

Dispersión intercontinental de una cepa de *Shigella flexneri* resistente a trimetoprima

Margarita M. Navia, Joaquim Ruiz y Jordi Vila

Servicio de Microbiología. Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia. IDIBAPS. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Hospital Clínic. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN. Caracterizar una cepa de *Shigella flexneri* resistente a trimetoprima, aislada de las heces de un viajero a su retorno de Kenia, y analizar su relación epidemiológica con un conjunto de cepas de similares características aisladas en Tanzania.

MÉTODOS. Las relaciones clonales se estudiaron mediante análisis del perfil plasmídico, secuencias extragénicas palindrómicas repetidas-reacción en cadena de la polimerasa (REP-PCR) y electroforesis en geles de campos pulsantes (PFGE). Se estudió la presencia de integrones tipo 1 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación. Mediante técnicas de conjugación y PCR se analizó la localización y transferabilidad del integrón detectado.

RESULTADOS. Los estudios epidemiológicos mostraron que el total de seis cepas estudiadas pertenecían a un mismo clon. Asimismo, todas ellas poseían el mismo gen codificante para resistencia a trimetoprima (*dfrA7*), el cual estaba localizado en un integrón situado a nivel cromosómico.

CONCLUSIONES. Es preciso mantener una vigilancia epidemiológica para controlar la difusión de microorganismos patógenos, o de genes de resistencia, entre áreas geográficas distantes.

Palabras clave: Trimetoprima. Resistencia. *dfrA7*. Viajeros. Diseminación clonal.

Intercontinental spread of a trimethoprim-resistant strain of *Shigella flexneri*

INTRODUCTION. In this study we characterize a trimethoprim-resistant strain of *Shigella flexneri* recovered from stool samples of an international traveler after a trip to Kenya, and analyze its epidemiological relationship with a set of strains having similar characteristics from Tanzania.

METHODS. Clonal relationships were studied by three techniques - plasmid profile, repetitive-element (REP)-PCR and pulse-field gel electrophoresis (PFGE). The presence of type 1 integrons was studied by PCR and sequencing. The location and transferability of the detected integron was analyzed by conjugation and PCR.

RESULTS. The epidemiological studies showed that all six strains studied belonged to the same clone. Furthermore, all of them carried the same gene encoding for trimethoprim resistance (*dfrA7*), which was located in an integron within a chromosome.

CONCLUSION. Continuous epidemiological surveillance is required to control the spread of pathogenic microorganisms and the dissemination of resistance-encoding genes among geographical areas.

Key words: Trimethoprim. Resistance. *dfrA7*. Travelers. Clonal spread.

Introducción

Se calcula que alrededor de 3 millones de seres humanos, niños en su mayoría, mueren anualmente durante el curso de afecciones diarreicas¹. Así, una de cada 4 muertes de niños menores de 5 años acontecida en países en vías de desarrollo se debe a un proceso diarreico^{1,2}. Un tercio de estas muertes se deben a infecciones causadas por *Shigella* spp.³.

Esta situación sociosanitaria repercute, asimismo, en los viajeros provenientes de países desarrollados. Se calcula que aproximadamente entre el 20 y el 60% de los viajeros a estas áreas, durante o después del viaje, sufren procesos diarreicos, la denominada diarrea del viajero⁴. Si se tiene en cuenta que, en la actualidad, el conjunto de estos países son uno de los principales destinos turísticos a nivel mundial, recibiendo millones de turistas cada año, la importancia de esta enfermedad queda fuera de toda duda.

El tratamiento de elección para las infecciones asociadas a *Shigella* spp. ha sido, durante largo tiempo, el cotrimoxazol. No obstante, el amplio uso de la combinación de trimetoprima con sulfonamidas, uso que incluye, además de la terapéutica humana, aplicaciones veterinarias, ha facilitado la aparición de aislamientos de *Shigella* spp. resistentes al cotrimoxazol⁵⁻⁸.

En la actualidad, se conocen diferentes mecanismos capaces de conferir resistencia a trimetoprima, siendo el más difundido la presencia de dihidrofolato reductasas (DHFR) resistentes a trimetoprima⁹. Así, hasta la actualidad, se han descrito más de 20 enzimas diferentes^{9,10}. La mayoría de ellas se haya codificada en genes que se localizan en integrones^{7,10}, con un mayor o menor grado de diseminación. Entre estas últimas, se halla la DHFRVII. La primera cita de esta enzima es del año 1989, año en el que se describió en un plásmido aislado en cepas de *Escherichia coli* causantes de un brote de diarrea porcina¹¹. En años subsiguientes, se describió

Correspondencia: Dr. J. Vila.
Servicio de Microbiología. Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia.
Hospital Clínic.
Villarreal, 170. 08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: vila@medicina.ub.es

Manuscrito recibido el 19-07-2002; aceptado el 23-12-2002.

