



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**“Dinámica de la resistencia a Trimetoprim
en cepas de *Shigella sonnei* aisladas en Chile
entre los años 1995-2013”**

Alfonso Nicolás Miranda Athens

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

Directora de Tesis

Dra. Cecilia Toro U.
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Patrocinante

Dra. Daniela Seelenfreund H.
Depto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile
Diciembre 2015

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiado por el proyecto FONDECYT 1130394 dirigido por la Dra. Cecilia Toro U.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre María Soledad, por todo, especialmente por incentivar el gusto por las ciencias biológicas.

A mi familia, en especial a mi hermana Francisca, a mis abuelos Ethna y Ovidio, a mi padre Bernardo y mi cuñado Leonardo, por el apoyo y ánimo brindados.

A mi profesora guía, Cecilia Toro, por las enseñanzas y gran paciencia que tuvo en la realización de esta memoria, sobre todo en el proceso de escritura.

Al profesor Juan Carlos Salazar, por su buena disposición para ayudarme cuando fue necesario.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, Karin, Bárbara, Tania, Paty y Thomas por hacer de la experiencia en el laboratorio más que sólo trabajo.

Al profesor Felipe del Canto y a Mirka Pardo, por su ayuda en las distintas etapas de la realización de este trabajo.

A los amigos de la U, Eduardo, Alejandro, Mel, Chahín, Leiva, Matías, María, Fernanda, Nicolás, Pinedo, Gonzalo, Ignacio, Noni, Mabel, Paula y Bárbara por su alegría, tiempo y experiencias compartidas durante toda la carrera.

Y finalmente a mis amigos Cristóbal, Renzo, Benjamín, Marcelo, Alfonso, Jesús y Camilo, por su especial ayuda y apoyo para lograr terminar este trabajo.

A todos, muchas muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Tabla de Contenidos	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	iv
Abreviaturas	v
Resumen	vi
Abstract	viii
I. Introducción	1
1. Shigelosis.....	1
2. Resistencia a antimicrobianos.....	3
3. Resistencia a trimetoprim.....	4
II. Hipótesis	9
III. Objetivo General	9
IV. Objetivos Específicos	9
V. Materiales y Métodos	10
1. Cepas, medios de cultivo y extracción de ADN.....	10
1.1 Cepas bacterianas.....	10
1.2 Medios de cultivo.....	10
1.3 Extracción de ADN genómico y plasmidial.....	11
2. Detección de genes de resistencia a Tmp.....	11
2.1 Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
2.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	13
3. Clonamiento de determinantes de resistencia a Tmp.....	14
3.1 Digestión de ADNg.....	14
3.2 Purificación de las fracciones de ADNg digerido.....	15
3.3 Ligación de fragmentos de ADNg digeridos a un vector de clonamiento.....	15
3.4 Preparación de células electrocompetentes.....	16
3.5 Transformación y obtención de una genoteca.....	16
4. Identificación de determinantes de resistencia a Tmp.....	17
4.1. Secuenciación por <i>primer-walking</i>	17
4.2. Análisis <i>in silico</i>	18

4.3.	Recircularización del plásmido identificado.....	18
5.	Determinación del patrón de susceptibilidad a antimicrobianos.....	19
5.1.	Antibiograma.....	19
VI.	Resultados	20
1.	Determinación de la presencia de genes de resistencia a Tmp más frecuentes en Chile, en cepas de <i>Shigella sonnei</i> resistentes a este antibiótico.....	20
1.1	Presencia y distribución de genes <i>dfrA1</i> y <i>dfrA8</i>	20
2.	Identificación de genes de resistencia a Tmp presentes en cepas resistentes de <i>Shigella sonnei</i> aisladas de pacientes en Chile durante el período 2008-2009.....	22
2.1	Obtención de una genoteca de <i>Shigella sonnei</i> Tmp ^R	22
2.2	Confirmación y aislamiento del plásmido recombinante.....	25
2.3	Identificación del gen de resistencia a Tmp por secuenciación.....	26
3.	Distribución del gen <i>dfrA14</i> en cepas resistentes de <i>Shigella sonnei</i> aisladas de pacientes en Chile entre los años 1995 y 2013.....	27
3.1	Presencia y distribución del gen de resistencia a Tmp <i>dfrA14</i>	27
3.2	Localización del gen de resistencia a Tmp <i>dfrA14</i>	29
4.	Caracterización del elemento genético que confiere resistencia a Tmp en cepas de <i>Shigella sonnei</i> aisladas en Chile entre los años 2008 y 2009.....	30
4.1.	Reconstitución del plásmido de <i>Shigella sonnei</i> que contiene el gen <i>dfrA14</i>	30
4.2.	Caracterización del perfil de susceptibilidad conferido por el plásmido pABC-3.....	32
VII.	Discusión	34
1.	Identificación de un nuevo determinante de resistencia para Tmp en Chile, <i>dfrA14</i>	34
2.	Distribución de genes de resistencia a Tmp.....	35
3.	Identificación de un plásmido de <i>Shigella sonnei</i> que contiene el gen <i>dfrA14</i>	39
4.	Posible procedencia del plásmido pABC-3.....	41
VIII.	Conclusiones	44
IX.	Bibliografía	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Trimetoprim y Dihidrofolato reductasa.....	5
Figura 2. Detección mediante PCR de genes <i>dfrA1</i> y <i>dfrA8</i> en cepas de <i>Shigella sonnei</i> Tmp ^R aisladas en Chile entre los años 1995 y 2013.....	20
Figura 3. Genoteca construida a partir de una cepa de <i>Shigella sonnei</i> Tmp ^R	24
Figura 4. Identificación de un clon Tmp ^R	25
Figura 5. Aislamiento y confirmación del plásmido recombinante que confiere resistencia a Tmp.....	26
Figura 6. Detección mediante PCR del <i>cassette</i> genético <i>dfrA14</i> en cepas representativas de <i>Shigella sonnei</i> Tmp ^R aisladas en Chile entre los años 1995 y 2013... ..	28
Figura 7. Distribución de los tres determinantes genéticos de resistencia a Tmp, <i>dfrA1</i> , <i>dfrA8</i> y <i>dfrA14</i> , detectados en cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas en Chile entre los años 1995 y 2013.....	29
Figura 8. Esquema de amplificación por PCR del contexto genético del <i>cassette dfrA14</i>	30
Figura 9. Digestión enzimática del plásmido que confiere resistencia a Tmp.....	31
Figura 10. Esquema comparativo de los plásmidos pABC-3 y pCERC1.....	32
Figura 11. Comparación de plásmidos que contienen el <i>cluster</i> de resistencia <i>sul2 strA-dfrA14-strA strB</i>	40
Figura 12. Comparación de plásmidos de <i>Shigella</i> similares a pABC-3.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Genes transferibles de resistencia a Tmp en bacterias Gram-negativo.....	6
Tabla 2.	Distribución zonal y temporal de cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas en Chile.....	10
Tabla 3.	Partidores para PCR.....	13
Tabla 4.	Partidores utilizados para secuenciación por <i>primer-walking</i>	18
Tabla 5.	Distribución de los determinantes genéticos de resistencia a Tmp más frecuentes en Chile.....	21
Tabla 6.	Antibiograma de los clones Tmp ^R obtenidos.....	33

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ADNp	ADN plasmidial
Amp	Ampicilina
Amp ^R	Resistente a ampicilina
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato reductasa
LB	Medio Luria-Bertani
Nal	Ácido nalidíxico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SxT	Cotrimoxazol
THF	Tetrahidrofolato
Tmp	Trimetoprim
Tmp ^R	Resistente a trimetoprim

RESUMEN

La shigelosis es una infección intestinal aguda causada por bacterias del género *Shigella*, cuyos síntomas varían desde diarrea acuosa hasta disentería bacilar inflamatoria grave. *Shigella* es un patógeno cuyo único hospedero es el humano, presenta una muy baja dosis infectiva (solo 10 organismos viables pueden producir enfermedad) y se contagia principalmente por vía fecal-oral. Esta bacteria permanece dentro de las cuatro principales causas de diarrea moderada-grave en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo, predominando el serogrupo *S. flexneri*, a diferencia de nuestro país donde predomina el serogrupo *S. sonnei*. Con el transcurso del tiempo, *Shigella* ha sido capaz de adquirir rápidamente diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos utilizados en su tratamiento, lo que genera la necesidad de conocer el patrón de susceptibilidad que presenta este patógeno antes de comenzar la terapia. Uno de los antibióticos utilizados en su tratamiento es el trimetoprim (Tmp), el cual inhibe la actividad de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). La resistencia a este antibiótico se genera principalmente por la adquisición de genes *dfr* que codifican para una enzima DHFR resistente a Tmp. En nuestro país, la resistencia a Tmp en cepas de *S. sonnei* aisladas entre los años 1995 y 1997 se atribuye principalmente a la presencia de los genes *dfrA1* y *dfrA8*, pero en un brote de *S. sonnei* surgido en los años 2008 y 2009, esta resistencia se debe a otro mecanismo no identificado. Además, la mayoría de las cepas de *S. sonnei* aisladas después del brote, presentan resistencia a Tmp pero su mecanismo de resistencia no ha sido estudiado.

Debido a esto, en el presente trabajo se propuso determinar el mecanismo de resistencia a trimetoprim y evaluar su distribución en cepas de *S. sonnei* aisladas en

nuestro país entre los años 1995 y 2013. Este mecanismo de resistencia se identificó mediante el uso de una genoteca construida con el ADN de una cepa de *S. sonnei* resistente a Tmp, revelando mediante secuenciación, un *cassette* genético que incluye al gen *dfrA14* como responsable de la resistencia a este antibiótico. Posteriormente, se determinó la distribución del gen *dfrA14* y de los genes previamente descritos *dfrA1* y *dfrA8* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las cepas aisladas entre los años 1995 y 2013. De esta forma, se obtuvo que entre los años 1995-1997 y 2004-2006 predominó *dfrA8*, en tanto que el 100% de las cepas aisladas durante el brote 2008-2009 presentaron *dfrA14*. Posteriormente, en los años 2010-2011 se detectó la presencia de *dfrA1* y *dfrA14* en proporciones similares y luego en el 2012-2013 reapareció además *dfrA8*. Adicionalmente, se determinó que la totalidad de las cepas que presentan *dfrA14*, lo hacen en el contexto genético de un plásmido de 6779 pb, capaz de otorgar resistencia a cotrimoxazol (mezcla de Tmp y sulfonamidas), denominado pABC-3. Este plásmido es prácticamente idéntico a un plásmido de *E. coli* denominado pCERC1, salvo por la ausencia de una repetición de 11 pb en su secuencia. También es similar a otros plásmidos presentes en *Shigella*, cuya principal diferencia es la ausencia de *dfrA14*. Esto sugiere dos posibles orígenes del pABC-3: uno es la adquisición del plásmido desde una *E. coli* y el otro es la inserción del *cassette* que contiene *dfrA14* en los plásmidos presentes en *Shigella*.

En conclusión, en el presente trabajo se describe que la resistencia a Tmp en cepas de *S. sonnei* aisladas en nuestro país se debe mayoritariamente a la presencia de los genes *dfrA1*, *dfrA8* y *dfrA14* y que este último se encuentra en el contexto genético del plásmido pABC-3, confiriendo resistencia a Tmp a la mayoría de las cepas de *S. sonnei* aisladas en nuestro país desde el año 2004 hasta 2013.

ABSTRACT

Dynamic of trimethoprim resistance in *Shigella sonnei* strains isolated in Chile between 1995 and 2013

Shigellosis is an acute intestinal infection caused by bacterial genus *Shigella*. Its symptoms vary from watery diarrhea to severe inflammatory bacillary dysentery. *Shigella*, a strictly human-pathogen, has a very low infectious dose (10 bacterial cells can produce illness) and is transmitted via faecal-oral. This pathogen affects mainly children under 5 years in developing countries, where *S. flexneri* is the most important serogroup, while in Chile *S. sonnei* is the prevalent serogroup. The use of antibiotics against *Shigella* is the first line therapy, however lately the acquisition of resistance mechanisms has increased. Therefore, antimicrobial susceptibility profiles are required before starting any treatment. Trimethoprim (Tmp), one of selected antibiotics against this pathogen, inhibits the activity of the dihydrofolate reductase enzyme (DHFR). Tmp-resistant (Tmp^R) bacteria are mainly due to acquisition of *dfr* genes, coding for DHFR enzymes. *S. sonnei* strains isolated in Chile between 1995 and 1997 showed the presence of *dfrA1* and *dfrA8* genes, but the mechanism of Tmp-resistance in a later outbreak (2008-2009) is unknown. The majority of *S. sonnei* strains isolated after the outbreak are Tmp^R, but their resistance mechanism has not been studied yet.

The general aim of this study was to identify the genetic marker responsible of the Tmp resistance mechanism in *S. sonnei* strains isolated between 1995 and 2013. A DNA library was obtained from a representative Tmp^R *S. sonnei* strain from the outbreak and a recombinant *E. coli* Tmp^R was isolated. Further, the sequenced clone was identified as harbouring the *dfrA14* gene. We evaluated the distribution of the

dfrA14 gene and the previously described genes, *dfrA1* and *dfrA8* in a laboratory collection of *S. sonnei* from 1995 – 2013. The results show that within periods 1995-1997 and 2004-2006 the *dfrA8* gene was the most prevalent, while 100% of the isolated strains during the 2008-2009 outbreak present the *dfrA14* gene. Later, between 2010 and 2011 *dfrA1* and *dfrA14* were detected in similar proportions, and then, between 2012 and 2013 *dfrA8* reappeared. In addition, it was determined that the *dfrA14* gene is harboured in a 6779 bp plasmid, named pABC-3, which confers cotrimoxazole resistance. This plasmid is nearly identical to the pCERC1 plasmid isolated from *E. coli*, except for an 11 bp sequence missing in pABC-3, and similar to other *Shigella* plasmids, without the insertion of the *dfrA14* gene cassette. This suggests two possible origins for the pABC-3 plasmid. One of them is the acquisition of the whole plasmid from *E. coli* and the other is the insertion of the *dfrA14* gene cassette into a *Shigella dfrA14*-less plasmid.

In conclusion, the present study showed that Tmp resistance in *S. sonnei* strains isolated in Chile is mainly due to the presence of the *dfrA1*, *dfrA8* and *dfrA14* genes. This last gene is found inside the pABC-3 plasmid conferring Tmp resistance to the majority of *S. sonnei* strains isolated between years 2004 and 2013 in our country.

