

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Caracterización de *Shigella sonnei* portadora de CTX-M-15 en un paciente español sin antecedentes de viaje al extranjero

Cristina Seral^{a,b,*}, Beatriz Rojo-Bezares^c, Ana Garrido^a, María José Gude^a, Yolanda Sáenz^c y F. Javier Castillo^{a,b}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

^b Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

^c Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 12 de septiembre de 2011

Aceptado el 2 de noviembre de 2011

On-line el 13 de enero de 2012

Palabras clave:

Shigella sonnei

CTX-M-15

Plásmido Inc11

Integrón de clase 2

R E S U M E N

De las 107 *Shigella* spp. aisladas entre 2000-2010, en una cepa de *Shigella sonnei* se detectaron los genes codificantes de TEM-1 y CTX-M-15, identificándose la estructura $ISEcp1 + bla_{CTX-M-15} + orf477$. La cepa portaba un integrón de clase 2 con los genes cassettes $dfrA1 + sat + aadA1$. Se detectó un plásmido del grupo Inc11 ST31 (CC-31) demostrando su transferencia por conjugación. Describimos la primera cepa de *S. sonnei* en nuestra comunidad productora de CTX-M-15 perteneciente a un paciente español que no había viajado al extranjero.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Characterisation of a CTX-M-15-producing *Shigella sonnei* in a Spanish patient who had not travelled abroad

A B S T R A C T

One hundred and seven *Shigella* spp. strains were isolated in our laboratory during the years 2000 to 2010. One *Shigella sonnei* harboured the genes that coded the β -lactamases TEM-1 and CTX-M-15, identifying the structure, $ISEcp1 + bla_{CTX-M-15} + orf477$, in their genetic environment. The strain also carried a class 2 integron with the gene cassettes $dfrA1 + sat + aadA1$. A plasmid group Inc11 ST31 (CC-31) was detected and its mobilization by conjugation was demonstrated. We describe for the first time a *S. sonnei* strain producing a CTX-M-15 β -lactamase recovered from a Spanish patient who had not travelled abroad.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La shigelosis es una infección intestinal aguda de presentación esporádica y/o epidémica y de distribución mundial, si bien la prevalencia de las diferentes especies (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*) varía geográficamente, en relación con el grado de desarrollo socioeconómico. En España predomina *S. sonnei*¹. La infección por aislados de esta especie resistentes a cefalosporinas de tercera generación y productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es inusual en nuestro país. Presentamos la

distribución de las infecciones producidas por *Shigella* spp. durante los últimos 10 años y las características de una cepa de *S. sonnei* portadora del gen que codifica para una BLEE identificada en nuestro medio.

Métodos

Se procesaron 75.892 coprocultivos en el período 2000-2010. La identificación y el estudio de sensibilidad a 22 antibióticos se realizaron mediante el sistema WIDER (Soria-Melguizo, España). Se confirmó la presencia de BLEE en una cepa mediante test de sinergia y E-test (CT/CTL, CZ/CZL, PM/PML [bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia]). La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a las recomendaciones del CLSI². Los genes implicados

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cseral@unizar.es (C. Seral).

en la resistencia a β -lactámicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}), así como sus entornos genéticos se estudiaron mediante PCR y secuenciación³. Mediante PCR⁴ se determinó la presencia de los genes de resistencia a tetraciclina (*tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D) y *tet*(E)), a sulfamidas (*sul1*, *sul2* y *sul3*) y a estreptomicina (*aadA*, *strA* y *strB*). La detección de integrones de clase 1 y 2 se analizó por PCR y posterior secuenciación⁴. El tipado de plásmidos se realizó mediante la asignación del grupo de incompatibilidad por el método PCR-based replicon typing (PBRT). Se designó la secuencia tipo del grupo de incompatibilidad I1 (IncI1) mediante multilocus sequence typing (pMLST) (<http://pubmlst.org/plasmid/>)^{5,6}. Los experimentos de conjugación se realizaron utilizando como cepa receptora *E. coli* CSH26 y los transconjugantes (TCs) se seleccionaron en placas de cefotaxima (CTX) (5 mg/L) y rifampicina (RIF) (100 mg/L). Los TCs se confirmaron mediante REP-PCR usando los siguientes cebadores: REP-1 (5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3') y REP-2 (5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3').

