos pertenecientes a la flora habitual.

La emergencia de genes que codifican la producción de betalactamasas en aislamientos de *Salmonella* ha sido perfectamente ejemplificado por Liebana y cols. quienes hallaron en Honduras una cepa de *Salmonella* *Infantis* poseedora de cuatro genes que codificaban para betalactamasas: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CMY-2}¹⁰³.

La caracterización de los tipos de BLEE mediante métodos moleculares podría llevar a un mejor entendimiento de la evolución y diseminación de las familias de β -

lactamasas y puede alertar acerca de la necesidad de adecuar el uso de diferentes antimicrobianos en humanos y animales.

6.3.2. Resistencia a fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son agentes habitualmente efectivos para el tratamiento de la salmonelosis⁸⁴, aunque se han informado casos de fallas terapéuticas en casos producidos por cepas con sensibilidad disminuida a estas drogas²²².

La existencia de cepas con resistencia disminuida a las fluoroquinolonas es considerada un problema emergente en diferentes países. En Estados Unidos de América se ha registrado un aumento que va del 0,4% en 1996 a un 1% en 1999¹⁹⁹. En ese mismo país ya se había encontrado en 1977 que las cepas resistentes al ácido nalidíxico incluían 13 serotipos diferentes, siendo los más comunes Typhimurium, Enteritidis y Virchow⁸¹.

En Polonia, entre 1998 y 1999 se encontró un 42,6% de resistencia al ácido nalidíxico entre todos los serotipos estudiados, correspondiendo un 25% al serotipo Infantis aunque los autores no mencionan los posibles mecanismos implicados²⁰⁷.

Sin embargo, Hakanen y cols. encontraron en Finlandia que un 2% de los aislamientos de *S. Infantis* presentaban sensibilidad reducida a ciprofloxacina aunque este serotipo sólo representó el 4,1% de los aislamientos, habiéndose relacionado dicho hallazgo con mutaciones puntuales en el gen *gyrA*⁷⁷.

En Barcelona se notó un aumento de la resistencia al ácido nalidíxico del 0,1% al 11% entre los períodos 1985-1987 y 1995-1998⁶⁹. Los serotipos que mayor resis-

tencia presentaron en el último período fueron Hadar (86%), Brandenburg (62%) y Virchow (47%), no encontrándose cepas de *S. Infantis* resistentes a este antimicrobiano.

En Inglaterra y Gales el serotipo más frecuente en el año 1999 fue *Salmonella* Enteritidis²¹², y el 8% de los aislamientos de este serotipo exhibió sensibilidad disminuida a ciprofloxacina, con CIMs entre 0,25 a 0,5 µg/ml, lo que corresponde a un aumento de 8 veces en la incidencia desde 1996. Otros serotipos frecuentes que mostraron un incremento en la incidencia de susceptibilidad disminuida a estos antimicrobianos fueron *S. Virchow* (11 a 39%) y *S. Hadar* (60 a 70%).

Aunque frecuentemente las cepas resistentes al ácido nalidíxico presentan resistencia concomitante a otros antimicrobianos, se han informado casos de cepas con resistencia solo al ácido nalidíxico, como lo fueron las cepas de *S. Panama* recuperadas de diversos brotes en el Principado de Asturias (España)¹⁹⁶, situación similar a la que se presentó en las cepas de *S. Infantis* aisladas en la ciudad de Corrientes.

La mutación de *gyrA* encontrada en las cepas de *S. Infantis* estudiadas en el presente trabajo (Ser83-Phe) es una de las más comúnmente encontradas en *Salmonella*⁷²; sin embargo, podría haber variaciones entre serotipos, ya que Liebana y cols. encontraron que la mutación más frecuente era Asp87-Asn¹⁰⁴, mientras que Piddock y cols. hallaron como más frecuente la sustitución Asp87-Gly¹⁶¹.

La marcada disminución de las CIM para nalidíxico comparada con el leve descenso para ciprofloxacina en presencia de FABNA encontrada en este trabajo, es

compatible con el concepto aceptado actualmente de que las bombas de expulsión reconocen en forma poco específica sustratos preferentemente hidrófobos¹³³.

Cada vez son más las publicaciones sobre resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad disminuida a ciprofloxacina, no sólo en serotipos frecuentes de *Salmonella*²¹³ sino también en aquellos serotipos inusuales¹⁸⁴, y se considera que este fenómeno está relacionado con el uso abusivo de las quinolonas, tanto en salud humana y animal como en la promoción del crecimiento de los animales⁸. Tal es así, que un estudio realizado en Alemania ha demostrado un aumento del 0,2 al 14,8% en la resistencia a quinolonas en *Salmonella* recuperadas de animales de granja, desde la aprobación del uso veterinario de la enrofloxacin¹¹⁷.

La resistencia a quinolonas debido a la presencia de una mutación en *gyrA* y alteraciones en la bomba de expulsión del tipo *AcrAB* ha sido obtenida mediante mutación "in vitro" en cepas de *S. Enteritidis*¹⁹⁷ y en aislamientos clínicos del mismo serotipo¹³³ y de *S. Typhimurium*⁷⁵, pero hasta el momento no se han informado casos de ocurrencia natural de este fenómeno en aislamientos clínicos de *S. Infantis* similares a los encontrados en el presente trabajo.

Independientemente del número de aislamientos que presentan la misma mutación en *gyrA*, las cepas pueden presentar un amplio rango de susceptibilidad al ácido nalidíxico con CIMs que pueden variar de 16 a 512 µg/ml, lo que sugiere que otros mecanismos de resistencia deben contribuir además al fenotipo¹⁶⁰

El bajo número de cepas con resistencia disminuida a las fluoroquinolonas encontrado en el presente trabajo puede deberse a que muchos de los aislamientos pro-

venían de niños y es sabido que el uso de este tipo de antimicrobianos no está indicado en pediatría. Asimismo, sólo una cepa era de origen animal, en quienes el uso de estos agentes está muy difundido.

Para combatir el desarrollo de resistencia en salmonelas zoonóticas a drogas como las fluoroquinolonas es deseable que éstas sean utilizadas cuidadosamente en animales destinados al consumo humano y que se sigan los Códigos de Práctica recientemente propuestos²¹².

En relación a esto, debe mencionarse que el Comité Consejero sobre Seguridad Microbiológica de los Alimentos (ACMSF) del Reino Unido publicó en 1999 un "Informe sobre Resistencia Antibiótica Microbiana en Relación con la Seguridad Alimentaria", en el cual se establece una serie de recomendaciones que apuntan al desarrollo de estrategias coherentes a fin de reducir al mínimo el uso veterinario de antibióticos entre los animales⁹.

6.3.3. Resistencia a Trimetoprima

La combinación trimetoprima/sulfametoxazol ha sido usada con éxito durante algún tiempo en aquellos casos de salmonelosis que requerían un tratamiento antimicrobiano, pero actualmente su uso está restringido a casos en los que las pruebas de susceptibilidad así lo indiquen, ya que actualmente *Salmonella* presenta elevados niveles de resistencia en diversos países⁸⁷.