I. INTRODUCCIÓN

1. Shigelosis

La shigelosis es una infección intestinal aguda, cuyos síntomas varían desde diarrea acuosa hasta disentería bacilar inflamatoria grave, caracterizada por dolor abdominal, fiebre y deposiciones con sangre y mucus (Schroeder y Hilbi, 2008). Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Shigella*, originalmente aisladas por Kiyoshi Shiga en 1896. Son bacilos Gram-negativo pequeños, no encapsulados, anaerobios facultativos, no móviles y no formadores de esporas. Este género bacteriano fue establecido como tal en 1930, pertenece a la tribu *Escherichia* de la familia *Enterobacteriaceae*, pero actualmente puede ser considerado parte del mismo patotipo que las *Escherichia coli* enteroinvasivas, ya que presentan similitud bioquímica y el mismo mecanismo de patogenicidad (Croxen y Finlay, 2010). Dependiendo de diferencias en el antígeno O y reacciones bioquímicas, *Shigella* se divide en cuatro serogrupos, *S. dysenteriae* (serogrupo A con 13 serotipos), *S. flexneri* (serogrupo B con 15 serotipos), *S. boydii* (serogrupo C con 18 serotipos) y *S. sonnei* (serogrupo D con 1 solo serotipo). De estos cuatro serogrupos, *S. sonnei* es la más diferenciada fisiológicamente, porque presenta reacciones β -D-galactosidasa y ornitina descarboxilasa positivas (Niyogi, 2005).

Para este patógeno el humano es el único hospedero natural. Su contagio se produce principalmente por la vía fecal-oral y presenta una dosis infectiva particularmente baja, siendo necesaria la ingesta de tan sólo 10 organismos viables para producir la enfermedad (DuPont *et al.*, 1989). Debido a la baja dosis infectiva y otros factores, las infecciones por *Shigella* son más frecuentes en países en vías de desarrollo (Kotloff *et al.*, 1999).

En el mundo ocurren anualmente cerca de 165 millones de casos de shigelosis, de los cuales, 163 millones ocurren en países en vías de desarrollo donde predomina el serogrupo *S. flexneri* y 1,5 millones en países industrializados donde predomina el serogrupo *S. sonnei*. Del total de casos, 1,1 millones resultan en muerte, afectando mayoritariamente (61%) a niños menores de 5 años (Kotloff *et al.*, 1999). Actualmente, se ha descrito que en países en desarrollo, *Shigella* es el cuarto agente etiológico más frecuente en los casos de diarrea moderada-grave en infantes (0-11 meses de edad), segundo en niños pequeños (12-23 meses de edad) y primero en niños de 24 a 59 meses de edad). Además, *Shigella* spp. fue frecuentemente aislada en casos de disentería con el 16,6% de los casos en infantes, 66% de los casos en niños pequeños y 78,4% de los casos en niños de hasta 5 años (Kotloff *et al.*, 2013).

Los datos disponibles en Chile son más bien antiguos e indican que la incidencia de shigelosis alcanza un 22% de los casos de disentería y un 5,4% de los casos de diarrea no asociados a disentería, predominando los serogrupos *S. sonnei* y *S. flexneri* en casi igual proporción (Prado *et al.*, 1999).

La gravedad de la enfermedad está determinada principalmente por el serogrupo de *Shigella* que infecte al hospedero, pero el tratamiento con antibióticos ha demostrado efectividad en disminuir el tiempo de duración de los signos de la enfermedad (fiebre y diarrea) y aparentemente también reduce el riesgo de complicaciones letales. Además de esto, disminuye la excreción del patógeno, por lo que disminuye también su diseminación (Ashkenazi *et al.*, 2003). Sin embargo, *Shigella* ha sido capaz de adquirir resistencia a los diversos antibióticos utilizados en su tratamiento, por lo que es necesario tener claro los patrones de resistencia, antes de comenzar la terapia. Inicialmente, se utilizaron sulfonamidas como antibióticos de tratamiento, hasta que en

Japón en 1940 se describieron cepas de *Shigella* resistentes. Luego, se aislaron cepas resistentes a tetraciclina y cloranfenicol, por lo que se comenzó a utilizar ampicilina (Amp) como tratamiento hasta la aparición de cepas resistentes en 1980. Posteriormente, se eligió el tratamiento con cotrimoxazol (mezcla de sulfametoxazol y trimetoprim, Tmp) hasta que a mediados de la década de 1980 surge un alto nivel de resistencia (Niyogi, 2007). El rápido surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos usados, dificulta el establecimiento de una terapia definida. Esto se debe principalmente a la adquisición de genes de resistencia a antibióticos asociados a elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, integrones e islas genómicas (Vrints *et al.*, 2009).

2. Resistencia a antimicrobianos

Para comprender cómo una bacteria se defiende de un agente antimicrobiano es necesario conocer el mecanismo de acción de los distintos tipos de antibióticos. Según este parámetro, es posible agruparlos en cuatro grandes grupos: (A) interferencia de la síntesis de pared celular, (B) inhibición de la síntesis de proteínas, (C) interferencia de la síntesis de ácidos nucleicos y (D) inhibición de una vía metabólica (Tenover, 2006). Por otro lado, las bacterias generan resistencia a los diferentes antibióticos mediante: (A) la inactivación del fármaco con enzimas que lo modifican (β -lactamasas, acetilasas, adenilasas, fosforilasas); (B) restricción del acceso al sitio blanco del fármaco por reducción en la permeabilidad de la pared bacteriana y la membrana citoplasmática; (C) cambio en el sitio blanco del fármaco, evitando la unión a él; (D) la evasión del metabolismo del fármaco y (E) el desarrollo de tolerancia (McManus, 1997). Genéticamente, estos mecanismos pueden ser intrínsecos de una bacteria (siendo

esta resistencia común para todo el género bacteriano en cuestión) o adquiridos. Las bacterias pueden adquirir resistencia a un agente antimicrobiano por mutaciones en su cromosoma, como es el caso de *Haemophilus influenzae*, que por mutación en el gen *folH*, que codifica para la enzima dihidrofolato reductasa intrínseca (DHFR), adquiere resistencia a Tmp (de Groot, 1996). Por otro lado, las bacterias pueden adquirir resistencia por incorporación de nuevo material genético mediante 3 diferentes procesos. Éstos son conjugación, transducción y transformación. En el primero, se transfiere un plásmido conjugativo que porta genes de resistencia a una bacteria receptora, a través del pilus sexual. En el segundo, los genes de resistencia de origen cromosomal o plasmidial pueden ser transferidos a una bacteria receptora mediante un bacteriófago. En el tercer proceso, la bacteria receptora incorpora ADN que se encuentre libre cerca de ella, como por ejemplo cuando hay en su entorno fragmentos de material genético que quedan después de una lisis celular (McManus, 1997).

3. Resistencia a Trimetoprim

El antibiótico Tmp es un inhibidor competitivo de la enzima DHFR, debido a que presenta similitud estructural (**Fig. 1A**) con una parte de la molécula 5,6-dihidrofolato, la cual es el sustrato de la enzima DHFR (Capasso y Sapuran, 2014). Esta enzima es esencial para todas las células vivas, cataliza la reducción NADPH-dependiente de 5,6-DHF a 5,6,7,8-Tetrahidrofolato (THF) y lo mantiene a niveles fisiológicos (**Fig. 1B**). Se requiere 5,6,7,8-THF para la biosíntesis de timidilato, purinas y los aminoácidos metionina y glicina (Hartman, 1993).

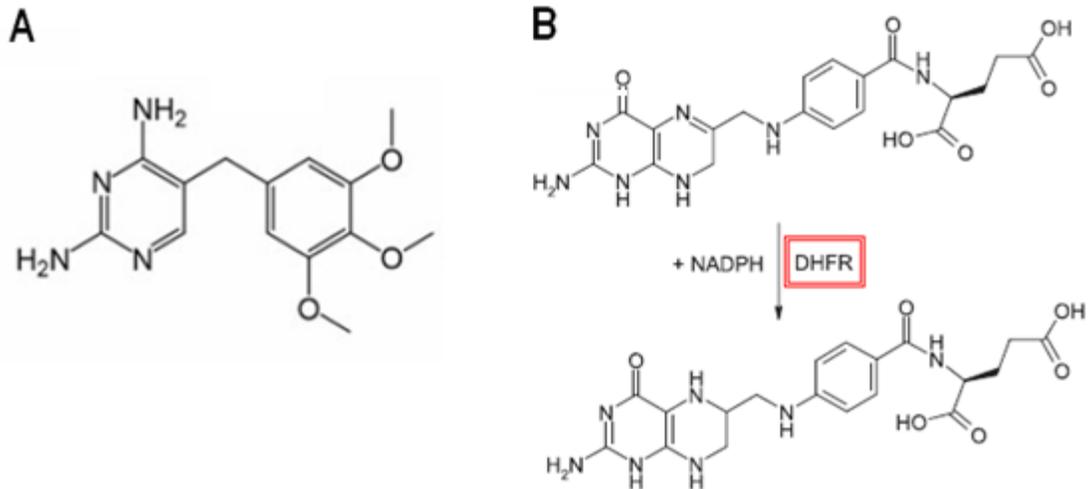


Figura 1. Trimetoprim y Dihidrofolato reductasa (A) Estructura del antibiótico trimetoprim. **(B)** Reacción catalizada por la enzima dihidrofolato reductasa, que reduce el dihidrofolato a tetrahidrofolato. (Modificada de Capasso y Sapuran, 2014).

La DHFR humana es intrínsecamente resistente a Tmp, lo que otorga selectividad y permite su uso como tratamiento en pacientes (Huovinen *et al.*, 1995).

Como se mencionó anteriormente, existen varios mecanismos de resistencia a antimicrobianos y la resistencia a Tmp está determinada por algunos de ellos. Por ejemplo, se ha descrito que la expresión de un sistema de bomba de expulsión de drogas es responsable de conferir resistencia a Tmp y sulfametoxazol en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Köhler *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha observado que la presencia de mutaciones tanto en la región promotora como en la región codificante del gen *folH* en *H. influenzae*, confiere resistencia a Tmp (de Groot *et al.*, 1996), debido a la sobreexpresión de la enzima DHFR y a la disminución de la afinidad entre la enzima y Tmp (de Groot *et al.*, 1991). Sin embargo, el principal mecanismo de resistencia a Tmp que presentan las bacterias Gram-negativo es la adquisición por transferencia horizontal de genes *dfp* o *dhfr*, que codifican enzimas DHFR resistentes a Tmp (Huovinen, 2001). La resistencia a este antibiótico en *Shigella* aparece y comienza a

aumentar rápidamente alrededor del año 1980. Esto ocurre principalmente por la diseminación de genes *dfr* (Huovinen *et al.*, 1995). Se ha descrito una amplia variedad de genes *dfr*, algunos de éstos se resumen en la **Tabla 1** (modificada de White y Rawlinson, 2001), donde se muestra también cuáles de ellos forman parte de un *cassette* genético (pequeño elemento genético móvil).

Tabla 1. Genes transferibles de resistencia a Tmp en bacterias Gram-negativo

Gen	Cassette	Enzima	Familia enzimática	Tamaño enzima (aa)	Número de Acceso
<i>dfrA1</i>	Sí	DHFR I	1	157	X00926
<i>dfrA3</i>	No	DHFR III	1	162	P12833
ND (*)	ND	DHFR IIIb	ND	ND	ND
ND	ND	DHFR IV	ND	ND	ND
<i>dfrA5</i>	Sí	DHFR V	1	157	X12868
<i>dfrA6</i>	Sí	DHFR VI	1	157	Z86002
<i>dfrA7</i>	Sí	DHFR VII	1	157	X58425
<i>dfrA8</i>	No	DHFR IIIc/ DHFR VIII (**)	1	169	U09273/ U10186
<i>dfrA9</i>	No	DHFR IX	1	177	X57730
<i>dfrA10</i>	No	DHFR X	1	187	M69220
<i>dfrA12</i>	Sí	DHFR XII	3	165	Z21672
<i>dfrA13</i>	Sí	DGFR XIII	3	165	Z50802
<i>dfrA14</i>	Sí	DHFR Ib	1	157	Z50804
<i>dfrA15</i>	Sí	DHFR XV	1	157	Z83311
<i>dfrA15b</i>	Sí	DHFR XVb	1	157	AF156486
<i>dfrA16</i>	Sí	DHFR XVI	1	157	AF077008
<i>dfrA16b</i>	Sí	DHFR XVb		157	AJ131405
<i>dfrA17</i>	Sí	DHFR VII	1	157	AF169041
<i>dfrB1</i>	Sí	DHFR IIa	2	78	U36276
<i>dfrB2</i>	Sí	DHFR IIb	2	78	J01773
<i>dfrB3</i>	Sí	DHFR IIc	2	78	X72585

(*) ND: no determinado. (**) DHFR IIIc y DHFR VIII son enzimas idénticas.

Además, se ha determinado que estos genes pueden estar ubicados tanto a nivel cromosomal como a nivel plasmidial (Huovinen *et al.*, 1995). De ellos, el más común entre las bacterias Gram-negativo es el gen *dfrA1*, el cual se encuentra en el contexto

de un integrón clase 2, junto a otros dos genes de resistencia (*sat2* y *aadA1*, confiriendo resistencia a estreptotricina y estreptomycinina, respectivamente) (Ramírez *et al.*, 2010). Se ha descrito que en Finlandia un 85% de las cepas de *S. sonnei* y *S. flexneri* resistentes a Tmp (Tmp^R) aisladas entre 1975-1988 presentan el gen *dfrA1* (Heikkilä *et al.*, 1990). De la misma forma, en Corea del Sur se determinó que todas las cepas de *S. sonnei* aisladas durante un período epidémico entre 1998-2000 presentaban un integrón clase 2 y el gen *dfrA1* asociado a éste. Las cepas aisladas en 1999 presentaban también un integrón de clase 1 (Oh *et al.*, 2003). En Australia, se observó que cepas de *S. sonnei* aisladas entre 1997-2000 Tmp^R presentaban un integrón clase 2 y el gen *dfrA1*, mientras que sólo 2 aislados presentaban un integrón de clase 1 (McIver *et al.*, 2002).

