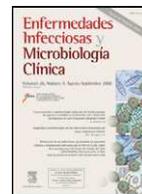


Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Ingeniería evolutiva en *Salmonella*: la emergencia de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia a antimicrobianos en serotipos no tifoideos

María del Carmen Mendoza*, Ana Herrero y María Rosario Rodicio

Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 16 de abril de 2008

Aceptado el 18 de septiembre de 2008

Palabras clave:

Salmonella typhimurium

Salmonella choleraesuis

Plásmidos híbridos

Resistencia a antimicrobianos

Tipos emergentes

Ingeniería evolutiva

RESUMEN

Un ejemplo de ingeniería evolutiva en bacterias patógenas es la emergencia en *Salmonella enterica* de plásmidos híbridos que han surgido por asociación de determinantes de resistencia (R) a antimicrobianos con plásmidos de virulencia (V) específicos de los serotipos *typhimurium* y *choleraesuis*. Los plásmidos VR poseen en común el operón *spv* (*Salmonella plasmid virulence*, que interviene en la infección sistémica) aunque difieren en la presencia de otros determinantes V y en el perfil de genes R. Los del serotipo *typhimurium* se han encontrado en Europa, y presentan regiones R con diferente grado de complejidad, pudiendo incluir integrones de clase 1 y distintos transposones. Los del serotipo *choleraesuis* proceden de cepas aisladas en Taiwán y sólo confieren resistencia a ampicilina y sulfonamidas. Ambos serotipos son zoonóticos y la formación de plásmidos VR puede aportar una ventaja selectiva en determinadas circunstancias, originando cepas más difíciles de tratar y con mayor potencial epidémico.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Evolutionary engineering in *Salmonella*: emergence of hybrid virulence-resistance plasmids in non-typhoid serotypes

ABSTRACT

An example of evolutive engineering in bacterial pathogens is the emergence of hybrid virulence-resistance (VR) plasmids in *Salmonella enterica*, resulting from an association between antimicrobial resistance determinants and specific virulence plasmids of the *S. typhimurium* and *S. choleraesuis* serotypes. VR plasmids all possess the *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) operon, which is involved in systemic infection; however, they differ in the presence of other virulence determinants and in the resistance gene profile. VR plasmids of *S. typhimurium* have been found in Europe, and show resistance regions with different levels of complexity that can include class 1 integrons and various transposons. VR plasmids of *S. choleraesuis*, detected in strains isolated in Taiwan, only confer resistance to ampicillin and sulfonamides. Both serotypes are zoonotic and the presence of hybrid VR plasmids may confer an adaptive advantage under certain conditions, resulting in bacterial strains that are more difficult to treat and have a higher epidemic potential.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Salmonella typhimurium

Salmonella choleraesuis

Hybrid plasmids

Antimicrobial resistance

Emerging types

Evolutionary engineering

Ingeniería evolutiva en *Salmonella*

La evolución de las bacterias patógenas en cuanto a la adquisición de determinantes de virulencia (V) y/o de resistencia (R) a agentes antimicrobianos se debe, fundamentalmente, a la incorporación, a menudo secuencial, de piezas de ADN, cuya

combinación origina nuevos elementos genéticos, que quedan inmediatamente sometidos a la selección natural en un ambiente cambiante¹. Las piezas que intervienen en este proceso de ingeniería evolutiva son de 3 tipos: operativas (entre las que se incluyen los genes que codifican y regulan las funciones V y R), translocativas (como secuencias de inserción, integrasas, transposasas, resolvasas,

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cmendoza@uniovi.es (M.C. Mendoza).

etc.) y dispersivas (entre las que se incluyen islas genómicas, bacteriófagos, plásmidos, transposones e integrones-casets génicas)^{1,2}. Al día de hoy, múltiples evidencias apoyan la idea de que una bacteria saprofita o comensal puede transformarse en patógena sólo por recibir, mediante transferencia horizontal, un determinado elemento genético²⁻⁴. Como ejemplo, se podría tomar una cepa ancestral de *Escherichia coli*, comensal habitual en el intestino de los animales homeotermos, que al adquirir la isla de patogenicidad SPI1 (*Salmonella pathogenicity island*) daría lugar a una cepa enteroinvasiva y, por tanto, patógena, conduciendo a la separación del género *Salmonella*. SPI1 contiene 2 grupos de genes (*inv-spa* y *prg-org*) que codifican un sistema de secreción de tipo III (SST3), mediante el cual la bacteria secreta e inyecta diversas proteínas efectoras (o de patogenicidad) en el citosol de la célula hospedadora. Parte de estas proteínas fuerzan la penetración de *Salmonella* en células no fagocíticas gracias a la modificación del citoesqueleto de actina. Un segundo grupo de proteínas efectoras será responsable de la enteropatogenicidad, causando inflamación del epitelio intestinal y síntomas diarreicos⁵. En otros momentos del largo proceso evolutivo hacia las actuales representantes de *Salmonella*, se fueron ganando nuevos determinantes V, cuyos productos permiten a la bacteria atravesar barreras y manipular las células del hospedador en sitios específicos durante el curso de la infección. Por ejemplo, SPI2 codifica un segundo SST3 requerido para la supervivencia de la bacteria, tanto en células epiteliales como en macrófagos^{4,6}. Hace años se postuló que un 4% (unos 200 genes) del genoma de la cepa tipo de *Salmonella* (*S. enterica* serotipo *typhimurium* LT2) estaba involucrado en la patogenicidad para el ratón⁷, hecho confirmado por la posterior secuenciación del genoma de esta cepa⁸. En las salmonelas actuales, la mayor parte de los determinantes V están localizados en el cromosoma formando islas, islotes, operones o genes sueltos, pero también se conoce la presencia de éstos en plásmidos específicos de algunos serotipos no tifoideos de *S. enterica*⁸⁻¹¹. Estos serotipos, transmitidos fundamentalmente por alimentos, son responsables de un gran número de enteritis

(salmonelosis) en el ámbito mundial, y pueden originar infecciones sistémicas en personas inmunodeprimidas¹²⁻¹⁵.

