

cepas portadoras del gen *blaKPC-2* en una planta de tratamiento de aguas residuales en Japón, por lo que deberíamos estar alerta ante la emergencia de estos mecanismos de resistencia plasmídicos en *Aeromonas* spp.⁸.

Bibliografía

1. Parker JL, Shaw JG. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. J Infect. 2011;62:109–18.
2. Tena D, González-Praetorius A, Gimeno C, Pérez-Pomata MT, Bisquert J. Extraintestinal infection due to *Aeromonas* spp.: Review of 38 cases. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25:235–41.
3. Sinclair HA, Heney C, Sidjabat HE, George NM, Bergh H, Anuj SN, et al. Genotypic and phenotypic identification of *Aeromonas* species and CphA-mediated carbapenem resistance in Queensland, Australia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85:98–101.
4. Alcaide E, Blasco MD, Esteve C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. Res Microbiol. 2010;161:40–5.
5. Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hyney M, Smith P, et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant TetA. Appl Environ Microbiol. 2000;66:3883–90.
6. Meng S, Wang YL, Liu CG, Yang J, Yuan M, Bai XN, et al. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Aeromonas* isolates from clinical patients, tap water systems, and food. Biomed Environ Sci. 2020;33:385–95.

7. Garbern SC, Chu TC, Gainey M, Kanekar SS, Nasrin S, Qu K, et al. Multidrug-resistant enteric pathogens in older children and adults with diarrhea in Bangladesh: epidemiology and risk factors. Trop Med Health. 2021;49:34. <http://dx.doi.org/10.1186/s41182-021-00327-x>.
8. Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M. Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolates from the effluent of an urban wastewater. Environ Microbiol Rep. 2019;11:589–97.

Iker Alonso-González*, Mikel Gallego-Rodrigo
y José Luis Barrios-Andrés

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Cruces,
Baracaldo (País Vasco), España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: Iker.alonsogonzalez@osakidetza.eus
(I. Alonso-González).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.06.009>

0213-005X/ © 2022 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Caracterización fenotípica y genotípica de *Shigella sonnei* portadora de la betalactamasa de espectro extendido CTX-M-27. A propósito de dos casos en España en hombres que tienen sexo con hombres



Phenotypic and genotypic characterization of *Shigella sonnei* carrying the extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-27. A report of two cases in Spain in men who have sex with men

Caso n.º 1

Se trata de un paciente de 28 años, natural de Portugal, que llevaba 15 días en España y mantenía relaciones sexuales con hombres (HSH). Acudió a urgencias con diarrea y fiebre de 38,1 °C, así como leve disuria y 20x10³ µl leucocitosis en sangre. Se recogió muestra de heces y orina, y el paciente fue ingresado con ceftriaxona intravenosa (1 g/24 h) como tratamiento empírico. En el coprocultivo se aisló *Shigella* spp., y el paciente fue dado de alta con ciprofloxacino oral (500 mg/12 h durante 3 días) antes de conocer la sensibilidad a antimicrobianos. El aislado resultó ser *Shigella sonnei* (*S. sonnei*) productora de una betalactamasa de espectro extendido (BLEE), CTX-M del grupo 9 resistente a cefalosporinas, cotrimoxazol y quinolonas. Varios días después, el paciente vuelve a ingresar por persistencia de cuadro con fiebre alta y diarrea líquida, siendo tratado esta vez con ertapenem (1 g cada 24 h por vía intravenosa durante 5 días). Es dado de alta al finalizar el ciclo de antibiótico por resolución del cuadro.

Caso n.º 2

Paciente de 47 años, HSH, en tratamiento mantenido con profilaxis preexposición (PrEP), que acudió a la consulta de infecciones de transmisión sexual (ITS) para control y recibir profilaxis con ceftriaxona (1 g intramuscular) por contacto sexual de riesgo. Refería cuadro de dolor abdominal difuso con aumento de deposiciones (hasta 10 al día) con productos patológicos (moco/sangre) con inicio 48 h antes, pero en ese momento se decidió actitud expectante. Volvió a ser atendido 7 días después dada la persistencia del cuadro clínico, recogiendo muestra de coprocultivo y de su pareja actual (con clínica gastrointestinal similar), con actitud expectante

a la espera de los resultados de coprocultivo. En la muestra de heces se detecta *S. sonnei* productora de la BLEE de tipo cefalosporinasa del grupo CTX-M-9, mientras que en su pareja se detecta *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) no portadora de BLEE y cuya sensibilidad a antimicrobianos fue distinta (únicamente resistente a quinolonas).