En nuestro país, se ha descrito la presencia mayoritaria del gen *dfrA8* entre las cepas de *S. sonnei* aisladas entre los años 1995-1997 (el cual tiene origen tanto plasmidial como cromosomal), mientras que el gen *dfrA1* no se encontró. Por el contrario, en *S. flexneri* la presencia del gen *dfrA8* fue baja en comparación al gen *dfrA1* con una frecuencia mayor al 80%. De la misma forma, se detectó el integrón clase 2 solo en cepas de *S. flexneri*, mientras que el integrón clase 1 fue encontrado en ambos serogrupos (Toro *et al.*, 2005).

La cantidad de cepas de *S. sonnei* resistentes a cotrimoxazol (Tmp-sulfametoxazol) en Chile entre los años 1995 y 2006 no tuvo gran variación (50% y 46%, respectivamente) (Marcoleta *et al.*, 2013), pero con la aparición de un brote de *S. sonnei* entre los años 2008 y 2009 (ISP, Informe de brotes, 2009) la frecuencia de cepas resistentes subió a un 100% (Marcoleta *et al.*, 2013). Además, resultados no publicados de nuestro laboratorio muestran que sin considerar las cepas del brote, se

ha visto un nivel creciente de cepas de *S. sonnei* Tmp^R aisladas desde 1995 hasta 2013.

Los resultados preliminares de la búsqueda de los genes de resistencia a Tmp *dfrA1* y *dfrA8*, previamente descritos en nuestro país, en las cepas de *S. sonnei* pertenecientes al brote del período 2008-2009, indicaron que ninguna de las cepas hasta ahora estudiadas presentan el gen *dfrA1* ni tampoco el gen *dfrA8*, concordando con la relación clonal descrita entre estas cepas (Ladino, 2013). Este resultado sugiere que el o los clones que dieron origen al brote surgido entre 2008 y 2009 presentan otros genes de resistencia a Tmp y que éstos no han sido descritos en Chile. Adicionalmente, resultados obtenidos por nuestro laboratorio indican que algunas de las cepas de *S. sonnei* aisladas en períodos posteriores al brote (2010-2011 y 2012-2013) mantienen una estrecha relación genética con las cepas del brote surgido entre 2008 y 2009.

II. HIPÓTESIS

Teniendo en consideración la cercana relación genética que existe entre las cepas de *S. sonnei* aisladas del brote surgido entre los años 2008-2009 y cepas aisladas en períodos posteriores, además que sus mecanismos de resistencia a trimetoprim siguen sin ser descritos, se planteó la siguiente hipótesis:

“Las cepas de *Shigella sonnei* resistentes a trimetoprim aisladas de pacientes chilenos durante el período 2008-2009 presentan genes de resistencia a trimetoprim diferentes a los previamente descritos en nuestro país y permanecen en la población de *S. sonnei* aisladas en períodos posteriores.”

III. OBJETIVO GENERAL

Identificar el o los genes que confieren resistencia a trimetoprim en cepas resistentes de *Shigella sonnei* aisladas durante el período 2008-2009 en Chile y evaluar su distribución poblacional en un período de 18 años entre 1995 y 2013.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la presencia de los determinantes genéticos de resistencia a trimetoprim más frecuentes en Chile, *dfrA1* y *dfrA8*, en las cepas resistentes de *Shigella sonnei* aisladas desde el año 2008 en adelante.
- 2.- Identificar genes de resistencia a trimetoprim presentes en cepas resistentes de *Shigella sonnei* aisladas de pacientes en Chile durante el período 2008-2009.
- 3.- Determinar la distribución de los genes de resistencia a trimetoprim identificados, en cepas resistentes de *Shigella sonnei* aisladas de pacientes en Chile.
- 4.- Caracterizar el elemento genético responsable de la resistencia a trimetoprim en cepas de *S. sonnei* aisladas en Chile en el período 2008-2009.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS, MEDIOS DE CULTIVO Y EXTRACCIÓN DE ADN

1.1 Cepas bacterianas

En este trabajo se utilizaron 100 cepas de *S. sonnei* Tmp^R aisladas entre los años 1995 y 2013. Éstas se distribuyeron de acuerdo a lo indicado en la **Tabla 2**. Algunas de las cepas de *S. sonnei* aisladas en el período A, se caracterizaron en un trabajo anterior (Toro *et al.*, 2005). La susceptibilidad antimicrobiana a Tmp fue previamente determinada en nuestro laboratorio mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer). Para realizar clonamiento se utilizó como cepa receptora *E. coli* DH5 α (F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*).

Tabla 2. Distribución zonal y temporal de cepas de *S. sonnei* aisladas en Chile

Período	Nº cepas	Fecha de aislamiento	Procedencia
A	20	1995-1997	20 (RM)
B	20	2004-2006	20 (RM)
C	20	2008-2009	6 (II R) 14 (RM)
D	20	2010-2011	2(I R) 1(II R) 6(V R) 4(VIII R) 5(RM) 2(XV R)
E	20	2012-2013	1(II R) 1(V R) 1(IX R) 2(X R) 15(RM)

Cada período de estudio tiene un total de 20 cepas. Región de Tarapacá (I R), Región de Antofagasta (II R), Región de Valparaíso (V R), Región del Biobío (VIII R), Región de la Araucanía (IX R), Región de Los Lagos (X R), Región de Arica y Parinacota (XV R), Región Metropolitana (RM).

1.2 Medios de cultivo

Medio líquido: Se utilizó medio Luria-Bertani (LB) para el cultivo de cepas de *S. sonnei* para extracción de ADN, el cultivo de *E. coli* DH5 α para la preparación de

células electrocompetentes y la recuperación de *E. coli* DH5 α electroporadas. El medio LB se preparó en 100 ml de agua ultrapura con cloruro de sodio 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, triptona 10 g/l y finalmente esterilizado en autoclave.

Medio sólido: Al medio LB se le agregó Agar-Agar a una concentración de 15 g/l y finalmente se esterilizó en autoclave. Para la realización del antibiograma se utilizó medio Agar-Mueller-Hinton (Difco™, EE.UU.) el cual se preparó en agua ultrapura y finalmente esterilizado en autoclave.

1.3 Extracción de ADN genómico y plasmidial

El ADN genómico (ADNg) de las cepas en estudio se extrajo desde un cultivo en caldo LB de 3 ml incubado a 37 °C toda la noche u *Over Night* (O.N.) mediante el sistema comercial de aislamiento de ADNg *E.Z.N.A. Bacterial® DNA Kit* (Omega Bio-tek, EE.UU.). El ADN extraído se eluyó en un volumen final de 100 μ l del tampón de elución incluido en el sistema comercial y se almacenó a - 20 °C hasta su utilización.

El ADN plasmidial (ADNp) de las cepas transformantes se extrajo desde un cultivo en caldo LB de 5 ml incubado a 37 °C en presencia del marcador de selección (Tmp 50 μ g/ml o Amp 100 μ g/ml) mediante el sistema comercial de extracción de plásmidos *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Holanda). El ADN extraído se eluyó en un volumen final de 100 μ l del tampón de elución incluido en el sistema comercial y se almacenó a - 20 °C hasta su utilización.

2. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A TMP

2.1 Reacción en cadena de la polimerasa

A partir de cada muestra de ADNg extraído de las cepas en estudio, se tomó una alícuota de 2 μ l, se diluyó 1/100 en agua ultrapura estéril y se realizó una reacción en

cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*, PCR) para la amplificación de los determinantes genéticos de resistencia a Tmp. Para la amplificación de los determinantes genéticos previamente descritos en Chile, *dfrA8* y *dfrA1*, se realizó una PCR múltiple utilizando ambas parejas de partidores simultáneamente. Para un volumen final de reacción de 20 μ l, se utilizaron, 2 μ l de *10X Paq Polymerase Buffer*, 0,6 μ l de $MgCl_2$ 25mM, 0,16 μ l de dNTPs 25 mM cada uno, 0,3 μ l de cada uno de los partidores DHFRIIIc-Fwd, DHFRIIIc-Rv, DHFRIa-F y DHFRIa-R (**Tabla 3**) a una concentración de 5 μ M, 2 μ l de ADNg diluido y 0,1 μ l de la enzima *Paq5000 DNA polymerase* 5 U/ μ l. La reacción se realizó con un paso de desnaturalización inicial de 92 °C durante 3 min seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 92 °C durante 1 min, apareamiento a 60 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s, luego un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. El amplicón que corresponde a *dfrA8* tiene un tamaño de 247 pb, mientras que el amplicón que corresponde a *dfrA1* tiene un tamaño de 367 pb.

Para la amplificación del *cassette* genético *dfrA14* se utilizó una mezcla de reacción similar, cambiando las parejas de partidores anteriormente usadas por los partidores *dfrA14-F* y *dfrA14-R* (**Tabla 3**) a una concentración de 5 μ M cada uno. La reacción se realizó con un paso de desnaturalización inicial de 94 °C durante 3 min seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, luego un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. El amplicón que corresponde a este *cassette* tiene un tamaño de 510 pb.

Para la determinación del contexto genético del *cassette dfrA14*, se diseñaron partidores de la vecindad del gen, a partir de la secuencia del fragmento clonado que confiere resistencia a Tmp. Para esto, se utilizó la siguiente mezcla de PCR: En un

volumen final de reacción de 20 µl, se utilizaron 4 µl de *5X Taq Polymerase Buffer* (Promega, EE.UU.), 1,2 µl de MgCl₂ 25mM, 0,4 µl de dNTPs 2,5 mM cada uno, 0,4 µl de cada partidor a una concentración de 20 pM, 2 µl de ADNg diluido y 0,1 µl de la enzima *Paq5000 DNA polymerase* 5 UI/µl. Para la amplificación de la vecindad del extremo 5' del *cassette dfrA14* se utilizaron los partidores pCERC1-F y dfrA14-R, mientras que para la amplificación de la vecindad del extremo 3' del *cassette* se utilizaron los partidores dfrA14-F y pCERC1-R. La reacción se realizó con un paso inicial de 3 min a 94 °C seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, luego un paso final a 72 °C por 7 min. El amplicón que corresponde a la vecindad del extremo 5' del *cassette dfrA14* tiene un tamaño de 1000 pb, mientras que el amplicón que corresponde a la vecindad del extremo 3' del *cassette dfrA14* tiene un tamaño de 1993 pb.

Tabla 3. Partidores para PCR

Gen	Nombre	5'-Secuencia-3'	Tm °C	Referencia
<i>dfrA1</i>	DHFR Ia-F	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC	59	Toro <i>et al.</i> , 2005
	DHFR Ia-R	GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	56,2	
<i>dfrA8</i>	DHFR IIIc-F	GAGCTTCCGGGTGTTCGTGAC	60,4	Toro <i>et al.</i> , 2005
	DHFR IIIc-R	CTTCCATGCCATTCTGCTCGTAGT	59,1	
<i>dfrA14</i>	dfrA14-F	TTAACCCAGGATGAGAACCT	56,4	Este trabajo
	dfrA14-R	CGATTGCATAGCTTTGTAA	52,3	
pCERC1	pCERC1-F	TGACTGGTTGCCTGTCAGA	60	Este trabajo
	pCERC1-R	GCTGGAGCATGGCTTTCTAC	59,9	

Partidores utilizados para la detección por PCR de segmentos de tres genes de resistencia a Tmp *dfrA1*, *dfrA8*, *dfrA14* y la localización del *cassette dfrA14* en su contexto genético.

2.2 Electroforesis en geles de agarosa

Para la resolución de los fragmentos amplificados en la PCR múltiple de *dfrA8* y *dfrA1* se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en tampón TAE 0,5X

(TAE 1X Tris 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1mM, pH 8,3) a 80 Volts constantes durante 40 min. Para la resolución del fragmento amplificado correspondiente al gen *dfrA14* y los plásmidos extraídos de clones transformantes, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 0,5X a 90 Volts constantes por 30 min. Para la resolución de los fragmentos generados por digestión del ADN_g con la enzima de restricción *Hind*III, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 0,5X a 90 Volts constantes por 50 min. Las muestras se mezclaron con un tampón de carga 6X (azul de bromofenol al 0,25%, glicerol al 30% en agua destilada) en razón 5:1.

3. CLONAMIENTO DE DETERMINANTES DE RESISTENCIA A TMP

3.1 Digestión de ADN_g

Para la digestión de 1 µg de ADN_g obtenido de una cepa *Tmp*^R, se agregó a la mezcla de reacción 0,5 µl (5 U) de la enzima de restricción *Hind*III 10 U/µl (Thermo-Scientific, EE.UU.), 2 µl del Tampón Rojo 10X (Thermo-Scientific, EE.UU.) y se completó a un volumen final de 20 µl con H₂O ultrapura estéril. De la misma forma, para la digestión de 200 ng del vector de clonamiento pUC19 (*lacZ'* Amp^R, vector de alto número de copias, Invitrogen, EE.UU.) y de los plásmidos recombinantes obtenidos de las cepas transformantes, se utilizó la misma mezcla de reacción anterior. Todas las reacciones fueron incubadas a 37 °C durante 3 h. Para evitar la recircularización del vector de clonamiento pUC19 linealizado, se realizó un paso adicional de desfosforilación agregando 1 U de la fosfatasa alcalina termosensible *FastAP* (Thermo-Scientific, EE.UU.) a la mezcla de reacción anterior y se incubó a

37 °C durante 10 min más. Ambas reacciones enzimáticas fueron detenidas por temperatura incubando a 80 °C durante 20 min.

3.2 Purificación de las fracciones de ADN digerido

Los fragmentos generados por la digestión de 1 µg de ADN genómico o total fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa como se describió previamente y luego se dividieron en 2 fracciones según su tamaño relativo a un estándar de 1 Kb (Thermo-Scientific, EE.UU.). Las fracciones correspondientes a los rangos de 2-6 Kb y 6-10 Kb se cortaron del gel y se purificaron mediante el sistema comercial *FavorPrep™ Gel/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen, Taiwan). Ambas fracciones de ADN digerido se extrajeron en un volumen final de 100 µl de H₂O ultrapura estéril y se determinó la concentración de cada una mediante la absorbancia a una longitud de onda (λ) = 260 nm obteniendo concentraciones de 7,11 ng/µl para la fracción de 2-6 Kb y 3,97 ng/µl para la fracción de 6-10 Kb.