Plásmidos de virulencia en *Salmonella*

La existencia de plásmidos V en *S. enterica* (pS-V) se puso por primera vez de manifiesto en el serotipo *typhimurium* (pSLT) en el año 1982¹⁶, y posteriormente se encontró en un número limitado de otros serotipos, todos pertenecientes a la subespecie 1. Algunos de ellos son particularmente frecuentes en infecciones humanas, como *enteritidis* (pSEV; 60 kb), *choleraesuis* (pSCV; 50 kb), dublin (pSDV; 80 kb), además de *typhimurium* (pSLT, pSTV; 90 kb)^{10,11}. Los plásmidos V poseen una región de 7,8 kb, altamente conservada, que contiene los genes *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) necesarios durante la fase sistémica de la enfermedad en hospedadores específicos (experimentales/naturales: *typhimurium* en ratón/ganado vacuno, *enteritidis* en ratón/pollo, *choleraesuis* en cerdo y dublin en ganado vacuno)^{9,10,17}. El locus *spv* está formado por 5 genes designados *spvRABCD*^{8,9,11}. El gen *spvR* codifica un regulador positivo esencial para la expresión de los otros genes *spv*. El producto de *spvB* es una ADP ribosil transferasa que actúa sobre la actina, bloqueando la conversión de G-actina en F-actina y provocando una desestabilización del citoesqueleto de células eucarióticas¹⁸. En el ratón, mutaciones en los genes *spv* no afectan a la colonización inicial del intestino, pero sí a la infección sistémica, ya que estos genes son necesarios para la supervivencia y multiplicación de la bacteria en el interior de los macrófagos^{17,18}.

Dependiendo del serotipo, los plásmidos V pueden contener otros genes asociados a virulencia (fig. 1) como son: a) El operón *pefBACDI* (*plasmid-encoded fimbriae*), implicado en la síntesis de un tipo de fimbrias que intervienen en la adherencia de la bacteria a las células epiteliales del intestino delgado de ratón^{10,19}. El operón *pef* está ausente en pSDV, el plásmido del serotipo dublin que, en cambio, codifica un tipo de fimbrias relacionadas con las K88 de *E. coli*¹⁰; b) los genes *rsk* y *rck* podrían estar implicados en

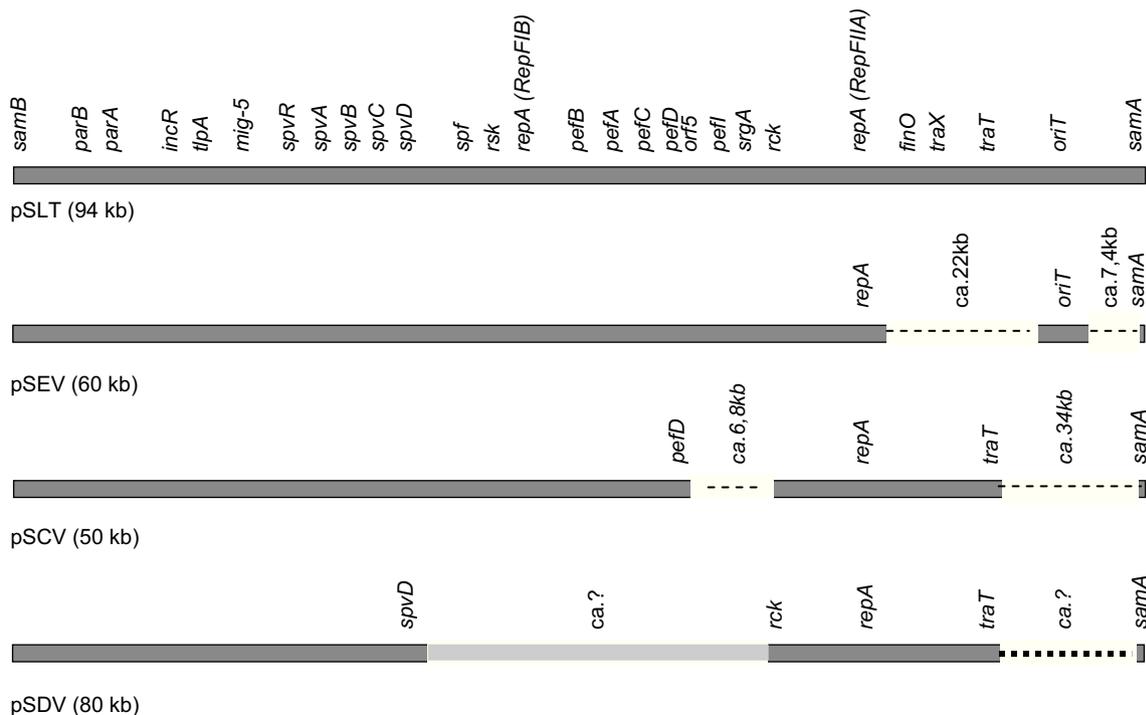


Figura 1. Representación esquemática de los mapas genéticos de 4 plásmidos V de *Salmonella*. Los plásmidos pSLT/pSTV, pSEV, pSCV y pSDV (específicos de serotipos *typhimurium*, *enteritidis*, *choleraesuis* y dublin, respectivamente) se presentan alineados respecto a pSLT. Delección determinada: ---; delección no determinada: - - - -; región heteróloga: . (Datos tomados de las referencias 8, 61 y derivados de nuestro estudio.)

