



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *SHIGELLA*  
*SONNEI* BIOTIPO *g* ASOCIADAS A INTEGRONES CLASE 2 EN  
AISLADOS CLÍNICOS EN MÉXICO**

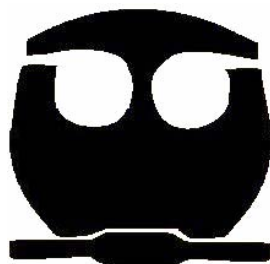
**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**DULCE PATRICIA LÓPEZ RIVAS**



**MÉXICO, D. F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Rosa María Ramírez Gama

**VOCAL:** Alejandro Camacho Cruz

**SECRETARIO:** Fernando Jesús Tuz Dzib

**1er SUPLENTE:** Norma Trejo Medina

**2o. SUPLENTE:** Luciano Hernández Gómez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

---

ASESOR DEL TEMA: QFB Fernando Jesús Tuz Dzib

---

SUPERVISOR TÉCNICO: QFB Aida Leticia Reyes González

---

SUSTENTANTE: Dulce Patricia López Rivas

*Un hombre no es otra cosa que lo que hace de sí mismo*  
*Jean Paul Sartre*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Q.F.B Fernando Tuz Dzib (Coordinador del Laboratorio de Bacteriología) por la oportunidad que me brindó para poder trabajar dentro del laboratorio a su cargo, por la disposición que tuvo para dirigir este trabajo, por la paciencia que me tuvo, por la confianza que depositó en mi, por la amistad y consejos que me brindó. GRACIAS por compartir conmigo su experiencia y conocimiento.*

*Al Dr. Guillermo Ruiz-Palacios (Jefe del Departamento de Infectología) por permitirme trabajar dentro del departamento a su cargo y hacerme sentir parte de un equipo. GRACIAS por el tiempo y experiencia que brindó en la revisión de éste trabajo.*

*A la Dra. Beatriz Ruiz-Palacios GRACIAS por brindarme parte de su tiempo y experiencia en la revisión de éste trabajo.*

*A la Dra. Luz Elena Cervantes (Coordinadora de los Laboratorios del Departamento de Infectología) GRACIAS por el tiempo que se tomó para la revisión de éste trabajo, por los comentarios que me hizo para mejorarlo y por la experiencia que compartió conmigo.*

*A la Q.F.B Leticia Reyes González (Asesora técnica) por compartir conmigo su experiencia, por la paciencia y confianza que me tuvo, por los consejos que me dio tanto en el ámbito profesional como personal, en fin, GRACIAS por todo, pero sobre todo por la amistad que me brindó.*

*A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bacteriología y Biología Molecular por que hicieron que mi estancia en el laboratorio fuera una experiencia inolvidable y muy enriquecedora, GRACIAS por que la participación de todos ustedes en éste trabajo fue de gran importancia, además la calidad humana de cada uno hizo posible que la interacción entre nosotros no sólo fuera a nivel profesional sino también a nivel personal. Fue un placer conocerlos y trabajar con todos ustedes.*

*A los miembros del jurado: Rosa María Ramírez Gama, Alejandro Camacho Cruz, Norma Trejo Medina y Luciano Hernández Gómez por brindarme parte de su tiempo para la revisión de éste trabajo.*

## DEDICATORIAS

*A mis padres quienes han sido un ejemplo inmejorable en mi vida, siempre los he admirado, son personas muy importantes para mí, GRACIAS por estar siempre conmigo y con mi hermana, por todas las grandes oportunidades que me han brindado, siempre las he valorado, verán que ninguno de sus esfuerzos y sacrificios han sido en vano y que todo eso tendrá resultados.*

*GRACIAS a que ustedes han sembrado en mí la curiosidad para ser diferente y mejor he podido llegar al cumplimiento de este objetivo. Quiero que sepan que los quiero mucho.*

*A mi hermana, que es una de las personas más importantes en mi vida y de la que he aprendido muchas cosas, siempre ha sido un ejemplo a seguir para mí, quiero que sepas que te quiero mucho, que he disfrutado mucho crecer a tu lado, que te admiro mucho, admiro tu inteligencia, tu entrega, tu nobleza, en fin... te admiro completa hermana.*

*A todos mis amigos, quienes han sido para mí personas muy importantes, cada uno de ustedes ha aportado algo valioso a mi vida, hicieron que me divirtiera y disfrutara cada una de las experiencias que he vivido hasta el momento como estudiante. GRACIAS por ser las personas que son.*

---



---

**Índice**

|  | <b>Pág.</b>         |
|--|---------------------|
|  | <b>CAPÍTULO I</b>   |
| <b>Resumen</b>   | 1                   |
|  | <b>CAPÍTULO II</b>  |
| <b>Objetivos</b>   | 2                   |
|  | <b>CAPÍTULO III</b> |
| <b>Antecedentes</b>  |                     |
| <b>3.1 Familia Enterobacteriaceae</b>                                    | 3                   |
| <b>3.2 Género <i>Shigella</i></b>  | 4                   |
| 3.2.1 Epidemiología  | 5                   |
| 3.2.2 Enfermedad   | 5                   |
| 3.2.3 Diagnóstico  | 6                   |
| 3.2.4 Tratamiento  | 6                   |
| <b>3.3 Resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos</b>              | 8                   |
| 3.3.1 Mecanismos de transferencia de genes de resistencia                | 9                   |
| 3.3.1.1 Transformación   | 9                   |
| 3.3.1.2 Transducción   | 9                   |
| 3.3.1.3 Conjugación  | 9                   |
| 3.3.2 Elementos involucrados en la transferencia de genes de resistencia | 10                  |
| 3.3.2.1 Plásmidos  | 10                  |
| 3.3.2.2 Transposones   | 10                  |
| 3.3.2.3 Cassettes genéticos  | 11                  |
| <b>3.4 Integrones</b>  | 11                  |
| 3.4.1 Estructura del integron  | 11                  |
| 3.4.2 Mecanismo de integración de los cassettes genéticos                | 12                  |
| 3.4.3 Clasificación de los integrones                                    | 13                  |
| 3.4.3.1 Integrones móviles   | 13                  |

---

|                                  | <b>Pág.</b> |
|----------------------------------|-------------|
| 3.4.3.1.1 Integrones clase 1     | 13          |
| 3.4.3.1.2 Integrones clase 2     | 14          |
| 3.4.3.1.3 Integrones clase 3     | 14          |
| 3.4.3.1.4 Integrones clase 4 y 5 | 14          |
| 3.4.3.2 Superintegrones          | 15          |

## **CAPÍTULO IV**

### ***Metodología Experimental***

|   |    |
|---|----|
| <b>4.1 Colección de especímenes y cepas bacterianas</b>                                   | 16 |
| <b>4.2 Pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos</b>                           | 16 |
| 4.2.1 Método de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco                      | 17 |
| 4.2.2 Método de CMI por el Sistema miniautorizado Vitek Jr. 60                            | 17 |
| <b>4.3 Biotipificación de <i>S. sonnei</i> por fermentación de ramnosa, xilosa y ONPG</b> | 18 |
| <b>4.4 Detección por PCR de la integrasa e integron clases 1 y 2</b>                      | 18 |
| 4.4.1 Extracción del ADN bacteriano   | 19 |
| 4.4.2 Detección de la integrasa e integron clase 1  | 19 |
| 4.4.3 Detección de la integrasa e integron clase 2  | 20 |

## **CAPÍTULO V**

### ***Resultados***

|   |    |
|---|----|
| <b>5.1 Cepas estudiadas</b>   | 22 |
| <b>5.2 Resistencia antimicrobiana de <i>S. sonnei</i></b>                                 | 22 |
| <b>5.3 Biotipificación de <i>S. sonnei</i> por fermentación de ramnosa, xilosa y ONPG</b> | 25 |
| <b>5.4 Detección de la integrasa e integron clase 1 y 2</b>                               | 25 |



**Pág.**

**CAPÍTULO VI**

***Discusión***

28

**CAPÍTULO VII**

***Conclusiones***

32

**CAPÍTULO VIII**

***Referencias***

33

## Resumen

**Introducción:** *Shigella* es el principal microorganismo causante de disentería bacilar en el mundo y responsable del 5 al 10% de las enfermedades diarreicas tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados. Estudios epidemiológicos recientes sobre *Shigella* han detectado la circulación de una clona de *Shigella sonnei*, definida como biotipo *g*, caracterizada por el fenotipo de resistencia a estreptomicina y trimetoprima y por la presencia de un integron clase 2 (*S. sonnei* *gMR-Int2*). Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio es determinar la presencia y circulación de cepas de *S. sonnei gMR-Int2* aisladas de muestras fecales de pacientes adultos en un hospital de tercer nivel.

**Métodos:** A las 53 cepas de *S. sonnei* aisladas durante el periodo de 1999 a 2007 se les realizaron pruebas de susceptibilidad a 21 agentes antimicrobianos. También se llevó a cabo la biotipificación por medio de perfiles de fermentación a tres carbohidratos (ramnosa, xilosa y *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosida) y el análisis del integron clase 1 y 2 a través de la técnica molecular de PCR, amplificando los genes de la integrasa y la región constante de los integrones.

**Resultados:** Los 53 aislados de *S. sonnei* analizados presentaron un alto porcentaje de resistencia a los antibióticos de primera línea como: espectinomicina (86.7%), estreptomicina (84.9%), tetraciclina (71.7%), trimetoprim-sulfametoxazol (66%) y cefalotina (60.3%); mientras que para las quinolonas y cefalosporinas de espectro extendido se obtuvo una susceptibilidad completa. El 96.2% de las cepas fueron clasificadas dentro del biotipo *g* y el 75.5% presentó el integron clase 2.

**Conclusiones:** Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que reporta la presencia y circulación de la cepa *S. sonnei gMR-Int2* en nuestro país, apoyando la evidencia de la reciente diseminación de esta cepa clonal, ahora considerada por algunos investigadores como pandémica.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

- Determinar la presencia y diseminación de cepas de *Shigella sonnei* biotipo *g*, multirresistentes, asociadas a integrones clase 2 aisladas de muestras fecales de pacientes adultos en un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas de *S. sonnei* aisladas de especímenes clínicos en un hospital de tercer nivel.
- Identificar la presencia de cepas de *S. sonnei* biotipo *g* mediante la fermentación de ramnosa, xilosa y *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosida (ONPG).
- Establecer la relación existente entre el perfil de resistencia a varios agentes antimicrobianos y la presencia del integron clase 2 en cepas de *S. sonnei* biotipo *g*.

## Antecedentes

### 3.1 Familia Enterobacteriaceae

La Familia Enterobacteriaceae constituye uno de los grupos bacterianos más importantes en la microbiología clínica, ya que incluye una gran variedad de géneros asociados con el ser humano. Algunos forman parte de la microbiota normal, como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, etc., mientras que otros tienen un papel patogénico ampliamente reconocido, como el grupo diarreogénico de *Escherichia*, ***Shigella***, *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter* y *Vibrio*.<sup>16</sup>

Son una familia heterogénea y amplia de bacterias Gram negativas. Son microorganismos que colonizan las diferentes mucosas, en especial las del tracto gastrointestinal (GI). Sin embargo, además de causar infecciones gastrointestinales, pueden causar infecciones extraintestinales como en el tracto urinario y el respiratorio, principalmente en hospederos inmunodeprimidos.<sup>16</sup> Los microorganismos pertenecientes a esta familia se aislan principalmente de muestras clínicas.