Microbiología

En el primer caso se realizó panel de PCR «STI Essential Assay, Allplex™» (Seegene Inc, Seúl, Corea del Sur) de la muestra de orina (primera parte de la micción) con detección de *Chlamydia trachomatis*. En ambos casos se extrajo muestra de heces para realizar el panel de PCR «Enteric bacterial» del sistema BD Max™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) con detección de ADN de *Shigella/Escherichia coli* (*E. coli*) enteroinvasivo. Posteriormente, la muestra de heces se sembró en los medios de agar MacConkey y Hektoen (BD™), pudiéndose aislar colonias lactosa negativas en el agar MacConkey que se identificaron como *Shigella* spp./*E. coli* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker, Massachusetts, EE. UU.), ya que este sistema no permite discriminar entre estos dos géneros. Las colonias lactosa negativas se sembraron en los medios de agar hierro-triple azúcar (TSI) y agar lisina-hierro (LIA) (BD™) para su identificación, confirmando el género *Shigella* spp. (fig. 1A). Posteriormente se realizó aglutinación con «Difco™ *Shigella* Antisera Poly» (BD™) para determinar la especie, y se confirmó la identificación de *S. sonnei*.

El antibiograma se realizó utilizando la técnica disco-difusión, así como el panel «ID/NMIC 503» del sistema Phoenix BD^R (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), mediante los cuales se detectó resistencia a cefalosporinas, aztreonam, trimetoprima/sulfametoxazol y quinolonas. También se estudió la sensibilidad a azitromicina en ambos aislados mediante E-test^R resultando resistentes con CMI >256 mg/l (punto de corte epidemiológico de las cepas salvajes en ≤16 mg/l). Se realizó prueba rápida de inmunocromatografía «NG-Test CTX-M Múltiple» (NG Biotech, Guipry-Messac, Francia), que permite detectar los tipos más comunes de cefalosporinas (grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25) resultando positiva. Posteriormente, se confirma el fenotipo de resistencia BLEE mediante la técnica de disco-difusión con los kits de confirmación (fig. 1B) «Total ESBL, AmpC and ESBL + AmpC Confirm kit» (ROSCO Diagnostica A/S, Taas-

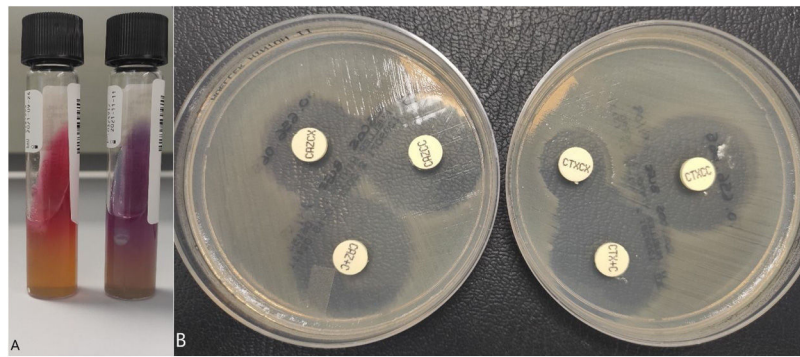


Figura 1. Identificación de *Shigella* spp. y detección de la presencia de una betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

A) Izquierda: medio TSI (triple azúcar-hierro), se observa fermentación de glucosa sin producir gas; derecha: medio LIA (lisina-hierro), se observa que no descarboxila ni desamina la lisina. B) Técnica de disco-difusión con los kits de confirmación «Total ESBL, AmpC and ESBL + AmpC Confirm kit» (ROSCO Diagnostica A/S, Taastrup, Dinamarca). Se observa el aumento del halo (> 5 mm) de cefotaxima y ceftazidima en presencia del ácido clavulánico pero no en presencia de cloxacilina, confirmándose la presencia de una BLEE.

trup, Dinamarca y mediante el panel «Check-Direct ESBL Screen» del sistema BD Max™ con detección de betalactamasa de tipo cefalosporinasa del grupo CTX-M-9 (que puede englobar distintos genes: *bla*CTX-M-14, *bla*CTX-M-24 y *bla*CTX-M-27).