La resistencia a trimetoprima encontrada en el presente trabajo es baja en comparación con los valores informados a nivel nacional, quizás debido al carácter predominantemente extrahospitalario de los aislamientos aquí analizados, aunque es-

tos niveles de resistencia están cerca de los valores encontrados en otros países⁸⁸ en los que además se ha informado un incremento en la resistencia a este fármaco^{62,87}.

Gallardo y cols. encontraron en Barcelona que las cepas de *S. Typhimurium* resistentes a trimetoprima poseían el gen relacionado con la DHFR tipo Ia, la enzima más prevalente en aislamientos europeos de *Salmonella*⁶². Sin embargo, en Italia se registraron pocos aislamientos de *Salmonella* resistentes a trimetoprima con la DHFR tipo I⁴.

Debido al pequeño número de aislamientos que presentaron resistencia a este antimicrobiano, en el presente trabajo no se determinó el mecanismo involucrado.

6.3.4. Resistencia a nitrofuranos

Si bien los nitrofuranos no están recomendados como antimicrobianos de primera línea en casos de salmonelosis en humanos, la administración de furazolidona en animales de granja es un hecho frecuente aunque su uso esté actualmente prohibido en los E.E.U.U.³⁴.

La resistencia a furazolidona parece ser una característica más frecuente en los aislamientos de *S. Enteritidis* que en otros serotipos, no sólo por los resultados obtenidos en el presente trabajo, sino también por los encontrados por otros autores. Rossi y cols. informaron en Argentina una resistencia del 34,3% frente a ese antimicrobiano mientras que frente a ampicilina era sólo del 11%¹⁷⁹. Rampling y cols. estudiaron aislamientos de *Salmonella* provenientes de diferentes fuentes y de diversos paí-

ses, hallando un 98% de resistencia a furazolidona entre *S. Enteritidis*, en comparación con un 38% de resistencia en otros serotipos¹⁷³.

Esto estaría indicando que aún cuando posean una dotación genética muy homogénea, diversos serotipos son capaces de desarrollar algún tipo particular de resistencia antimicrobiana bajo presión selectiva del hábitat en el que se encuentran.

6.3.5. Multirresistencia antimicrobiana

En el presente trabajo, los únicos aislamientos multirresistentes correspondieron al serotipo *Infantis* productor de una BLEE de la familia CTX-M-2, ampliamente distribuido en la región nordeste de nuestro país. Patrones de resistencia similares han sido también encontrados en cepas hospitalarias de Brasil, las cuales resultaron ser todas resistentes a ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, ceftazidima, gentamicina, cloranfenicol y trimetoprima/sulfametoxazol. Aunque no se determinó el tipo de enzima involucrada, el hecho de que fueran sensibles a cefoxitina hace presumir que eran productoras de una BLEE plasmídica⁴⁸.

Durante 1999 la incidencia de multirresistencia en salmonelas aisladas de humanas en Inglaterra y Gales correspondió a *S. Typhimurium* (el 59% de los aislamientos de este serotipo fueron multirresistentes), *S. Hadar* (49%) y *S. Virchow* (14%), manteniéndose por debajo del 1% la incidencia de aislamientos multirresistentes dentro del serotipo *Enteritidis*²¹².

En España, aislamientos multirresistentes de *S. enterica* serotipo [4,5,12:i:-] fueron recuperados de infecciones en humanos⁷⁴, mientras que en Grecia se encontraron cepas multirresistentes de *S. Blockley*²⁰⁸.

En un estudio realizado en Etiopía sobre aislamientos a partir de carcasas de pollo, se observó que los serotipos que mayor multirresistencia presentaron fueron *S. Typhimurium* var. Copenhagen, *S. Typhimurium*, *S. Anatum* y *S. Braenderup*, los cuales fueron resistentes a más de 8 antimicrobianos¹³⁵.

Aunque los aislamientos de *S. Newport* hallados en el presente trabajo fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados, éste es considerado actualmente un serotipo emergente en los Estados Unidos, principalmente ligado a cepas multirresistentes de rápida diseminación debido a su capacidad para sobrevivir y persistir en el ambiente²³.

6.4. Tipificación epidemiológica

La identificación de la relación clonal entre aislamientos obtenidos a partir de un brote o el estudio de la persistencia endémica de ciertas cepas es crucial tanto para entender la verdadera epidemiología y magnitud de la salmonelosis como para adoptar medidas orientadas a prevenir la diseminación de la infección y erradicar su fuente.

Pueden encontrarse numerosos trabajos acerca de este tema en los cuales diversos métodos de tipificación fenotípica y genotípica son aplicados para diferenciar aislamientos de *Salmonella* de origen humano, animal o ambiental^{62,109,159,178,228}. En todos

ellos se concluye que ningún método por sí solo permite poner luz sobre una situación epidemiológica si no se lo analiza junto con otras técnicas y dentro un contexto temporal, espacial y sanitario determinado.

A continuación se discutirán los resultados hallados en el presente trabajo en relación a los diferentes métodos de tipificación empleados.

6.4.1. Tipificación mediante antibiograma

La susceptibilidad antimicrobiana ha sido utilizada por diferentes investigadores para tipificar aislamientos de *Salmonella* con fines epidemiológicos^{28,112}.

Sin embargo, en el presente trabajo se demostró que la resistencia antimicrobiana no es un marcador epidemiológico específico en cepas recuperadas a través de un período largo de tiempo, aunque sí en aquellas recuperadas con estrecho margen temporal. Esto puede deberse a que las bacterias pueden cambiar sus perfiles de susceptibilidad bajo presión antimicrobiana por mutaciones espontáneas o, lo que ocurre más frecuentemente, por la adquisición de factores de resistencia codificados en elementos genéticos transferibles tales como transposones y plásmidos¹¹⁹.

No obstante ello, la presencia de determinado perfil de resistencia en aislamientos del mismo serotipo recuperados durante un corto período de tiempo, alertó sobre la posible existencia de un brote, como fue el caso de las cepas multirresistentes de *Salmonella* Infantis aisladas en la ciudad de Presidencia Roque Saénz Peña (Chaco), las de *Salmonella* Infantis resistentes solamente al ácido nalidíxico obtenidas de un brote ocurrido en la ciudad de Corrientes y los aislamientos de *Salmonella*

Enteritidis, también de Corrientes, que presentaron resistencia solamente a nitrofuranos.

6.4.2. Estudio de la dotación plasmídica

Los perfiles plasmídicos han sido ampliamente utilizados para la caracterización de cepas epidémicas y diversos autores los han encontrado útiles como herramientas epidemiológicas para discriminar los aislamientos esporádicos de aquellos provenientes de brotes, tanto de origen animal, humano o ambiental^{112,121,124}.

No obstante, esta metodología tiene un valor limitado, debido a que cepas no relacionadas genéticamente pueden albergar los mismos plásmidos y cepas relacionadas genéticamente pueden perder plásmidos inestables¹¹⁹.

En tal sentido, se pudo observar en los 15 aislamientos de *S. Infantis* estudiados en el presente trabajo que todos presentaron al menos un plásmido, mientras que Helmuth y cols. hallaron, por ejemplo, que un 85% de los aislamientos de este mismo serotipo no portaban plásmidos⁸⁰.