la resistencia de *Salmonella* a la acción bacteriolítica del suero. El primero se encuentra en los plásmidos V de *typhimurium*, *enteritidis* y *choleraesuis*, y el segundo sólo en los de *typhimurium* y *enteritidis*. La resistencia al suero mediada por el producto del gen *rck* está asociada con la inhibición de la polimerización del componente C9 del sistema del complemento, impidiendo la formación de complejos de ataque de membrana y, por tanto, la disrupción de la bacteria^{10,20}; c) el locus *spf*, presente en 3 plásmidos V (pSTV, pSEV y pSCV) está implicado en la supresión de la activación de la respuesta inmune del hospedador, y en el caso de pSTV está asociado con la producción de IL-12p40 por macrófagos del ratón^{11,21}; d) otros genes V son *mig-5*, *tlpA* y *srgA*, que codifican, respectivamente, una anhidrasa carbónica inducible en macrófagos, una proteína que actúa como termosensor reprimiendo su propia expresión cuando hay un aumento de temperatura y una posible disulfuro oxidoreductasa, esencial para la biogénesis de fimbrias de codificación plasmídica^{10,22}; e) otros loci codifican funciones de replicación y transferencia por conjugación. Sin embargo, mientras pSLT es un plásmido auto-transferible, al menos bajo determinadas condiciones^{10,23}, que posee el origen de transferencia del factor F (*oriT*) y una región *tra* compleja, los otros 3 plásmidos (pSEV, pSDV y pSCV) han perdido esta capacidad, por presentar diferentes deleciones en la región *tra*^{10,23}; f) en los plásmidos V se han detectado, además, un número de loci de función desconocida^{8,9}.

En cuanto al origen de los plásmidos V, se piensa que en algún momento del proceso evolutivo pudo tener lugar la integración del factor F (en el caso de pSTV, pSEV y pSCV) o de un plásmido relacionado (en el caso de pSDV, que pertenece a un linaje diferente), en el cromosoma de *Salmonella*, próximo al operón *spv*. Posteriormente, el factor F integrado se escindiría del cromosoma arrastrando al locus *spv* y generando los ancestros de los plásmidos V actualmente presentes en *Salmonella*¹¹. Esta hipótesis viene apoyada por la presencia de dicho operón en el cromosoma de aislamientos pertenecientes a las subespecies II, IIIa, IV y VII de *S. enterica*. Sin embargo, la detección de genes relacionados con transposasas flaqueando la región *spv*, sugiere que esta región pudo haber sido adquirida mediante transposición¹¹.

Plásmidos híbridos derivados de pSLT y portadores del integrón InH detectados en España en el serotipo *typhimurium*

Una nueva etapa en la ingeniería evolutiva de *Salmonella* ha sido la emergencia, aparentemente reciente, de plásmidos híbridos con determinantes V y R. Ya se ha indicado que en la mayor parte de los casos, la resistencia a antimicrobianos en las bacterias es consecuencia de la adquisición de nueva información genética portada por algún tipo de elemento móvil, y los transposones y las casetes génicas localizadas en integrones son entidades clave en la formación y evolución de los plásmidos^{1,2,10,24,25}. Frecuentemente, los integrones forman parte de transposones y éstos, a su vez, suelen estar localizados en plásmidos, a menudo conjugativos. Estos plásmidos pueden ser transferidos a otras bacterias, y también insertarse en el cromosoma y/o en otros plásmidos presentes en el nuevo hospedador o en el inicial. Un ejemplo relevante lo constituyen los integrones portadores de la casete génica *aadA1*, sola o en combinación con otras casetes de adquisición posterior, que forman parte de transposones del tipo Tn21, que pueden estar localizados en diferentes plásmidos o en el cromosoma, unas veces solos y otras en combinación con transposones y/o integrones adicionales, formando agrupaciones con diferente grado de complejidad estructural^{24,25}.

En *Salmonella* se han detectado plásmidos VR en los serotipos *typhimurium*²⁶⁻³⁰ y *choleraesuis*^{11,31}. Uno de los plásmidos híbridos

