

## ARTÍCULOS ORIGINALES

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

### *Plesiomonas shigelloides* una Vibrionaceae en quien pensar

Lic. Laura Bravo,<sup>1</sup> Lic. Roberto Cabrera,<sup>2</sup> Dra. Margarita Ramírez,<sup>3</sup> Dra. Alina Llop,<sup>4</sup> Téc. Anabel Fernández,<sup>5</sup> Lic. Belkys García<sup>6</sup> y Lic. Luis Morier<sup>7</sup>

#### RESUMEN

Se investigó la estructura antigénica y la susceptibilidad antimicrobiana en 99 cepas aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda (6 procedentes de un brote de enfermedad de transmisión digestiva en Santiago de Cuba) y en una cepa aislada de un paciente fallecido por síndrome neurológico infeccioso (SNI, meningitis). Se identificaron de las cepas cubanas aisladas 4 nuevos serotipos *no descritos con anterioridad en la clasificación mundial* (093, 094, 095, 096) los que fueron incluidos en el Esquema de Serotipaje Internacional, por el Centro de Referencia Internacional, Praga, República Checa. Se demostró por primera vez en Cuba la circulación de los serotipos O17: H11, O11: H2, O23: H1a1c, O57: H3 que presentan reacción cruzada con el género *Shigella*. Las cepas procedentes del brote de enfermedad de transmisión digestiva correspondieron al serotipo O50: H11, en ellas se evidenció la presencia de toxina termoestable. Se describió el primer caso reportado en Cuba de síndrome neurológico infeccioso con etiología a *Plesiomonas shigelloides*, la cepa correspondió al serotipo O50: H11. Se demostró el patrón de resistencia antimicrobiana reportado internacionalmente.

**Descriptores DeCS:** PLESIOMONAS/clasificación; SEROTIPIFICACION; TEST DE SENSIBILIDAD MICROBIANA.

*Plesiomonas shigelloides* es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, oxidasa positivo perteneciente a la familia Vibrionaceae.<sup>1</sup> Aislado por primera vez en 1947 en las heces de un paciente con gastroenteritis, este microorganismo ha sido asociado con bacteriemia, meningitis y septicemia del recién nacido, hepatopatía alcohólica, sickleemia y la enfermedad de Hodgkin.<sup>2</sup>

La principal evidencia de que *Plesiomonas shigelloides* es un patógeno entérico es que este microorganismo ha sido aislado de personas con diarrea (1-16 %) más frecuentemente que, de las heces de personas sin diarreas (0,1 %).<sup>3</sup> Entre los

factores potenciales de virulencia asociados con la patogenicidad de este microorganismo se encuentran: la invasividad y la enterotoxigenicidad (toxina termoestable), entre otros. Estos factores son motivo de estudio en diferentes áreas geográficas, asociados con la diarrea del viajero en áreas tropicales y subtropicales. Con una sola especie y múltiples serotipos se conoce que *Plesiomonas shigelloides* presenta reacción cruzada con algunos serotipos del género *Shigella*, entre los que se pueden mencionar el O17: H11 que tiene un lipopolisacárido idéntico al de *Sh. sonnei* fase 1, O11: H11 (*Sh. dysenteriae* 8), O22: H3 (*Sh. dysenteriae* 7), O23: H1a1c (*Sh. boydii* 13),

<sup>1</sup> Licenciada en Biología. Investigadora Auxiliar.

<sup>2</sup> Licenciado en Microbiología.

<sup>3</sup> Especialista de I Grado en Microbiología. Investigadora Agregada.

<sup>4</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Profesora Titular. Investigadora Titular.

<sup>5</sup> Técnica en Farmacia Industrial.

<sup>6</sup> Licenciada en Farmacia Industrial.