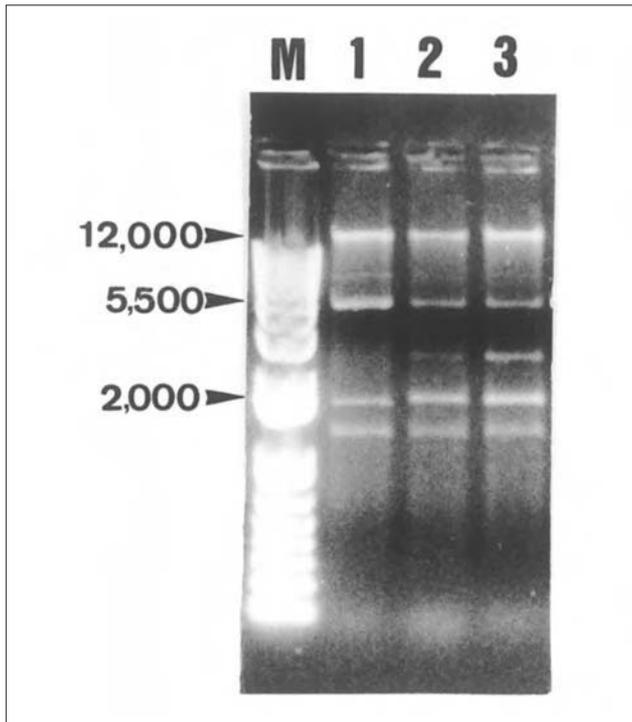


Figura 1. Perfil plasmídico de las cepas. 1, Cepa de *S. flexneri* procedente del viajero a Kenia. 2 y 3, Cepas de *S. flexneri* aisladas de niños tanzanos. M: marcador de pesos.

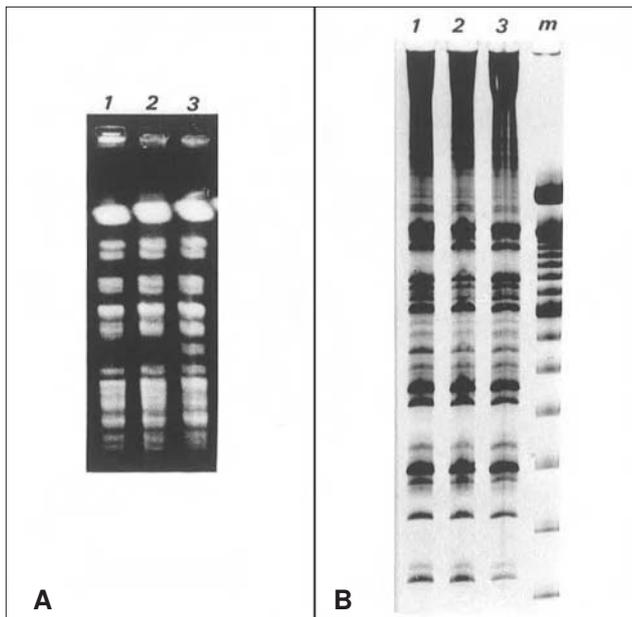


Figura 2. Técnicas de epidemiología molecular:
 A) Electroforesis en campo pulsante: 1 y 2, cepas de *S. flexneri* aisladas de niños tanzanos, 3 cepa de *S. flexneri* aislada de las heces del viajero a Kenia.
 B) REP-PCR: 1 y 2, cepas de *S. flexneri* aisladas de niños tanzanos; 3, cepa de *S. flexneri* aislada de las heces del viajero a Kenia. M: marcador de pesos (100 bp ladder; GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA).

en cepas de *E. coli* provenientes de Suecia, Sri Lanka, Finlandia, Nigeria o Sudáfrica, así como en otros microorganismos como *Salmonella typhi* de la India¹²⁻¹⁴.

Más recientemente se ha descrito esta enzima en un clon de *S. flexneri* aislado de heces de niños con diarrea en Tanzania⁷. En este trabajo se analiza la dispersión de dicho clon entre Kenia y Tanzania, así como su introducción en Europa, a través de viajeros internacionales.

Métodos

En un trabajo previo desarrollado en 1997 sobre epidemiología y niveles de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Shigella* spp. causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tanzania, se comunicó la presencia de cinco cepas de *S. flexneri* que poseían un integrón que contenía el gen *dfrA7*⁷. Posteriormente, en 1999, se aisló una cepa de *S. flexneri* de las heces de un viajero procedente de Kenia (previamente se verificó que únicamente se hubiese desplazado a este país).