de *typhimurium*, designado pUO-StVR2, fue descubierto en nuestro laboratorio en cepas clínicas de este serotipo, aisladas en Asturias entre 1993 y 1999²⁸. Estas cepas compartían el fenotipo pentarresistente (ACSSuT, resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina/espectinomicina, sulfonamidas y tetraciclina) de un grupo pandémico de *typhimurium*, asociado preferentemente al fagotipo DT104, que ha sido objeto de numerosas revisiones bibliográficas³²⁻³⁴. Ahora bien, cabe destacar que en el tipo pandémico, los genes responsables de la resistencia son *bla*_{PSE-1}, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*, respectivamente, y que estos genes se localizan en una isla cromosómica de 43 kb, denominada SGI1. Esta isla contiene un integrón de clase 1 complejo, con 2 sitios *attI1*, el primero ocupado por la casete *aadA2* y el segundo por el gen *bla*_{PSE-1}³⁴⁻³⁸. Por el contrario, el fenotipo ACSSuT conferido por pUO-StVR2 se debe a los genes *bla*_{OXA-1} (designado también *bla*_{OXA-30}³⁹), *catA1*, *aadA1*, *sul1* y *tet(B)*^{28,30,38}. El plásmido pUO-StVR2 tiene un tamaño de aproximadamente 130 kb (inicialmente estimado en 140 kb), es conjugativo, pertenece al grupo de incompatibilidad IncFII y porta la mayor parte de los genes característicos de pSTV (locus *spv*, *rck*, *traT*, *traX*, *oriT*, *sama*, *samb*, *repA* [RepFIIA], *parA*, *parB*, *srgA*), siendo defectivo para la región que abarca el operón *pef* y en el gen *rsk*^{28,30,38}. Se piensa que pUO-StVR2 podría proceder de pSTV tras haber ganado (en un solo paso o de forma secuencial) una región R compleja, de unas 45 kb (fig. 2), que incluye un integrón de clase 1, designado InH³⁸, con una región variable de unas 2.000 pb que contiene las casetes génicas *bla*_{OXA-1}-*aadA1*, y una región 3' constante con los genes *qacEΔ1-sul1*. En la región R de pUO-StVR2 se localizan, además, 3 transposones: a) Tn2603, relacionado con Tn21 (perteneciente a la familia Tn3) y portador del integrón InH y del operón *mer* que codifica resistencia a mercurio^{40,41}; b) Tn9, que aporta el gen *catA1* y se encuentra ligado a Tn2603, y c) Tn10 donde se localiza el gen *tet(B)*²⁵. La secuencia de nucleótidos de la región R, que se está determinando actualmente, aportará información acerca de su origen y los mecanismos de ensamblaje de las distintas piezas que la constituyen (genes R, integrón, secuencias de inserción y transposones, así como de su sitio de inserción en el plásmido pSTV).

Estudios en curso, realizados en colaboración con el Centro Nacional de Microbiología (CNM) han revelado la existencia de variantes de pUO-StVR2, designadas pUO-StVR4 a VR9⁴², presentes en cepas multirresistentes de *typhimurium* recogidas en diferentes laboratorios españoles. Algunos de estos plásmidos confieren a sus hospedadores el mismo fenotipo R y genotipo VR que pUO-StVR2, pero se diferencian en cuanto a tamaño y/o número de sitios de corte con distintas endonucleasas (*XbaI*, *SphI*, *HindIII*, *EcoRI*, etc.). Éste es el caso de los plásmidos pUO-StVR4 y pUO-StVR5. Por otro lado, pUO-StVR7 porta un segundo integrón en cuya región variable (aproximadamente, 1.000 pb) se identificó la casete génica *aadA22*, que difiere de *aadA1* en 21 nucleótidos. La ganancia de dicho integrón afecta al genotipo R, pero no al fenotipo. Sin embargo, en el caso de otros plásmidos, la pérdida o adquisición de determinantes R se traduce en una alteración del fenotipo. Así, pUO-StVR6 y pUO-StVR7 no confieren resistencia a cloranfenicol y tetraciclina, debido probablemente a una deleción que afecta a los genes *catA1* y *tet(B)* y, por tanto, a los transposones Tn9 y Tn10; mientras que pUO-StVR8 y pUO-StVR9 han ganado un determinante de resistencia a trimetoprim (aún no identificado), ampliando así el espectro de resistencia.

Las primeras cepas de *typhimurium* portadoras de pUO-StVR2 se asignaron a un mismo grupo genómico por presentar perfiles de genes R, genes V, integrones y macrorrestricción genómica (*XbaI*-PFGE) idénticos y claramente diferentes de los mostrados por otras cepas multirresistentes del mismo serotipo²⁸. Sin embargo, la fagotipificación de estas cepas reveló una cierta heterogeneidad, ya que fueron no fagotipables, de patrón no

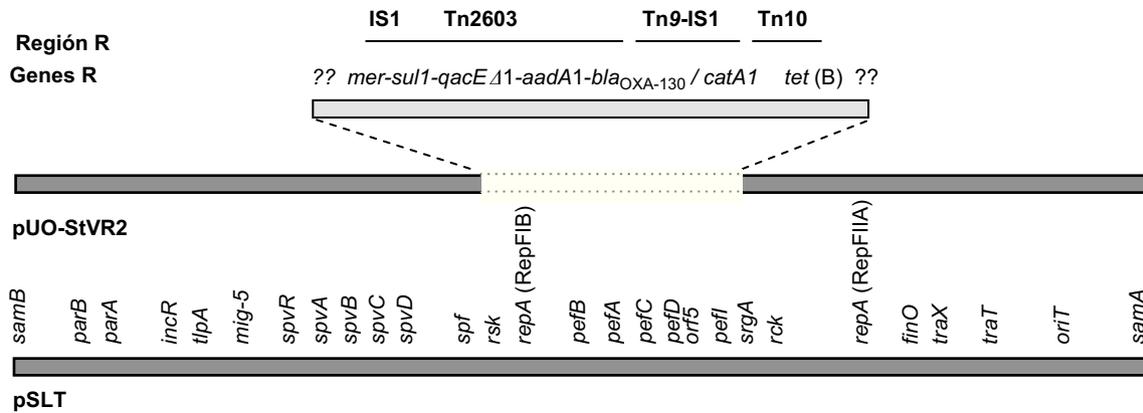


Figura 2. Mapas de los plásmidos pSLT y pUO-StVR2. Aparentemente pUO-StVR2 (ca. 125 kb) es un derivado de pSLT (94 kb), en el que se ha insertado una compleja región R de unas 40 kb, provocando la delección de una región que afecta al operón *pef* y al gen *rsk*. Datos tomados de las referencias 8, 9, 61 y de nuestra propia investigación.