Ambas cepas fueron enviadas al Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) que realizó detección fenotípica y genotípica de resistencias antibióticas. Se detectó que ambas cepas eran portadoras de la BLEE CTX-M-27 mediante técnicas fenotípicas y por secuenciación, perteneciendo al secuenciotipo 152 (MLST). El análisis de los genomas indicó que ambos aislados pertenecían al clúster de la alerta de *S. sonnei* multirresistente emitida por Reino Unido durante los meses previos a los casos expuestos¹. Los dos aislados eran idénticos entre sí con 0 alelos de diferencia usando el esquema cgMLST del software SeqSphere (Ridom Bioinformatics, Alemania).

Discusión

El género *Shigella* (incluye las especies *S. sonnei*, *S. flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella dysenteriae*) causa un síndrome gastrointestinal denominado shigelosis. La mayoría de los pacientes sufren diarrea (en ocasiones con productos patológicos), fiebre y dolor abdominal. Su transmisión se produce principalmente por contacto de persona a persona, con alimentos o agua contaminados. Normalmente, la infección es autolimitada, sin necesidad de requerir tratamiento antibiótico. Con respecto a la transmisión por vía sexual, en los últimos años se ha visto asociada a brotes entre HSH por todo el mundo, en EE. UU., España y Londres^{2–4}. En cuanto a los factores de riesgo de infección, el uso de la PrEP posiblemente podría estar influyendo en los comportamientos sexuales al reducir el uso de las medidas de barrera (preservativos), aumentando así la prevalencia de las ITS, entre las que se incluye la shigelosis como causa emergente⁵.

Por otro lado, las resistencias a antimicrobianos debidas a BLEE cada vez suponen un problema mayor. Las comunicaciones de cepas de *S. sonnei* portadoras de BLEE en pacientes que no han viajado a zonas endémicas (Asia) son escasas hasta el momento, de modo que un adecuado programa de vigilancia nos podría dar información acerca de la situación epidemiológica en nuestro país^{6–8}. Precisamente en Gran Bretaña, se han comunicado varios brotes (o brote prolongado) de *S. sonnei* portadoras de BLEE (gen *bla*CTX-M-27-Grupo 9) y un plásmido QnrB19 (sensibilidad disminuida a quinolonas) entre HSH desde 2015⁹. Así mismo, en Australia desde 2019 se comprobó un aumento de casos de shigelosis en HSH cuyas cepas comparten un perfil similar a las estudiadas en Gran Bretaña (probablemente introducido por viajeros que regresaron de una zona en la que circulaba este grupo clonal)¹⁰. En España,

hay 8 casos confirmados y 22 posibles casos relacionados con estas cepas multirresistentes de *S. sonnei*. De hecho, al menos otros cuatro aislamientos secuenciados están estrechamente relacionados dentro del clúster y con las secuencias representativas del Reino Unido, al igual que nuestras dos cepas¹.

En pacientes HSH que presenten clínica gastrointestinal con fiebre, dolor abdominal, vómitos o diarrea con productos patológicos como sangre o moco, se debería sospechar *Shigella* spp. como infección transmitida por vía sexual. Se debería restringir el uso de antibióticos a los casos moderados/graves para evitar la consolidación y transmisión de resistencias antibióticas. A nivel epidemiológico debería vigilarse su transmisión y actuar como otra ITS más, evitando mantener relaciones sexuales y con coproculativo de control para asegurarse de que la carga bacteriana es baja o indetectable.

Financiación

Este trabajo no ha recibido ningún tipo de financiación.