Los resultados de la dotación plasmídica descrito en este trabajo se corresponden con bastante aproximación con aquellos previamente publicados en diversas serovariedades de *Salmonella*^{140,178} y en *S. Infantis*¹⁰⁷, en las cuales el predominante es el plásmido de virulencia seroespecífico¹⁰⁵.

Sin embargo, el análisis del perfil plasmídico no resultó útil para discriminar entre cepas debido al bajo número de plásmidos encontrados y al amplio período de

tiempo en que se hallaron. Algunos plásmidos pudieron haber sido perdidos o ganados bajo condiciones ambientales¹¹⁹.

6.4.3. Amplificación de secuencias repetitivas

El análisis de los perfiles genómicos basados en la amplificación de secuencias REP y/o ERIC ha sido empleado con éxito en la tipificación epidemiológica de aislamientos de *Salmonella* por diversos autores^{40,62,224}.

En este trabajo, la amplificación de las secuencias REP en cepas de *Salmonella* Infantis reveló la homogeneidad genética de cepas sin relación epidemiológica aparente y recuperadas de diferentes sitios geográficos del nordeste de Argentina, sin embargo, sus perfiles de bandas fueron diferentes a aquellos presentados por las cepas españolas utilizadas como control de diversidad genética, lo que confirma la utilidad antes señalada.

A pesar de la gran homeogeneidad clonal existente entre aislamientos de *Salmonella* Enteritidis aisladas en Polonia, Chmielewski y cols. pudieron demostrar que la técnica de REP-PCR resulta muy útil para la tipificación de este serotipo⁴⁰. Tal es así que en el presente trabajo se pudieron diferenciar los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis en varios genotipos. Dentro de estas cepas se incluyeron cuatro aislamientos (LB216922, LB216991, PEZ2 y LB218679) procedentes de un brote de origen alimentario secundario al consumo de mayonesa casera, las cuales presentaron igual perfil de bandas, confirmandose así su relación genética.

La aplicación adicional de otras técnicas de tipificación como ERIC-PCR y PFGE ayudaría a confirmar o descartar la relación clonal entre aquellos que presentaron igual patrón de bandas pero que no poseen una relación epidemiológica aparente.

Por otra parte, la amplificación de las secuencias ERIC fue aplicada por diferentes autores para diferenciar cepas de diversos serotipos de *Salmonella*, encontrándose que la utilidad de dichas metodologías varían según el serotipo analizado^{24,82,197}.

En el presente trabajo se halló que un grupo de *Salmonella* Infantis presentó un patrón de muy pocas bandas, algunas de ellas muy débiles, al utilizar simultáneamente dos cebadores diferentes para secuencias ERIC.

Un segundo grupo de *S. Infantis*, sin relación epidemiológica con el primero, mostró un perfil de bandas bastante nítido al utilizar dos partes del mismo cebador para amplificar las secuencias ERIC.

En ambos grupos de aislamientos pertenecientes al mismo serotipo pudieron diferenciarse claramente las cepas argentinas de aquellas cepas españolas utilizadas como control.

Un grupo de cepas de *Salmonella* Newport provenientes de un brote ocurrido en la ciudad de Corrientes (cuyo origen no pudo determinarse) mostraron igual patrón de bandas al aplicarse la amplificación mediante el cebador ERIC-2, pudiéndose confirmar su relación genética ya que los patrones fueron diferentes a los que presentaron aislamientos de igual serotipo provenientes de distintas provincias de nuestro

país. Sin embargo las bandas no fueron tan nítidas al utilizar los cebadores ERIC-1 y ERIC-2 en forma conjunta.

Estas observaciones coincide con lo hallado por Kumao *et al*, al tipificar aislamientos de diferentes serotipos utilizando por un lado el par de cebadores ERIC-1/ERIC-2 y por otro lado el cebador ERIC-2 solamente⁹⁶.

6.4.4. Análisis del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsátil

El análisis de macrorrestricción genómica basado en la electroforesis en campo pulsátil del genoma total bacteriano es considerado como la más poderosa herramienta para discriminar entre cepas¹⁵³.

La diversidad genética entre aislamientos de *S. Infantis* ha sido demostrada por Murakami *et al*¹³⁸ al estudiar aislamientos de origen humano y animal luego de la digestión con *BlnI*, obteniendo 35 perfiles de bandas, y por Wegener y Baggesen quienes obtuvieron 21 perfiles al estudiar 135 aislamientos aplicando la digestión mediante *XbaI*²²⁷.

En el presente trabajo, todas las cepas de *S. Infantis* mostraron igual perfil mediante la técnica de PFGE, los cuales fueron diferentes a los de las cepas españolas usadas como control, aunque en un principio se esperaba que las cepas de *Salmonella Infantis* HG1, HV2 y HV141 fueran genéticamente diferentes del resto de las cepas (SP30 a SP103), dada su diversidad geográfica y temporal. Sin embargo, su relación genética ha quedado demostrada por los resultados de las técnicas de tipificación molecular aplicadas.

Todo esto hace pensar que la diseminación de un clon de *S. Infantis* ha tenido lugar en la región nordeste de Argentina durante un prolongado período de tiempo. Un hallazgo similar fue comunicado por Sulakvelidze et al. al estudiar dos brotes aparentemente diferentes en la República de Georgia²⁰⁵.

Actualmente se acepta que tanto los métodos basados en amplificación de secuencias repetitivas como el PFGE poseen alto poder discriminatorio, buena reproducibilidad y son de fácil interpretación¹⁵³. Los hallazgos del presente trabajo coinciden con ello, en lo que se refiere a la tipificación de aislamientos de *S. Infantis*.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante el presente trabajo, puede concluirse que:

1) Los serotipos de *Salmonella* encontrados en la región presentaron gran diversidad, aunque igual predominancia que a escala nacional.

2) La perfiles de susceptibilidad antimicrobiana son muy variables entre los serotipos encontrados, lo que hace imprescindible realizar el estudio de la sensibilidad de cada aislamiento en particular.

3) La emergencia de cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación y al ácido nalidíxico indica la necesidad de disponer de sistemas activos de vigilancia de la resistencia antimicrobiana frente a estas drogas, a la vez que fijar políticas para un uso racional de las mismas en salud humana y animal.

4) Los métodos basados en la amplificación mediante PCR de secuencias repetitivas (REP y ERIC) presentaron gran utilidad en la tipificación epidemiológica de las cepas estudiadas.