3.3 Ligación de fragmentos de ADN digeridos a un vector de clonamiento

Se tomó una alícuota del vector de clonamiento pUC19 linealizado, se mezcló con la fracción 2-6 Kb de ADN digerido en una proporción 5:1 inserto:vector, considerando un tamaño promedio de 4 Kb y 2686 pb respectivamente, para calcular la molaridad de cada uno. Para la fracción 6-10 Kb de ADN digerido, se utilizó una proporción de inserto:vector 3:1, considerando un tamaño promedio de 8 Kb de la fracción para calcular su molaridad. A cada mezcla se le agregaron 2 µl de tampón 10X T4 ADN ligasa (Thermo-Scientific, EE.UU.), 1 U Weiss de T4 ADN ligasa (Thermo-Scientific, EE.UU.) y se completó a un volumen final de 20 µl con H₂O ultrapura estéril. Ambas

mezclas de reacción se incubaron a 4 °C O.N. y se detuvieron incubando a 65 °C durante 10 min.

3.4 Preparación de células electrocompetentes

Se sembraron células *E. coli* DH5α en un tubo con 2 ml de caldo LB (pre-inóculo) desde colonias crecidas en agar-LB suplementado con ácido nalidíxico (Nal) 15 µg/ml. Luego, el cultivo se incubó a 37 °C en agitación O.N. Para ello se tomó 1 ml del pre-inóculo generado y se transfirió a 100 ml de caldo LB suplementado con 100 µl de Nal 15µg/ml en un matraz de 500 ml. Posteriormente, se incubó a 37 °C durante 3-4 h con agitación hasta alcanzar una densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600nm}) = 0,4. Una vez alcanzada la DO, el matraz se dejó en hielo durante 10 min. Luego, el cultivo se centrifugó a 4 °C y 4000 g durante 5 min en una centrífuga Mikro 22R (Hettich, Alemania). El sedimento se resuspendió en 20 ml de H₂O ultrapura estéril y fría, se centrifugó nuevamente en iguales condiciones y se repitió el proceso hasta alcanzar un total de 4 lavados. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10 % estéril y frío, se centrifugó en iguales condiciones y resuspendió en 500 µl de glicerol al 10 % estéril y frío. Finalmente, la suspensión bacteriana se dividió en alícuotas de 50 µl cada una y se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

3.5 Transformación y obtención de una genoteca

Se descongelaron en hielo alícuotas de 50 µl de células electrocompetentes y se les agregó 4 µl de la mezcla de reacción de ligación o 1 µl de extracto plasmidial. Todas las mezclas de reacción o extractos plasmidiales fueron previamente dializadas durante 30 min contra H₂O ultrapura estéril en una membrana hidrófila de ésteres de

celulosa mezclados, con un tamaño de poro de 0,025 μm . Las mezclas de transformación se incubaron en hielo por 10 min y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 1 mm, previamente enfriada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego, las mezclas de transformación se electroporaron usando un equipo *Electroporator 2510* (Eppendorf, Alemania), aplicando un pulso de 1800 Volts y se les agregó rápidamente 1 ml de caldo LB precalentado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. El cultivo se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h con agitación. Finalmente, se sembraron 100 μl de células recuperadas en placas con Amp o la totalidad del cultivo recuperado en placas con Tmp, en placas de Agar-LB suplementadas con Amp 100 $\mu\text{g/ml}$ o Tmp 50 $\mu\text{g/ml}$ y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) 20 $\mu\text{g/ml}$ e Isopropil- β -D-1-tiogalacto-piranosido (IPTG) 0,1 mM. Estas placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ O.N.

4. IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES DE RESISTENCIA A TMP

4.1 Secuenciación por *primer-walking*

El plásmido recombinante del clon transformante Tmp^R se aisló mediante extracción plasmidial, como se describió previamente. Esta muestra se envió a MacroGen Inc. (Seúl, República de Corea) para la secuenciación del inserto clonado en el vector pUC19, usando en primera instancia los partidores universales M13F y M13R-pUC. Posteriormente, en base a las secuencias obtenidas se diseñaron 6 partidores específicos para este fin, los que se indican en la **Tabla 4**. De esta forma, cada segmento secuenciado abarcó una extensión de 900 pb aproximadamente. El ensamblaje de las secuencias se realizó mediante la búsqueda de secuencias que coincidieran en los extremos de cada segmento y posterior alineamiento con secuencias obtenidas por *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Tabla 4. Partidores utilizados para secuenciación por *primer-walking*

Partidores para secuenciación	5'-Secuencia-3'	Tm °C
pCLON3-Fwd2	ATAGCCGATCAAATGATGAG	52,14
pCLON3-Rv2	TAACGAATTCTTGCGGTTTC	54,93
pCLON3-Fwd3	CACTCCCACTCTTACATTGT	52,47
pCLON3-Rv3	GGTTTAACCGTAATCAACAG	52,38
pCLON3-Fwd4	TAAAACAGGCAACAAACCAC	56,22
pCLON3-Rv4	GCGAATATGACCTTTTTGAT	54,38

4.2 Análisis *in silico*

Cada secuencia recibida se ingresó a la herramienta BLAST disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y mediante el algoritmo megablast, se comparó con la base de datos no redundante *Nucleotide collection*.

4.3 Recircularización del plásmido identificado

Se aisló el plásmido recombinante que confiere resistencia a Tmp, pCLON3, y se identificó la secuencia del inserto que es homóloga a un plásmido previamente descrito. Este inserto se aisló mediante digestión del plásmido recombinante con la enzima *HindIII* y posterior electroforesis en gel de agarosa. Para ello, la banda correspondiente al inserto liberado fue cortada y purificada con el uso del sistema comercial *FavorPrep™ Gel/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen, Taiwán). Este fragmento se sometió a una reacción de autoligación. Se agregó 2 µl de tampón 10X T4 ADN ligasa (Thermo-Scientific, EE.UU.), a 50 ng de fragmento linealizado, 5 U Weiss de T4 ADN ligasa (Thermo-Scientific, EE.UU.) y se completó a un volumen final de 20 µl con H₂O ultrapura estéril. Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó a 4 °C O.N. y se detuvo la reacción incubando a 65 °C durante 10 min. Finalmente, se transformaron cepas de *E. coli* DH5α electrocompetentes con esta

mezcla de ligación y se seleccionaron clones resistentes en placas de Agar-LB suplementado con Tmp (50 µg/ml). El plásmido que confiere resistencia a Tmp recuperado de esta transformación, se denominó pABC-3 (Número de acceso GenBank KT988306).

5. DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

5.1 Antibiograma

Se determinó el patrón de susceptibilidad de cepas *E. coli* DH5α a nueve antibióticos mediante el método de difusión de disco en agar. Se evaluó este patrón en la cepa *E. coli* DH5α, la cepa transformada con el vector de clonamiento pUC19, la cepa transformada con el plásmido recombinante pCLON3 y la cepa transformada con el plásmido recircularizado, pABC-3. Se preparó un pre-inóculo de cada cepa en 2 ml de caldo LB suplementado con el antibiótico correspondiente (Nal 15 µg/ml, Amp 100 µg/ml o Tmp 50 µg/ml). A partir de este pre-inóculo se diluyó el cultivo obtenido con suero fisiológico estéril (NaCl 0,9% en agua destilada) para alcanzar una densidad de 0,5 unidades McFarland. Posteriormente, se sembró cada cepa en 2 placas de Agar-Mueller-Hinton con una tórula en tres direcciones diferentes, cubriendo la superficie total de la placa. Luego que las placas se secan, se depositaron los discos de antibiótico y se incubaron a 37 °C O.N. Al día siguiente, se midió (en milímetros) el diámetro del halo de inhibición formado por el antibiótico y finalmente se interpretaron los valores obtenidos de acuerdo a lo establecido por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en el consenso del año 2013 para enterobacterias.

VI. RESULTADOS

1. Determinación de la presencia de genes de resistencia a Tmp más frecuentes en Chile, en cepas de *Shigella sonnei* resistentes a este antibiótico

1.1 Presencia y distribución de genes *dfrA1* y *dfrA8*

Para evaluar la presencia de los genes de resistencia a Tmp más frecuentes en Chile, *dfrA1* y *dfrA8*, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple a muestras de ADN extraído de cien cepas de *Shigella sonnei* Tmp^R aisladas entre 1995-2013, con las dos parejas de partidores específicos previamente descritas en la **Tabla 3** (ver sección materiales y métodos) y se obtuvieron amplicones de 367 pb y 247 pb correspondientes a los genes *dfrA1* y *dfrA8*, respectivamente (**Fig. 2**).

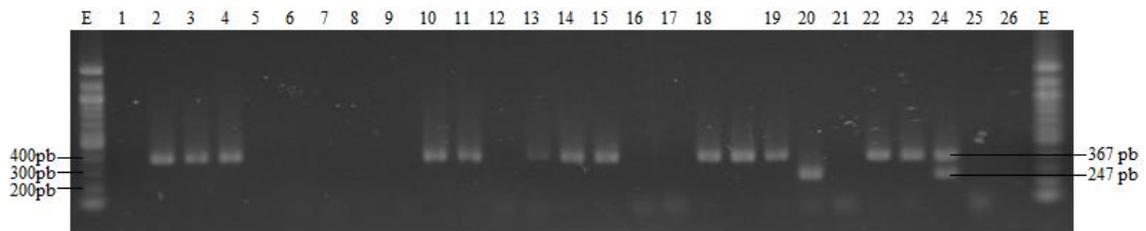


Figura 2. Detección mediante PCR de genes *dfrA1* y *dfrA8* en cepas de *Shigella sonnei* Tmp^R aisladas en Chile entre los años 1995 y 2013. Se muestra en la figura un gel representativo con los resultados de la amplificación de los fragmentos específicos para *dfrA1* y *dfrA8* en algunas cepas del estudio. Carriles 1-23: cepas de *Shigella sonnei* Tmp^R. 24: Control positivo (cepa con ambos genes). 25: Control negativo (cepa sensible a Tmp) 26: H₂O. E: Estándar 100 pb (New England Biolabs, EE.UU.).

El resultado de las cien cepas analizadas se resume en la **Tabla 5**, que muestra la distribución de los genes de resistencia a Tmp *dfrA1* y *dfrA8*. En el grupo de 20 cepas aisladas entre 1995 y 1997, se observa que hay una presencia mayoritaria del gen *dfrA8*, 85% de las cepas lo presentan de forma exclusiva y 10 % lo hacen simultáneamente con el gen *dfrA1*, además una cepa no presentó estos marcadores

genéticos de resistencia a Tmp (5%). De manera similar, en el período B, se observa una mayor presencia del gen *dfrA8* (90%), no se detectó el gen *dfrA1* y dos cepas (10%) fueron negativas para ambos marcadores. En concordancia con los resultados preliminares, la presencia de los genes *dfrA1* y *dfrA8* no fue detectada en ninguna cepa del período C. Luego, en el período D se observa un cambio en la distribución con respecto a los períodos A y B, detectando la presencia del gen *dfrA1* en siete cepas (35%) mientras que el gen *dfrA8* no fue detectado. En la mayoría de las cepas en estudio del período D (13 cepas, 65%) no se detectó ninguno de los dos genes. Finalmente, en el período E, diez de las cepas en estudio (50%) presentaron el gen *dfrA1*, una cepa (5%) el gen *dfrA8* y nueve cepas (45%) ninguno de los dos genes. Se destaca que del total de cien cepas de *Shigella sonnei* en estudio, cuarenta y cinco (45%) poseen resistencia a Tmp que no está asociada a los genes previamente descritos en nuestro país *dfrA1* ni *dfrA8*.

Tabla 5. Distribución de los determinantes genéticos de resistencia a Tmp más frecuentes en Chile

Período	Cantidad Total de cepas	<i>dfrA1</i>		<i>dfrA8</i>		<i>dfrA1</i> + <i>dfrA8</i>		No detectado	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
A (1995-1997)	20	0	0	17	85	2	10	1	5
B (2004-2006)	20	0	0	18	90	0	0	2	10
C (2008-2009)	20	0	0	0	0	0	0	20	100
D (2010-2011)	20	7	35	0	0	0	0	13	65
E (2012-2013)	20	10	50	1	5	0	0	9	45
Total	100	17	17	36	36	2	2	45	45

Columna N° indica el número de cepas por período que presentan el determinante genético analizado. Columna % indica el porcentaje de cepas por período que presentan el determinante genético analizado.

2. Identificación de genes de resistencia a Tmp presentes en cepas resistentes de *Shigella sonnei* aisladas de pacientes en Chile durante el período 2008-2009

2.1 Obtención de una genoteca de *Shigella sonnei* Tmp^R

Con el propósito de identificar el o los posibles genes que confieren resistencia a Tmp en las cepas de *Shigella sonnei* aisladas durante el período 2008-2009 que no presentan *dfrA1* ni *dfrA8*, se construyó una genoteca a partir del ADNg de una cepa aislada en el período C resistente a este antibiótico, escogida al azar.

Para esto, el ADNg extraído se digirió con la enzima de restricción *HindIII*, generando fragmentos de tamaños entre 10 y 2 Kb como se observa en la **Fig. 3A**. En el carril 1 se observa el ADNg extraído sin digerir, mientras que en el carril 2 se muestra el ADNg. La ausencia de ADN cromosomal de alto peso molecular (no digerido) en la parte superior del gel y un bandeo de mayor intensidad partiendo en la zona de las 10 Kb hasta aproximadamente las 2 Kb, dan cuenta del proceso de digestión.

Para generar la genoteca con el ADNg de una cepa de *S. sonnei* Tmp^R, el ADN digerido se dividió en dos fracciones, la primera consistió en los fragmentos generados entre 6Kb y 10Kb, mientras que la segunda en los fragmentos generados entre 2Kb y 6Kb. Ambas fracciones de ADNg digerido (2-6 y 6-10 Kb) se clonaron en el vector de clonamiento pUC19 y posteriormente se transformaron en *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Al seleccionar con Amp o Tmp no se obtuvo ningún clon resistente del ensayo de transformación con la primera fracción (6-10Kb), mientras que de la transformación con la segunda fracción (2-6 Kb) sí se obtuvieron bacterias transformantes resistentes a Amp (**Fig. 3B**). Los clones resultantes se cultivaron en un

medio selectivo-diferencial (placas de Agar-LB suplementado con Amp, X-gal e IPTG) y se seleccionaron solo las colonias de color blanco, lo que sugiere que la bacteria transformante adquirió un plásmido recombinante formado por la incorporación de un fragmento de ADN previamente digerido al vector de clonamiento pUC19. La resistencia a Amp (Amp^R) está determinada por el gen *bla* que porta el vector de clonamiento pUC19 y codifica una β -lactamasa. Al incorporar pUC19 sin inserto de ADN clonado, se genera el proceso de alfa-complementación entre el producto del gen *lacZ* que porta el vector, con el del gen *lacZ* que porta la bacteria. De esta forma, la bacteria transformante produce la enzima β -galactosidasa funcional que hidroliza el sustrato cromogénico X-gal, resultando en colonias de color azul. El color blanco de las colonias transformantes resulta de la incorporación de un inserto de ADN en el sitio de múltiple clonamiento que interrumpe el gen *lacZ* de pUC19 y por lo tanto impide su expresión. Al impedir su expresión, no se lleva a cabo el proceso de alfa complementación, la enzima β -galactosidasa es inactiva y no se hidroliza el sustrato X-gal.