Bibliografía

- European Centre for Disease Prevention and Control. Increase in extensively-drug resistant *Shigella sonnei* infections in men who have sex with men in the EU/EEA and the UK – 23 February 2022. ECDC: Stockholm; 2022. [consultado 1 Abr 2022]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Shigella-infections-MSM-Feb-2022.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Shigella sonnei* outbreak among men who have sex with men—San Francisco, California, 2000–2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2001;50:922–6. PMID: 11699845.
- Culqui DR, García-de-Olalla P, Alva-Chavez KP, Lafuente S, Rius C, de Simón M, et al. Análisis del patrón epidemiológico de la shigelosis en Barcelona entre 1988 y 2012: ¿es una infección de transmisión sexual emergente? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33:379–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.013>.
- Morgan O, Crook P, Cheasty T, Jiggle B, Giraudon I, Hughes H, et al. *Shigella sonnei* outbreak among homosexual men, London. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1458–60. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1209.060282>.
- Jansen K, Steffen G, Potthoff A, Schuppe AK, Beer D, Jessen H, et al., MSM Screening Study group. STI in times of PrEP: high prevalence of chlamydia, gonorrhoea, and mycoplasma at different anatomic sites in men who have sex with men in Germany. *BMC Infect Dis.* 2020;20:110. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-020-4831-4>.
- Kim JS, Kim J, Jeon SE, Kim SJ, Kim NO, Hong S, et al. Complete nucleotide sequence of the IncI1 plasmid pSH4469 encoding CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a clinical isolate of *Shigella sonnei* from an outbreak in the Republic of Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44:533–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.08.007>.
- Seral C, Rojo-Bezares B, Garrido A, Gude MJ, Sáenz Y, Castillo FJ. Caracterización de *Shigella sonnei* portadora de CTX-M-15 en un paciente español sin antecedentes de viaje al extranjero. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:469–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2011.11.015>.
- González Donapetry P, Pescador Martín P, Gómez-Gil Mira R, Ruiz Carrascoso G. Imported infection by CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-

- producing *Shigella sonnei*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37:141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2018.03.006>.
9. Mook P, McCormick J, Bains M, Cowley IA, Chattaway MA, Jenkins C, et al. ESBL-producing and macrolide-resistant *Shigella sonnei* infections among men who have sex with men, England, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016;22:1948–52. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2211.160653>.
10. Ingle DJ, Andersson P, Valcanis M, Barnden J, da Silva AG, Horan KA, et al. Prolonged outbreak of multidrug-resistant *Shigella sonnei* harboring blaCTX-M-27 in Victoria, Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64:e01518–1520. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01518-20>.

Domingo Fernández Vecilla^{a,b,*}, Kristina Zugazaga Inchaurreza^{a,b}, Itxaso Lombide Aguirre^{b,c} y José Luis Díaz de Tuesta del Arco^{a,b}

^a Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Vizcaya, España

^b Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces, Barakaldo, Vizcaya, España

^c Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Vizcaya, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: domingofvec@gmail.com

(D. Fernández Vecilla).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.06.006>

0213-005X/ © 2022 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Synergistic anti-malarial effects of *Ocimum sanctum* leaf extract and artemisinin



Efectos antipalúdicos sinérgicos del extracto de hoja de *Ocimum sanctum* y artemisinina

Malaria remains a major health problem in Indonesia. It has been reported that the prevalence of parasitemia in Timika, Papua was 16.3%, and almost 50% of cases were caused by *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*).¹ Papua province has not only the highest prevalence of malaria in Indonesia but also the highest prevalence of multidrug-resistance to both *P. vivax* and *P. falciparum*.² Although artemisinin-based combination therapy (ACT) was adopted as the first-line anti-malarial treatment, studies have demonstrated the failure of ACT towards malaria elimination in several Southeast Asian countries.³ Hence, an alternative combination therapy against malaria is needed.

Ocimum sanctum (*O. sanctum*, Indonesian name Kemangi) belongs to the Lamiaceae family and is widely distributed throughout Indonesia. *O. sanctum* is used by Indonesian to treat several diseases, including malaria; however, the underlying mechanism remains elusive. A study revealed that the ethanolic leaf extract of *O. sanctum* displays more potent antiplasmodial activity than other *Ocimum* species *in vitro*.⁴ Therefore, this study aims to evaluate the synergistic anti-malarial properties of *O. sanctum* and artemisinin (ART) against the *Plasmodium* infection *in vivo*. In addition, the level of transforming growth factor-beta (TGF- β) was examined.