El patrón de sensibilidad antibiótica se obtuvo mediante tiras de E-test (AB Biodisk, Sölna, Suecia) en placas de Mueller-Hinton, siguiendo las instrucciones del fabricante. En concreto se analizó la sensibilidad a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacino y cotrimoxazol.

La relación epidemiológica entre las cepas se determinó mediante tres técnicas diferentes: (REP-PCR), digestión con enzimas de baja frecuencia de corte y posterior electroforesis en geles de campos pulsantes (PFGE) y análisis plasmídico. La REP-PCR y el PFGE se realizaron siguiendo metodologías descritas previamente⁷, mientras que los plásmidos se extrajeron de cultivos bacterianos usando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, EEUU), que posteriormente fue visualizado en geles de agarosa al 0,7% tras ser teñidos con bromuro de etidio.

El estudio de la presencia y contenido de integrones se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación según la metodología previamente descrita⁷. Para determinar la posible transferencia mediante conjugación de la resistencia a trimetoprima se realizaron conjugaciones, tanto en medio líquido como en medio sólido sobre filtro, usando como bacteria receptora la cepa J53 de *E. coli* (F⁻, pro, Tm^S, Amp^S, Rif^R, Lac⁺), gentilmente cedida por el Dr. Gómez-Lus (Universidad de Zaragoza). En total se efectuaron tres ensayos por cepa y método.

La ubicación del gen *dfrA7* en plásmido o cromosoma se determinó mediante PCR con cebadores específicos, tanto para la *dfrA7* como para integrones⁷ sobre ambos productos previamente purificados. Como control, para detectar la presencia de ADN cromosómico, se utilizaron cebadores específicos para *gvrA*¹⁵.

Resultados

Tanto las cepas aisladas en Tanzania, como aquella proveniente de Kenia, presentaban un patrón de resistencia a ampicilina, cotrimoxazol, cloranfenicol y tetraciclina, siendo sensibles al ciprofloxacino (concentración inhibitoria mínima [CIM] de 0,006 µg/ml) y al ácido nalidíxico (CIM de 1,5 µg/ml).

Las tres técnicas epidemiológicas utilizadas mostraron la existencia de relaciones clonales entre las cepas de Tanzania y la procedente de Kenia (figs. 1 y 2). En la cepa originaria de Kenia se encontraron 5 plásmidos (> 12 kb, 7,5 kb, 5 kb, 2 kb, 1,5 kb), que con excepción de aquel de 7,5kb también se encontraron en las cepas de Tanzania (fig. 1).

Al utilizar los cebadores para amplificar integrones de tipo 1 se detectó, en todos los casos, una banda de aproximadamente 750 pb, que al ser secuenciada mostró

la presencia de un único gen (*dfrA7*) y una homología del 100% con la secuencia presente en el banco de genes.

Para localizar la ubicación de este integrón, se efectuaron estudios de conjugación y de PCR. Los estudios de conjugación mostraron que el gen no era transferible. Por su lado, los estudios de PCR mostraron la presencia en el cromosoma del integrón de 750 pb, así como más específicamente del gen *dfrA7*; los intentos de amplificación a partir de ADN plasmídico fueron negativos.

Discusión

En este estudio se demuestra la diseminación clonal de una cepa de *S. flexneri* multirresistente entre Tanzania y Kenia, así como su llegada a Europa en un viajero con diarrea del viajero.

La localización en un integrón del gen *dfrA7* es algo que ya había sido previamente descrito^{7,10}, aún cuando las únicas cepas de *Shigella* spp. en las que ha sido hallado hasta la fecha son las presentes en este estudio. Asimismo, se ha descrito con frecuencia en diferentes microorganismos en zonas relativamente próximas a Kenia y Tanzania, como sería el caso de Sudáfrica¹². Este hecho, junto con la escasa información a nivel microbiológico y molecular, de los microorganismos presentes en esta zona geográfica, y la amplia movilidad de buena parte de la población que la habita, hacen presuponer una posible amplia diseminación de este gen en la zona.