5) La aplicación de técnicas de tipificación molecular permitieron confirmar y caracterizar exactamente la existencia de brotes infecciosos, que de otra manera sólo hubieran quedado en el ámbito de las especulaciones epidemiológicas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aarestrup FM, Wiuff C, Mølbak K, Threlfall EJ. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:827-829.
2. Abbott SL, Portoni BA, Janda JM. Urinary tract infections associated with nontyphoidal *Salmonella* serogroups. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4177-4178.
3. Ackman DM, Drabkin P, Birkhead G, Cieslak P. Reptile-associated salmonellosis in New York State. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:995-959.
4. Agodi A, Marranzano M, Jones CS, Threlfall EJ. Molecular characterization of trimethoprim resistance in salmonellas isolated in Sicily, 1985-1988. *Eur J Epidemiol* 1995; 11: 33-38.
5. Ait Mhand R, Soukri A, Moustauoui N, et al. Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum β -lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:169-172.
6. Albayrak F, Cocka F, Erdem B, Aysev AD. Predictive value of nalidixic acid resistance for detecting salmonellae with decreased ciprofloxacin susceptibility. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23:332-336.
7. Altekruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging Foodborne Diseases. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 285-293.
8. Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microb Drug Resist* 2000; 6:77-83.
9. Anónimo. Report of the Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food on Microbial Antibiotic Resistance in Relation to Food Safety. The Stationery Office, London. 1999.
10. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 7ma Ed. 1999. ASM Press, Washington, D.C. pp 116-137.
11. Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Piñeiro SA, Centron D. *Bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual Class 1 Integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemoth* 2002; 46:2303-2306.
12. Armand Lefèvre L, Leflon Guibout V, Bredin J, Barguelli F, Amor A, Pagès JM, Nicolas Chanoine MH. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 β -lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1165-1168.
13. Attié de Castro F, Roseli dos Santos V, Gomes Martins CH, Fernandes SA, Zaia JE, Martínez R. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. *Brazilian J Infect Dis* 2002; 6:244-251.
14. Bager F. DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. *Int J Antimicrobi Agents* 2000;14:271-274.
15. Bailey JS, Fedorka Cray PJ, Stern NJ, Craven SE, Cox NA, Cosby DE. Serotyping and ribotyping of *Salmonella* using restriction enzyme *PvuII*. *J Food Prot* 2002;65:1005-1007.

16. Baraniak A, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Two different extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in one the first ESBL-producing *Salmonella* isolates in Poland. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1095-1095.
17. Barnaud G, Arlet G, Verdet C, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible β -lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2352-2358.
18. Baucheron S, Imberechts H, Chaslus-Dancla E, Cloeckeaert A. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage type DT204. *Microb Drug Resist* 2002; 8:281-289.
19. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Rohnisch T, Schweighart S, Wilhelm R. A new plasmidic cefotaximase form patients infected with *Salmonella* typhimurium. *Infection* 1992; 20:158-163.
20. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:509-513.
21. Bender JB, Hedberg CW, Boxrud DJ, Besser JM, Wicklund JH, Smith KE, Osterholm MT. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *N Engl J Med* 2001; 344:189-195.
22. Bennet PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria: *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:1-4.
23. Berge ACB, Adaska JM, Sischo WM. Use of antibiotic susceptibility patterns and pulsed field gel electrophoresis to compare historic and contemporary isolates of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:318-323.
24. Beyer W, Mukendi FM, Kimming P, Böhm R. Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1549-1554.
25. Boletín Epidemiológico Nacional 2000-2001. Brotes de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Ministerio de Salud. Argentina. 2002; pp 10-11.
26. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1-14.
27. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC, ASM Press. 2003. Pp. 654-671.
28. Borrego JJ, Castro D, Jiménez Notario M, Luque A, Martínez Manzanares E, Rodríguez Avial C, Picazo JJ. Comparison of epidemiological markers of *Salmonella* strains isolated from different sources in Spain. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3058-3064.
29. Bouvet PJM, Grimont PAD. Données de surveillance 1999 du Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*. *Bull Épidémiol Hebdomad* 2001; 12. Disponible en: <http://www.invs.sante.fr/beh/2001/12/index.html>.

30. Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1980-1984.
31. Brenner DJ, Falkow S. Genetics of the Enterobacteriaceae. C. Molecular relationships among members of the Enterobacteriaceae. *Adv Genet* 1971; 16:81-118.
32. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2465-2467.
33. Briggs CE, Fratamico PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:846-849.
34. CDC. *Salmonella* Surveillance Summary 2002. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2003.
35. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illness - Selected sites, United States, 1999. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49:201-205.
36. Chadfield MS, Hinton MH. Evaluation of treatment and prophylaxis with nitrofurans and comparison with alternative antimicrobial agents in experimental *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* infections in chicks. *Vet Res Comm* 2003; 27:257-273.
37. Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiller CS, Dougan G, Falkow S. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of a *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 2003; 185:553-563
38. Chansiripornchai N, Ramasota P, Bangtrakulnonth A, Sasipreeyajan J, Svenson SB. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 29:221-225.
39. Chisholm SA, Crichton PB, Knight HI, Old DC. Molecular typing of *Salmonella* serotype Thompson strains isolated from human and animal sources. *Epidemiol Infect* 1999; 122:33-39.
40. Chmielewski R, Wielicko A, Kucowski M, Mazurkiewicz M, Ugorski M. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella* Enteritidis isolates from Poland. *J Vet Med* 2002; 49:163-168.
41. Cloeckaert A, Chaslus Dancla E. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Vet Res* 2001; 32: 291-300.
42. Cockerill FR III. Genetics methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:199-212.
43. Coria Lorenzo JJ, Villalpando Carrión S, Gómez Barreto D, Treviño Mateos A. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. *Rev Mex Pediatr* 2001; 68:200-215.
44. Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. Molecular relationships among the Salmonellae. *J Bacteriol* 1973; 115-307-315.
45. Daly M, Fanning S. Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:4842-4848.

46. Darwin KH, Miller VL. Molecular Basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:405-428.
47. Davies PR, Morrow WE, Jones FT, Deen J, Fedorka Cray PJ, Harris IT. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Epidemiol Infect* 1997; 119:237-244.
48. De Moraes BA, Cravo CAN, Loureiro MM, Solari CA, Asensi MD. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a University Hospital from Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42:201-207.
49. Di Conza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G. Novel class 1 Integron (INS21) carrying *bla_{CTX-M-2}* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2257-2261.
50. Doménech Sánchez A, Vila J. Fundamentos, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:46-54.
51. Duguid JP, Anderson ES, Alfredsson GA, Barker R, Old DC. A new biotyping for *Salmonella typhimurium* and its phylogenetic significance. *J Med Microbiol* 1975; 8:149-166.
52. Espinasse F, Gheorghiu R, Poiata A, Labia R, Nicolas Chanoine MH. Reduced susceptibility to co-amoxiclav in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in Romania between 1985 and 1993. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39:103-106.
53. Euzaby JP. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffman and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp.nov., nom.rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49(Pt 2):927-930.
54. Farmer JJ. Enterobacteriaceae: introduction and identification. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC, ASM Press. 2003. Pp. 636-653.
55. Fernandes SA, Ghilardi ACR, Tavechio AT, Machado AMO, Pignatari ACC. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45: 59-63.
56. Fernandes SA, Tavechio AT, Neme SN, Calzada CT, Dias AMG, Nakahara LK, Oliveira JC, Irino K, Taunay AE. Marcadores epidemiológicos de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella agona*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1992; 34:91-98.
57. Fernandez Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:355-360
58. Fey PD, Safraneck TJ, Rupp ME, Dune EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *New Engl J Med* 2000; 342:1242-1249.
59. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:761-770.