The leaves of *O. sanctum* were collected from Malang, East Java, Indonesia. The species was identified and confirmed by a plant taxonomist of the herbarium unit, UPT Materia Medica, Batu, East Java, Indonesia. The ethanolic extract preparation was conducted as previously described.⁵ For *in vivo* experiments, female Balb/c mice between 8 and 12 weeks of age were used. Sixty-three mice were randomly assigned into seven groups (9 mice per group), namely negative control, positive control, infected mice treated with ART (0.036 mg/g/day); two different doses of *O. Sanctum* extract (0.25 and 0.5 mg/g/day); and combinations of artemisinin and *O. Sanctum* extract. The malaria model was performed by i.p. injection of *Plasmodium berghei* adjusted to 10^6 parasites in 0.2 mL blood per mouse. Infected mice were then treated on the sixth day of infection with parasitemia approximately around 10% for seven consecutive days. To examine TGF- β levels, mice peritoneal macrophages on day seven post-treatment were cultured as described previously,⁶ and the supernatants were used to quantify the concentration of TGF- β (BioLegend) by ELISA.^{7–10} The study was approved by the medical ethics committee of Brawijaya University with Reference No. 27-KE. The reduction of parasitemia and TGF- β levels were analyzed by two and one-way ANOVA, respectively, followed by

the Fisher LSD *post hoc* test using StatPlus. Significant differences were accepted when $p < 0.05$.

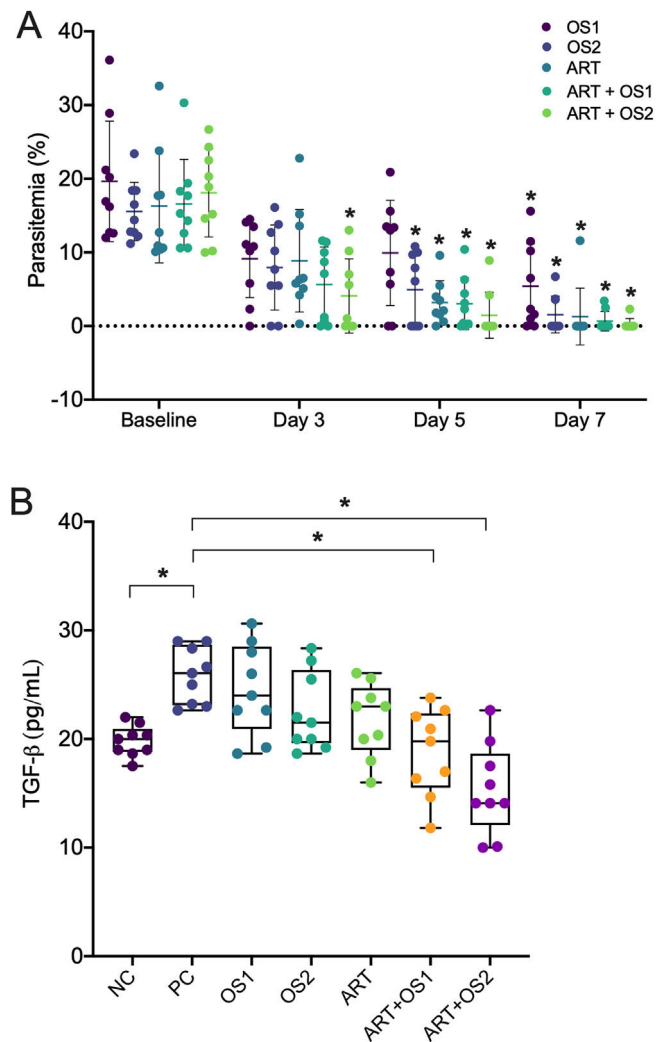


Fig. 1. Synergistic anti-malarial effects of *Ocimum sanctum* leaf extract and artemisinin. (A) Reduction of parasitemia. (B) TGF- β level by peritoneal macrophages during mice malaria infections measured by ELISA after 24h *in vitro* culture. Data are expressed as a mean \pm standard deviation (SD). (*) Indicates a significant difference compared to the baseline level or between two groups indicated in the graphs ($p < 0.05$). OS1 = *O. Sanctum* 0.25 mg/g/day; OS2 = *O. Sanctum* 0.5 mg/g/day; ART = artemisinin 0.036 mg/g/day; ART + OS1 = artemisinin 0.036 mg/g/day + *O. Sanctum* 0.25 mg/g/day; ART + OS2 = artemisinin 0.036 mg/g/day + *O. Sanctum* 0.5 mg/g/day; NC = negative control; PC, positive control.