Es interesante notar que en todas las cepas incluidas en este estudio, el gen *dfrA7* estaba codificado a nivel cromosómico, hecho frecuente, a tenor de las observaciones de Adrian¹². En un estudio realizado por su grupo, se detalla que entre todos los genes que codifican para DHFR hallados en cepas comensales de *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp., aisladas de heces de voluntarios sanos en Sudáfrica, es el gen *dfrA7* el que con más frecuencia se hallaba codificado en el cromosoma, no siendo transferible por conjugación en 62 de 67 cepas (92,54%) que lo presentaban. Estos resultados contrastaban con lo que se encontraba para el resto de genes *dfr* incluidos en este estudio. La segunda DHFR, que presentaba peores niveles de transferencia por conjugación, fue la DHFR Ia, conjugando en 11 de las 52 cepas (21,15%) que la presentaban. Este dato pone de manifiesto las dificultades que presenta este gen para propagarse de manera horizontal. No obstante, en este estudio de Adrian et al¹² no se analizaron las relaciones epidemiológicas presentes entre las cepas, por lo que quedó sin establecer si las cepas que presentaban una codificación cromosómica del gen *dfrA7* pertenecían a un mismo clon o a varios. En nuestro estudio se constata, mediante tres técnicas diferentes, la estrecha relación epidemiológica existente entre las cepas incluidas en el mismo, demostrando que poseen un mismo origen clonal. Se ha de tener en cuenta que numerosos integrones se hallan en un transposón, lo que permitiría explicar su localización tanto plasmídica como cromosómica. Otra posibilidad teórica que debe tenerse en cuenta sería la posible integración, total o parcial, en el cromosoma, de un plásmido portador del citado gen.

El hecho de que una cepa bacteriana se disemine lentamente entre zonas limítrofes, como sería el caso de Kenia y Tanzania, debido a lo que se podría dar en llamar movimientos naturales de sus huéspedes, o por simples medios mecánicos, como pueden ser corrientes de agua, es algo connatural a todo ser vivo. No obstante, el que una cepa bacteriana específica pueda desplazarse miles de kilómetros en cuestión de horas, es algo que hasta la aparición de los actuales medios de transporte no podía tener lugar. Esto pone de manifiesto la necesidad de iniciar estudios epidemiológicos para controlar, en la medida de lo posible, la difusión de microorganismos, o genes de resistencia, entre diferentes y lejanas áreas geográficas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a una subvención del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS00/0997) y a una beca de la SEIMC.

Bibliografía

- Murray CJL, López AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study. *Lancet* 1997;349:1269-76.
- Sack RB, Rahman M, Yunus M, Khan EH. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal diseases. *Clin Infect Dis* 1997;24(Suppl 1): S102-5.
- Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of Shigella infections: Implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 1999;77:651-6.
- Gascón J, Vila J, Valls ME, Ruiz L, Vidal J, Corachan M, et al. Etiology of traveller's diarrhea in Spanish travellers to developing countries. *Eur J Epidemiol* 1993;9:217-23.
- Heikkilä E, Siitonen A, Jähkölä M, Fling M, Sundström L, Huovinen P. Increase of trimethoprim resistance among *Shigella* species, 1975-1988: Analysis of resistance mechanisms. *J Infect Dis* 1990;161:1242-8.
- Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Skold O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:279-89.
- Navia MM, Capitano L, Ruiz J, Vargas M, Urassa H, Schelleberg D, et al. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. Isolated from faeces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J Clin Microbiol* 1999;37:3113-7.
- Vila J, Gascón J, Abdalla S, Gómez J, Marco F, Moreno A, et al. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates causing traveler's diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2668-70.
- Thomson CJ. Trimethoprim and brodimoprim resistance of gram positive and gram negative bacteria. *J Chemother* 1993;5:458-64.
- White PA, Rawlinson WD. Current status of the *aadA* and *dfr* gene cassette families. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:495-6.
- Amyes SGB, Towner KJ, Carter GL, Thomson CJ, Young HK. The type VII dihydrofolate reductase: A novel plasmid-encoded trimethoprim-resistant enzyme from Gram-negative bacteria isolated in Britain. *J Antimicrob Chemother* 1989;24:111-9.
- Adrian PV, Klugman KP, Amyes SGB. Prevalence of trimethoprim resistant dihydrofolate reductase genes identified with oligonucleotide probes in plasmids from isolates of commensal faecal flora. *Epidemiol Infect* 1995;35: 497-508.
- Shanahan PMA, Jesudason MV, Thomson CJ, Amyes SGB. Molecular analysis of and identification of antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Salmonella typhi* from India. *J Clin Microbiol* 1998;36:1595-600.
- Sundström L, Swedberg G, Skold O. Characterization of Transposon Tn5086, carrying the site-specifically inserted gene *dhfr*VII mediating trimethoprim resistance. *J Bacteriol* 1993;175:1796-805.
- Vila J, Ruiz J, Marco F, Barceló A, Goñi P, Giralte E, et al. Association between double mutation in *gyrA* of ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2477-9.