Las enterobacterias se caracterizan fenotípicamente por lo siguiente: a) son bacilos Gram negativos; b) bacterias no esporuladas con crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis por lo que se definen como anaerobios facultativos; c) reducen los nitratos a nitritos; d) fermentan azúcares como la glucosa, con diversos productos finales; e) son oxidasa negativa; f) pueden ser móviles mediante flagelos peritricos o inmóviles; y g) sus requerimientos nutricionales son relativamente simples, ya que son capaces de crecer en medios de cultivo utilizados rutinariamente en los laboratorios de microbiología,<sup>16</sup> como agar Mc Conkey (MC), agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), agar *Salmonella-Shigella* (SS) y agar Hektoen, después de ser incubados durante 18-24 hr a 37°C.

Los microorganismos pertenecientes a esta familia se encuentran extensamente dispersos en la naturaleza, ya que se pueden encontrar en el suelo, agua, plantas y en el tracto GI del ser humano y de los animales.<sup>28</sup>

A nivel mundial, las enterobacterias son responsables de más de la mitad de las infecciones gastrointestinales y de la mayoría de las infecciones urinarias. Antes de la aparición de la resistencia bacteriana a los antibióticos, las infecciones causadas por estos microorganismos eran relativamente fáciles de erradicar.<sup>28</sup>

La detección de especies resistentes pertenecientes a esta familia es de suma importancia para la vigilancia de las infecciones que se presentan en las comunidades, así como aquellas que se presentan en los hospitales.<sup>28</sup>

### 3.2 Género *Shigella*

Son bacilos Gram negativos pequeños, no móviles, anaerobios facultativos, no esporulados, que no fermentan la lactosa. Existen cuatro especies de *Shigella* clasificadas con base a sus diferencias serológicas a nivel de lipopolisacáridos: *S. dysenteriae* (serogrupo A, 13 serotipos), *S. flexneri* (serogrupo B, 15 serotipos), *S. boydii* (serogrupo C, 18 serotipos) y *S. sonnei* (serogrupo D, un solo serotipo).<sup>5,24,25,44</sup>

También, se han clasificado en cinco biotipos<sup>33,43</sup> de acuerdo a sus diferencias bioquímicas, principalmente por el patrón de fermentación a los carbohidratos ramnosa (RHA), xilosa (XYL) y *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosida (ONPG):

**Tabla 1. Clasificación de las especies de *Shigella* en 5 diferentes biotipos de acuerdo al perfil de fermentación de RHA, XYL y ONPG.**

| Biotipo    | RHA | XYL | ONPG |
|------------|-----|-----|------|
| <i>a</i> * | +   | -   | +    |
| <i>d</i>   | +   | +   | -    |
| <i>e</i>   | +   | +   | +    |
| <i>f</i>   | -   | -   | -    |
| <i>g</i> * | -   | -   | +    |

\*Biotipos más comunes.<sup>43</sup>

### 3.2.1 Epidemiología

Las especies de *Shigella* son los principales microorganismos causantes de la disentería bacilar (shigellosis) a nivel mundial. Hoy, después de 100 años de que el médico japonés Shiga descubriera esta bacteria, la shigellosis sigue siendo un problema importante de salud pública, especialmente en los países en vías de desarrollo debido a la falta de higiene existente en éstos y a los precarios suministros de agua potable.

La shigellosis es la gastroenteritis bacteriana con mayor riesgo de contagio, que resulta de la adherencia e invasión de *Shigella* a las células epiteliales de la mucosa del intestino causando inflamación y ulceración de la misma. Se ha demostrado que menos de 200 unidades formadoras de colonias (UFC) pueden producir la enfermedad en adultos sanos.<sup>24,55</sup> Esta enfermedad es una infección de distribución universal, y puede ocurrir a cualquier edad. Sin embargo, es más frecuente en la población pediátrica<sup>17,20,29</sup> (más del 60% de los casos ocurren en niños de entre 1 y 5 años). Este microorganismo es fácilmente transmisible a través de las manos, agua, alimentos o fomites contaminados,<sup>16,17</sup> siendo el hombre el único reservorio conocido.<sup>15,16,24,25</sup>

*S. sonnei* es la especie asociada comúnmente con las enfermedades diarreicas en países desarrollados,<sup>14,15,30</sup> sin embargo, los síntomas tienden a ser moderados y en ocasiones los pacientes podrían ser asintomáticos.<sup>23,28</sup> Por otro lado, *S. flexneri* es la especie más frecuentemente aislada en los países en vías de desarrollo.<sup>30,54</sup> Estos conceptos están cambiando e investigaciones recientes sobre prevalencia de serogrupos a nivel mundial indican cambios significativos y radicales en su frecuencia. Actualmente, no es sorprendente encontrar que *S. sonnei* sea aislada más frecuentemente en países en vías de desarrollo.<sup>50</sup>

### 3.2.2 Enfermedad

La disentería bacilar es una infección invasiva que se manifiesta de diferentes formas dependiendo de la edad, la presencia de factores de riesgo, y el estado del sistema inmune del hospedero, que se manifiesta desde una diarrea leve de corta duración hasta una enfermedad inflamatoria del colon.<sup>44</sup>

Los síntomas habituales de esta enfermedad son: diarrea acuosa sobre todo al principio del cuadro clínico, deshidratación, fiebre, dolor abdominal, fatiga, anorexia y, en casos más severos, diarrea con sangre, moco o pus.<sup>16,20,24,25,44</sup> La posibilidad de transmisión existe mientras el microorganismo se excrete por las heces. La mayoría de los episodios de shigellosis en pacientes sanos son autolimitados y se resuelven en 5 a 7 días sin secuelas.<sup>24</sup> Las complicaciones se observan en pacientes inmunodeprimidos y en niños desnutridos o muy pequeños. El periodo de incubación es de 1 a 7 días y, esta enfermedad puede presentarse en cualquier época del año, aunque es más común observarla durante las épocas de calor o lluvia.<sup>28,55</sup>

A nivel mundial, se estima que la shigellosis causa alrededor de 1,100,000 muertes por año, siendo los niños menores de 5 años la población más afectada.<sup>29, 37,51,56</sup>

### 3.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico está basado principalmente en el aislamiento e identificación microbiológica de *Shigella* de un espécimen fecal, el cual debe ser recolectado en etapas tempranas de la enfermedad y enviado al laboratorio en medio de transporte adecuado debido a que esta bacteria es muy lábil a condiciones ambientales.

El aislamiento de *Shigella* en el laboratorio de microbiología está basado en el cultivo de la muestra clínica en medios diferenciales y/o selectivos<sup>16,44</sup> como agar MC, agar XLD y agar SS, e incubación bajo condiciones de aerobiosis durante 24 hr a 37°C. La identificación se realiza a través de pruebas bioquímicas convencionales<sup>19</sup> y el diagnóstico se confirma por medio de pruebas serológicas.

### 3.2.4 Tratamiento

Con una hidratación adecuada, la shigellosis es generalmente una enfermedad autolimitada y la decisión para prescribir antibióticos depende de la severidad de la enfermedad y de la edad del paciente.<sup>45</sup>

El tratamiento con antibióticos mejora los síntomas dentro de las primeras 48 hr y reduce el tiempo de duración de la enfermedad, de aproximadamente 5-7 días a 3 días. Sin tratamiento antimicrobiano, o con el uso de antibióticos ineficientes, un episodio de shigelosis puede durar de 2 a 10 días aumentando el riesgo de complicaciones serias o muerte.<sup>44</sup>

Hace algunas décadas, una gran variedad de agentes antimicrobianos eran efectivos para el tratamiento de la shigelosis; sin embargo, debido a la aparición de clonas resistentes, las opciones terapéuticas se han limitado, siendo esto un gran problema de salud pública a nivel mundial.

En la actualidad, debido al uso indiscriminado de los antibióticos, se ha reportado en muchas partes del mundo, incluyendo México, la existencia de especies de *Shigella* con alto porcentaje de resistencia a agentes antimicrobianos tales como las sulfonamidas, tetraciclina, ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol, que en un principio fueron recomendados como los antibióticos de primera elección para el tratamiento de la shigelosis debido a su alta eficacia y bajo costo.<sup>5, 24,30,54,55,57</sup> De manera alarmante, el uso inadecuado de antibióticos de amplio espectro parece ejercer una presión selectiva y favorecer la aparición de clonas de *Shigella* spp. resistentes a estos agentes antimicrobianos de espectro extendido. En los últimos años se ha reportado la presencia de beta-lactamasas del tipo TEM, SHV, CMY, CTX,<sup>26,54,55</sup> así como la resistencia a fluoroquinolonas,<sup>30,45,57</sup> entre especies de *Shigella*.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina, como primera opción para el tratamiento de la shigelosis en adultos, siendo su uso limitado en los niños debido a su alto grado de toxicidad, por lo que se recomienda el uso de los macrólidos (azitromicina) y de las cefalosporinas de tercera generación (CEE), como la ceftriaxona, para el tratamiento de dicha enfermedad en los niños.<sup>45,24,30</sup>

Los cambios en la prevalencia de los serogrupos y en los patrones de susceptibilidad de *Shigella* dificultan la elección del medicamento adecuado para el tratamiento de la enfermedad.<sup>44</sup>



La carga de enfermedad de la shigellosis en términos de salud pública se está agravando por el aumento en la resistencia a los antibióticos en todo el mundo<sup>18,20,24, 35,51,57,</sup>

### **3.3 Resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos**

Por más de 50 años se han utilizado agentes antimicrobianos para controlar las infecciones bacterianas en humanos, animales y plantas.<sup>2</sup> En los primeros días del uso de los agentes antimicrobianos en la terapéutica, la resistencia a éstos no era considerada un problema importante, ya que el número de especies resistentes era bajo y un gran número de agentes nuevos y altamente efectivos eran descubiertos.<sup>53</sup>

Sin embargo, el incremento de la presión selectiva impuesta por el uso irracional de los agentes antimicrobianos aceleró el desarrollo y expansión de la resistencia bacteriana, lo que originó un fenómeno muy complejo que involucra una gran variedad de agentes antimicrobianos, especies bacterianas, genes de resistencia y mecanismos de resistencia.<sup>22</sup>

La definición del concepto de resistencia, puede estar basado en diferentes criterios como son: genético, bioquímico, microbiológico y clínico. En el presente trabajo la definición que interesa está basada en el criterio clínico, en donde se menciona que una especie es resistente cuando sobrevive a la terapia con agentes antimicrobianos.