Resultados y discusión

En el 10,8% de los coprocultivos procesados se aisló algún enteropatógeno bacteriano (tabla 1). Se identificaron 107 aislados de *Shigella* spp. (1,3% de los positivos). Las especies encontradas fueron: *S. sonnei* (63 aislados, 57,8%), *S. flexneri* (32, 29,3%) y *S. boydii* (12, 11%). Entre los porcentajes de resistencia detectados a distintos antibióticos destacan: cotrimoxazol (72,5%), ampicilina (35,8%), gentamicina (22,4%) y ciprofloxacino (2,7%). Todos los aislados fueron sensibles a fosfomicina. Un aislado de *S. sonnei* mostró resistencia a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima > 8 mg/L, ceftazidima > 16 mg/L) y de cuarta generación (cefepime > 8 mg/L) y, además, a tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas, cotrimoxazol y trimetoprim. En este aislado se detectaron los genes codificantes de TEM-1 y de una BLEE, CTX-M-15. Analizando el entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-15}, se identificó la estructura *ISEcp1* + *bla*_{CTX-M-15} + *orf477*. No se detectó la secuencia de inserción *IS26* truncando a *ISEcp1*. Además aguas arriba del gen *bla*_{CTX-M-15} se encontró la región W (48pb) y el promotor típico (-10 TACAAT) (-35 TTGAA) implicado en la transcripción de dicho gen *bla* (fig. 1). Este entorno del gen *bla*_{CTX-M-15} se ha descrito como el más frecuente⁷.

También se detectó el gen *tet*(A) de resistencia a tetraciclina y los genes *strA-strB* que formaban parte del entorno genético del gen *sul2* (fig. 1). El aislado portaba un integrón de clase 2 con la estructura genética característica del transposon Tn7 que contenía en su región variable los genes cassettes *dfrA1* + *sat* + *aadA1* (fig. 1); esta estructura genética de integrón de clase 2 es muy frecuente en la especie *S. sonnei* y se cree que son organizaciones altamente conservadas debido a que pueden estar localizadas en superestructuras genéticas móviles⁸. La técnica de PBRT reveló la presencia de un plásmido del grupo de incompatibilidad IncI1 que pertenecía a la secuencia tipo ST31 (CC-31). El fragmento obtenido

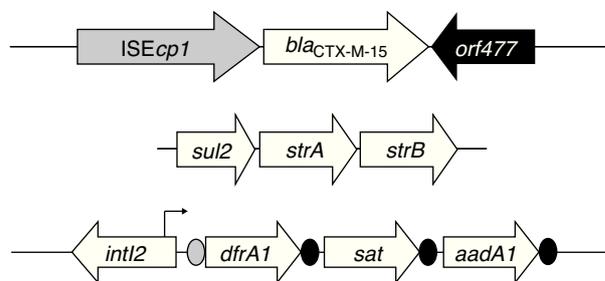


Figura 1. Estructuras genéticas asociadas a los genes *bla*_{CTX-M-15} y *sul2* y estructura del integrón de clase 2 de la cepa de *Shigella sonnei*.

por PCR de los genes *repI*, *sogS* y *ardA* analizados para designar el pMLST del IncI1 fue el esperado, pero curiosamente los genes *trbA* y *pndC* implicados en el mantenimiento y la transferencia del plásmido, estaban truncados por el gen *finQ*, por lo que se obtuvo un amplicón de 2305 pb, como también sucede en la secuencia del plásmido pPWDA.03 de *E. coli* (número de GenBank HQ114284)⁶. Únicamente se aisló un tipo de TC que era resistente a ampicilina y productor de BLEE y sensible a tetraciclina, estreptomicina, sulfamidas, cotrimoxazol y trimetoprim. El estudio genotípico del TC reveló que portaba los genes de las β -lactamasas CTX-M-15 y TEM-1 así como el plásmido IncI1. El integrón de clase 2, el gen *tet*(A) y el entorno del gen *sul2* no se detectaron en el TC.

Las β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido de clase A de Ambler son todavía infrecuentes en el género *Shigella*, aunque se han difundido ampliamente en otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Hasta la fecha, se han descrito 5 tipos de β -lactamasas de tipo CTX-M en *Shigella* spp.: CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-15 y CTX-M-64^{9,10} y diversas β -lactamasas tipo TEM. En Europa (República Checa), se ha descrito recientemente un aislamiento clínico de *S. sonnei* en un paciente que había viajado a Asia y que portaba el gen *bla*_{CTX-M-15} localizada en un plásmido IncFII¹¹. Por el contrario, en nuestro aislado de *S. sonnei* se detectó la presencia de un plásmido IncI1 que podría albergar el gen *bla*_{CTX-M-15} como se ha descrito previamente en cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* aisladas en Francia, Reino Unido, Pakistán y Honduras^{12,13}.