En la **Fig. 3C** se observa que los plásmidos recombinantes (obtenidos de 5 colonias Amp^R diferentes) poseen distintos tamaños y por lo tanto contienen diferentes insertos de ADN (carriles 2-6), sugiriendo que la población de clones obtenidos es heterogénea. Para confirmar la heterogeneidad de la población los plásmidos obtenidos se digirieron con la enzima *HindIII* y se observaron bandas correspondientes a insertos de diferentes tamaños (carriles 8-12), además de la banda correspondiente al vector de clonamiento pUC19.

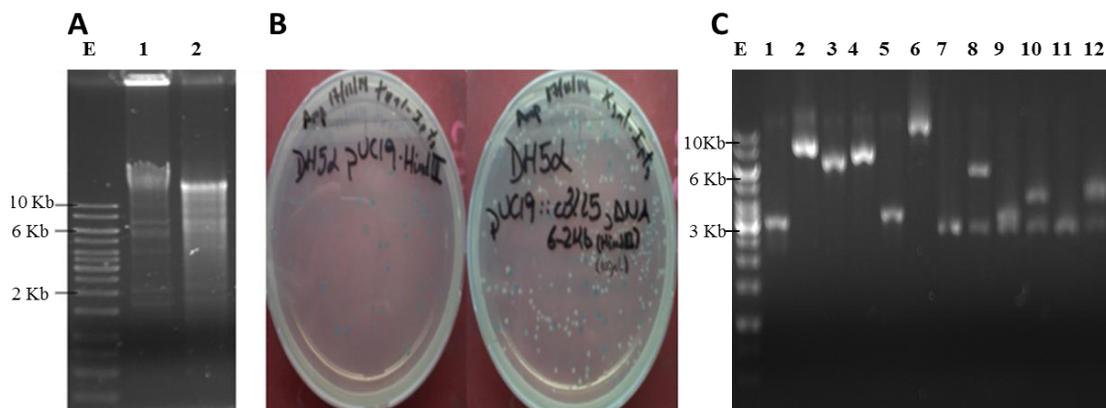


Figura 3. Genoteca construida a partir de una cepa de *Shigella sonnei* Tmp^R. (A) Digestión con la enzima de restricción *Hind*III, de ADNg de una cepa de *S sonnei* Tmp^R correspondiente al período C. Carril 1: ADNg sin digerir de la cepa de *S sonnei* Tmp^R c8225, Carril 2: ADNg digerido con *Hind*III de la cepa c8225. E: Estándar 1 Kb (Thermo-Scientific, EE.UU.). (B) Placa LB-Amp con transformantes obtenidas con el control de digestión pUC19/*Hind*III (izquierda) y placa representativa de la genoteca obtenida (derecha). (C) Plásmidos recombinantes obtenidos de genoteca en placas de Amp. Carril 1: pUC19 vacío. Carriles 2-6: Plásmidos recombinantes de 5 clones diferentes resistentes a Amp. Carril 7: pUC19 vacío digerido con *Hind*III. Carriles 8-12: Plásmidos recombinantes de los 5 clones anteriores digeridos con *Hind*III. E: Estándar 1 Kb (Thermo-Scientific, EE.UU.).

Paralelamente, luego de la transformación con la segunda fracción (fragmentos de 2-6 Kb ligados al vector pUC19), la genoteca obtenida se seleccionó en medio Agar-LB suplementado con Tmp y se obtuvieron 10 clones Tmp^R. Se sembraron estos diez clones Tmp^R en placas de medio Agar-LB suplementado con Amp para seleccionar la incorporación de un plásmido recombinante (vector de clonamiento pUC19 con un inserto de ADN). Nueve de estos clones fueron sensibles a Amp y uno (Clon 3) fue Amp^R (Fig. 4A), sugiriendo la incorporación de un plásmido recombinante. Los nueve clones Tmp^R sensibles a Amp son probablemente resultado de mutaciones espontáneas que otorgaron resistencia a Tmp a las *E. coli* DH5 α , que no adquirieron ningún plásmido recombinante en el proceso de transformación.

Para verificar que el Clon 3 Tmp^R Amp^R, incorporó un plásmido recombinante, se resolvió en un gel de agarosa (Fig. 4B) su contenido plasmidial sin digerir (carril 3) y

digerido con la enzima *Hind*III (carril 4). La banda observada para el ADNp sin digerir tiene un tamaño de entre 8 y 10 Kb concordando con la suma de los tamaños de las bandas observadas para el ADNp digerido, correspondientes al vector pUC19 (cerca a las 3 Kb) y a un inserto de ADN clonado de un tamaño aproximado de 6 Kb. De esta forma se comprueba que el Clon 3 Tmp^R Amp^R posee un plásmido recombinante (pCLON3).

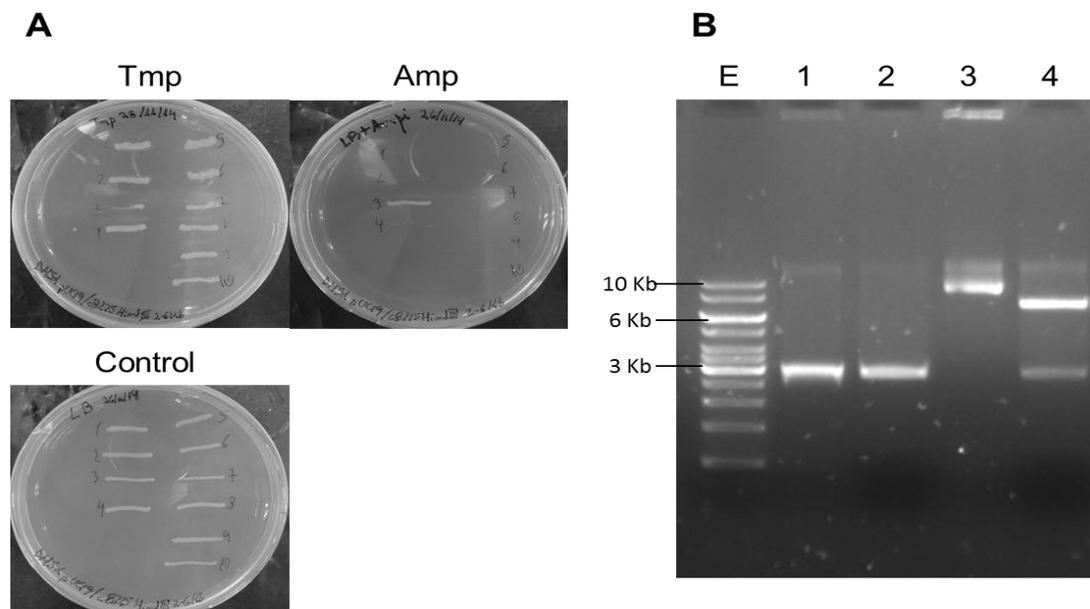


Figura 4. Identificación de un clon Tmp^R. (A) Tmp: Placa Agar-Tmp con las 10 colonias recuperadas. Amp: Placa Agar-Amp con las 10 colonias recuperadas. Control: Placa Agar-LB con las 10 colonias recuperadas. (B) Carril 1: pUC19 vacío. Carril 2: pUC19 vacío digerido con *Hind*III. Carril 3: plásmido recombinante obtenido (pCLON3) del clon Tmp^R recuperado. Carril 4: plásmido recombinante obtenido (pCLON3) del clon Tmp^R recuperado, digerido con *Hind*III. E: Estándar 1Kb (Thermo-Scientific, EE.UU.)

2.2 Confirmación y aislamiento del plásmido recombinante

Luego de clonar el fragmento de ADN que confiere el fenotipo buscado, se procedió a confirmar que el plásmido recombinante aislado (pCLON3) sea el causante de este fenotipo. Para ello se transformó *E. coli* DH5α electrocompetentes con el plásmido

pCLON3 purificado mediante electroporación. Se seleccionaron 3 colonias al azar de los clones Tmp^R obtenidos y se sembraron en placas de Agar-LB suplementadas con Amp. Las tres colonias crecieron en presencia de Amp. En la **Fig. 5** se muestra la resolución en un gel de agarosa del ADNp de tres los clones Tmp^R Amp^R obtenidos digeridos con la enzima *Hind*III (carriles 1, 3 y 5) y sin digerir (carriles 2 4 y 6). Se comprobó que los tres clones poseían el mismo plásmido, debido a que presentan el mismo patrón de digestión con la enzima *Hind*III y que coincide con el observado en la **Fig. 4B** para el ADNp del Clon 3 Tmp^R Amp^R digerido (carril 4). Las diferencias de tamaño en los plásmidos sin digerir se pueden atribuir a un distinto nivel de sobreenrollamiento del mismo plásmido. Con este resultado, se comprobó que efectivamente el inserto clonado del pCLON3 contiene determinantes genéticos que confieren resistencia a Tmp.

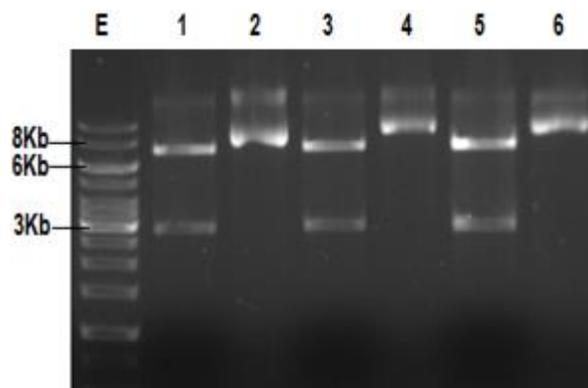


Figura 5. Aislamiento y confirmación del plásmido recombinante que confiere resistencia a Tmp. Carriles 1, 3 y 5: ADNp digerido con *Hind*III, extraído de 3 colonias al azar Tmp^R Amp^R resultantes de la transformación con el vector recombinante anteriormente obtenido. Carriles 2, 4 y 6: ADNp extraído de las mismas 3 colonias Tmp^R Amp^R resultantes de la transformación con el vector recombinante anteriormente obtenido. E: Estándar 1Kb (Thermo-Scientific, EE.UU.).

2.3 Identificación del gen de resistencia a Tmp por secuenciación

Para identificar el o los determinantes genéticos contenidos en el inserto clonado, se secuenció el fragmento de 6-7 Kb, mediante *primer-walking*. Debido al tamaño del inserto, se requirieron 3 parejas de partidores para secuenciar el inserto completo (**Tabla 4**, ver sección materiales y métodos). Para ensamblar los segmentos secuenciados y obtener el inserto completo, se buscó el solapamiento de secuencias entre el extremo 3' de un segmento con el extremo 5' del siguiente fragmento. De esta forma, se obtuvo una secuencia de 6779 pb. La secuencia obtenida presenta una zona o *cluster* de resistencia a antimicrobianos *sul2 strA::dfrA14 strB*, formado por los genes *sul2* de resistencia a sulfonamidas, los genes *strA* y *strB* de resistencia a estreptomicina y un *cassette* genético de 568 pb que incluye al gen de resistencia a Tmp, *dfrA14*. Este gen codifica una enzima dihidrofolato reductasa de clase A, resistente a Tmp. A partir de la secuencia obtenida, se diseñaron dos parejas de partidores descritas en la **Tabla 3** (ver sección de materiales y métodos), que se utilizaron para determinar tanto la presencia del *cassette* genético *dfrA14* como su contexto genético en la población de cepas de *S. sonnei* aisladas en Chile, correspondientes a los 5 períodos de estudio incluidos en este trabajo.

3. Distribución del gen *dfrA14* en cepas resistentes de *Shigella sonnei* aisladas de pacientes en Chile entre los años 1995 y 2013

3.1 Presencia y distribución del gen de resistencia a Tmp *dfrA14*

La presencia del *cassette* genético responsable de la resistencia a Tmp *dfrA14*, anteriormente identificado, se detectó mediante PCR en muestras de ADN extraído de

las cepas de *S. sonnei* Tmp^R con los partidores específicos detallados en la **Tabla 3** (ver sección materiales y métodos). Estos partidores generan un amplicón de 510 pb (**Fig.6**)

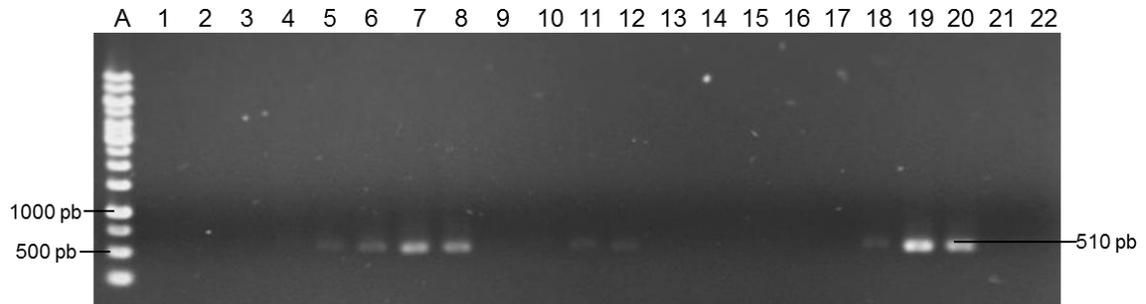


Figura 6. Detección mediante PCR del cassette genético *dfrA14* en cepas representativas de *Shigella sonnei* Tmp^R aisladas en Chile entre los años 1995 y 2013. Se muestra en la figura un gel representativo de la detección del gen *dfrA14* en cepas Tmp^R obtenidas en los diferentes períodos. Carriles 1-19: cepas de *S. sonnei* Tmp^R 20: Control positivo (cepa madre de genoteca). 21: Control negativo (cepa sensible a Tmp) 22: H₂O. E: Estándar 1Kb. En los carriles 5-8, 11, 12 y 18-20 se observa una banda de aproximadamente 500 pb que corresponde al amplicón esperado para el gen *dfrA14*.