Una especie bacteriana puede presentar dos tipos de resistencia: intrínseca y adquirida. El primer tipo de resistencia se debe a cualidades estructurales y funcionales que permiten la tolerancia a ciertos antibióticos por todos los miembros de un grupo bacteriano en particular. Este tipo de resistencia representa un problema clínico en el manejo de las especies bacterianas que son insensibles a un gran número de agentes antimicrobianos, limitando las opciones de tratamiento. Sin embargo, la resistencia adquirida representa una mayor amenaza para la salud humana ya que es la causante de la aparición y diseminación de resistencia en bacterias normalmente susceptibles; dicha resistencia se encuentra asociada sólo con algunas especies de un género bacteriano en particular o con alguna especie.<sup>22</sup>

La adquisición de resistencia puede ser debida a cambios dentro del genoma bacteriano por mutación o por adquisición horizontal de información genética externa, la cual se puede dar por tres principales mecanismos: conjugación, transformación y transducción.

### 3.3.1 Mecanismos de transferencia de genes de resistencia

Los genes pueden ser diseminados verticalmente durante la división celular del hospedero, pero también pueden ser transferidos horizontalmente entre bacterias de igual o diferente especie o género vía transformación, transducción y conjugación.

3.3.1.1 *Transformación*: Es la transferencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) libre dentro de una célula receptora. El ADN libre se origina de bacterias lisadas. Este mecanismo, al igual que la transducción, se observa principalmente en bacterias de la misma especie.<sup>22</sup>

3.3.1.2 *Transducción*: Es la transferencia de genes de una bacteria donadora a otra receptora utilizando como vector a un fago, el cual inyecta su ADN dentro de la célula receptora. Este tipo de transferencia se encuentra limitada por la cantidad de ADN que puede ser empaquetada en el fago y los requerimientos necesarios para que se dé la unión fago-célula receptora.<sup>21,34,53</sup>

Este mecanismo se observa principalmente entre bacterias de la misma especie.

3.3.1.3 *Conjugación*: Es la unión de dos células bacterianas, durante la cual se transfiere material genético de una célula donadora a una receptora. El contacto cercano de estas dos células es uno de los principales requerimientos para que se lleve a cabo la conjugación.<sup>21,34,53</sup>

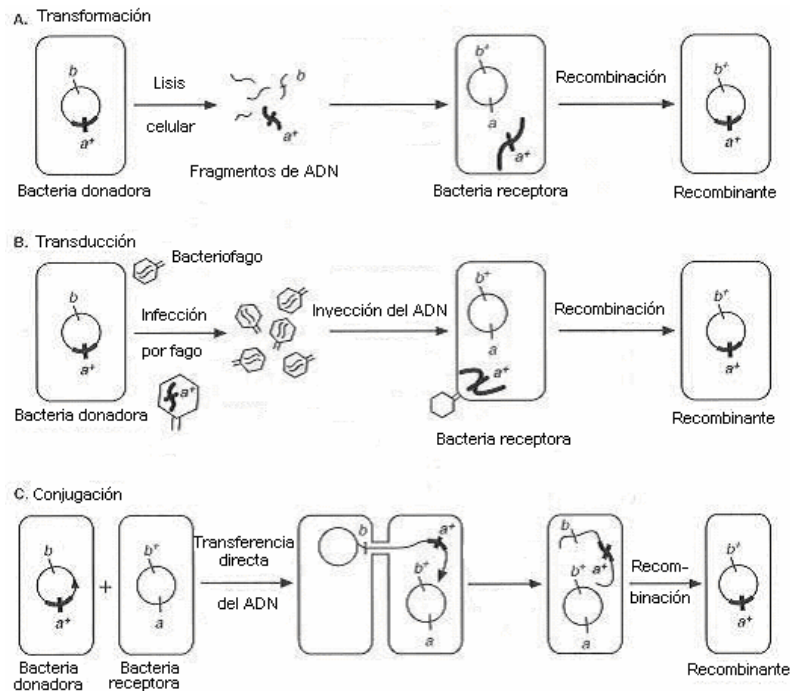


Figura 1. Mecanismos de transferencia horizontal de material genético entre bacterias:  
A. Transformación, B. Transducción y C. Conjugación.

### 3.3.2 Elementos involucrados en la transferencia de genes de resistencia

Los plásmidos, transposones, 'cassettes' genéticos e integrones juegan un papel importante en la transferencia horizontal de los genes de resistencia a agentes antimicrobianos entre las bacterias.

3.3.2.1 *Plásmidos*: Son los mediadores más importantes en la diseminación de genes de resistencia. Un plásmido se define como una molécula circular de ADN extracromosómico que se replica de manera autónoma, cuyo tamaño va desde 300 pares de bases (pb) a 2400 kilo pares de bases (kb). Estos elementos genéticos codifican tanto genes de resistencia como propiedades metabólicas o de virulencia específicas.

Los plásmidos usualmente actúan como vectores para los transposones e integrones.<sup>1</sup>

21,53

3.3.2.2 *Transposones*: Son secuencias de ADN móviles que son transferidas de un lugar a otro dentro del mismo genoma. Existen transposones simples y complejos. Los

simples son aquellos que sólo llevan el gen de la transposasa, la cual es la enzima que media la integración o escisión del elemento; por otro lado, los transposones complejos se caracterizan por tener secuencias terminales invertidas y repetidas que separan las secuencias que codifican los genes de resistencia de los de la transposasa.<sup>1,34,53</sup>

3.3.2.3 *Cassettes genéticos*: Son pequeños elementos genéticos móviles presentes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Comúnmente consisten en un solo gen con un solo sitio de recombinación específica (*attC*), el cual la mayoría de las veces es un gen de resistencia antimicrobiana.<sup>59</sup> Los cassettes genéticos usualmente se encuentran presentes en sitios específicos dentro del integron.<sup>53</sup>

### 3.4 Integron

Son elementos móviles de ADN que capturan e incorporan marcos de lectura abiertos a través de la recombinación sitio específico, que se encuentran en cassettes genéticos exógenos y los convierten en genes funcionales asegurándose de su correcta expresión.<sup>6,39</sup>

Los integrones facilitan la diseminación de los genes entre las clonas bacterianas.<sup>1,39</sup> Es importante destacar que todos los integrones se encuentran ligados a elementos móviles de ADN, como secuencias de inserción (IS), plásmidos y transposones, los cuales sirven como vehículos para la transmisión del material genético. Por último, cabe mencionar que este tipo de elementos móviles se han encontrado tanto en bacterias Gram negativas, como por ejemplo Enterobacterias, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Acinetobacter*, como en bacterias Gram positivas, como *Corynebacterium* y *Staphylococcus*.<sup>6,41</sup>

#### 3.4.1 Estructura del integron

Todos los integrones están compuestos de tres elementos claves necesarios para la captura de genes exógenos.

1. Gen *intI*: Este gen codifica una enzima llamada integrasa con actividad de recombinasa en sitio-específico.

2. Sitio de recombinación específico (*attI*), en el cual se integran los cassettes genéticos que confieren resistencia o alguna otra característica.

3. Dos promotores ( $P_I$  y  $P_C$ ), donde  $P_I$  dirige la transcripción de la integrasa y  $P_C$  dirige la transcripción de los cassettes genéticos.<sup>6,39</sup>

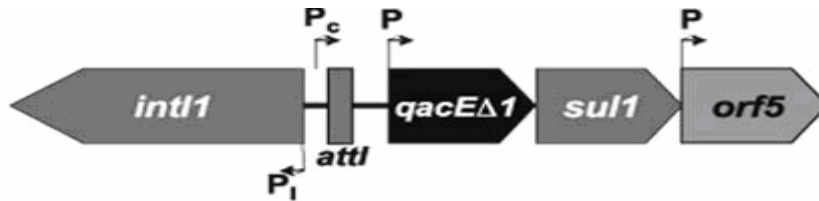


Figura 2. Estructura general de los integrones: Gen *intl*, sitio de recombinación específica (*attI*) y los promotores  $P_I$  y  $P_C$

### 3.4.2 Mecanismo de integración de los cassettes genéticos

La integrasa permite la interacción del sitio *attI* con el sitio de recombinación específica de los cassettes genéticos *attC*, también conocido como elemento de 59-pb, uniéndolos y facilitando de esta manera la integración o escisión de los cassettes genéticos en la zona variable del integron.<sup>6,39</sup> Esta integración se lleva a cabo corriente abajo del promotor  $P_C$  en el sitio *attI*, permitiéndose de esta manera la expresión de los genes que se encuentran en los cassettes genéticos.

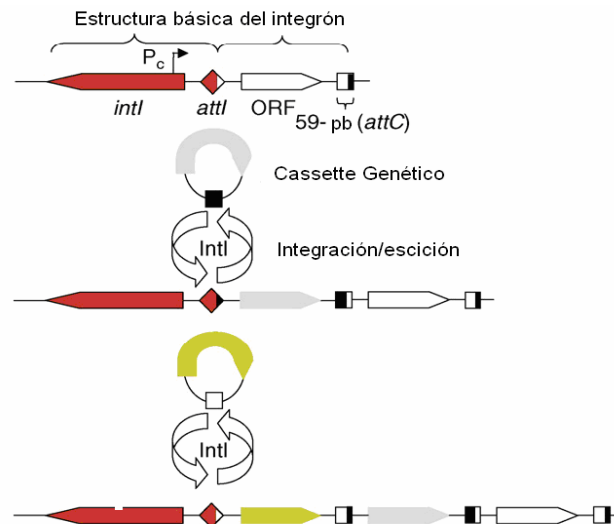


Figura 3. Mecanismo de integración de los cassettes genéticos: Gen *intl*, Sitio *attC* (59pb), sitio de recombinación *attI*, marco de lectura abierto (ORF) y  $P_C$  promotor del cassette

### 3.4.3 Clasificación de los integrones

Los integrones pueden ser divididos en dos grandes grupos: los integrones móviles y los superintegrones.

#### 3.4.3.1 Integrones móviles

Este tipo de integrones se encuentran ligados a elementos móviles de ADN y son los que están relacionados con la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos.

Actualmente, se han identificado cinco clases de integrones móviles involucrados en la diseminación de los genes de resistencia, dicha clasificación está basada en la secuencia que codifica para la integrasa, teniendo de esta manera integrones clase 1, 2, 3, 4 y 5.<sup>39</sup>

##### 3.4.3.1.1 *Integrones clase 1*

Los integrones clase 1 están asociados al transposon Tn402, el cual a su vez puede encontrarse dentro del transposon Tn21. Esta clase es la que se encuentra comúnmente en aislados clínicos y a la que pertenecen la mayoría de los cassettes genéticos que confieren resistencia a agentes antimicrobianos conocidos.

