

M<sup>a</sup> José González-Abad  
Mercedes Alonso-Sanz

# *Salmonella enterica* con fenotipo no clásico de resistencia a quinolonas en pacientes pediátricos

Sección de Microbiología, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid

---

## RESUMEN

**Introducción.** Una sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas en *Salmonella* spp. puede asociar fracaso terapéutico. El empleo de ciprofloxacino en infecciones extraintestinales e intestinales graves por *Salmonella* spp. es controvertido en niños y, consecuentemente, la repercusión clínica de estos aislados es poco significativa. Por tanto, se desconoce el estado real de la resistencia a quinolonas en la población pediátrica atendida. El objetivo del estudio fue evaluar la incidencia del fenotipo no clásico de resistencia a quinolonas en pacientes pediátricos.

**Material y métodos.** En el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid, se estudió la sensibilidad a ácido nalidíxico y ciprofloxacino por microdilución de 268 *Salmonella* spp. (2009-2013). Además, 146 cepas (2011-2013) fueron estudiadas frente a ciprofloxacino por E-test. Sensibilidad disminuida a ciprofloxacino fue definida como una CMI de 0,125-1 mg/L.

**Resultados.** De 42 aislados con sensibilidad disminuida a ciprofloxacino, 4 mostraron un fenotipo no clásico de resistencia a quinolonas. Tres aislados eran portadores de genes *qnr* que determinan resistencia a quinolonas mediada por plásmidos.

**Conclusiones.** El porcentaje de cepas con un genotipo que confiere un fenotipo no clásico de resistencia a quinolonas es bajo en nuestra serie. Su identificación es difícil empleando métodos convencionales pero su capacidad de diseminación recomienda una correcta identificación. Considerando la baja tasa de aislamiento de estas cepas en este estudio, la evaluación de la CMI de ciprofloxacino en todo aislado sensible a ácido nalidíxico podría no ser coste-efectiva. Alternativamente, proponemos un seguimiento periódico para detectar cualquier cambio de tendencia.

**PALABRAS CLAVE:** resistencia a quinolonas; *Salmonella* spp.; puntos de corte ciprofloxacino; genes *qnr*; niños

---

Correspondencia:  
M<sup>a</sup> José González-Abad  
Hospital Infantil Universitario Niño Jesús  
Avda. Menéndez Pelayo, 65  
28009 Madrid  
Tfno.: 915035900  
E-mail: mjglezabad@yahoo.es

## *Salmonella enterica* with nonclassical quinolone resistance phenotype in pediatric patients

### ABSTRACT

**Introduction.** Decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Salmonella* spp. may lead to treatment failures. The use of ciprofloxacin for extraintestinal and serious intestinal *Salmonella* infections in children is controversial and therefore the clinical relevance of these strains is not significant. Consequently little is known about the quinolone resistance of strains *Salmonella* of our paediatric population. The objective of this study was to assess the incidence of nonclassical quinolone resistance phenotype in paediatric patients.

**Material and methods.** Two hundred and sixty eight *Salmonella* spp. from Hospital Infantil Universitario Niño Jesús of Madrid (2009-2013) were tested against nalidixic acid and ciprofloxacin by microdilution. Moreover, 146 strains (2011-2013) were tested against ciprofloxacin by E-test. Reduced ciprofloxacin susceptibility was defined as a MIC of 0.125-1 mg/L.

**Results.** Of 42 isolates with reduced ciprofloxacin susceptibility, four isolates showing nonclassical quinolone resistance phenotype. Three were confirmed as carrying of plasmid-mediated quinolone resistance-conferring genes *qnr*.

**Conclusions.** The percentage of strains with a genotype that confers a nonclassical quinolone resistance phenotype is low in our series. The identification of these isolates is difficult using conventional methods, but its ability of horizontal spread recommends an appropriate identification. Taking into account the low isolation rate of these strains in this study, evaluation of ciprofloxacin MIC on every nalidixic acid susceptible strain would not be cost effective. Alternatively, we propose to evaluate periodically any changing trend.