60. Fontana J, Stout A, Bolstorff A, Timperi R. Automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for rapid identification of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Newport. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:496-499.
61. Gaillot O, Clément C, Simonet M, Philippon A. Novel transferable β -lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39:85-87.
62. Gallardo F, Ruiz J, Towner KJ, Vila J. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *J Med Microbiol* 1999; 48:367-374.
63. Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Mei-Yi Wong R, Frye J, Usera MA, McClelland M. DNA Microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2074-2078.
64. García del Portillo F. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect* 2001; 3:1305-1311.
65. Gautom RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2977-2980.
66. Gazouli M, Sidorenko S.V, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouvelekis LS. A plasmid-mediated -lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 119-121.
67. Gazouli M, Tzelepi E, Markogiannakis A, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing β -lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 165:289-293.
68. Gebreyes WA, Altier C. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2813-2822.
69. Gebreyes WA, Davies PR, Morrow WE, Funk JA, Altier C. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4633-4636.
70. Giraud E, Cloeckaert A, Kerboeuf D, Chaslus Dancla E. Evidence for active efflux as the primary mechanisms of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1223-1228.
71. Grimont F, Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1986; 137:165-175.
72. Griggs DJ, Gensberg K, Piddock LJV. Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrobi Agents Chemother* 1996; 40:1009-1013.
73. Groisman EA, Ochman H. The Path of *Salmonella*. *ASM News* 2000; 66:21-27.
74. Guerra B, Laconcha I, Soto SM, González Hevia MA, Mendoza MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microb Lett* 2000; 190:341-347.

75. Guerra B, Malorny B, Schroeter A, Helmuth R. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2059.
76. Guo L, Killefer J, Kenney PB, Amick Morris JD. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to study *Salmonella* ecology in a turkey production environment. *Poult Sci* 1999;78:24-31.
77. Hakanen A, Kotilainen P, Jalava J, Siitonen A, Huovinen P. Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonellas* and validation of nalidixic acid screening test. *J Clin Microbiol* 1999;37:3572-3577.
78. Hammami A, Arlet G, Ben Redjeb S, Grimont F, Ben Hassen A, Rekik A, Philippon A. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in neonatal intensive care unit in Tunisia caused by multiply drug resistant *Salmonella wien* producing SHV-2 beta-lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:641-646.
79. Hanson ND, Moland ES, Hossain A, Neville SA, Gosbell IB, Thomson K. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:1011-1014.
80. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A, Bulling E. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect Immun* 1985; 48:175-182.
81. Herikstad H, Hayes P, Mokhtar M, Fracaro ML, Threlfall EJ, Angulo FJ. Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. *Emerg Infect Dis* 1997; 3:371-372.
82. Hermans PWM, Saha SK, van Leeuwen WJ, Verbrugh HA, van Belkum A, Goessens WHF. Molecular typing of *Salmonella typhi* strains from Dhaka (Bangladesh) and development of DNA probes identifying plasmid-encodes multidrug-resistant isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1373-1379.
83. Hickman Brenner FW, Stubbs AD, Farmer JJ 3rd. Phage typing of *Salmonella enteritidis* in the United States. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2817-2823.
84. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32:263-269
85. Hudson CR, Quist C, Lee MD, Keyes K, Dodson SV, Morales C, Sanchez S, White DG, Maurer JJ. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1860-1865.
86. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animal and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:379-433.
87. Huovinen P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1608-1613.
88. Jensen G, Wandall DA, Gaarslev K, Panavas S, Gutschik E. Antibiotic resistance in *Shigella* and *Salmonella* in a region of Lithuania. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:872-876.
89. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145:1365-1373.
90. Kantama L, Jayanetra P. *Salmonella enteritidis* outbreak in Thailand: study by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996; 27:119-125.

91. Kapperud G, Lassen J, Hasseltvedt V. *Salmonella* infection in Norway: descriptive epidemiology and a case-control study. *Epidemiol Infect* 1998; 121:569-577.
92. Kennedy M, Vugia D, Fiorentino T, Farley M, Pass M, Smith K, Smith P, Cieslak P, Griffin P, EIP FoodNet Working Group. FoodNet 1996 to 1998: data on deaths and invasive illnesses demonstrate the severity of *Salmonella* and *Listeria*. Abstract: food safety - 14. International Conference on Emerging Infectious Diseases 2000. Atlanta, Georgia.
93. Kiessling CR, Cutting JH, Loftis M, Kiessling WM, Datta AR, Sofos JN. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates, 1999-2000. *J Food Prot* 2002; 4:603-608.
94. Koeck JL, Arlet G, Philippon A, et al. A plasmid-mediated CMY-2 beta-lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella* senftenberg. *FEMS Microb Lett* 1997; 152:255-260.
95. Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris JG JR, Sulakvelidze A. Multilocus sequence typing characterization of clinical and environmental salmonella strains. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1626-1635.
96. Kumao T, Ba-Thein W, hayasi H. Molecular subtyping methods for detection of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg outbreaks. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2057-2061.
97. Lacroix FJC, Cloeckaert A, Grépinet O, Pinault C, Popoff MY, Waxin H, Pardon P. *Salmonella typhimurium* *acrB*-like genes: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and murine infection. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 135:161-167.
98. Lagatolla C, Dolzani L, Tonin E, Lavenia A, Di Michele M, Tommasini T, Monti Bragadin C. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2440-2443.
99. Lee K, Yong D, Yum JH, Kim HH, Chong Y. Diversity of TEM-52 extended-spectrum β -lactamase-producing non-typhoidal *Salmonella* isolates in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:493-496.
100. Lee R, Peppe J, George H. Pulsed-field electrophoresis of genomic digests demonstrates linkages among food, food handlers, and patrons in a food-borne *Salmonella javiana* outbreak in Massachusetts. *J Clin Microbiol* 1998, 36:284-285.
101. Lesser CF, Miller SI. *Salmonellosis*. Vol 2003, New York: McGraw-Hill; 2003.
102. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:185-191
103. Liebana E, Batchelor M, Torres C, Briñas L, Lagos LA, Abdalhamid B, Hanson ND, Martínez Urtaza J. Pediatric infection due to multiresistant *Salmonella enterica* serotype Infantis in Honduras. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4885-4888.
104. Liebana E, Clouting C, Cassar CA, Randal LP, Walker RA, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Ridley AM, Davies RH. Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1481-1486.
105. Liebana E, Guns D, García-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley FA, Davies RH. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3609-3616.