Este tipo de integrones está constituido primeramente en su extremo 5' por el gen que codifica su integrasa, seguido por un sitio de recombinación (*attI*). En la región variable de estos integrones es donde se lleva a cabo la inserción de los cassettes genéticos, siendo los más comunes los que codifican resistencia a agentes antimicrobianos. Por último, en su extremo 3' se encuentran los genes *sul1* y *qacEΔ1*, que codifican resistencia a sulfonamidas y a compuestos cuaternarios de amonio, respectivamente.<sup>6,59</sup>

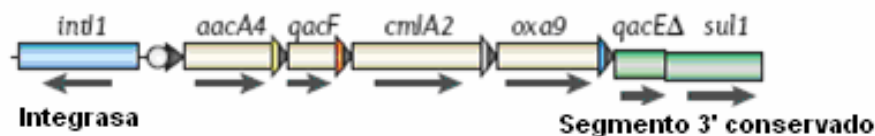


Figura 4. Ejemplo del arreglo genético del integron clase 1: los cassettes genéticos *aacA4* (resistencia a aminoglicósidos), *cmIA2* (resistencia a cloranfenicol), *oxa9* (resistencia a  $\beta$ -lactámicos), *qacF* y *qacEΔ* (resistencia a compuestos cuaternarios de amonio) y *sul1* (resistencia a sulfonamidas)

### 3.4.3.1.2 Integrones clase 2

Este tipo de integrones está asociado exclusivamente con el transposon Tn7 y sus derivados. Una característica de suma importancia de éstos, es que en su región variable sólo contienen tres genes: *dfrA1* (dihidrofolato reductasa), *sat1* (estreptotricina acetiltransferasa) y *aadA1* (aminoglicósido adeniltransferasa), que confieren resistencia a trimetoprim, estreptotricina y a estreptomina/espectinomicina, respectivamente.<sup>5</sup> Este arreglo genético característico y único se debe a que la integrasa presenta una mutación en el codon 179 (TTA) provocando un codon de paro prematuro y, como resultado, la expresión de una enzima (integrasa) defectuosa, la cual impide la inserción de más cassettes genéticos.<sup>39,47</sup>

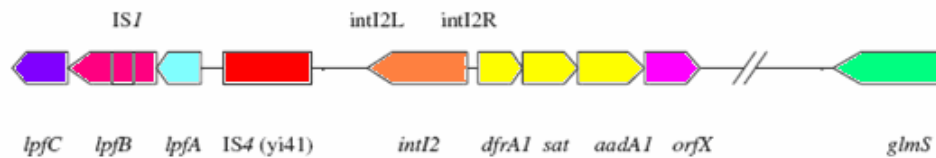


Figura 5. Esquema-ejemplo de la parte final derecha e izquierda del transposon Tn7, el cual contiene un arreglo de genes dentro del integron clase 2.

### 3.4.3.1.3 Integrones clase 3

Actualmente se cuenta con poca información acerca de este tipo de integrones. Lo único que se conoce es que éstos se encuentran asociados a un transposon insertado en un plásmido que todavía no ha sido caracterizado.<sup>39,58</sup>

### 3.4.3.1.4 Integrones clase 4 y 5

Estos fueron identificados inicialmente gracias a su participación en el desarrollo de la resistencia a trimetoprim en el género *Vibrio*.

El integron clase 4, el cual forma parte de los elementos SXT, ha sido encontrado en *Vibrio cholerae*, mientras que el integron clase 5 está localizado en un transposon compuesto que se encuentra dentro de un plásmido en *Vibrio salmonicida*.<sup>39, 58</sup>

### 3.4.3.2 Superintegrones

Este tipo de integrones codifican una integrasa específica (*VchInt1A*). Además, presentan dos características importantes que los distinguen de los integrones móviles. Primero, la cantidad de cassettes genéticos asociados a este tipo de integron es muy alta; en ocasiones llegan a tener hasta 20 cassettes genéticos, los cuales presentan una alta homología entre sus sitios de recombinación específica (*attC*). En segundo lugar son estructuras cromosomales, lo que impide su movilidad.

Los cassettes genéticos de los superintegrones, además de codificar resistencia a agentes antimicrobianos, pueden codificar factores de virulencia y enzimas que participan en el metabolismo primario.

Por último, los superintegrones han sido identificados en *Vibrio*, *Xantomonas*, y en algunas clases de *Pseudomonas*.<sup>1,6,38,39,47</sup>

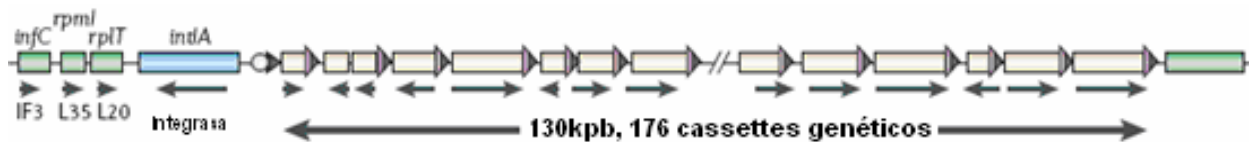


Figura 6. Representación esquemática de un superintegron cromosomal de *V. cholerae*.



## **Metodología Experimental**

### **4.1 Colección de especímenes y cepas bacterianas**

Durante el periodo de 1999 a 2007, un total de 8,607 coprocultivos de pacientes que presentaban alguna sintomatología gastrointestinal fueron remitidos y procesados en el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), para la búsqueda de los principales patógenos bacterianos entéricos: *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Las cepas fueron aisladas e identificadas en el Laboratorio de Bacteriología de acuerdo a los métodos microbiológicos y bioquímicos estándar,<sup>19</sup> mientras que el método de aglutinación en portaobjetos con antisueros específicos (Difco Laboratories. Detroit, Michigan, USA) fue utilizado para determinar la especie. Todos los aislados con patrón bioquímico fenotípico de *Shigella* fueron confirmados por el Sistema miniautorizado Vitek Jr. 60 (BioMérieux Inc, Marcy-l'Etoile, Francia).

Un total de 85 cepas de *Shigella* fueron aisladas: *S. sonnei* (53), *S. flexneri* (25) y *S. boydii* (7). No se aisló *S. dysenteriae*. Para propósitos de este estudio, sólo se examinaron las 53 cepas de *S. sonnei*.

Todos los aislados clínicos fueron almacenados y conservados en caldo infusión cerebro-corazón con glicerol al 15% a -20°C hasta su uso.

### **4.2 Pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos**

La susceptibilidad a agentes antimicrobianos se determinó por medio de dos métodos: difusión en disco y de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) utilizando los resultados del Sistema miniautorizado Vitek Jr. 60.

#### 4.2.1 Método de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco

Este método se llevo a cabo de acuerdo a los lineamientos del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>12</sup>

A partir de un cultivo de 24 hr, se preparó una suspensión bacteriana ajustada al tubo de 0.5 de Mc Farland (MF) en solución salina al 0.85%. Después, con un hisopo estéril se inoculó masivamente la suspensión en una placa de agar Mueller Hinton; posteriormente se colocaron los sensidiscos (Becton Dickinson, EU.) de los agentes antimicrobianos que fueron evaluados y se incubaron a 37°C durante 18 a 24 hr; después de la incubación se registró e interpretó la lectura de los halos de inhibición.

Los agentes antimicrobianos probados por este método fueron los siguientes (el contenido del disco está indicado dentro de los paréntesis): Cefalotina, **CF** (30µg); Ciprofloxacina, **CIP** (5µg); Cefpodoxima, **CPD** (10µg); Cefotaxima, **CTX** (30µg); Cefoxitina, **FOX** (30µg); Kanamicina, **K** (30µg); Ácido Nalidíxico, **NA** (30µg); Estreptomina, **S** (10µg); Espectinomicina, **SPT** (100µg); Tetraciclina, **Te** (30µg) y Trimetoprim, **TMP** (5µg).

#### 4.2.2 Método de CMI por el Sistema miniautorizado Vitek Jr. 60

Este método sirve para determinar la susceptibilidad de bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos de crecimiento rápido. Consta de tres tarjetas, que son GNI, que es la tarjeta empleada para la identificación del microorganismo, GNS-122 y GNS-127 que son tarjetas que constan de una serie de diluciones de determinados agentes antimicrobianos, que sirven para determinar el patrón de susceptibilidad del microorganismo.

Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina a partir de un cultivo puro de 24 hr y se ajustó al tubo 1.0 de MF; esta suspensión sirvió para inocular la tarjeta GNI. De esa suspensión bacteriana se tomaron 50 µL y se pasaron a un tubo que contenía 1.8 mL de solución salina; este procedimiento se realizó por duplicado para la inoculación de las tarjetas GNS-122 y GNS-127. Después de haber llevado a cabo este procedimiento, las tarjetas fueron selladas e introducidas en la cámara de incubación del Sistema miniautorizado Vitek Jr. 60, después de 24 hr se obtuvo el reporte del patrón de susceptibilidad de la cepa analizada.

Los agentes antimicrobianos considerados para el análisis del perfil de susceptibilidad por este método fueron: Ampicilina, **AMP**; Amoxicilina/Ácido clavulánico, **AMC**; Aztreonam, **AZT**; Cefepime, **CPM**; Ceftazidima, **CAZ**; Ceftriaxona, **CRO**; Cloranfenicol, **CHL**; Imipenem, **IPM**; Gentamicina, **CN** y Trimetoprim-sulfametoxazol, **SXT**.

#### 4.3 Biotipificación de *S. sonnei* por fermentación de ramnosa, xilosa y ONPG

La biotipificación de las cepas de *S. sonnei* se realizó por medio de la fermentación de los siguientes carbohidratos: RHA, XYL y ONPG.<sup>43</sup>

En el caso de la RHA y la XYL, se preparó una solución de base caldo rojo de fenol al 1% de cada uno de estos carbohidratos; a dicha solución se le inoculó la cepa a analizar. Se incubaron a 37°C durante 24 hr. El cambio de rojo-anaranjado a amarillo fue considerado como positivo.

Para la determinación del ONPG, se utilizó el resultado de la tarjeta del Sistema miniautorizado Vitek Jr. 60, el cual se llevó a cabo como se describe en el punto **4.2.2**.

Para verificar que las reacciones fueran correctas, en la fermentación de RHA y XYL se utilizaron como controles positivos y negativos, las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* ATCC 13314 y *Salmonella enterica* Typhi ATCC 19430, respectivamente.

#### 4.4 Detección por PCR de la integrasa e integron clases 1 y 2

Este análisis se llevó a cabo por el método molecular de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction),<sup>3</sup> utilizando pares de iniciadores específicos que amplifican los genes de la *Int1* e *Int2*, así como la región constante de los integrones clases 1 y 2 (Tabla 2).

#### 4.4.1 Extracción del ADN bacteriano

El ADN bacteriano utilizado en cada uno de los PCR realizados para la detección tanto de las integrasas como de los integrones se obtuvo de la siguiente manera: A partir de un cultivo puro de 24 hr en agar soya tripticaseína, se tomó  $\frac{1}{4}$  de una colonia y se resuspendió en una solución de Chelex al 7.5% (BioRad Chelex<sup>®</sup> 100 Resin). El Chelex es una resina que nos permite obtener ADN puro a través de un fenómeno de repulsión entre la misma y el ADN bacteriano, ya que ambos presentan la misma carga (negativa). El ADN bacteriano se obtuvo sometiendo la suspensión a un proceso térmico de 100°C durante 10 minutos en un termociclador (Perkin Elmer, DNA Thermal Cycler), después se centrifugó la muestra a 12,000 rpm durante 10 min para asegurar la precipitación del Chelex unido a todos los componentes bacterianos no deseados, y obtener un ADN viable para evitar inespecificidades en las reacciones de PCR.