Se determinó la distribución del amplicón de 510 pb correspondiente al gen *dfrA14* en la población de *S. sonnei* de cada período en estudio (**Fig. 7**). La presencia del cassette *dfrA14* se detectó solo a partir del período B en una cepa (5%) de las 20 totales. Por el contrario, en el período C, el 100% de las cepas analizadas poseen este gen de resistencia, cuya frecuencia fue disminuyendo en los períodos D con trece cepas positivas (65%) y E con 10 cepas positivas (50%). Se destaca que del total de cepas analizadas el 96% presentan solo un determinante genético de resistencia a Tmp. La presencia conjunta de los genes *dfrA1* y *dfrA8* solo se detectó en dos cepas del período A (2% del total), en tanto que la combinación *dfrA8* y *dfrA14* se detectó en una sola cepa del período E (1% del total). Cabe destacar que en una cepa del período

B y una cepa del período A, no fue posible detectar ninguno de estos tres determinantes genéticos de resistencia a Tmp.

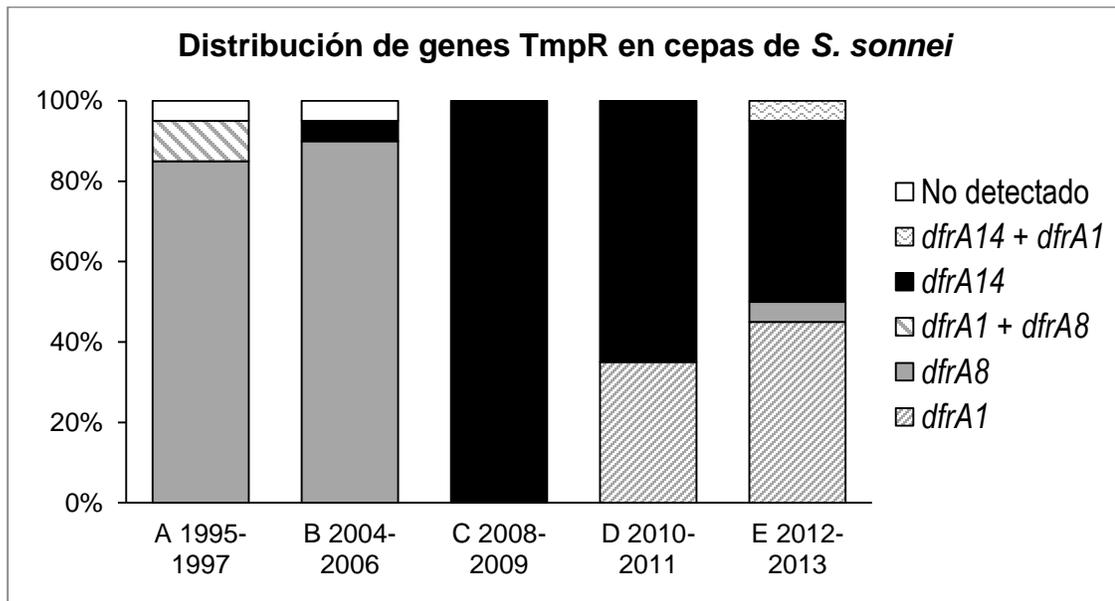


Figura 7. Distribución de los tres determinantes genéticos de resistencia a Tmp, *dfrA1*, *dfrA8* y *dfrA14*, detectados en cepas de *S. sonnei* aisladas en Chile entre los años 1995 y 2013. En el eje de las ordenadas se grafica la frecuencia de cada gen o combinación de genes en términos porcentuales; en el eje de las abscisas se encuentran los períodos de aislamiento de cepas de *S. sonnei* Tmp^R en estudio. Se destaca la presencia del gen *dfrA14* en el 100% de las cepas del período C y una gradual disminución en los D con un 65% y E con un 50%.

3.2 Localización del gen de resistencia a Tmp *dfrA14*

Para determinar la localización o contexto genético del gen *dfrA14* en las cepas de *S. sonnei* analizadas, se diseñó un partidor en cada una de las zonas aledañas a los extremos del gen *dfrA14* secuenciado (Tabla 3, ver sección materiales y métodos). Estos partidores se combinaron con partidores internos del gen *dfrA14* como se indica en la Fig. 8, obteniendo de esta forma un amplicón de 1000 pb para la vecindad del extremo 5' del gen *dfrA14* y un amplicón de 1993 pb para la vecindad del extremo 3'. De las cien cepas analizadas en este trabajo, el resultado de ambas amplificaciones fue positivo para todas las cepas Tmp^R que presentaron el gen *dfrA14* (datos no

mostrados), indicando que en las cepas de *S. sonnei* analizadas en este trabajo, este marcador se encuentra siempre en el mismo contexto genético.

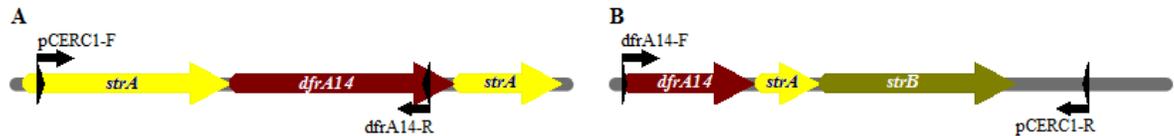


Figura 8. Esquema de amplificación por PCR del contexto genético del cassette *dfrA14*. (A) Vecindad del extremo 5' del cassette genético *dfrA14* donde se obtiene un amplicón de 1000 pb y (B) vecindad del extremo 3' del cassette genético *dfrA14* donde se obtiene un amplicón de 1993 pb.

4. Caracterización del elemento genético que confiere resistencia a Tmp en cepas de *Shigella sonnei* aisladas en Chile entre los años 2008 y 2009

El análisis por *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de la secuencia del inserto de 6779 pb clonado en el pCLON3, determinó que ésta es prácticamente idéntica a un plásmido de 6790 pb previamente descrito en *E. coli* cepa S1.2.T2R denominado pCERC1 (Anantham y Hall, 2012). La única diferencia que presenta nuestra secuencia con la de pCERC1 es la falta de una repetición de una secuencia de 11 pb, que da cuenta de la diferencia de tamaño. En vista que la secuencia de 6779 pb obtenida es prácticamente idéntica a la de pCERC1, se decidió determinar si el inserto corresponde a un plásmido funcional mediante recircularización y posterior transformación de *E. coli* DH5 α .

4.1 Reconstitución del plásmido de *Shigella sonnei* que contiene el gen *dfrA14*

Para corroborar que el inserto secuenciado corresponde a un plásmido capaz de replicarse, se reconstituyó este elemento genético mediante la escisión y auto-ligación del inserto para luego transformar mediante electroporación de *E. coli* DH5 α

electrocompetentes. Luego de la transformación, se cultivaron las bacterias transformadas en presencia de Tmp, se recuperaron colonias Tmp^R, de las cuales se seleccionó un clon al azar y se extrajo su ADNp. El extracto plasmidial se digirió con la enzima de restricción *Hind*III y se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa. En la **Fig. 9** se compara el patrón de digestión de los plásmidos pUC19 (carril 1), pCLON3 (carril 2) y del plásmido reconstituido (carril 3). Se observa que la digestión del plásmido reconstituido revela una banda de igual tamaño que la banda correspondiente al inserto clonado en el plásmido recombinante pCLON3, además de la ausencia de la banda correspondiente al vector pUC19.

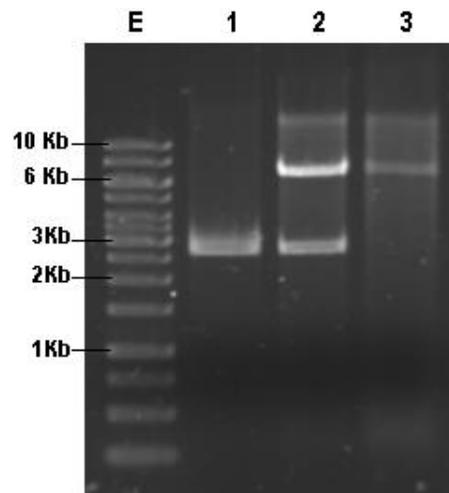


Figura 9. Digestión enzimática del plásmido que confiere resistencia a Tmp. Carril 1: Vector de clonamiento pUC19 digerido con *Hind*III. Carril 2: pCLON3 digerido con *Hind*III. Carril 3: Plásmido reconstituido digerido con *Hind*III.

Estos resultados indican que al recircularizar el fragmento clonado y transformarlo en una bacteria electrocompetente, seleccionando en placas con Tmp, este elemento genético es capaz de replicarse y conferir resistencia a Tmp. De esta forma, se determinó que el fragmento de 6779 pb clonado dentro del vector pUC19, es

efectivamente un plásmido autoreplicativo y se denominó pABC-3 (Número de acceso KT988306) (**Fig. 10**)

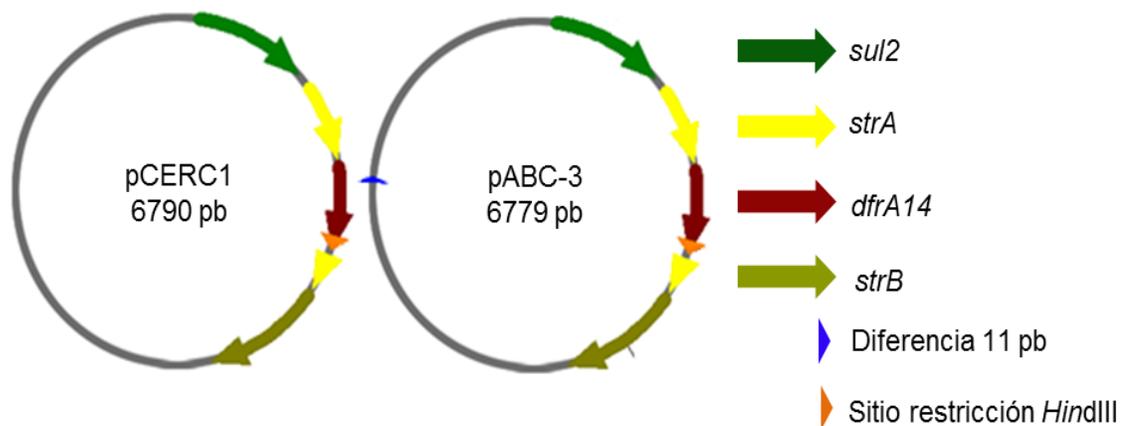


Figura 10. Esquema comparativo de los plásmidos pABC-3 y pCERC1. A la izquierda se muestra un esquema del plásmido previamente descrito denominado pCERC1 (Anantham y Hall,. 2012) y a la derecha se muestra un esquema del plásmido identificado pABC-3. En verde el gen *sul-2*, en amarillo el gen interrumpido *strA*, en burdeo el *cassette* genético responsable de la resistencia a Tmp *dfrA14* interrumpiendo a *strA*, en naranja el sitio attC del *cassette* *dfrA14*, en amarillo oscuro el gen *strB*, en celeste se indica el sitio de restricción de *HindIII* AAGCTT y finalmente en azul se indica el sitio de única diferencia entre ambos plásmidos.

4.2 Caracterización del perfil de susceptibilidad conferido por el plásmido pABC-3

Para conocer el perfil de susceptibilidad que confieren tanto el plásmido recombinante (pCLON3), como el pABC-3 a las cepas de *E. coli* DH5 α transformadas, se realizó un antibiograma para nueve antibióticos (**Tabla 6**). De acuerdo al tamaño de los halos de inhibición de crecimiento de las cepas analizadas, se observó que tanto el plásmido recombinante pCLON3 como el pABC-3 confieren resistencia a Tmp y también a cotrimoxazol (SxT), posiblemente por la presencia del gen *sul2*, el cual forma parte del fragmento clonado. Por otro lado, pCLON3 confiere resistencia a Amp mientras que pABC-3 no, debido a que esta característica está codificada por el vector

de clonamiento pUC19. Como control de susceptibilidad se utilizó una cepa de *E. coli* DH5 α sin transformar, la cual es resistente a ácido nalidíxico.

Tabla 6. Antibiograma de los clones Tmp^R obtenidos.

Cepa bacteriana	Amp		SxT		TE		CIP		C		Tmp		CTX		W		Str	
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
DH5 α	18	S	29	S	20	S	28	S	23	S	29	S	34	S	7	R	17	S
DH5 α / pUC19	6	R	30	S	21	S	30	S	23	S	30	S	32	S	7	R	18	S
DH5 α / pCLON3	6	R	6	R	20	S	30	S	25	S	6	R	32	S	7	R	20	S
DH5 α / pABC-3	19	S	6	R	20	S	30	S	22	S	6	R	31	S	7	R	19	S

Todas las bacterias utilizadas fueron *E. coli* DH5 α transformadas con lo indicado en la primera columna. D: Diámetro; I: Interpretación; Amp: Ampicilina. SxT: Cotrimoxazol. TE: Tetraciclina. CIP: Ciprofloxacino. C: Cloranfenicol. Tmp: Trimetoprim. CTX: Cefotaxima. W: Ácido Nalidíxico. Str: Estreptomina. R: Resistente. S: Sensible. La sensibilidad o resistencia de la bacteria a un antibiótico fue determinada por el tamaño del halo de inhibición medido en milímetros (mm), según las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

VII. DISCUSIÓN

1. Identificación de un nuevo determinante de resistencia para Tmp en Chile, *dfrA14*

Existe una amplia diversidad de mecanismos por los que una bacteria puede adquirir resistencia a Tmp, entre los que se incluyen cambios en la permeabilidad de la membrana, bombas de expulsión, cambios en la región promotora del gen que codifica la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), mutaciones puntuales en la DHFR y adquisición de genes que codifican para enzimas DHFR insensibles a Tmp (Huovinen 2001). De éstos, el mecanismo más común es la adquisición de genes *dfr* que codifican para enzimas DHFR insensibles a Tmp. Teniendo en cuenta la diversidad de mecanismos, además de la gran variedad de genes *dfr* (se han descrito al menos 30 genes *dfr* de resistencia a Tmp, (Šeputienė *et al.*, 2010), se hace difícil buscar cada uno de éstos por separado, como lo hizo Navia *et al.* (2003), quien realizó una detección de 16 genes *dfr* mediante PCR y *Restriction Fragments Length Polymorphism* (RFLP). A diferencia de ese grupo de investigación, en este trabajo se construyó una genoteca de ADN, de manera similar a lo efectuado por de Groot *et al.* (1988). Brevemente, de Groot y sus colaboradores, construyeron una genoteca con fragmentos de ADN genómico de *Haemophilus influenzae* Tmp^R, digerido con la enzima *Sau3A1*, de un tamaño entre 35 y 45 Kb clonados en el vector pHC79, se obtuvo un plásmido recombinante que contenía un gen de resistencia a Tmp, el cual se subclonó en el vector pGEM3 para acotar el fragmento clonado. Posteriormente, en el trabajo realizado por de Groot *et al.* (1996), se secuenció este plásmido recombinante y se logró identificar que el gen responsable de la resistencia a Tmp era

folH mutado en su región promotora y codificante, cuya sobreexpresión da cuenta de la insensibilidad a Tmp. El gen *folH* codifica para la enzima DHFR intrínseca de este organismo.