106. Liebisch B, Schwarz S. Evaluation and comparison of molecular techniques for epidemiological typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *dublin*. J Clin Microbiol 1996; 34:641-646.
107. Lindqvist N, Heinikainen S, Toivonen AM, Pelkonen S. Discrimination between endemic and feedborne *Salmonella* Infantis in cattle by molecular typing. Epidemiol Infect 1999; 122:497-504.
108. Linton AH, Hinton MH. Enterobacteriaceae associated with animals in health and disease. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 1988; 17:71S-85S.
109. Litwin CM, Leonard RB, Karroll KC, Drummond WK, Pavia AT. Characterization of endemic strains *Shigella sonnei* by use of plasmid DNA analysis and pulsed-field gel electrophoresis to detect patterns of transmission. J Infect Dis 1997; 175:864-870.
110. Livermore DM, Brown DF. Detection of β -lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001; 48(Suppl. 1):S59-S64.
111. Llanes C, Kirchgessner V, Plesiat P. Propagation of TEM- and PSE-type β -lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2430-2436.
112. Luque A, Moriñigo MA, Rodriguez Avial C, Picazo JJ, Borrego JJ. Resistencias a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes orígenes. Enferm Infec Microbiol Clin 1994; 12:187-192.
113. Ma D, Cook DN, Hearst JE, Nikaido H. Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. Trends Microbiol 1994; 2:489-493.
114. MacDonald KL, Cohen ML, Hargrett Bean NT, Wells JG, Puhf ND, Collin SF, Blake PA. Changes in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from humans in the United States. JAMA 1987; 258:1496-1499.
115. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:140-145.
116. Mekanera A, Arlet G, Gautier V, Manai M. Molecular epidemiology and characterization of plasmid-encoded β -lactamases produced by Tunisian clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Mbandaka resistant to broad-spectrum cephalosporins. J Clin Microbiol 2003; 41:2940-2945.
117. Malorny B, Schroeter A, Helmuth R. Incidence of quinolones resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2278-2282.
118. Marano NN, Rossiter S, Stamey K, Joyce K, Barrett TJ, Tollefson LK, Angulo FJ. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) for enteric bacteria, 1996-1999: surveillance for action. J Am Vet Med Assoc 2000; 217:1829-1830.
119. Marco F, Jiménez de Anta MT. Métodos de tipificación: análisis de plásmidos. Ventajas e inconvenientes. Enferm Infec Microbiol Clin 1993; 11:97-101.
120. Marcus SL, Brumell JH, Pfeiffer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect 2000; 2:145-156.

121. Mariscal Larrubia A, Clavijo Frutos E, Carnero Varo M, García Ruiz R, García Rodríguez A, Pinedo Sánchez A, Fernández Crehuet J. Epidemiología molecular de toxiinfecciones producidas por *Salmonella enterica*: correlación del serotipo y del perfil proteico y análisis del ADN plasmídico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10:328-333.
122. Markogiannakis A, Tassios PT, Lambiri M, Ward LR, Kourea Kremastinou J, Legakis NJ, The Greek Nontyphoidal *Salmonella* Study Group, Vatopoulos AC. Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serptypoe Typhimurium phage type DT104. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1260-1271.
123. Matushek MG, Bonten MJM, Hayden MK. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2598-2600.
124. Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:228-243.
125. McDonough PL, Shin SJ, Lein DH. Diagnostic and public health dilemma of lactose-fermenting *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in cattle in the Northeastern United States. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1221-1226.
126. Mhand RA, Brahim N, Moustou N, El Mdaghri N, Amarouch H, Grimont F, Bingen E, Benbachir M. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella typhimurium* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3769-3773.
127. Milleman Y, Gaubert S, Remy D, Colmin C. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium bovine isolates from farm and meat. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2204-2209.
128. Milleman Y, Lesage MC, Chaslus Dancla E, Lafont JP. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:173-179.
129. Milleman Y. Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles. *Vet Res* 1998; 29:3-19.
130. Miller SI, Hohmann EL, Pegues DA. *Salmonella* (including *Salmonella typhi*). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and practice of infectious diseases*. New York, Churchill Livingstone. 2000. Pp. 2344-2362.
131. Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Internat J Antimicrob Agents* 2004; 23:547-555.
132. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard J. Imipenem resistance in a *Salmonella* strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1297-1300.
133. Miró E, Vergés C, García I, Mirelis B, Navarro F, Coll P, Prats G, Martínez Martínez L. Resistencia a quinolonas y betalactámicos en *Salmonella enterica*, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:204-211.
134. Mølbak K, Gerner Smidt P, Wegener HC. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 514-515.

135. Molla B, Mesfin A, Alemayehu D. Multiple antimicrobial-resistant *Salmonella* serotypes isolated from chicken carcass and giblets in Debre Zeit and Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiop J Health Dev* 2003; 17:131-149.
136. Morosini MI, Blazquez J, Negri MC, Canton R, Loza E, Baquero F. Characterization of a nosocomial outbreak involving an epidemic plasmid encoding for TEM-27 in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Othmarschen. *J Infect Dis* 1996; 174:1015-1020.
137. Mueller UG, Wolfenbarger LL. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 1999; 14:389-394.
138. Murakami K, Horikawa K, Otsuki K. Genotypic characterization of human and environmental isolates of *Salmonella choleraesuis* subspecies *choleraesuis* serovar Infantis by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiol Immunol* 1999; 43:293-296.
139. Nair S, Lin TK, Pang T, Altwegg M. Characterization of *Salmonella* Serovars by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2002. 40:2346-2351.
140. Nakamura M, Sato S, Ohya T, Susuki S, Ikeda S. Plasmid profile analysis in epidemiological studies of animal *Salmonella typhimurium* infection in Japan. *J Clin Microbiol* 1986; 23:360-365.
141. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Antimicrobial susceptibility by pathogens. 1996-1999 Report. Table 6. Centers for Disease Control. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/narms/table6.htm>
142. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Thirteenth Informational Supplement. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania. 1998.
143. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania. 1999.
144. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania. 2000.
145. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth Informational Supplement. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania. 2003.
146. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth Informational Supplement. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania. 2004.
147. Navia MM, Ruiz J, Sanchez Céspedes J, Vila J. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCT and RFLP. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003; 295-298.
148. Navarro F, Miró E. Update on CTX-M-type β -lactamases. *Rev Med Microbiol* 2002; 13:63-73.
149. Navarro F, Llovet T, Echeita MA, Coll P, Aladueña A, Usera MA, Prats G. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2931-2834.
150. Navarro Risueño F, Miró Cardona E, Mirelis Otero B. Lectura interpretada del antibiograma en enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20:225-234.