El ADN obtenido de cada una de las muestras analizadas fue almacenado a -20°C por no más de cuatro semanas.

#### 4.4.2 Detección de la integrasa e integron clase 1

Para la detección de la integrasa 1 por PCR, se utilizó el par de iniciadores Intl1-F y Intl1-R y para el integron clase 1 se usó el par de iniciadores 5'CS y 3'CS, los cuales se unen a la región conservada 5' y 3' del integron.<sup>49</sup> (Tabla 2).

Para el caso de la integrasa clase 1, a cada mezcla de reacción se le añadió 33.8  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O desionizada, 5  $\mu$ L de Amortiguador II 10x PCR 50 mM, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (3  $\mu$ L), 0.2 mM (2  $\mu$ L) de dNTP's (oligonucleótidos), 0.5  $\mu$ L de cada iniciador Intl1-F y intl1-R (25 pmol/ $\mu$ L de cada uno de los iniciadores), 1U (0.2  $\mu$ L) de Taq AmpliTaq ADN polimerasa y finalmente 5  $\mu$ L de ADN bacteriano, obteniendo un volumen final de reacción de 50  $\mu$ L. La amplificación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Mazel *et al.*,<sup>38</sup> en un termociclador (PTC-100<sup>™</sup> Programmable Thermal Controller. MJ Research Inc.) con el siguiente perfil de temperatura: pre-desnaturalización a 94°C/5min, seguido de 35 ciclos de 94°C/1min, 62°C/1min, y 72°C/1min, con un paso final de extensión de 72°C/5min.

La detección del integron clase 1 se llevó a cabo siguiendo lo descrito por Levesque *et al.*,<sup>32</sup> con una mezcla de reacción que contenía: 34.8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, 5  $\mu\text{L}$  de Amortiguador II 10x PCR 50 mM, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  (2  $\mu\text{L}$ ), 0.2 mM de dNTP's (2  $\mu\text{L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador 5'CS y 3'CS (25 pmol/ $\mu\text{L}$  de cada uno de los iniciadores), 1U (0.2  $\mu\text{L}$ ) de Taq AmpliTaq ADN polimerasa y finalmente 5  $\mu\text{L}$  de ADN bacteriano, teniendo al igual que en el caso anterior un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . En este caso la amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones térmicas: pre-desnaturalización 94°C/5min, seguido de 35 ciclos de 94°C/1min, 55°C/1min, y 72°C/5min, con una extensión de 72°C/5min.

Finalmente, los productos de ADN amplificados tanto en el caso de la integrasa como del integron clase 1 fueron analizados a través de una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5x con 2.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio a 95 V durante 1 hr.

#### 4.4.3 Detección de la integrasa e integron clase 2

Para la detección de la integrasa clase 2, se emplearon el par de iniciadores intI2-F y intI2-R, y para el caso del integron clase 2 el par de iniciadores fueron hep 74, el cual se une a la región *attI2*, y hep 51, que se une a la región del gen *orfX*, situada en la parte final derecha del transposon Tn7.<sup>58</sup> (Tabla 2)

A la mezcla de reacción empleada para la detección de la integrasa clase 2 se le añadió 33.8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, 5  $\mu\text{L}$  de Amortiguador II 10x PCR 50 mM, 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (3  $\mu\text{L}$ ), 0.2 mM (2  $\mu\text{L}$ ) de dNTP's, 0.5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador IntI2-F y intI2-R (25 pmol/ $\mu\text{L}$  de cada uno de los iniciadores), 1U (0.2  $\mu\text{L}$ ) de Taq AmpliTaq ADN polimerasa y por último 5  $\mu\text{L}$  de ADN bacteriano, para así obtener un volumen final de reacción de 50  $\mu\text{L}$ . La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (PTC-100™) bajo el siguiente perfil térmico: pre-desnaturalización 94°C/5min, seguido de 30 ciclos de 94°C/30seg, 62°C/30seg, 72°C/1min, con una extensión de 72°C/5min, todo esto de acuerdo a lo publicado por Mazel *et al.*<sup>38</sup>

Por otra parte, la mezcla de reacción utilizada para la detección del integron clase 2 se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento publicado por Mammina *et al*,<sup>35</sup> la cual contenía: 33.8 µL de H<sub>2</sub>O desionizada, 5 µL de Amortiguador II 10x PCR 50 mM, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (3 µL), 0.2 mM (2 µL) de dNTP's, 0.5 µL de cada iniciador hep 74 y hep 51 (25 pmol/µL de cada iniciador), 1U (0.2 µL) de Taq AmpliTaq ADN polimerasa y finalmente 5 µL de ADN bacteriano, obteniendo de esta manera un volumen final de 50 µL. La amplificación consistió en 30 ciclos de 94°C/30seg, 55°C/30seg, 72°C/4min y una temperatura de extensión de 72°C/5min; la temperatura de pre-desnaturalización fue de 94°C durante 5 minutos.

Finalmente, al igual que en el caso descrito en el punto 4.4.2, los productos de ADN amplificados fueron analizados a través de una electroforesis convencional con un gel de agarosa al 1% en amortiguador 0.5x TBE con 2.5 µL de bromuro de etidio y con condiciones de corrida de 95 V por 1 h.

**Controles:** Como control positivo y control negativo en estos experimentos se utilizó una cepa de *E.coli* 1176, y una cepa de *E. coli* 1150, respectivamente, ambas aisladas de especímenes clínicos en el INCMSZ.

**Tabla 2. Secuencia de los iniciadores utilizados en la detección de la integrasa e integron clase 1 y 2 por el ensayo de PCR**

| Iniciador | Secuencia (5' → 3')            | Localización de la secuencia | Referencia |
|-----------|--------------------------------|------------------------------|------------|
| intl-1F   | ACATGTGATGGCGACGCACGA          | <i>intl1</i>                 | 49         |
| intl-1R   | ATTTCTGTCCTGGCTGGCGA           | <i>intl1</i>                 | 49         |
| 5'CS      | GGCATCCAAGCAGCAAG              | 5'CS integron 1              | 49         |
| 3'CS      | AAAGCAGACTTGACCTGA             | 3'CS integron 1              | 49         |
| intl-2F   | CACGGATATGCGACAAAAGGT          | <i>intl2</i>                 | 49         |
| intl-2R   | GTAGCAAACGAGTGACGAAATG         | <i>intl2</i>                 | 49         |
| hep 74    | CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA | <i>attl2</i>                 | 58         |
| hep 51    | GATGCCATCGCAAGTACGAG           | <i>orfX</i> dentroTn7        | 58         |

## Resultados

### 5.1 Cepas estudiadas

De los 8,607 especímenes fecales procesados dentro del periodo de 1999-2007 en el INCMNSZ, el 1 % (85 cepas) corresponde a *Shigella* spp., de las cuales el 0.6 % (53) fueron *S. sonnei*.

De las 85 cepas de *Shigella* aisladas durante los 8 años, la distribución de las especies fue: 53 (62.3%) de *S. sonnei*, 25 (29.4%) de *S. flexneri* y 7 (8.2%) de *S. boydii* C.

### 5.2 Resistencia antimicrobiana de *S. sonnei*

Las 53 cepas de *S. sonnei* analizadas en este estudio presentaron resistencia al menos a uno de los 21 agentes antimicrobianos probados. La Tabla 3 contiene una descripción detallada de la resistencia.

Los agentes antimicrobianos contra los que se presentó un alto porcentaje de resistencia fueron: Espectinomicina (86.7%), Estreptomina (84.9%), Tetraciclina (71.7%), Trimetoprim-sulfametoxazol (66%), Trimetoprim (64.1%) y Cefalotina (60.3%), seguido de la resistencia a Ampicilina (35.8%) y a Amoxicilina/Ácido clavulánico (32.1%). Todas las cepas mostraron susceptibilidad a: Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina, Aztreonam, CEE, así como a la Gentamicina e Imipenem. A excepción de una cepa aislada en 1999, todas los aislados de *S. sonnei* mostraron susceptibilidad a cloranfenicol,.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos de susceptibilidad llevados a cabo en este estudio se pudo observar que los perfiles de resistencia más comunes dentro de las cepas de *S. sonnei* biotipo *g* asociadas al integron clase 2 fueron: **CF, Te, SPT, S, TMP, SXT** (23%); **AMP, AMC, CF, Te, SPT, S, TMP, SXT** (18%) y **Te, SPT, S, TMP, SXT** (18%) (Tabla 4).

**Tabla 3. Fenotipo de resistencia antimicrobiana de los aislados de *Shigella sonnei* obtenidos en INCMNSZ en el periodo de 1999-2007**

| Agente antimicrobiano | Punto de corte (R) | Año de aislamiento, No. de aislados resistentes (%) |        |         |         |           |          |          |         |          | Total por antibiótico |   |
|-----------------------|--------------------|---|--------|---------|---------|-----------|----------|----------|---------|----------|-----------------------|---|
|                       |                    | 1999  | 2000   | 2001    | 2002    | 2003      | 2004     | 2005     | 2006    | 2007     |                       |   |
| Ác. nalidixico        | <=13               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     | 0 |
| Ampicilina            | >=32               | 3 (50)  | 0      | 1 (50)  | 2 (50)  | 9 (75)    | 3 (37.5) | 0        | 1 (25)  | 0        | 19 (35.8)             |   |
| Amoxi/clavulánico     | >=32               | 2(33.3)   | 0      | 1(50)   | 1(25)   | 9(75)     | 3(37.5)  | 0        | 1(25)   | 0        | 17((32.1)             |   |
| Aztreonam             | >=32               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Cefalotina            | <=14               | 4 (66.6)  | 0      | 2 (100) | 4 (100) | 7 (58.3)  | 7 (87.5) | 4 (44.4) | 1 (25)  | 3 (50)   | 32 (60.3)             |   |
| Cefepime              | >=32               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Cefotaxima            | <=14               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Cefoxitina            | <=14               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Ceftazidima           | >=32               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Ceftriaxona           | >=64               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Cepodoxima            | <=17               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Ciprofloxacina        | <=15               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Cloranfenicol         | >=32               | 1 (16.6)  | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 1 (1.8)               |   |
| Espectinomicina       | <=15               | 5 (83.3)  | 1 (50) | 2 (100) | 2 (50)  | 10 (83.3) | 8 (100)  | 8 (88.8) | 4 (100) | 6 (100)  | 46 (86.7)             |   |
| Estreptomicina        | <=11               | 3 (50)  | 1 (50) | 1 (50)  | 3 (75)  | 10 (83.3) | 8 (100)  | 9 (100)  | 4 (100) | 6 (100)  | 45 (84.9)             |   |
| Gentamicina           | >=16               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Kanamicina            | <=13               | 1 (16.6)  | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 1 (25)  | 0        | 2 (3.7)               |   |
| Imipenem              | >=16               | 0   | 0      | 0       | 0       | 0         | 0        | 0        | 0       | 0        | 0                     |   |
| Tetraciclina          | <=14               | 4 (66.6)  | 0      | 1 (50)  | 2 (50)  | 9 (75)    | 7 (87.5) | 5 (62.5) | 4 (100) | 6 (100)  | 38 (71.7)             |   |
| Trimetoprim           | <=10               | 3 (50)  | 0      | 1( 50)  | 1 (25)  | 8 (66.6)  | 7 (87.5) | 6 (66.6) | 4 (100) | 4 (66.6) | 34 (64.1)             |   |
| Trime/sulfametoxazol  | >=320              | 3 (50)  | 0      | 1 (50)  | 2 (50)  | 9 (75)    | 7 (87.5) | 5 (55.5) | 4 (100) | 4 (66.6) | 35 (66)               |   |
| <b>Total por año</b>  |                    | 6 (11.3)  | 2 (4)  | 2 (4)   | 4 (7.5) | 12 (22.6) | 8 (15)   | 9 (17)   | 4 (7.5) | 6 (11.3) | 53 (100)              |   |