reconocido, o pertenecían a fagotipos bien definidos: DT104 o DT120. En estudios con aislamientos posteriores recogidos en Asturias (2001–2002)³⁰ y en otras regiones españolas (2002–2004)⁴² (datos no publicados) se han encontrado éstos y otros fagotipos (DT104b, DT208, DT41, DT27, DT193, DT160 y DTU302), y además se ha revelado que, aunque la mayoría de los aislamientos generaban perfiles de macrorrestricción genómica con *Xba*I y *Bln*I idénticos a los aislamientos más antiguos, algunos originaron perfiles diferentes (fig. 3). También es reseñable la detección, en baja frecuencia, de aislamientos portadores de pUO-StVR2 con fenotipo/genotipo R extendido, no atribuible a la presencia del plásmido híbrido. Cabe destacar la detección de genes de resistencia a trimetoprim (*dfrA12*, aportado por un plásmido de resistencia compatible con pUO-StVR2, y *dfrA1*, presente en el cromosoma y un gen sin identificar en el plásmido híbrido)^{30,42}, gentamicina (gen de localización plasmídica, aún sin identificar)⁴², y ácido nalidíxico (debido a una mutación puntual que cambia el aminoácido Asp87 del gen *gyrA* por Asn [GAC a AAC])⁴² (datos no publicados). Además, se identificaron aislamientos con el mismo fenotipo R pero distinto genotipo R, que incluye los genes *strA/B-sul2* (resistencia a estreptomicina-sulfadiazina) localizados en plásmidos de pequeño tamaño (< 15 kb). Estos datos apoyan el mantenimiento de los aislamientos característicos del grupo a lo largo de la última década en España, junto con la aparición de nuevas variantes, lo que supone una evolución intragrupo, además de la ya constatada evolución plasmídica^{30,42}.

En cuanto a la diseminación o dispersión geográfica, los plásmidos pUO-StVR se han encontrado hasta la fecha en aislamientos clínicos procedentes de 21 ciudades españolas, en algún caso asociados a brotes alimentarios de tipo familiar o comunitario^{30,42,43}. Por ello, al menos desde 2002, el grupo *typhimurium* pUO-StVR debe considerarse endémico en España⁴². Por otro lado, tanto pUO-StVR2 como pUO-StVR9 se han encontrado en aislamientos procedentes de cerdos enfermos, y pUO-StVR2 en aislamientos de productos cárnicos destinados a consumo humano^{42,43} (datos no publicados), lo cual indica la existencia de un reservorio animal.

De momento, las cepas de *Salmonella* con plásmidos del tipo pUO StVR2 sólo se han detectado y caracterizado en España. Este hecho podría ser interpretado de 2 formas: que estas cepas estén limitadas a nuestra área geográfica o, más probable, que no se han buscado con la metodología apropiada en otros países. En cualquier caso, presuponemos que su diseminación será cuestión de tiempo y en ella jugarán (o están ya jugando) un papel importante tanto los movimientos poblacionales (incluido el

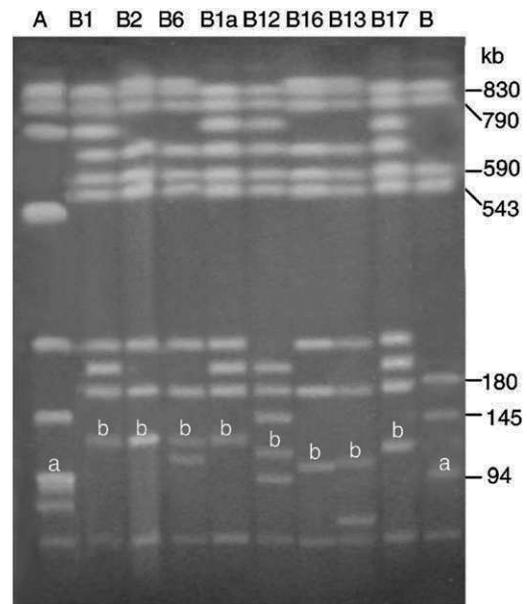


Figura 3. Análisis de macrorrestricción genómica mediante PFGE utilizando la endonucleasa *Bln*I de aislamientos de *Salmonella typhimurium* portadores de diferentes plásmidos del grupo pUO-StVR. A y B, perfiles mostrados por aislamientos de *S. typhimurium* fuera de grupo: A, LSP 14/92 (representativo del clon pentarresistente DT104) y B, cepa tipo LT2 (pSLT). B1, B2, B6, B1a, B12, B16, B13 y B17, perfiles generados por LSP 31/93 (pUO-StVR2/ca. 130 kb), LSP 137/01 (pUO-StVR2/ca. 130 kb), LSP 174/01 (pUO-StVR2/ca. 125 kb+pUO-StR12/ca. 110 kb), CNM 42/04 (pUO-StVR4/ca. 135 kb), CNM 173/02 (pUO-StVR5/ca. 115 kb), CNM 171/02 (pUO-StVR6/ca. 105 kb), CNM 179/02 (pUO-StVR7/ca. 105 kb), CNM 79/04 (pUO-StVR8/ca. 120 kb), respectivamente. Este último perfil también fue generado por CNM 181/04 (pUO-StVR9/ca.120 kb). a: plásmido pSLT de 94 kb específico del serotipo *typhimurium*; b: fragmentos correspondientes a plásmidos pUO-StVR identificados mediante hibridación utilizando como sonda el plásmido pUO-StVR2.