151. O' Brian SJ, de Valk H. *Salmonella* - "old" organism, continued challenges!. *Eurosurveillance* 2003; 8(2):33-35.
152. Old DC, Rankin SC, Crichton PB. Assessment of strain relatedness among *Salmonella* serotypes Salinatis, Duisburg, and Sandiego by biotyping, ribotyping, IS200 fingerprinting, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1687-1692.
153. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1661-1669.
154. Organización Panamericana de la Salud. Información de resistencia antimicrobiana en Argentina. Disponible en http://165.158.1.110/spanish/hcp/antimicrob_argentina.htm.
155. Orman BE, Piñeiro SA, Arduino S, Galas M, Melano R, Caffer MI, Sordelli DO, Centrón D. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3963-3970.
156. Oteo J, Alós JI. ¿Qué hay de nuevo en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20:28-33.
157. Paterson DL, Harrison MW, Robson JMB. Clinical spectrum of urinary tract infections due to nontyphoidal *Salmonella* species. *Clin Infect dis* 1997; 25:754.
158. Pelkonen S, Romppanen E, Siitonen A, Pelkonen J. Differentiation of *Salmonella* serovar Infantis isolates from human and animal sources by fingerprinting IS200 and 16S rrn Loci. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2128-2133.
159. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-mediated AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 45:1-11.
160. Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26:3-16.
161. Piddock LJV, Ricci V, McLaren I, Griggs DJ. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J Antimicrobial Chemother* 1998; 41:635-641.
162. Pitout JDD, Reisbig MD, Mulvey M, Chui L, Loui M, Crowe L, Church DL, Elsayed S, Gregson D, Ahmed R, Tilley P, Hanson ND. Association between handling of pet treats and infection with *Salmonella* enterica serotype Newport expressing the AmpC β -lactamase, CMY-2. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4578-4582.
163. Pohl P, Lintermans P, Bex F, Desmyter A, Dreze P, Fonteyne PA, Couturier M. Propriétés phénotypiques et génotypiques de quatre plasmides de virulence de *Salmonella typhimurium*. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1987; 138:523-528.
164. Poirel L, Guibert M, Bellais S, Naas T, Nordmann P. Integron- and carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 from French patients. *Antimicrob J Chemother* 1999; 43:1098-1104.
165. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2001 (N° 45) to de Kauffman-White scheme. *Res Microbiol* 2003; 154:173-174.

166. Porwollik S, McClelland M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infection* 2003; 5:977-989.
167. Poupart MC, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella* Mbandaka isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1498-1500.
168. Prat S, Fernández A, Fica A, Fernández J, Alexandre M, Heitman I. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella enteritidis* de muestras clínicas, alimentarias y avícolas de Chile. *Rev Panam Salud Publica* 2001; 9:7-12.
169. Prats G, Mirelis B, Llovet T, Muñoz C, Miró E, Navarro F. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995 - 1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1140-1145.
170. Pujol M, Peña C. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:69-71..
171. Quintiliani R Jr, Sahn DF, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 7ma Ed. 1999. ASM Press, Washington, D.C. pp 1505-1525.
172. Radice M, González C, Power P, Vidal MC, Gutkind G. Third-generation cephalosporin resistance in *Shigella sonnei*, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:1-2.
173. Rampling A, Upson R, Brown DFJ. Nitrofurantoin resistance in isolates of *Salmonella enteritidis* phage type 4 from poultry and humans. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25:285-290.
174. Rankin SC, Aceto H, Cassidy J, Holt J, Young S, Love B, Tewari D, Munro DS, Benson CE. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4679-4681.
175. Recchia GD, Hall RM. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* 1997; 10:389-394.
176. Renau TE, Leger R, Flame EM, Sangalang J, She MW, Yen R et al. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *J Med Chem* 1999; 42:4928-4931.
177. Revathi G, Shannon KP, Stapleton PD, Jain BK, French GL. An outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* senftenberg in a burns ward. *J Hosp Infect* 1998; 40:295-302.
178. Ridley AM, Threlfall EJ, Browe B. Genotypic characterisation of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2314-2321.
179. Rossi MA, Galas M, Caffer MI, Tokumoto M, Guelfand L, Binsztein N. Surveillance of *Salmonella enterica* antimicrobial resistance en Argentina. Different serovars, different resistance profile. Abstract 43.008. Abstract Book of the 9th International Congress on Infectious Diseases, Buenos Aires, Argentina. 2000: 86.
180. Rossi MA, Tokumoto M, Galas M, Soloaga R, Corso A y Red Nacional de Laboratorios que participan en el Programa WHONET. Vigilancia de la resistencia a los antibacterianos en Argentina. Programa Whonet, 1995-1996. *Rev Panam Salud Publica* 1999; 6:234-241.

181. Rossi A, Lopardo H, Woloj M, Picandet AM, Marino M, Galas M, Radice M, Gutkind G. Non-typhoid *Salmonella* spp. resistant to cefotaxime. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:697-702.
182. Rubino JR. The economic impact of human *Salmonella* infection. *Clin Microbiol Newsletter* 1997; 19:25-32.
183. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1109-1117.
184. Ruiz J, Navia MM, Marco F, Vila J. Mecanismos de resistencia a betalactámicos y ácido nalidíxico en aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* serotipo *hadar* y *bsilla*. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2004; 22:251-256.
185. Santos RL, Zhang S, Tsois RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Micorbes Infect* 2001; 3:1335-1344.
186. Sarwari AR, Magder LS, Levine P, McNAmara AM, Knowler S, Armstrong GL, Etzel R, Hollingsworth J, Morris JG Jr. Serotype distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. *J Infect Dis* 2001;183:1295-1299.
187. Schmieger H. Molecular survey of the *Salmonella* phage typing system of Anderson. *J Bacteriol* 1999; 181:1630-1635.
188. Schroeder SA, Aserkoff B, Brachman PS. Epidemic salmonellosis in hospital and institutions. A five year review. *N Engl J Med* 1968; 279:674-678.
189. Schutze GE, Schutze SE, Kirby RS. Extraintestinal salmonellosis in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:482-485.
190. Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs* 2002; 62:557-566.
191. Simmons A. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar Newport. *Vet Rec* 2002; 150:759.
192. Sistema de Información Regional para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA). Brotes de ETA ocurridos, Argentina, 2000-2002. INPPAZ OPS/OMS. Disponible en: http://www.panalimentos.org/sirveta/e/graf_02.asp.
193. Skibsted U, Baggesen DL, Dessau R, Lisby G. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and phage-typing in the analysis of a hospital outbreak of *Salmonella enteritidis*. *J Hosp Infect* 1998; 38:207-216.
194. Slauch JM. Molecular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. Disponible en: <http://www.life.ufuc.edu/micro/slauch.html>.
195. Snyder L, Champness W. Molecular genetics of bacteria. Washington, DC: ASM Press; 1997.
196. Soler Crespo P, Cano Portero R, Hernandez Pezzi G, de Mateo Ontañón S, Usera González MA. Enter-Net: Red europea de vigilancia de enfermedades entérica, *Salmonella* y *Escherichia coli* O157. *Bol Epidemiol Semanal* 1998; 6:241-248.
197. Soto SM, Guerra B, del Cerro A, González Hevia MA, Mendoza MC. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. *Int J Food Microbiol* 2001; 71:35-43.