En pacientes con shigelosis, particularmente en los casos más graves, está indicado el tratamiento antibiótico porque puede ayudar a resolver la diarrea, mejorar la evolución clínica y disminuir el periodo de comunicabilidad. Los antimicrobianos de primera línea son ampicilina y cotrimoxazol, aunque no son infrecuentes las infecciones por aislados multirresistentes (ampicilina, cotrimoxazol y tetraciclinas y/o cloranfenicol), para los que pueden indicarse tratamientos alternativos, como fluoroquinolonas o cefalosporinas de tercera generación. En la actualidad se registran tasas elevadas de resistencia y/o sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas en pacientes que han viajado a la India¹⁴, lo que ha llevado

Tabla 1
Coprocultivos procesados durante los años 2001–2010 y enteropatógenos aislados en dichas muestras

Año	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
Coprocultivos	6.759	7.538	7.528	7.830	7.685	7.595	7.837	7.205	8.309	7.606	75.892
Positivos para enteropatógenos	1.000	1.009	995	925	858	788	550	758	707	570	8.160
<i>Salmonella enterica</i>	304	394	334	346	197	207	172	138	254	138	2.484
Enteritidis	181	233	216	195	97	81	57	28	27	18	1133
Typhimurium	68	107	66	89	58	68	59	67	170	87	839
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	64	54	36	25	27	24	19	27	30	30	336
<i>Campylobacter</i> spp.	424	368	420	389	440	404	296	365	286	284	3.676
<i>Shigella</i> spp.	3	10	13	5	21	13	14	12	11	5	107
<i>S. sonnei</i>	1	7	7	4	18	4	7	6	7	2	63
<i>S. flexneri</i>	2	3	6	1	3	6	5	4	1	1	32
<i>S. boydii</i>	-	-	-	-	-	3	2	2	3	2	12

a aconsejar el uso de ceftriaxona para el tratamiento empírico de la diarrea del viajero de esta procedencia¹⁴. Aunque la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *Shigella* es anecdótica en nuestro país, describimos la primera cepa de *S. sonnei* encontrada en nuestra comunidad portadora del gen *bla*_{CTX-M-15} y aislada de un paciente español que no había viajado fuera de España. Este hallazgo, en un paciente autóctono, del que hay descrito un precedente análogo en Francia¹⁰, confirma la importancia de continuar vigilando la transmisión de CTX-M-15, enzima ampliamente distribuida en otras enterobacterias, particularmente en *E. coli*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Castillo FJ, Carranza E, Clavel A, Rubio MC, Gómez-Lus R. Epidemiology of shigellosis and colicin typing of *Shigella sonnei*. A 14-year study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1991;9:530–6.
- Clinical and Laboratory Standards I. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty Informational Supplement CLSI document M100-S20. 2010.
- Vinué L, Lantero M, Sáenz Y, Somalo S, de Diego I, Pérez F, et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. *J Med Microbiol*. 2008;57 Pt 7:916–20.
- Vinué L, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Olarte I, Undabeitia E, Somalo S, et al. Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:492–6.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005;63:219–28.
- García-Fernández A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of Inc11 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:1229–33.
- Dhanji H, Patel R, Wall R, Doumith M, Patel B, Hope R, et al. Variation in the genetic environments of bla(CTX-M-15) in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1005–12.
- Chang CY, Lu PL, Lin CC, Lee TM, Tsai MY, Chang LL. Integron types, gene cassettes, antimicrobial resistance genes and plasmids of *Shigella sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. *J Med Microbiol*. 2011;60 Pt 2:197–204.
- Nagano Y, Nagano N, Wachino J, Ishikawa K, Arakawa Y. Novel chimeric beta-lactamase CTX-M-64, a hybrid of CTX-M-15-like and CTX-M-14 beta-lactamases, found in a *Shigella sonnei* strain resistant to various oxyimino-cephalosporins, including ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:69–74.
- Lartigue MF, Poirer L, Decousser JW, Nordmann P. Multidrug-resistant *Shigella sonnei* and *Salmonella enterica* Serotype typhimurium isolates producing CTX-M beta-lactamases as causes of community-acquired infection in France. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1069–70.
- Hrabák J, Empel J, Gniadkowski M, Halhuber Z, Rébl K, Urbásková P. CTX-M-15-producing *Shigella sonnei* strain from a Czech patient who traveled in Asia. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2147–8.
- Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3203–6.
- Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:67–71.
- Mensa L, Marco F, Vila J, Gascón J, Ruiz J. Quinolone resistance among *Shigella* spp isolated from travellers returning from India. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:279–81.