turismo), como de mercancías. A favor de este supuesto, tenemos como antecedentes cercanos la rápida diseminación espacial de 2 tipos pandémicos y prevalentes: el ya comentado *typhimurium* DT104 y *enteritidis* (fagotipos PT4 y PT1) que tiene como principal reservorio las gallináceas y como vehículo de transmisión los alimentos derivados, incluidos los huevos⁴⁴⁻⁴⁸. Además, datos en relación con la epidemiología de integrones de clase 1 en *Salmonella*, revelaron la presencia de integrones con la misma región variable que InH en aislamientos de *typhimurium* analizados en otros laboratorios de España⁴⁹⁻⁵¹ y en diferentes países del

sur de Europa: de origen clínico en Albania^{52,53} y en Francia⁵⁴, y tanto clínicos como de productos de cerdo en Portugal⁵⁵. Al menos una parte de los aislamientos de España⁵¹, Francia⁵⁴ y Portugal⁵⁵ generaba perfiles *Xba*I muy similares a los encontrados por nosotros^{28,30,42}. Integrones de tipo InH se han detectado también en Noruega, en 5 aislamientos clínicos del serotipo *typhimurium* fagotipo DT120, y es destacable que las encuestas epidemiológicas realizadas a los pacientes indicaron que 4 de ellos podrían haber sido adquiridos en España durante los años 1996-1999⁵⁶. Sin embargo, en ninguno de estos casos se investigó la posible relación del integrón con plásmidos de virulencia del tipo pUO-StVR. Para ello bastaría con visualizar el ADN plasmídico mediante un método apropiado (p. ej., lisis alcalina, S1-PFGE, o macro-restricción-PFGE utilizando una endonucleasa con un único sitio de reconocimiento en el plásmido)^{28,30,42}, e hibridarlo con sondas específicas para los genes *bla*_{OXA-1}, utilizado como marcador de resistencia y del integrón InH, y *spvC*, marcador de virulencia (fig. 3).

Otros plásmidos híbridos de virulencia/resistencia en *Salmonella*

Procesos de transposición y/o recombinación entre pSTV y diferentes plásmidos R, han conllevado a la emergencia de otros plásmidos híbridos (portadores o no de integrones tipo InH) en la Europa mediterránea. En Italia, en 1997, se encontró una cepa clínica de *typhimurium* que contenía un plásmido VR de 110 kb (denominado t-ST4), aparentemente no conjugativo pero transferible a *E. coli* por transformación, y perteneciente al grupo de incompatibilidad IncFII²⁹. Este plásmido poseía genes característicos de pSLT (*spvC*, *rck*, *pefA* y *traT*), portaba un integrón con la misma región variable que InH (designado In-t8), junto a un segundo integrón (In-t7) con la casete *aadB* (resistencia a gentamicina y kanamicina), respectivamente asociados a transposones del tipo Tn21 y Tn1696, así como otros 3 genes R: *catA1*, *dfrA23* y *sul1*, éste último en la región 3' constante de los integrones. En cuanto a cepas de *typhimurium* aisladas en Francia, aunque se estudiaron en menor profundidad, se pudo constatar que expresaban el fenotipo ACSSuT, en el cual la resistencia a ampicilina se debía a los genes *bla*_{TEM-1} o *bla*_{PSE-1}, localizados en plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncFIC/P/Q, que hibridaban con una sonda *spvCD*²⁶.

Sin embargo, el caso más preocupante y bajo vigilancia epidemiológica especial, fue descrito en 1997 por el CNM. Se trata de una variante monofásica del serotipo *typhimurium*, carente del gen *fljB*, con fórmula antigénica [4,5,12:i:-], multi-resistente (fenotipo ACGSSuT±T), y adscrita al fagotipo U302^{57,58}. Esta variante, considerada por el CNM como serotipo para el seguimiento epidemiológico, había sido aislada esporádicamente entre 1993 y 1996, pasando posteriormente a ocupar la cuarta posición en frecuencia en nuestro país, por detrás de *enteritidis*, *typhimurium* y Hadar (<http://cne.isciii.es/htdocs/bes/bes2005.htm>). La comparación de esta variante con la cepa tipo *typhimurium* LT2, realizada mediante microarrays, demostró que la primera carecía del operón *fljAB* y de otras regiones del genoma, como parte del regulón responsable de la asimilación anaeróbica de la alantoína, varios profagos y el gen *iroB*⁵⁹. Ante la alerta de la emergencia de este clon, con resistencia extendida a gentamicina y trimetoprim respecto al fenotipo ACSSuT prevalente, nuestro laboratorio optó por participar en su estudio encontrando que los aislamientos [4,5,12:i:-] recogidos en Asturias entre 1997 y 2000, analizados mediante macrorestricción genómica con *Xba*I, generaban perfiles de bandas con una similitud >90% y, en su mayor parte, poseían un plásmido VR de aproximadamente 140 kb (pUO-StVR3), no autotransferible a *E. coli*, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncN, portador de una región R muy diferente

de la encontrada en pUO-StVR2 (que incluye *bla*_{TEM-1}-*cmlA1-aa-c[3]-IV-aadA2-sul1-dfrA12±tet[A]*; resistencia a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomocina, sulfonamidas, trimetoprim, ± tetraciclina, respectivamente), y de un integrón de clase I (InI) con los genes *qacEΔ1-sul1* en la región 3' constante, y las casetes *dfrA12-aadA2* en la región variable (de unas 1900 pb). Además, contiene el locus *spv* pero no el operón *pef* ni los genes *rck* y *rsk*^{27,38} (datos no publicados). pUO-StVR3 deriva probablemente de un plásmido R que habría adquirido, al menos, la región *spv* de pSLT. El posible antecesor pudo haber sido pUO-StR4, que también se ha encontrado en aislamientos [4,5,12:i:-], que carece de genes de virulencia, pero comparte con pUO-StVR3 el integrón, el perfil de resistencia y el grupo de incompatibilidad. A día de hoy, el CNM ha identificado aislamientos [4,5,12:i:-] con diferentes perfiles R y plásmidos VR de tamaño entre 100-200 kb (datos no publicados).