198. Soto SM, Ruiz J, Mendoza MC, Vila J. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22:537-540.
199. Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:312-316.
200. Stamey K, Abbott S, Rau M, Barrett T, Tollefson L, Marano N, Angulo F, NARMS Working Group. Emerging antimicrobial resistance among human *Salmonella* isolates to clinically important antimicrobial agents, NARMS 1996-1999. *Abstract: Antimicrobial Resistance - 21. International Conference on Emerging Infectious Diseases 2000. Atlanta, Georgia.*
201. Stanley J, Jones CS, Threlfall EJ. Evolutionary lines among *Salmonella enteritidis* phage types are identified by insertion sequence IS200 distribution. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 82:83-90.
202. Stavric S. Defined culture and prospects. *Int J Food Microbiol* 1992; 15:245-263.
203. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP, Brittain KL, et al. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2864-2872.
204. St Louis ME, Morse DL, Potter ME, DeMelfi TM, Guzevich JJ, Tauxe RV, Blake PA. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New implications for the control of salmonellosis. *JAMA* 1988; 259:2103-2107.
205. Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* strains. *Int J Antimicrob Agents* 2000 16: 211-217.
206. Sulakvelidze A, Kekelidze M, Turabelidze D, et al. Salmonellosis in the Republic of Georgia: using a molecular typing to identify the outbreak-causing strain. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 70-73.
207. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, and the CDC PulseNet Task Force. PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:382-389.
208. Szych J, Cieslik A, Paciorek J, Kaluzewski. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18: 37-42.
209. Tassios PT, Chadjichristodoulou C, Lambiri M, Lambiri M, Kansouzidou Kanakoudi A, Sarandapoulou Z, Kourea Kremastinou J, Tzouvelekis LS, Legakis NJ. Molecular typing of multidrug-resistant *Salmonella* Blockley outbreak isolates from Greece. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 60-64.
210. Tassios PT, Markogiannakis A, Vatopoulos AC, et al. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* during a 7-year period in Greece. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1316-1321.
211. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-2239.
212. Thong K, Cheong Y, Puthuchearu S, Koh C, Pang T. Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1135-1141.

213. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food-and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews* 2002; 6:141-148.
214. Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104 - a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:7-10.
215. Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C, Gerner Schmidt P, Tschäpe H, Cormican M, Luzzi I, F Schnieder, W Wannet, Machado J, Edwards G. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill* 2003; 8:41-45.
216. Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR, Rowe B. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella typhimurium* DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet Rec* 1994;134:577.
217. Tollefson L, Angulo FJ, Fedorka-Cray PJ. National surveillance for antibiotic resistance in zoonotic enteric pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1998;14:141-150.
218. Turk JR, Fales WH, Maddox C, Miller M, Pace L, Fischer J, Kreeger J, Johnson G, Turnquist S, Ramos JA. Pneumonia associated with *Salmonella choleraesuis* infection in swine: 99 cases (1987-1990). *J Am Vet Med Assoc* 1992; 201:1615-1616.
219. Usera MA, Aladueña A, Díez R, de la Fuente M, Gutiérrez R, Cerdán P, Echeita A. Análisis de las cepas de *Salmonella* sp aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 1997. *Bol Epidemiol Semanal* 1998; 6:137-148.
220. Vahaboglu H, Dodanli S, Eroglu C, Ozturk R, Soyletir G, Yildirim I, Avkan V. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clon. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2942-2946.
221. Van Duijkeren E, Wannet WJB, Houwers DJ, van Pelt W. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3980-3985.
222. Van Lith LA, Aarts HJ. Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Lett Appl Microbiol* 1994; 19:273-276.
223. Vasallo FJ, Martín Rabadan P, Alcalá L, García Lechuz JM, Rodríguez Creixems M, Bouza E. Failure of ciprofloxacin therapy for invasive nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26:535-536.
224. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:6823-6831.
225. Vila J. Perspectivas actuales y futuras de las técnicas de biología molecular en el estudio epidemiológico de las infecciones nosocomiales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14:341-344.
226. Villa L, Mammina C, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Tassios PT, Nastasi A, Carattoli A. Multidrug and broad-spectrum cephalosporin resistance among *Salmonella enterica* serotype Enteritidis clinical isolates in Southern Italy. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2662-2665.
227. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:4407-4414.

228. Wegener HC, Baggesen DL. Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis by use pulsed gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 1996; 32:125-131.
229. Weide-Botjes M, Liebisch B, Schwarz S, Watts JL. Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *cholerasuis* field isolates and differentiation from homologous vaccine strains Suisaloral and SC-54. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2460-2463.
230. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:7213-7218.
231. White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, McDermott PC, McDermott S, Wagner DD, Meng J. The isolation of antibiotic resistance salmonella from retail ground meats. *N Engl J Med* 2001; 345:1147-1154.
232. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (Suppl 2):S94-103.
233. Yan SS, Pendrak ML, Abela Rider B, Punderson JW, Fedorko DP, Foley SL. An overview of *Salmonella* typing. Public health perspectives. *Clin Appl Microbiol Rev* 2003; 4:189-204.
234. Zansky S, Wallace B, Schoonmaker Bopp D, Smith P, Ramsey F, Painter J, Gupta A, Kalluri P, Noviello S. From the Centers of Disease Control and Prevention. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport-United States. January-April 2002. *JAMA* 2002; 288:951-953.

9. ANEXO

Algunos aspectos de la investigación desarrollada en esta Tesis han dado origen a las siguientes publicaciones y presentaciones en eventos científicos

9.1. Publicaciones

- Merino LA, Ronconi MC, Bojanich MV. **Resistencia antimicrobiana y presencia de plásmidos en cepas de *Salmonella* y *Shigella* aisladas en las provincias del Chaco y Corrientes (Argentina).** Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers 2001; Vol XIV: 309-321.
- Merino LA, Navia MM, Ruiz J, Sierra JM, Cech NB, Lodeiro NS, Vila J. **Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Infantis by different typing methods.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 2003; 45:119-123.
- Merino LA, Hreňuk GE. **Epidemiología molecular y mecanismos de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp aisladas en el nordeste argentino.** Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers 2005; Vol XVI: 297-318.
- Merino LA, Alonso JM, Navia MM, Ruiz J, Sierra JM, Vila J. **Resistencia a antimicrobianos betalactámicos en *Salmonella enterica* serovar Infantis aisladas en la región nordeste de Argentina.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología 2005; 25 (3) jul-sep.

9.2. Presentaciones en eventos científicos

- Merino LA, Alonso JM, Ronconi MC, Hreňuk GE. **Dotación plasmídica como marcador epidemiológico bacteriano.** Jornadas de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas - U.N.N.E. Octubre de 1999. Resistencia - Chaco.
- Merino LA, Ronconi MC, Cech NB, Lodeiro NS. **Análisis de la relación clonal entre aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* serovar Infantis mediante diferentes métodos de tipificación.** 45° Jornadas Médico-Bioquímicas del Interior. 8 y 9 de septiembre de 2000. Villa Angela - Chaco.
- Merino LA, Ruiz J, Navia MM, Vila J. **Resistencia a cefalosporinas de tercera generación en cepas de *Salmonella enterica* sub. *enterica* serovar Infantis.** X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 17 al 19 de marzo de 2002. Sevilla. España.
- Pichel MG, Castañeda NC, Caffer MI, Monzón MC, Merino LA, Binztein N. **Molecular epidemiology of an outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Newport in Argentina.** International Conference on Emerging Infectious Diseases. 24 al 26 de marzo de 2002. Atlanta. Georgia. Estados Unidos de América.
- Merino LA, Ruiz J, Pato AM, Alonso JM, Vila J. **Doble mecanismo de resistencia a quinolonas en *Salmonella enterica* serovar infantis.** XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Poster. 17 al 21 de octubre de 2004. Buenos Aires.
- Merino LA, Ruiz J, Alonso JM, Vila J. **Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular en cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis aisladas en las provincias de Chaco y Corrientes (Argentina).** Jornadas de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas - U.N.N.E. Octubre de 2005. Corrientes.