**Tabla 4. Perfiles de resistencia a los agentes antimicrobianos evaluados de las cepas de *S. sonnei* biotipo *g* asociadas al integron clase 2 aisladas en el INCMNSZ dentro del periodo de 1999-2007.**

| Fenotipo de resistencia            | Año de aislamiento, No. de aislados resistentes (%) <sup>a,b</sup> |      |      |      |      |      |      |          |
|------------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|----------|
|                                    | 1999   | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | Total    |
| <b>AMP,AMC,CF,Te,SPT,S,TMP,SXT</b> | 2  | 0    | 3    | 2    | 0    | 0    | 0    | 7 (18)   |
| AMP,AMC,CF,Te,SPT,S,SXT            | 0  | 0    | 3    | 1    | 0    | 0    | 0    | 4 (10.2) |
| AMP,AMC,Te,SPT,S,TMP,SXT           | 0  | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 2 (5.1)  |
| <b>CF,Te,SPT,S,TMP,SXT</b>         | 0  | 0    | 0    | 4    | 3    | 1    | 1    | 9 (23)   |
| CF,Te,SPT,S,TMP                    | 0  | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 2 (5.1)  |
| CF,Te,SPT,S,SXT                    | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1 (2.6)  |
| <b>Te,SPT,S,TMP,SXT</b>            | 0  | 0    | 0    | 0    | 2    | 2    | 3    | 7 (18)   |
| CF,Te,SPT,S                        | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1 (2.6)  |
| CF,Te,SPT,TMP                      | 0  | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1 (2.6)  |
| CF,Te,S,TMP                        | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1 (2.6)  |
| CF,Te,TMP                          | 0  | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1 (2.6)  |
| Te,SPT,S                           | 0  | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1 (2.6)  |
| SPT,S                              | 0  | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1 (2.6)  |

<sup>a</sup> En el 2000 y 2001 ninguna de las cepas resistentes evaluadas presentaron alguno de los fenotipos de resistencia que se presentan en la tabla.

<sup>b</sup> En el 2005 la cepa 8818 sólo presentó resistencia a S.

### 5.3 Biotipificación de *S. sonnei* por fermentación de ramnosa, xilosa y ONPG

La distribución de las 53 cepas de *S. sonnei* biotipificadas se muestra en la Tabla 5.

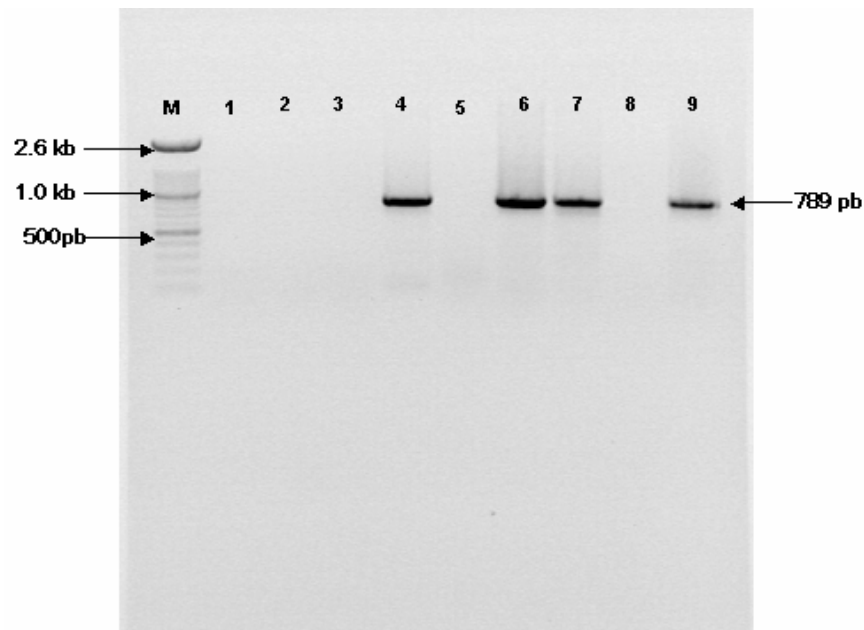
El mayor porcentaje de los aislados estudiados fue agrupado dentro del biotipo *g* con un 96.2% (51/53) y sólo un porcentaje minoritario de 3.7% (2/53) de los aislados fue asociado con el biotipo *a*; no se detectaron ninguno de los otros tres biotipos existentes.

Este resultado concuerda con lo publicado en la literatura, donde se dice que los biotipos *g* y *a* son los más comunes.<sup>15,35,43</sup>

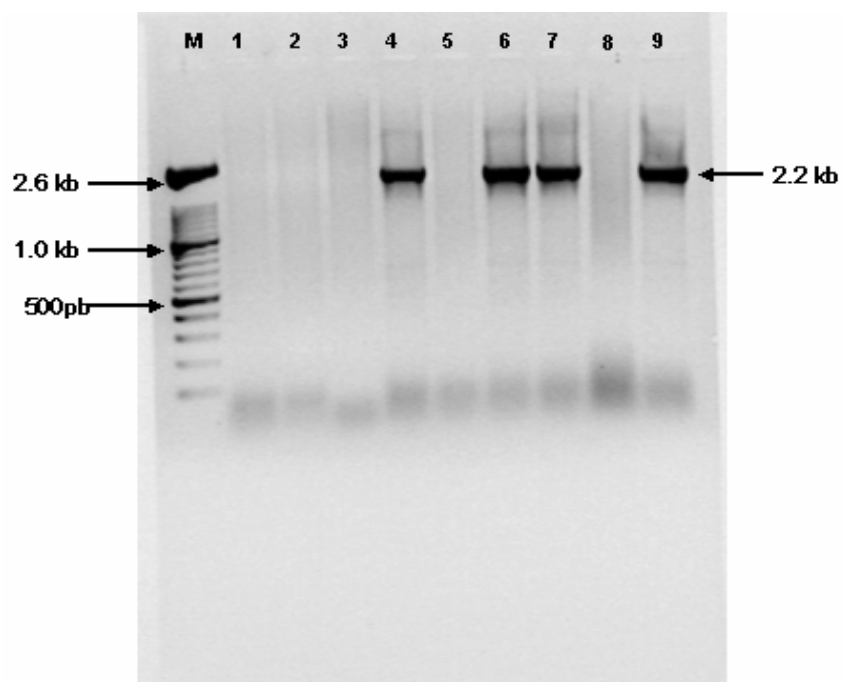
### 5.4 Detección de la integrasa e integron clase 1 y 2

El 75.5% (40 de 53) de las cepas de *S. sonnei* amplificaron tanto para el gen de la integrasa como para la región constante del integron clase 2 (Figuras 7 y 8) con un peso molecular de 789 pb y 2.2 Kb, respectivamente. Sólo en uno (1.8%) de los aislados se detectó el integron clase 1 (*S. sonnei* 5978 biotipo *a* aislada en 2002) (Tabla 5). En ninguna de las cepas estudiadas se identificaron ambos integrones.

Es importante mencionar que gran parte de las cepas de *S. sonnei* aisladas dentro del periodo 2003-2007 a excepción de dos cepas aisladas en el 2003 (Cepas 6979 y 7065) resultaron ser positivas para el integron clase 2.



**Figura 7.** Integrasa clase 2 en cepas de *Shigella* spp. Carril M: Marcador de peso molecular XIV (Roche Diagnostics, Indianápolis IN, USA); Carril1: *S. flexneri* 2975; Carril 2: *S. flexneri* 3023; Carril 3: *S. sonnei* 5223; Carril 4: *S. sonnei* 11402; Carril 5: *S. boydii* C 11465, Carril 6: *S. flexneri* 11569; Carril 7: *S. sonnei* 11642; Carril 8: *E. coli* 1150 *Int2*<sup>-</sup>; Carril 9: *E. coli* 1176 *Int2*<sup>+</sup>. Peso molecular 789 pb.



**Figura 8.** Integron clase 2 en cepas de *Shigella* spp. Carril M: Marcador de peso molecular XIV (Roche Diagnostics, Indianápolis IN, USA); Carril1: *S. flexneri* 2975; Carril 2: *S. flexneri* 3023; Carril 3: *S. sonnei* 5223; Carril 4: *S. sonnei* 11402; Carril 5: *S. boydii* C 11465, Carril 6: *S. flexneri* 11569; Carril 7: *S. sonnei* 11642; Carril 8: *E. coli* 1150 *Int2*<sup>-</sup>; Carril 9: *E. coli* 1176 *Int2*<sup>+</sup>. Peso molecular 2.2 kb.

**Tabla 5. Distribución de *S. sonnei* biotipo *g* y del integron clase 2 de los aislados clínicos obtenidos durante el periodo 1999-2007 en el INCMNSZ.**

| Año de aislamiento | No. de aislados | Presencia de                  | Biotipo (%)          |                  |
|--------------------|-----------------|-------------------------------|----------------------|------------------|
|                    |                 | <i>IntI2</i> e Integron 2 (%) | <i>a</i>             | <i>g</i>         |
| 1999               | 6               | 2 (33.3)                      | 0                    | 6 (100)          |
| 2000               | 2               | 0                             | 0                    | 2 (100)          |
| 2001               | 2               | 0                             | 0                    | 2 (100)          |
| 2002               | 4               | 1 (25)                        | 1 (25)               | 3 (75)           |
| 2003               | 12              | 10 (83.3)                     | 1 (8.3) <sup>b</sup> | 11 (91.6)        |
| 2004               | 8               | 8 (100)                       | 0                    | 8 (100)          |
| 2005               | 9               | 9 (100)                       | 0                    | 9 (100)          |
| 2006               | 4               | 4 (100)                       | 0                    | 4 (100)          |
| 2007               | 6               | 6 (100)                       | 0                    | 6 (100)          |
| <b>Total</b>       | <b>53</b>       | <b>40 (75.5)</b>              | <b>2 (3.7)</b>       | <b>51 (96.2)</b> |

<sup>a</sup> La cepa de *S. sonnei* 5978 biotipo *a*, aislada en el 2002 fue la única positiva para la integrasa e integron clase 1.