Es altamente interesante resaltar que en Taiwan, y presumiblemente en otras zonas asiáticas, ha tenido lugar un proceso paralelo de «ingeniería evolutiva» que ha conducido a la emergencia de plásmidos VR muy diferentes a los registrados en el serotipo *typhimurium* en países europeos. Esos plásmidos se han seleccionado en el serotipo *choleraesuis*, endémico en la zona, altamente invasivo, que generalmente requiere terapia antimicrobiana. Por ello, la resistencia a antimicrobianos puede constituir un serio problema^{11,31,60}. Afortunadamente, la incidencia de *choleraesuis* en España y en otros países europeos es nula o muy baja (<http://cne.isciii.es/htdocs/bes/bes2005.htm>). Las cepas de *choleraesuis* analizadas³¹ habían sido recogidas de muestras clínicas en los años 1996 y 1997, albergaban plásmidos de gran tamaño (136 y 140 kb) que portaban el gen *spvC* (utilizado como indicador del plásmidos de virulencia de *Salmonella*⁶¹) junto a los genes de resistencia *bla*_{TEM-1} y *sul1*. Como origen, los autores postulan la posible cointegración, mediante recombinación, de pSCV con plásmidos R. De hecho, en cepas clínicas correspondientes al mismo período, se identificó un plásmido de 90 kb, portador de los genes *sul1-bla*_{TEM-1}. Sin embargo, en ningún caso, la resistencia se asocia con la presencia de integrones o transposones³¹.

Importancia de la emergencia de plásmidos híbridos de virulencia/resistencia en bacterias

Finalmente, cabe destacar que la emergencia de plásmidos híbridos VR en salmonelas no tifoideas (bacterias zoonóticas, con amplio rango de hospedador y fuerte potencial epidémico) constituye un nuevo e interesante ejemplo de evolución bacteriana que puede conducir a la coselección de 2 grupos de determinantes (V y R) para una mejor adaptación de la bacteria en diferentes circunstancias: a) en situaciones no infectivas, pero en presencia de antimicrobianos, los determinantes R permiten la selección simultánea de los determinantes V, y b) en situaciones infectivas la presencia de los factores V garantiza el mantenimiento de los determinantes R, incluso en ausencia de la presión selectiva ejercida por el uso de antimicrobianos. Aunque la adquisición de nuevos plásmidos puede ocasionar un coste inicial a la bacteria receptora, se ha demostrado que éste puede ser compensado por mutaciones en el genoma del hospedador, que restauran, o incluso mejoran, su eficacia biológica en pocas generaciones². Por tanto, los plásmidos VR aportan una gran ventaja adaptativa, dando lugar a la emergencia de «nuevas» cepas patógenas que podrían ser más difíciles de tratar. Esto constituye un grave problema sanitario, máxime si se tiene en cuenta la posible incorporación de determinantes R asociados a transposones en el cromosoma bacteriano, donde se estabilizan, así como la transferencia horizontal de los plásmidos VR, no sólo a otras cepas y serotipos de *Salmonella* sino también a diferentes géneros

bacterianos. Este último hecho se ha constatado experimentalmente al transferirse distintos plásmidos híbridos a *E. coli*, vía conjugación o transformación^{28-30,42}. La diseminación de estas «nuevas» cepas patógenas podría contribuir al incremento en la prevalencia de la salmonelosis, tanto en humanos como en animales.

Agradecimientos

Las autoras desean expresar su agradecimiento a todas las personas e instituciones que, de alguna manera, han contribuido a la investigación recogida en esta revisión, muy especialmente a las Dras. Beatriz Guerra (Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany), M. Ángeles González-Hevia (Laboratorio de Salud Pública, Principado de Asturias) y Aurora Echeita (Centro Nacional de Microbiología, Madrid).

Financiación

Nuestro trabajo acerca del tema se ha desarrollado en el marco de proyectos del Ministerio de Sanidad y Consumo, Fondo de Investigación Sanitaria (PI00-0184; PI02-0172 y PI05-2489) y Ministerio de Educación y Ciencia (SAF-2005-04212).