En esta tesis se construyó una genoteca de ADN genómico extraído de una cepa de *S. sonnei* Tmp^R, la cual no presentaba ninguno de los genes de resistencia descritos en nuestro país, *dfrA1* y *dfrA8*. A diferencia de lo realizado por el trabajo mencionado antes, para la construcción de la genoteca se utilizaron fragmentos de entre 2 y 6 Kb de ADN digerido con la enzima *HindIII* clonados en el vector pUC19. Se obtuvo una colonia que presentó el fenotipo de resistencia a Tmp (fenotipo buscado) y Amp (antibiótico de selección del vector utilizado). Luego, al secuenciar el inserto clonado, se identificó un *cassette* génico que contiene el gen *dfrA14* como el responsable de otorgar resistencia a Tmp. A diferencia de lo realizado por de Groot, quien logró identificar mutaciones en el gen de la DHFR intrínseca responsables de la resistencia a Tmp, en este trabajo se logró identificar un gen *dfr* que codifica para una DHFR adquirida, insensible a Tmp, que no había sido identificado en cepas aisladas en Chile.

2. Distribución de genes de resistencia a Tmp

La distribución descrita previamente en nuestro país para los genes *dfrA1* y *dfrA8* indica que la totalidad de cepas de *Shigella sonnei* Tmp^R aisladas en el período 1995-1997, presentaban el gen *dfrA8* y ninguna presentaba el gen *dfrA1* (Toro *et al.*, 2005). En concordancia con estos resultados, la distribución, de los genes de resistencia a Tmp *dfrA1* y *dfrA8* obtenida en este trabajo en cepas de *S. sonnei*, aisladas en los primeros dos períodos, 1995-1997 y 2004-2006, presentan casi en su totalidad el gen

dfrA8, 95% para el primer período (17 cepas sólo presentan este gen y 2 cepas lo hacen en conjunto con *dfrA1*) y 90% (18 cepas) para el segundo. Cabe destacar que dos cepas del primer período presentaron el gen *dfrA1*, dos de ellas lo hicieron en conjunto con el gen *dfrA8*. Es importante tener en consideración que el gen de resistencia a Tmp *dfrA1*, en Chile solo ha sido reportado en cepas de *S. flexneri* y no en *S. sonnei* (Toro *et al.*, 2005).

Por otro lado, en los últimos dos períodos 2010-2011 y 2012-2013 se observa un cambio radical en la distribución de los genes anteriormente mencionados, ya que la presencia del gen *dfrA1* fue de 35% (7 cepas) y 50% (10 cepas), respectivamente, mientras que la de *dfrA8* fue de 0%(ninguna cepa) y 5% (1 cepa), respectivamente. Es importante tener en cuenta que las cepas aisladas en los últimos dos períodos proceden de varias regiones del país, mientras que las cepas de los primeros dos períodos son solo de la región metropolitana.

Otros resultados no publicados de nuestro laboratorio indican que la aparición del gen *dfrA1* coincide con la aparición del integrón clase 2, lo cual ha sido descrito previamente (Ramírez *et al.*, 2010, Šeputienė *et al.*, 2010). Esto sugiere que el gen podría estar asociado a este integrón. Šeputienė *et al.* (2010), describe también un integrón clase 1 que contiene al gen *dfrA1*, contrastando con los resultados en conjunto de nuestro laboratorio y este trabajo, ya que de las cuarenta y tres cepas que presentan un integrón de clase 1, ninguna de ellas posee el gen *dfrA1*. La única excepción corresponde a una cepa aislada en el último período que presenta también un integrón de clase 2.

Por otro lado y en concordancia con lo reportado para el gen de resistencia a Tmp *dfrA8* (Brolund *et al.*, 2010), éste fue identificado principalmente en cepas que no presentan ninguna de las dos clases de integrón, a excepción de tres cepas aisladas en el primer período de estudio, las cuales poseen un integrón clase 1. De estas cepas, dos poseen un integrón de clase 1 atípico que según resultados de nuestro laboratorio, no presenta genes de resistencia a Tmp, sino que solo incluye los genes *blaOXA1* de resistencia a Amp y *aadA1* de resistencia a estreptomicina y espectinomicina. Mientras que el integrón de la cepa restante no ha sido estudiado. Sin embargo, se ha descrito que cepas de *S. sonnei* aisladas en el mismo período que esta cepa y sin ninguna de las dos clases de integrones mencionadas, poseen un plásmido conjugativo con el gen *dfrA8* (Toro *et al.*, 2005), lo que sugiere que esta cepa presenta este plásmido y que el gen *dfrA8* no estaría asociado a integrones.

Por su parte, el gen *dfrA14* fue encontrado en el 100% de las cepas aisladas en el tercer período de estudio 2008-2009. Las cepas pertenecientes a este grupo forman parte del brote surgido en la región Metropolitana y la región de Antofagasta, el que fue analizado en una tesis anterior (Ladino, 2013) para determinar similitud genética entre las cepas. En el trabajo mencionado, se identificó una relación genética cercana entre los distintos aislados bacterianos de *S. sonnei* de ambas regiones, sugiriendo el esparcimiento de un solo clon en el país. De esta forma, la presencia del gen *dfrA14* en el 100% de las cepas aisladas en el tercer período en estudio indica que este marcador también es propio del clon de *S. sonnei* circulante en nuestro país y va en concordancia con la cercana relación genética que hay entre las cepas aisladas de este período. Además de estas cepas, se logró identificar este gen en una cepa aislada en el segundo período de estudio 2004-2006, que por resultados obtenidos en nuestro

laboratorio, sabemos que también presentan cercanía genética a las cepas del tercer período. Esto nos indica que el gen de resistencia a Tmp *dfrA14* ya se encontraba en la población nacional de *S. sonnei*, previo al surgimiento del brote del período 2008-2009. Pese a que la totalidad de las cepas del período 2008-2009 posee este gen, su frecuencia fue disminuyendo en los dos períodos posteriores. Esto contrasta con la estabilidad de los genes de resistencia a Tmp en *E. coli* descrita en un trabajo anterior, donde luego de una drástica disminución en la administración de Tmp a pacientes durante dos años, la resistencia a este antibiótico no se vio afectada. Los autores atribuyen este efecto al bajo costo en el *fitness* que presentan los genes *dfr* de resistencia a Tmp y a la existencia de una fuerte co-selección con otros antibióticos (Sundqvist *et al.*, 2010). Además, la distribución de 13 genes encargados de conferir resistencia a este antibiótico (*dfrA1*, *dfrA3*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA8*, *dfrA9*, *dfrA10*, *dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA17*, *dfrA24*, *dfrA26* y *dfr2d*) no se vio alterada luego de la intervención (Brolund *et al.*, 2010).

Debido a que el gen *dfrA14* presente en las cepas de *S. sonnei* aisladas en nuestro país se encuentra dentro del contexto genético del plásmido pABC-3 de 6779 pb, el cual solo otorga resistencia a Tmp y cotrimoxazol (Tmp más sulfametoxazol), es poco probable que haya ocurrido una co-selección del antibiótico como ocurre en el caso anterior. De esta forma, el cambio en la distribución particular del gen *dfrA14* ocurriría por pérdida del plásmido de resistencia en la población o por dilución entre clones de *S. sonnei* de distinto origen presentes en Chile.

Del total de 100 cepas de *S. sonnei* Tmp^R analizadas, dos cepas no presentaron ninguno de los tres genes de resistencia a Tmp (*dfrA1*, *dfrA8* y *dfrA14*) analizados en el presente trabajo. En el contexto de una tesis paralela realizada por Bárbara Ávila

(Ávila B. 2015), se verificó la susceptibilidad a Tmp de una de estas cepas, la cual resultó sensible. Concordante con este resultado no se identificó ninguno de los tres genes de resistencia estudiados para este antibiótico. En consecuencia, queda solo una cepa cuyo genotipo aún es desconocido.

3. Identificación de un plásmido de *Shigella sonnei* que contiene el gen *dfrA14*

Como resultado de la genoteca, en este trabajo se obtuvo un plásmido recombinante capaz de otorgar resistencia a Tmp. Mediante secuenciación, se identificó que el fragmento de ADN clonado en el vector pUC19 posee 6779 pb y es prácticamente idéntico a un plásmido de *E. coli* denominado pCERC1 (Anantham y Hall, 2012). La única diferencia que presenta en su secuencia es la ausencia de una repetición de 11 pb en el marco de lectura abierto 3 (ORF3), cuya función no ha sido descrita aún. Al recircularizar el fragmento de 6779 pb clonado y transformarlo en *E. coli* se logró identificar un plásmido autoreplicativo que confiere resistencia a Tmp, denominado pABC-3. Este resultado concuerda con lo encontrado en la tesis paralela realizada por Bárbara Ávila (2015), donde se confirma la existencia de un plásmido de tamaño coincidente en el perfil plasmidial de cepas de *S. sonnei* Tmp^R aisladas en Chile durante los años 2008 y 2009. En esta tesis, se logró aislar este plásmido desde geles de agarosa y se utilizó para transformar directamente *E. coli* DH5 α , obteniendo cepas Tmp^R, cuyo plásmido se secuenció. De esta forma, se verificó que la secuencia era idéntica al plásmido pABC-3, concluyendo que éste corresponde a un plásmido completo y no a un fragmento parcial.

Este plásmido confiere resistencia a cotrimoxazol (sulfametoxazol-Tmp). En su secuencia, pABC-3 tiene una zona o *cluster* que agrupa 4 genes de resistencia a

antimicrobianos, los cuales son *sul2* (resistencia a sulfonamidas), *strA* y *strB* (resistencia a estreptomicina) y *dfrA14* el cual interrumpe el gen *strA*. Este *cluster* de resistencia (*sul2 strA::dfrA14 strB*) no sólo se encuentra en el plásmido mencionado, pCERC1, sino también en otros plásmidos de diferentes géneros bacterianos, como por ejemplo en el plásmido de aproximadamente 8,9 Kb denominado pYR1521 (número de acceso NG_041026.1) de *Yersinia ruckeri* aisladas de trucha arcoíris (Huang *et al.*, 2014), otro caso específico corresponde al plásmido de 6050 pb denominado pM3224T (número de acceso KP197004.1) de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aislada de cerdos (Bossé *et al.*, 2015) y en el plásmido de 6,8 Kb parcialmente secuenciado denominado pSTOJO1 (número de acceso NG_035503.1) de *E. coli* aislada de humanos en Nigeria (Ojo *et al.*, 2002) (Fig. 11).

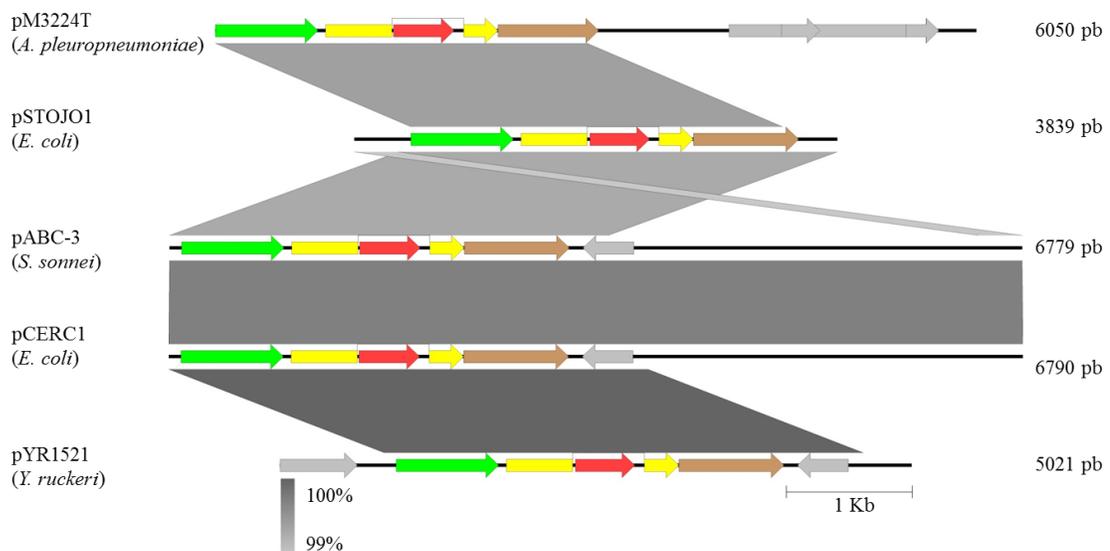


Figura 11. Comparación de plásmidos que contienen el *cluster* de resistencia *sul2 strA-dfrA14-strA strB*. En orden descendente se encuentran: plásmido pM3224T (*A. pleuropneumoniae*), secuencia parcial de plásmido pSTOJO1 (*E. coli*), pABC-3 (*S. sonnei*), pCERC1 (*E. coli*) y secuencia parcial de plásmido pYR1521 (*Y. ruckeri*). En verde se señala el gen *sul2*, en amarillo el gen *strA*, en rojo el gen *dfrA14*, en café *strB* y en gris otros genes no relacionados con resistencia. La intensidad de las zonas grises indica identidad de secuencia.