**KEYWORDS:** quinolone resistance; *Salmonella* spp.; ciprofloxacin breakpoints; *qnr* genes; children

## INTRODUCCIÓN

Entre aislados de *Salmonella* spp. con un fenotipo de resistencia a quinolonas clásico, caracterizado por sensibilidad disminuida a ciprofloxacino (CMI 0,125-1 mg/L) y resistencia a ácido nalidíxico, está documentada una respuesta clínica reducida a fluoroquinolonas, fracasos del tratamiento y elevada mortalidad, incluso con un régimen terapéutico adecuado<sup>1,2</sup>. Hakanen et al.<sup>3</sup>, comunican en 2005 la aparición de un nuevo patrón de resistencia a quinolonas en cepas de *Salmonella enterica* que, siendo sensibles a ácido nalidíxico, mostraban una sensibilidad disminuida a ciprofloxacino. Se trata de una resistencia mediada por plásmidos (PMQR) con implicación de los genes *qnr*, *aac(6')*-*lb-cr* y *qepA*. Se desconoce el impacto clínico de estas cepas en el tratamiento de la salmonelosis con fluoroquinolonas si bien es probable que sea el factor determinante de la respuesta clínica a la terapia. Este fenotipo no convencional requiere la administración de mayores concentraciones de fluoroquinolonas para prevenir la selección *in vivo* de mutaciones adicionales que resulten en una resistencia de alto nivel, por lo que su detección es una cuestión relevante<sup>4</sup>. En población pediátrica, y a pesar de lo comentado, la repercusión clínica de ambos fenotipos es poco significativa ya que, de requerirse terapia antibiótica en el paciente inmunodeprimido o en el manejo de infección invasora por *Salmonella* spp., el empleo de ciprofloxacino es controvertido no recomendándose, de existir otra alternativa, su administración en menores de 18 años. En consecuencia se desconoce el estado real de la resistencia a quinolonas de aislados de *Salmonella* spp. procedentes de la población pediátrica atendida en nuestro centro, siendo éste el objetivo del presente trabajo.

## MÉTODOS

En el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid, se estudiaron 280 episodios de gastroenteritis aguda (GEA) por *Salmonella* spp. en el periodo 2009-2013, correspondientes a 268 pacientes. El cultivo y la identificación de las cepas se realizaron mediante medios y pruebas habituales. El estudio de sensibilidad a ácido nalidíxico y ciprofloxacino se determinó mediante microdilución (Vitek® 2 Compact, bioMérieux, Inc.; Durham, North Carolina, USA), según criterios del CLSI. En una segunda parte del estudio, se recuperaron los aislados correspondientes al periodo 2011-2013 con la finalidad de estudiar su sensibilidad a ciprofloxacino mediante E-test (E test MIC Evaluator™, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hants, England) aplicando, de acuerdo con publicaciones previas, un valor de CMI de 0,125-1 mg/L como definición de sensibilidad disminuida a ciprofloxacino<sup>5-7</sup>. Se consideró sólo el primer episodio de GEA por *Salmonella* spp. de cada paciente en cada periodo de estudio.

## RESULTADOS

Considerando solo el primer episodio de GEA por *Salmonella* spp. de cada paciente en el periodo referido, el 23% (61

de los aislados presentaron resistencia a ácido nalidíxico. No se detectó resistencia a ciprofloxacino mediante microdilución. Se recuperaron 146 aislados (uno por paciente) correspondientes al periodo 2011-2013 para estudiar su sensibilidad a ciprofloxacino mediante E-test con el fin de discriminar valores pequeños de CMI y aplicar como punto de corte de sensibilidad disminuida a ciprofloxacino una CMI >0,125-1 mg/L (tabla 1). De todos los aislados estudiados, 4 de los que mostraron sensibilidad disminuida a ciprofloxacino (CMI 0,125-1mg/L) fueron también sensibles a ácido nalidíxico. La caracterización genotípica de estos aislados reveló que 3 eran portadores del gen *qnrS1* (Instituto de Salud Carlos III). Respecto al cuarto aislado, el límite de sensibilidad a fluoroquinolonas se hallaba en el valor indicativo de un mecanismo de resistencia plasmídico, si bien la PCR para la detección de los genes implicados resultó negativa. Los aislados fueron identificados como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* I. De los 3 aislados portadores del gen *qnrS1*, uno de ellos correspondió al serotipo Typhimurium y los dos restantes al serotipo Stanley. El aislado sin detección de un mecanismo de resistencia plasmídico correspondió al serotipo Typhimurium.

Tabla 1

Sensibilidad antibiótica de aislados de *Salmonella* spp. (2011-2013) a ácido nalidíxico (microdilución) y ciprofloxacino (E-test).

CMI ácido nalidíxico $\geq 32$ mg/L <sup>a</sup>		CMI ácido nalidíxico $\leq 16$ mg/L <sup>a</sup>	
(38)		(108)	
CMI ciprofloxacino	CMI ciprofloxacino	CMI ciprofloxacino	CMI ciprofloxacino
$\leq 0,06$ mg/L	0,125-1 mg/L	$\leq 0,06$ mg/L	0,125-1 mg/L
0	38	104	4

<sup>a</sup>Resistente: CMI  $\geq 32$  mg/L, sensible: CMI  $\leq 16$  mg/L

## DISCUSIÓN

En la población pediátrica atendida en nuestro centro, se constata un porcentaje elevado de resistencia a ácido nalidíxico que predeciría *in vivo* una sensibilidad disminuida a ciprofloxacino, desaconsejándose esta fluoroquinolona si fuese necesaria una elección terapéutica. El hecho de no hallar *in vitro* una sensibilidad disminuida a ciprofloxacino mediante microdilución en dichas cepas no descarta que tal vez esta circunstancia esté subestimada dado que se aplica como punto de corte el publicado por el CLSI (sensible  $\leq 1$  mg/L, resistente  $\geq 4$  mg/L) a pesar de que la evidencia clínica, microbiológica y la acumulada de estudios farmacocinéticos-farmacodinámicos sugieren un punto de corte de resistencia a ciprofloxacino para *Salmonella* spp.  $\geq 0,125$  mg/L. Por este motivo ciertos autores invitan a una reevaluación del mismo con objeto de que refleje el riesgo de fallos en el tratamiento de *Salmonella* spp. con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas<sup>5-7</sup>. Esta decisión es difícil ya que algunos pacientes con estos aislados podrían potencialmente responder de forma adecuada a dosis mayores o cursos prolongados de fluoroquinolonas. Como alternativa