Bibliografía

- Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:510-8.
- Martínez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:647-79.
- Groisman E, Ochman H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol*. 1997;5:343-9.
- Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:14-56.
- Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol*. 2000;36:997-1005.
- Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol*. 2003;5:501-11.
- Bowe F, Lipps CJ, Tsois RM, Groisman E, Heffron F, Kusters JG. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect Immun*. 1998;66:3372-7.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 2001;413:852-6.
- Rotger R, Casadesús J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol*. 1999;2:177-84.
- Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol*. 2006;134:737-40.
- Chu C, Chiu CH. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. *Microbes Infect*. 2006;8:1931-6.
- Rodríguez M, de Diego I, Mendoza MC. Extraintestinal salmonellosis in a general hospital (1991-1996): relationships between *Salmonella* genomic groups and clinical presentations. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3291-6.
- Rodríguez M, de Diego I, Martínez N, Rodicio MR, Mendoza MC. Nontyphoidal *Salmonella* causing focal infections in patients admitted at a Spanish general hospital during an 11-year period (1991-2001). *Int J Med Microbiol*. 2006;296:211-22.
- Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26:141-8.
- Yagupsky P, Maimon N, Dagan R. Increasing incidence of nontyphi *Salmonella* bacteremia among children living in southern Israel. *Int J Infect Dis*. 2002;6:94-7.
- Jones GW, Rabert DK, Svinarich DM, Whitfield HJ. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun*. 1982;38:476-86.
- Olsen JE, Brown DJ, Thomsen LE, Platt DJ, Chadfield MS. Differences in the carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. *Microb Pathogen*. 2004;36:337-47.
- Lesnick ML, Reiner NE, Fierer J, Guiney DG. The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol*. 2001;39:1464-70.
- Baumler AJ, Gilde AJ, Tsois RM, van der Velden AV, Ahmer BM, Heffron F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J Bacteriol*. 1997;179:317-22.
- Heffernan EJ, Reed S, Hackett J, Fierer J, Roudier C, Guiney D. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gene *rck*. *J Clin Invest*. 1992;90:953-64.
- Chang CC, Ou JT. Excess production of interleukin-12 subunit p40 stimulated by the virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the early phase of infection in the mouse. *Microb Pathog*. 2002;32:15-25.
- Bouwman CW, Kohli M, Killoran A, Touchie GA, Kadner RJ, Martin NL. Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid-encoded paralogue of the disulfide oxidoreductase DsbA, essential for biogenesis of plasmid-encoded fimbriae. *J Bacteriol*. 2003;185:991-1000.
- Ahmer BM, Tan M, Heffron F. The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol*. 1999;181:1364-8.
- Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, et al. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:2925-9.
- Miriagou V, Carattoli A, Fanning S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect Rev*. 2006;8:1923-30.
- Llanes C, Kirchgessner V, Plesiat P. Propagation of TEM- and PSE-type beta-lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:2430-6.
- Guerra B, Soto S, Argüelles JM, Mendoza MC. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying class integrons in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1305-8.
- Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2977-81.
- Villa L, Carattoli A. Integron and transposons on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1194-7.
- Herrero A, Rodicio MR, González-Hevia MA, Mendoza MC. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence-resistance plasmid pUO-StVR2. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:39-45.
- Chu C, Chiu CH, Wu WY, Chu CH, Liu TP, Ou JT. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2299-303.
- Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104—a truly international multidrug-resistant clone. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46:7-10.
- Cloekaert A, Schwarz S. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Vet Res*. 2001;32:301-10.
- Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloekaert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect*. 2006;8:1915-22.
- Boyd D, Peters GA, Cloekaert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, et al. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol*. 2001;183:5725-32.
- Boyd D, Cloekaert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey MR. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1714-22.
- Carattoli A, Filetice E, Villa L, Dionisi AM, Ricci A, Luzzi I. Antibiotic resistance genes and *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2821-8.
- Guerra B, Junker E, Miko A, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization and location of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb Drug Resist*. 2004;10:83-91.
- Mulvey MR, Boyd DA. OXA-1 is OXA-30 is OXA-1. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:224-5.
- Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63:507-22.
- Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:7378-82.
- Herrero A, Rodicio MR, Echeita MA, Mendoza MC. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): a new multidrug resistant group endemic in Spain. *Int J Med Microbiol*. 2008;298:253-61.
- Bances M, Herrero A, González Y, Rodicio MR, González-Hevia MA. Brote de gastroenteritis en una guardería causado por una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium portadora del plásmido híbrido de resistencia-virulencia pUO-StVR2. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:376-81.

44. Del Cerro A, Soto SM, Mendoza MC. Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. *Food Microbiol.* 2003;20:431–8.
45. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol Infect.* 1990;105:21–7.
46. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microb Rev.* 2002;26:141–8.
47. Threlfall EJ, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M, et al. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Eurosurveillance.* 2003;8:41–4.
48. Davis MA, Hancock DD, Besser TE. Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: the importance of dissemination. *J Lab Clin Med.* 2002;140:135–41.
49. Gallardo F, Ruiz J, Soto SM, Jiménez de Anta MT, Vila J. Distintos mecanismos de resistencia asociados a integrones en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium*. *Revi Esp Quimioter.* 2003;16:398–402.
50. Pérez MO, Carulla M, Pérez M, Jardí-Baiges AM, Llovet-Lombarte MI, Tejedor-Ganduxé X, et al. Diseminación de integrones de clase I entre cepas de *Salmonella enterica* productoras de diferentes tipos de β -lactamasas aisladas en la región sanitaria de Tortosa. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(Supl 1):21.
51. Güerri ML, Aladueña A, Echeita A, Rotger R. Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella* serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. *Intl J Antimicrob Agents.* 2004;24:327–33.
52. Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, et al. Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:3053–8.
53. Carattoli A, Villa L, Pezzella C, Bordi E, Visca P. Expanding drug resistance through integron acquisition by IncFI plasmids of *Salmonella enterica* Typhimurium. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:444–7.
54. Weill FX, Guesnier F, Guibert V, Timinouni M, Demartin M, Polomack L. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993–2003). *J Clin Microbiol.* 2006;44:700–8.
55. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:429–34.
56. Lindstedt BA, Heir E, Nygård I, Kapperud G. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J Med Microbiol.* 2003;52:141–9.
57. Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA. Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3425.
58. Echeita MA, Herrera S, Usera MA. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2981–3.
59. Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, et al. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2074–8.
60. Chiu CH, Tang P, Chu C, Hu S, Bao Q, Yu J, et al. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acid Res.* 2005;33:1690–8.
61. Chu C, Hong S-F, Tsai C, Lin W-S, Liu T-P, Ou JT. Comparative physical and genetic maps of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, and Dublin. *Infect Immun.* 1999;67:2611–4.