<sup>b</sup> La cepa de *S. sonnei* 7471 biotipo *a*, aislada en el 2003, amplificó tanto para la integrasa e integron clase 2.

## Discusión

Nuestros resultados muestran la presencia de *S. sonnei* gMR-Int2 en la población estudiada y confirman la emergencia y diseminación de esta cepa pandémica en nuestro medio. En concordancia a los reportes previos, incluyendo el trabajo realizado en el 2006 por Mammina *et al*,<sup>35</sup> observamos casos esporádicos de la presencia de *S. sonnei* gMR-Int2 a finales del los 90s, pero un claro establecimiento y diseminación de esta cepa pandémica desde principios del 2003. A partir de este año, todas las cepas mexicanas en estudio pueden ser consideradas como *S. sonnei* gMR-Int2.

Aunque el número de cepas consideradas en este estudio es limitado por lo que es posible subestimar la prevalencia real de *S. sonnei* gMR-Int2, al basarnos únicamente en aislados obtenidos del INCMNSZ, estos resultados muestran una clara tendencia de la circulación dentro de nuestra comunidad de una cepa de *S. sonnei* gMR-Int2.

Se ha reportado una incidencia baja de *Shigella* spp. en los pocos estudios llevados a cabo en adultos en países con desarrollo medio o bajo, incluyendo Latinoamérica. A pesar de que el INCMNSZ es un hospital de tercer nivel especializado en enfermedades de adultos y no de niños, población donde se ha realizado la gran mayoría de los estudios sobre la incidencia de *Shigella* spp., el porcentaje de aislamiento en este estudio fue del 1 % similar al reportado en Perú y Brasil, que fue de 2 al 3%.<sup>50</sup>

*S. sonnei* es la especie aislada con mayor frecuencia en países industrializados.<sup>13,24</sup> Nuestro estudio, en contraste a los datos de estos países (media de 15%), de las 85 cepas aisladas en el INCMNSZ dentro del periodo de 1999-2007 que fueron identificadas como *Shigella* spp., el 62.3% fue identificado como *S. sonnei*, mientras que *S. flexneri* se aisló sólo en un 29.4%. Sin embargo, en un estudio previo llevado a cabo por Guerrero *et al*.<sup>23</sup> en la ciudad de México en una población infantil se reportaron resultados similares para el aislamiento de *S. sonnei* (46%) y *S. flexneri* (43%). Este cambio de prevalencia en los serogrupos de *Shigella* en nuestro ambiente probablemente se debe a la circulación de la clona pandémica de *Shigella sonnei* gMR-Int2, como ya se ha demostrado en otras partes del mundo.

Con los resultados obtenidos en este estudio se confirma que, en nuestro medio, los agentes antimicrobianos de primera línea se han convertido en ineficaces y, como se muestra en la Tabla 3, a pesar de haber analizado un número pequeño de cepas por año, la alta resistencia se ha mantenido en la última década. Estos datos concuerdan con el hecho de que la resistencia antimicrobiana de *Shigella* spp., en especial de *S. sonnei*, es particularmente hacia antibióticos de primera línea tales como trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina y ampicilina, los cuales son usados comúnmente para el tratamiento de la shigellosis en todo el mundo por su bajo costo.<sup>17,24,30,54,55</sup> Además, nuestras cepas mostraron un fenotipo de susceptibilidad total a cloranfenicol (98%), lo que coincide con lo reportado por grupos europeos y del medio oriente,<sup>17,37,36,51</sup> donde han identificado y caracterizado la circulación de la cepa clonal de *S. sonnei* gMR-Int2, que posee una resistencia parcial a ampicilina (6 a 9%) y una susceptibilidad prácticamente completa a cloranfenicol (100 a 98%).

Nuestros resultados junto con los datos de los estudios previos, sugieren que el fenotipo cloranfenicol-susceptible de los aislados de *S. sonnei* gMR-Int2 podría ser considerado como un marcador característico de susceptibilidad de estas cepas para su identificación clonal, apoyando la hipótesis de la diseminación mundial de esta clona. En un estudio realizado en Corea,<sup>31</sup> se encontró que las cepas de *S. sonnei* (CHL-resistente, RHA-positiva) aisladas durante los inicios de los 80s, previo a la aparición de la cepa pandémica de *S. sonnei* gMR-Int2, sugiere que estas cepas poseían la facilidad para adquirir los genes que confieren la resistencia a cloranfenicol entre las diversas y heterogéneas clonas de *S. sonnei*. En contraste, ellos reportaron la presencia de cepas con una completa susceptibilidad a cloranfenicol y RHA negativa aisladas a partir de finales de la década de los 90s. Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos por varios grupos de investigadores,<sup>36,51,17</sup> y concuerdan con los nuestros, en el sentido de que prácticamente todas las cepas de *S. sonnei* gMR-Int2 aisladas en diversas partes del mundo desde inicios de este siglo presentan el fenotipo de cloranfenicol-susceptible.

Asimismo, se encontró un alto porcentaje de resistencia (60.3%) a cefalotina, una cefalosporina de 1ª generación, debido muy probablemente a que este fenotipo de resistencia es indicativo de la presencia de una enzima  $\beta$ -lactamasa del tipo TEM-1 que le confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas primarias, como se ha reportado entre especies de *Shigella*.<sup>7,17</sup>

En nuestro estudio, no se observó resistencia a las CEE, así como a las quinolonas evaluadas, estos datos concuerdan con un trabajo realizado por Calva *et al.*,<sup>8</sup> en el Departamento de Infectología del INCMNSZ, donde en un estudio de cohorte en niños sanos en una zona periurbana de la Ciudad de México identificaron el 1 % de *E coli* (usada como microorganismo centinela) resistente a fluoroquinolonas presentes en su microbiota intestinal. Además, el mismo grupo identificó el uso infrecuente (2%) de las quinolonas como opción terapéutica en esa comunidad.<sup>7,8</sup>

Es importante mencionar que el patrón de resistencia puede variar con respecto al país o ciudad de la que se hable, por lo cual para asegurar el tratamiento adecuado de la shigellosis y evitar la aparición de cepas de *S. sonnei* resistentes a CEE, como se ha reportado en algunas partes del mundo,<sup>4,5,17,23,27,54,55</sup> es necesario llevar a cabo una continua vigilancia de éstos y determinar cuáles son los agentes antimicrobianos que continúan siendo eficaces para el tratamiento de esta enfermedad.<sup>2</sup> El análisis hecho de la relación entre la presencia del integron clase 2 y los perfiles de resistencia a los agentes antimicrobianos estudiados, como se muestra en la Tabla 4, reveló que la presencia de estos elementos no puede ser asociada con un patrón de resistencia específico, es decir, no siempre las características de multiresistencia están relacionadas con la presencia de los integrones.<sup>41</sup>

Con respecto a la clasificación de *Shigella* spp. de acuerdo a su perfil de fermentación frente a tres carbohidratos, los datos obtenidos (Tabla 5) mostraron que el 96.2% de las cepas estudiadas fueron agrupadas dentro del biotipo *g*, y sólo el 3.7% fue identificado como biotipo *a*. Estos porcentajes concuerdan con reportes recientes de varias partes del mundo, en donde se ha observado que estos dos biotipos son los más comunes.<sup>35,40,43</sup>

La aparición de recientes reportes en algunas ciudades en Europa sobre la diseminación de una clona de *S. sonnei* gMR-Int2,<sup>15,36,40,46,51</sup> además de la falta de información en nuestro país de la existencia de este tipo de cepas, nos motivó a investigar y conocer las características que presentan las cepas de *S. sonnei* que circulan en nuestra ciudad.

Finalmente, hay reportes recientes en nuestro país sobre el aislamiento de *S. sonnei* tanto de alimentos<sup>10</sup> como de especímenes fecales,<sup>13,48,52</sup> aunque las cepas en estos estudios no fueron identificadas como gMR-Int2 estos datos muestran que el aislamiento de este microorganismo es frecuente en nuestro ambiente. Dichos datos, junto con reportes en la literatura de brotes ocasionados por *S. sonnei* con las características de gMR-Int2 en guarderías<sup>11</sup> y por consumo de productos frescos<sup>42</sup> (perejil cultivado en México), sugieren que el aislamiento de *S. sonnei* gMR-Int2 en nuestra área geográfica puede ser considerado un problema emergente de salud pública como consecuencia de la diseminación y circulación de esta cepa pandémica.



### **Conclusiones**

- Este es el primer estudio que reporta la presencia y circulación de la cepa de *S. sonnei* gMR-Int2 en nuestro país, apoyando la evidencia de la reciente diseminación de esta cepa clonal, ahora considerada por algunos investigadores como pandémica.
- Los datos obtenidos demuestran la alta resistencia a agentes antimicrobianos de primera línea utilizados comúnmente para el tratamiento de la shigellosis en nuestro medio, por lo tanto, ya no deberían ser considerados como de primera elección.
- La resistencia a los agentes antimicrobianos representa un reto terapéutico, que requiere de un programa de monitoreo continuo de los perfiles de resistencia de *Shigella* spp. a nivel nacional e internacional, a fin de controlar la diseminación de cepas resistentes de este microorganismo.
- La característica fenotípica de susceptibilidad a cloranfenicol podría ser considerada como un marcador adicional para la identificación, caracterización y diseminación de cepas de *S. sonnei* gMR-Int2.

### Referencias

1. Aarestrup M.F. **2006**. The origin, evolution, and local and global dissemination of antimicrobial resistance, p. 339-352. *En* Aarestrup M.F. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press. Washington DC, USA.
2. Aarestrup M.F. **2006**. Concluding remarks and future aspects: some personal views, p. 425-429. *En* Aarestrup M.F. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press. Washington D.C, USA.
3. Aarts J.M.H., Guerra B., Malorny B. **2006**. Molecular methods for detection of antibiotic resistance, p. 37-48. *En* Aarestrup M.F. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press. Washington DC, USA.
4. Acikgoz Z.C., Eser O.K., Kocagöz S. **2008**. CTX-M-3 type beta-lactamase producing *Shigella sonnei* isolates from pediatric bacillary dysentery cases. *Jpn J Infect Dis.* **61**:135-137.
5. Ahmed M.A., Furuta K., Shimomura K., Kasama Y. y Shimamoto T. **2006**. Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan. *J Med Microbiol.* **55**:1685-1691.
6. Boucher Y., Labbate M., Koenig E. J., Stokes W. H. **2007**. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in Microbiol.* **15**:301-309.
7. Bradford, P.A. **2001**. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* **14**:933-951.