En los casos de los plásmidos mencionados, la presencia del gen *strA* interrumpido por el *cassette* genético *dfrA14*, no confiere resistencia a estreptomicina, como lo indicado por el antibiograma realizado en el presente trabajo. En concordancia con lo anterior, Chiou & Jones (1995), describen que un alto nivel de resistencia a estreptomicina depende de la expresión conjunta de los genes *strA* y *strB* presentes en los plásmidos, por lo que al interrumpir la secuencia del gen *strA* con el *cassette* genético *dfrA14*, se interrumpe la producción de la proteína funcional que otorga la resistencia a estreptomicina. Además, se ha observado que la estructura genética *strA-strB* funciona como un operón (Shaw *et al.*, 1996), por lo que al interrumpir la secuencia del gen *strA* con el *cassette dfrA14* es probable que la producción de la proteína funcional codificada por el gen *strB* también sea dañada, explicando así la sensibilidad a estreptomicina que genera la inserción del *cassette dfrA14*.

4. Posible procedencia del plásmido pABC-3

Debido a que el plásmido pABC-3 es prácticamente idéntico al pCERC1, es posible pensar que éste fue traspasado de forma completa, de una bacteria a otra. Pero, estos plásmidos no codifican ninguna proteína de movilización, por lo que su propagación se puede deber a transformación natural como es sugerido por Anantham y Hall (2012).

Por otro lado, en el género *Shigella* se han descrito otros plásmidos con una estructura y secuencia similar al pABC-3, cuya diferencia más significativa es la ausencia del *cassette dfrA14*. Ejemplo de ellos son el plásmido de 6200 pb pSFxv_3 (número de acceso NC_017329) de *S. flexneri* (Ye *et al.*, 2010), el plásmido de 8401 pb pKKTET7 (número de acceso NC_008439) de *S. sonnei*, el plásmido de 8401 pb pSs046_spa (número de acceso NC_009345) de *S. sonnei* (Yang *et al.*, 2005) y el

plásmido parcialmente secuenciado pSS4 (número de acceso AF534183) de *S. sonnei*

(Fig.12).

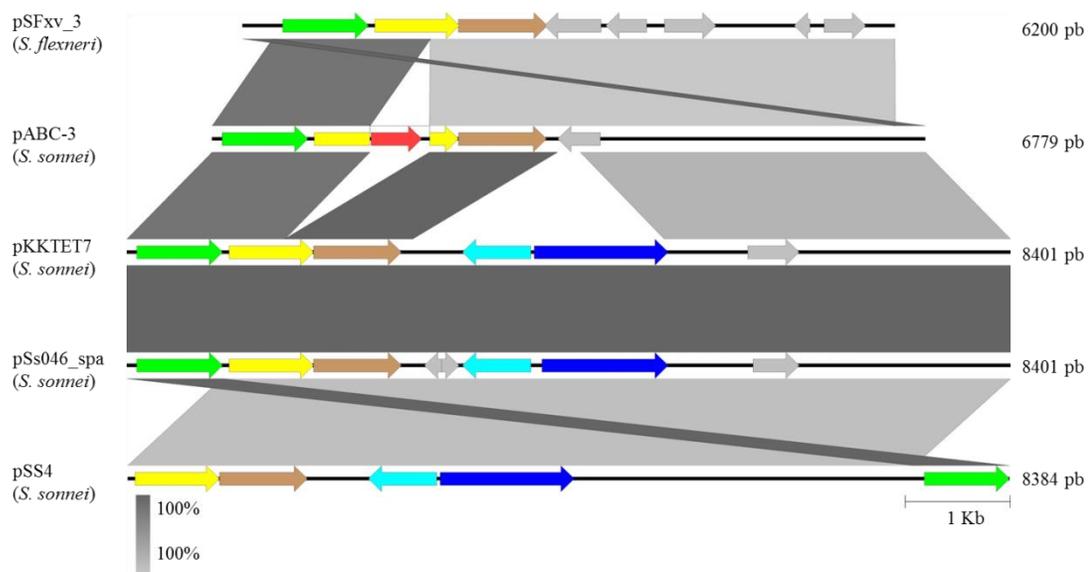


Figura 12. Comparación de plásmidos de *Shigella* similares a pABC-3. En orden descendente se encuentran: plásmido pSFxv_3 (*S. flexneri*), plásmido pABC-3 (*S. sonnei*), pKKTET7 (*S. sonnei*), pSs046_spa (*S. sonnei*.) y secuencia parcial de plásmido pSS4 (*S. sonnei*). En verde se señala el gen *sul2*, en amarillo el gen *strA*, en rojo el gen *dfrA14*, en café *strB*, en celeste el gen *tetR*, en azul el gen *tetA* y en gris otros genes no relacionados con resistencia. Las zonas achuradas indican identidad de secuencia.

El plásmido de *S. flexneri* conserva prácticamente la misma secuencia que la de pABC-3, salvo por la ausencia del cassette *dfrA14* y una repetición de 11 pb en la misma zona de la repetición de 11 pb que diferencia a pABC-3 de pCERC1. Los tres plásmidos de *S. sonnei* mencionados antes, poseen adicionalmente un gen de resistencia a tetraciclina *tetA* con su respectivo gen regulador *tetR*, el que se encarga de reprimir la expresión de *tetA* en ausencia de tetraciclina y de detener la represión en presencia de ella (Berens y Hillen, 2003). Además de esto, los tres plásmidos descritos en *S. sonnei* presentan diferencias en la misma zona que distingue a pABC-3 de pCERC1, los plásmidos pKKTET7 y pSs046_spa tienen una repetición de 11 pb

adicional a pABC-3, mientras que pSS4 presenta una repetición de 11 pb menos que pABC-3.

Junto con lo anterior, otros resultados de nuestro laboratorio muestran que la amplificación por PCR de un fragmento de ADN común entre pABC-3 y los plásmidos mencionados en la **Fig. 12**, es positiva en algunas cepas de *S. sonnei* sensibles a Tmp. La amplificación positiva del fragmento común de los plásmidos mencionados, sugiere la posibilidad que las cepas de *S. sonnei* aisladas en Chile presenten alguno de los plásmidos similares a pABC-3 sin el *cassette dfrA14*. Teniendo en cuenta lo anterior y que la secuencia del *cluster* de resistencia de los plásmidos mencionados en la **Fig. 11** es idéntica, es posible pensar que el plásmido pABC-3 se origina de la inserción del *cassette* genético *dfrA14* en un sitio secundario determinado dentro del gen de resistencia a estreptomicina *strA*, lo que permite que este *cassette* permanezca estable dentro del plásmido y que siempre se encuentre en la misma ubicación en los plásmidos mencionados en la **Fig. 11**, como se describe en Recchia y Hall (1995).

En conclusión, en esta tesis se describió que la resistencia a Tmp en cepas de *S. sonnei* aisladas en nuestro país entre los años 1995 y 2013, se debe mayoritariamente a la presencia de uno de los genes *dfrA1*, *dfrA8* o *dfrA14*. Adicionalmente, se determinó que este último se encuentra en el contexto genético del plásmido de 6779 pb, denominado pABC-3, el cual confiere resistencia a cotrimoxazol (mezcla de Tmp y sulfametoxazol) a la mayoría de las cepas de *S. sonnei* aisladas en nuestro país desde el año 2004 hasta 2013.

VIII. CONCLUSIONES

- La distribución de los genes de resistencia a trimetoprim *dfrA1* y *dfrA8* en cepas de *Shigella sonnei*, sufre un cambio radical a partir de los años 2008-2009, coincidiendo con la aparición del gen *dfrA14*.
- El gen *dfrA14* es responsable de conferir resistencia a trimetoprim en cepas de *Shigella sonnei* aisladas entre los años 2008-2009 y éste permanece en la población de cepas aisladas en períodos posteriores.
- La resistencia a trimetoprim en la mayoría de las cepas de *Shigella sonnei* aisladas en Chile entre 1995 y 2013 está determinada por la presencia de sólo uno de los genes estudiados, *dfrA1*, *dfrA8* o *dfrA14*.
- El gen *dfrA14* presente en cepas de *Shigella sonnei* resistentes a trimetoprim aisladas en Chile, se encuentra siempre en el contexto genético del plásmido de 6779 pb, pABC-3, el cual confiere resistencia a trimetoprim y cotrimoxazol.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Anantham S, Hall RM. (2012). pCERC1, a small, globally disseminated plasmid carrying the *dfrA14* cassette in the *strA* gene of the *sul2-strA-strB* gene cluster. *Microb Drug Resist* 18(4):364-71.

Ashkenazi S, Levy I, Kazaronovski V, Samra Z. (2003). Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. *J Antimicrob Chemother* 51(2):427-9.

Ávila B. (2015). Detección de genes *sul* y *dfr* en plásmidos de cepas chilenas de *Shigella sonnei* multirresistentes aisladas en el periodo 2008-2009. Tesis para optar al grado de Magíster en Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Berens C, Hillen W. (2003). Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* 270(15):3109-21.

Bossé JT, Li Y, Walker S, Atherton T, Fernandez Crespo R, Williamson SM, Rogers J, Chaudhuri RR, Weinert LA, Oshota O, Holden MT, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR; BRaDP1T Consortium. (2015). Identification of *dfrA14* in two distinct plasmids conferring trimethoprim resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 70(8):2217-22.

Brolund A, Sundqvist M, Kahlmeter G, Grape M. (2010). Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. *PLoS One* 16;5(2):e9233.

Capasso C, Supuran CT. (2014). Sulfa and trimethoprim-like drugs-antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 29(3):379-87.

Chiou CS, Jones AL. (1995). Expression and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*. *Gene* 152(1):47-51.

Croxen MA, Finlay BB. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8(1):26-38.

de Groot R, Campos J, Moseley SL, Smith AL. (1988). Molecular cloning and mechanism of trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 32(4):477-84.

de Groot R, Chaffin DO, Kuehn M, Smith AL. (1991). Trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae* is due to altered dihydrofolate reductase(s). *Biochem J* 274 (Pt 3):657-62.

de Groot R, Sluijter M, de Bruyn A, Campos J, Goessens WH, Smith AL, Hermans PW. (1996). Genetic characterization of trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 40(9):2131-6.

DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB. (1989). Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis* 159(6):1126-8.

Hartman PG. (1993). Molecular aspects and mechanism of action of dihydrofolate reductase inhibitors. *J Chemother* 5(6):369-76.

Heikkilä E, Siitonen A, Jahkola M, Fling M, Sundström L, Huovinen P. (1990). Increase of trimethoprim resistance among *Shigella* species, 1975-1988: analysis of resistance mechanisms. *J Infect Dis* 161(6):1242-8.

Huang Y, Michael GB, Becker R, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S, Runge M, Steinhagen D. (2014). Pheno- and genotypic analysis of antimicrobial resistance properties of *Yersinia ruckeri* from fish. *Vet Microbiol* 171(3-4):406-12.

Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39(2):279-89.

Huovinen P. (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis* 32(11):1608-14

Instituto de Salud Pública. (2009). Informe de brotes de diarrea por *Shigella sonnei*, Diciembre – Mayo del 2009. Ministerio de Salud, Chile. Departamento de Epidemiología. <http://epi.minsal.cl/epi/html/Actualidad/BrotesShigellasonnei.pdf>

Köhler T, Kok M, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Gotoh N, Nishino T, Curty LK, Pechere JC. (1996). Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 40(10):2288-90.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omere R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 382(9888):209-22.

Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. (1999). Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 77(8):651-66.

Ladino A. (2013). Análisis de relación clonal entre cepas de *Shigella sonnei* aisladas de brotes de dos regiones de Chile. Tesis para optar al grado de Magíster en Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Marcoleta A, Toro C, Prado V, Serrano M, Fernández P, Benadof D, Camponovo R, Campos V, Porte L, Zamorano J, Ortega C, Urqueta B, Ulloa MT. (2013). Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella sonnei* aisladas durante tres períodos diferentes en la Región Metropolitana, Chile. *Rev Chilena Infectol* Dec;30(6):616-21.

McIver CJ, White PA, Jones LA, Karagiannis T, Harkness J, Marriott D, Rawlinson WD. (2002). Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. *J Clin Microbiol* 40(4):1538-40.

McManus MC. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm* 54(12):1420-33.

Navia MM, Ruiz J, Sanchez-Cespedes J, Vila J. (2003). Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis* 46(4):295-8.

Niyogi SK. (2005). Shigellosis. *J Microbiol* 43(2):133-43.

Niyogi SK. (2007). Increasing antimicrobial resistance--an emerging problem in the treatment of shigellosis. *Clin Microbiol Infect* 13(12):1141-3.

Oh JY, Yu HS, Kim SK, Seol SY, Cho DT, Lee JC. (2003). Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from southwestern Korea during epidemic periods. *J Clin Microbiol* 41(1):421-3.

Ojo KK, Kehrenberg C, Schwarz S, Odelola HA. (2002). Identification of a complete *dfrA14* gene cassette integrated at a secondary site in a resistance plasmid of uropathogenic *Escherichia coli* from Nigeria. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6):2054-5.

Prado V, Lagos R, Nataro JP, San Martin O, Arellano C, Wang JY, Borczyk AA, Levine MM. (1999). Population-based study of the incidence of *Shigella* diarrhea and causative serotypes in Santiago, Chile. *Pediatr Infect Dis J* 18(6):500-5.

Ramírez MS, Piñeiro S. (2010). Argentinian Integron Study Group, Centrón D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother* 54(2):699-706.

Recchia GD, Hall RM. (1995). Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the incQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* 15(1):179-87.

Schroeder GN, Hilbi H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev* 21(1):134-56.

Šeputienė V, Povilonis J, Ruzauskas M, Pavilonis A, Suziedėlienė E. (2010). Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. *J Med Microbiol* 59(Pt 3):315-22.

Shaw PC, Liang AC, Kam KM, Ling JM. (1996). Presence of *strA-strB* gene within a streptomycin-resistance operon in a clinical isolate of *Shigella flexneri*. *Pathology* 28(4):356-8.

Tenover FC. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 34(5 Suppl 1):S3-10; discussion S64-73.

Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, Prado V. (2005). Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiol Infect* 133(1):81-6.

Vrints M, Mairiaux E, Van Meervenne E, Collard JM, Bertrand S. (2009). Surveillance of antibiotic susceptibility patterns among *Shigella sonnei* strains isolated in Belgium during the 18-year period 1990 to 2007. *J Clin Microbiol* 47(5):1379-85.

White PA, Rawlinson WD. (2001). Current status of the *aadA* and *dfp* gene cassette families. *J Antimicrob Chemother* 47(4):495-6.

Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, Yan Y, Tang X, Wang J, Xiong Z, Dong J, Xue Y, Zhu Y, Xu X, Sun L, Chen S, Nie H, Peng J, Xu J, Wang Y, Yuan Z, Wen Y, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Hou Y, Yu J, Jin Q. (2005). Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Res* 33(19):6445-58.