a esta disyuntiva se propuso y validó un test de *screening* de cepas resistentes a ácido nalidíxico, recomendado desde 2004 por el CLSI, fundamentado en el hecho de que las cepas con sensibilidad disminuida a ciproflaxacino eran uniformemente resistentes a ácido nalidíxico<sup>8</sup>. En el presente estudio, cuando a los aislados resistentes a ácido nalidíxico se les aplicó como punto de corte de resistencia a ciproflaxacino una CMI  $\geq 0,125$  mg/L, todos ellos presentaron sensibilidad disminuida a ciproflaxacino confirmándose, por un lado, la validez del test de *screening* para detectar el fenotipo clásico de resistencia a quinolonas y, por otro, que este fenotipo es el mayoritario entre nuestras cepas lo cual es un reflejo de su prevalencia actualmente en el mundo. No obstante, desde que Hakanen et al.<sup>3</sup> comunicasen en 2005 la aparición de un patrón de resistencia no convencional en cepas de *S. enterica* de viajeros procedentes del Sudeste asiático, la detección de este nuevo fenotipo (sensibilidad disminuida a ciproflaxacino y sensibilidad a ácido nalidíxico), se ha incrementado sensiblemente. Este fenotipo de resistencia no clásico parecía en su momento confinado a dicha región geográfica pero el incremento detectado poco tiempo después recomendaba ya entonces un estrecho control para evitar su diseminación. La mediación por plásmidos de este fenotipo no convencional fundamenta su capacidad de diseminación más no sólo ésta es altamente eficaz sino que, además, se ha detectado la coexistencia de determinantes PMQR con  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en el mismo plásmido de modo que la presión selectiva por fluoroquinolonas podría conducir a la aparición y expansión de cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes<sup>9,10</sup>. Por otra parte, la emergencia de dicho fenotipo no convencional pone en entredicho el valor del test de *screening* comentado, pues no todas las cepas con sensibilidad disminuida a ciproflaxacino son unánimemente resistentes a ácido nalidíxico. Es, por consiguiente, un fenotipo difícil de detectar utilizando una metodología convencional. En la serie estudiada, la incidencia de este fenotipo es escasamente relevante más es necesario conocer esta circunstancia y caracterizar microbiológicamente nuestros aislados, especialmente cuando desde un punto de vista clínico, pudiera parecer una cuestión poco relevante al estar desaconsejado el uso de quinolonas en el paciente pediátrico. Por otra parte, este conocimiento precisa de una búsqueda activa aplicando un valor de CMI para su detección (0,125-1 mg/L) que integre los principios farmacocinéticos/farmacodinámicos del antibiótico, tal y como recomiendan numerosos autores. Finalmente consideramos que una vez conocida la baja tasa de aislamientos de *Salmonella* spp. con un fenotipo no clásico de resistencia a quinolonas en la población pediátrica estudiada, la determinación de la CMI de ciproflaxacino en cepas sensibles a ácido nalidíxico no sería eficiente si bien debiera realizarse periódicamente con la finalidad de detectar cualquier cambio de tendencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Mølbak K. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:490-5.
2. Slinger R, Desjardins M, McCarthy AE, Ramotar K, Jessamine P, Guibord C, et al. Suboptimal clinical response to ciprofloxacin in patients with enteric fever due to *Salmonella* spp. with reduced fluoroquinolone susceptibility: a case series. *BMC Infect Dis* 2004; 4:36-9.
3. Hakanen AJ, Lindgren M, Huovinen P, Jalava J, Siitonen A, Kotilainen P. New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enterica*: nalidixic acid-susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5775-8.
4. de Toro M, Rojo-Bezares B, Vinué L, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y. In vivo selection of aac(6)-Ib-cr and mutations in the gyrA gene in a clinical qnrS1-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1945-9.
5. Aarestrup FM, Wiuff C, Mølbak K, Threlfall EJ. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.?. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:827-9.
6. Crump JA, Barrett TJ, Nelson JT, Angulo FJ. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype Typhi and for Non-Typhi salmonellae. *Clin Infect Dis* 2003; 37:75-81.
7. Accou-Demartin M, Gaborieau V, Song Y, Roumagnac P, Marchou B, Achtman M, et al. *Salmonella enterica* serotype Typhi with non-classical quinolone resistance phenotype. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1091-4.
8. Hakanen AJ, 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; 37:3572-7.
9. Gunell M, Webber MA, Kotilainen P, Lilly AJ, Caddick JM, Jalava J, et al. Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3832-6.
10. González F, Araque M. Association of transferable quinolone resistance determinant *qnrB19* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Salmonella* Give and *Salmonella* Heidelberg in Venezuela. *Int J Microbiol* 2013; 2013:628185.