8. Calva J.J., Osornio-Sifuentes J., Cerón C. **1996**. Antimicrobial resistance in fecal flora: longitudinal community-based surveillance of children from urban Mexico. *Antimicrob Agents Chemoth.* **40**:1699-1702.
9. Calva J.J. **1996**. Antibiotic use in a periurban community Mexico: A household and drugs store survey. *Soc Sci Med* **42**:1121-1128.
10. Castillo A., Villaruel-López A., Navarro-Hidalgo V., Martínez-González N.E., Torres-Vitela M.R. **2006**. *Salmonella* and *Shigella* in freshly squeezed orange juice, fresh oranges, and wiping cloths collected from public markets and street boots in Guadalajara, México: incidence and comparison of analytical routes. *J Food Prot.* **69**:2595-2599.
11. Centers for Disease Control and Prevention. **2004**. Day care-related outbreaks of rhamnose-negative *Shigella sonnei* six states, June 2001-March 2003. *Morb Mortal Wkly Rep.* **53**:60-63.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. **2006**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S-16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
13. Cortés-Ortiz A.I., Rodríguez-Ángeles G., Moreno-Escobar A.E., Tenorio-Lara J.M., Torres-Mazadiego B.P., Montiel-Vázquez E. **2002**. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Pública de México.* **44**; 297-302.
14. De Lappe N., Doran G., Connor O. J., Mammina C., Cormican M. **2006**. Use of pulsed-field gel electrophoresis for comparison of similar but distinguishable isolates of *Shigella sonnei* collected in Ireland and Italy. *J Clin Microbiol.* **44**: 3808-3810.
15. De Lappe N., O'Halloran F., Fanning S., Corbett-Feeney G., Cheasty T., Cormican M. **2003**. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from Western Ireland, an area of low incidence of infection. *J Clin Microbiol.* **41**:1919-1924.

16. De la Maza M.L, Pezzlo T. M, Shigei T. J, Peterson M. E. **2004**. Color Atlas of Medical Bacteriology, p. 83,84,92-94. ASM Press. Washington DC, USA.
17. Dubois V., Parizano P. M., Arpin C., Coulange L., Bezian C.M., Quentin C. **2007**. High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 1333-1340.
18. Estrategia Mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos, p. 11-59. **2001**. Organización Mundial de la Salud (OMS). Ginebra, Suiza.
19. Farmer III J.J. **2003**. Enterobacteriaceae. Introduction and identification, p. 636-653. *En* Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C. Manual of clinical microbiology. Vol 1. ASM Press. Washington DC, USA.
20. Fernández I. M. Sansonetti J. P. **2003**. Effector molecules of *Shigella* pathogenesis and host responses, p. 455-456. *En* Hecht A. G. Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell. ASM Press. Washington DC, USA.
21. Griffiths F.J.A., Gelbart M.W., Miller H.J., Lewontin C.R. **1999**. Genética moderna, p. 271-292. McGraw-Hill- Interamericana de España, S.A. España.
22. Guardabassi L., Courvalin P. **2006**. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance, p. 1-18. *En* Aarestrup M.F. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press. Washington DC, USA.
23. Guerrero, L., Calva, J.J., Morrow, A.L., Velazquez, F.R., Tuz-Dzib, F., Lopez-Vidal, Y., Ortega H., Arroyo H., Cleary T.G., Pickering L.K., Ruiz-Palacios G.M. **1994**. Asymptomatic *Shigella* infections in a cohort of Mexican children younger than two years of age. *Pediatr Infect Dis J.* **13**:597-602.

24. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1, p. 1-27. **2005**. World Health Organization (WHO). Geneva, Switzerland.
25. Hernández, C.A., Calvo V.A., Lobato S.E., Fernández F., Concheiro M., Amador T.J. **2008**. Infección por *Shigella* spp. en el Hospital de Getafe entre 2001 y 2006. *An Pediatr.* **68**:605-608.
26. Hrabák J., Empel J., Gniadkowski M., Halbhuber Z., Rébl K., Urbásková P. **2008**. CTX-M-15 producing *Shigella sonnei* strain from a Czech patient who traveled in Asia. *J Clin Microbiol.* **46**: 2147-2148.
27. Kim S., Kim J., Kang Y., Park Y., Lee B. **2004**. Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in members of the Genus *Shigella* in the Republic of Korea. *J Clin Microbiol.* **42**:5264-5269.
28. Koneman W. E, Allen S. D, Janda M. W, Schreckenberger P. C, Washington C. W. **1997**. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, p.172, 197-200. 5<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
29. Kotloff K. L., Winickoff J. P., Ivanoff B., Clemens J. D., Swerdlow D. L., Sansonetti P.J., Adak G. K., and Levine M. M.. **1999**. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull WHO*, **77**:651-666.
30. Kuo C.Y., Perera J., Carlos C., Tan B.H., Kumarasinghe G., So T., Van P.H., Chongthaleong A., Son J.H., Chiu C.H. **2008**. Antimicrobial susceptibility of *Shigella* isolates in eight Asian countries, 2001-2004. *J Microbiol Immunol Infect.* **41**:107-111.
31. Lee, J.C., Oh J.Y., Kim K.S., Jeong Y.W., Cho J.W., Park J.C., Seol S.Y. y Cho D.T. **2001**. Antimicrobial resistance of *Shigella sonnei* in Korea during the last two decades. *APMIS* **109**:228-234.

32. Levesque C., Pinché L., LaRose C., Roy H. P. **1995**. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**: 185-191.
33. Liu P. YF., Lau Y.J., Hu B.S., Shyr J.M., Shi Z.Y., Tsai W.S., Lin Y.H., Tseng C.Y. **1995**. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J of Clin. Microbiol.* **33**:1779-1783.
34. Madigan T.M., Martinko M.J., Parker J. **2004**. Brock. Biología de los microorganismos, p.279-301. 10ª Ed. Pearson Educación. España.
35. Mammina C., Aleo A., Romani C. y Nastasi A. **2006**. *Shigella sonnei* biotype *g* carrying class 2 integrons in southern Italy: a retrospective typing study by pulsed field gel electrophoresis. *BMC Infections Diseases.* **6**:117-121.
36. Mammina C., Pontello M., Dal Vecchio A., Nastasi A. **2005**. Identification of *Shigella sonnei* biotype *g* isolates carrying class 2 integrons in Italy (2001 to 2003). *J Clin Microbiol.* **43**:2467-2470.
37. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. **1995**. Principles and practice of infectious diseases, p. 2033-2039. 4<sup>th</sup> Ed. Churchill Livingstone. USA.
38. Mazel D., Dychinco B., Webb A.V., Davies J. **2000**. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 1568-1574.
39. Mazel D. **2006**. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Microbiol.***4**: 608-620.
40. McIver J. C., White A. P., Jones A. L., Karagiannis T., Harkness J., Marriott D., Rawlinson D. W. **2002**. Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype *g* carrying integrons. *J Clin Microbiol.* **40**: 1538-1540.

41. Moraga R., Santander E., Arias T., Méndez F. **2007**. Integrones y su relación con el fenotipo de resistencia en bacilos gramnegativos aislados en el Hospital Torres Galdames de Iquique, Chile Rev Chil Infect. **24**: 384-390.
42. Naimi T.S., Wicklund J.H., Olsen S.J., Krause G., Wells J.G., Bartkus J.M., Boxrud D.J., Sullivan M., Kassenborg H., Besser J.M., Mintz E.D., Osterholm M.T., Hedberg C.W. **2003**. Concurrent outbreaks of *Shigella sonnei* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections associated with parsley: implications for surveillance and control of foodborne illness. J Food Prot. **66**:535-541.
43. Nastasi A., Pignato S., Mammina C., Giammanco G. **1993**. rRNA gene restriction patterns and biotypes of *Shigella sonnei*. Epidemiol Infect. **110**:23-30.
44. Niyogi K. S. **2005**. Shigellosis. The J. of Microbiol. **43**:133-143.
45. Niyogi k. S. **2007**. Increasing antimicrobial resistance – an emerging problem in the treatment of shigellosis. Clin Microbiol Infect. **13**: 1141-1143.
46. Oh Y. J., Yu S. H., Kim K. S., Seol Y. S., Cho T. D., Lee C. J. **2003**. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* Isolates from Southwestern Korea during epidemic periods. J Clin Microbiol. **41**: 421-423.
47. Pan C. J., Ye R., Meng M-D., Zhang W., Wang Q-H., Liu Z-K. **2006**. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationship to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. J Antimicrob Chemother. **58**: 288-296.
48. Paniagua G.L., Monroy E., García-González O., Alonso J., Negrete E., Vaca S. **2007**. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. Annals Clin Microbiol Antimicrob. **6**:17.

49. Ploy M-C, Denis F., Courvalin P., Lambert T. **2000**. Molecular characterization of integron in *Acinetobacter baumannii*: description of hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 2684-2688.
50. Ram P.K., Crump J.A., Gupta S.K., Miller M.A., Mintz E.D. **2008**. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol. Infect.* **136**: 577-603.
51. Ranjbar R., Aleo A., Giammanco G.M, Dionisi A. Ma., Sadeghifard N. y Mammina C. **2007**. Genetic relatedness among isolates of *Shigella sonnei* carrying class 2 integrons in Teheran, Iran, 2002-2003. *BMC Infections Diseases.* **7**:62-67.
52. Scerpella E.G., Mathewson J.J., DuPont H.L., Marani S.K., Ericsson C.D. **1994**. *Shigella sonnei* strains isolated from U.S. summer students in Guadalajara, Mexico, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol.* **32**:2549-2552.
53. Schwarz S., Cloeckert A., Roberts C.M. **2006**. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents, p. 73-98. *En Aarestrup M.F. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* ASM Press. Washington DC, USA.
54. Sire J.M., Macondo E.A., Terrier-Gros-Claude J.D., Siby T., Bahsoun I., Seck A., Garin B. **2008**. Antimicrobial resistance in *Shigella* species isolated in Dakar, Senegal (2004-2006). *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**: 307-309.
55. Sivapalasingam S., Nelson J.M., Joyce K., Hoekstra M., Angulo F.J., Mintz E.D. **2006**. High prevalence of antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the United States tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002. *Antimicrob Agents and Chemother.* **50**:49-54.
56. Sur D., Ramamurthy T., Deen J., Bhattacharya S.K., **2004**. Shigellosis: challenges and management issues. *Indian J. Med Res.* **120**: 454-462.



- 57.** Von Seidlen L., Kim D.R., Ali M., Lee H., Wang X.Y., Thiem V.D., Canh D.G., Chaicumpa W., Agtini M.D., Hossain A., Bhutta Z.A., Manson C., Sethabutr O., Talukder K., Nair G.B., Deen J.L., Kotloff K., Clemens J. **2006.** A Multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six asian countries: disease burden, clinical manifestation, and microbiology. *PloS Medicine*. **3**:1556-1569.
- 58.** White A.P., Mclver J.C., Rawlinson D. W. **2001.** Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**:2658-2661.
- 59.** White A.P., Mclver J.C., Rawlinson D. W. **2000.** Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfp A17*. *FEMS Microbiol Lett*. 265-269.