<sup>7</sup> Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

054: H2 (*Sh. boydii* 2), 057: H3 (*Sh. boydii* 9), 093: H2 (*Sh. dysenteriae* 6).<sup>4,5</sup>

Los estudios de serotipaje resultan útiles para propósitos epidemiológicos o para determinar las relaciones entre cepas dentro de una genoespecie.<sup>6</sup>

A pesar de que la enfermedad diarreica aguda es generalmente autolimitada, la terapia antimicrobiana ha sido utilizada con eficacia en pacientes con diarreas de más de 4 ó 5 d de evolución, en individuos inmunodeprimidos, con enfermedades subyacentes o infecciones extraintestinales.<sup>7</sup> Por todo lo antes expuesto el propósito fue introducir en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, la técnica de serotipaje en este agente.

## MÉTODOS

Durante los años 1990-1998 se recibieron en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto "Pedro Kourí" (IPK) un total de 618 cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de heces (6 de ellas aisladas en un brote de enfermedad de transmisión digestiva y una cepa aislada de un paciente fallecido por síndrome neurológico infeccioso, meningitis), procedentes de los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología de Pinar del Río, Ciudad de La Habana, Matanzas, Villa Clara, Ciego de Ávila, Camagüey, Las Tunas, Holguín, Guantánamo, Santiago de Cuba, Granma, y del Centro Municipal de Higiene y Epidemiología de la Isla de la Juventud. Todas las cepas fueron ubicadas en género y especie de acuerdo con lo que refiere la literatura especializada.<sup>8</sup>

Para los estudios de serotipaje y susceptibilidad antimicrobiana se escogieron 100 cepas que fueron serotipadas según el esquema de serotipaje internacional y se utilizaron suspensiones de cultivos de 18-24 h; éstos fueron aglutinados en láminas con antisueros somáticos y flagelares diluidos 1/10 y 1/25 respectivamente, procedentes del Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología de Praga. En algunas cepas la aglutinación flagelar pudo ser determinada después de realizar algunos subcultivos en medio de agar nutriente semisólido, para estimular la producción de flagelos.<sup>9</sup> La susceptibilidad antimicrobiana frente a 17 drogas fue determinada por la técnica de Bauer-Kirby.<sup>10</sup>

La determinación de la enterotoxigenicidad fue investigada en aquellas cepas procedentes del brote mediante la técnica descrita por Donta y otros, que es reconocida como técnica de referencia internacional. Se utilizaron monocapas pertenecientes a la línea clonal Y-1, procedentes de la ATCC (*American Type Culture Collection*), las cuales fueron adaptadas y mantenidas en el laboratorio de cultivo celular del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La interpretación de la lectura se hizo basándose en el criterio de que la toxina termoestable puede causar redondeamiento y efecto citotóxico en 50 % de las células adrenales Y-1.<sup>11</sup>

Se utilizaron como cepas controles en todas estas pruebas: *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 5132, *Vibrio cholerae* 569 B, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27850.

## RESULTADOS

Las 618 cepas en estudio se identificaron como *Plesiomonas shigelloides*, pues resultaron ser bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, con reacción positiva a la oxidasa, lisina, arginina, ornitina, rojo de metilo y redujeron los nitratos a nitritos, glucosa (sin producción de gas); asimismo móviles con producción de indol, utilización del inositol no así del manitol. Todas las cepas resultaron negativas a la producción de ureasa, acetoina, citrato reductasa y ácido fenilpirúvico, lactosa, sacarosa y cisteína disulfurada. De esta forma todas las cepas fueron identificadas según la literatura especializada como *Plesiomonas shigelloides*.

La distribución de serotipos por provincias fue la siguiente: *Isla de la Juventud*: 07: H40, 022: H3; *Pinar del Río*: 017: H11, 011: H2, 08: H3, 01: H1a1b, 06: H3, 022: H3, 096: H18, 038: H8, 051: H1a1c, 02: H1a1c; *Ciudad de La Habana*: 058: H2, 03: H2, 04: H49; *Matanzas*: 023: H1a1c, 07: H40, 022: H3, 01: H1a1b; *Villa Clara*: 051: H1a1c; *Ciego de Ávila*: 052: H3; *Camagüey*: 017: H11, 026: H1a1c, 011: H2, 03: H2, 057: H3, 055: H46, 07: H40, 035: H11, 095: H11, 094: H3, 05: H38, 083: H45, 096: H18, 019: H2, 05: H38, 012: NM, 01: H1a1b, 042: H2; *Las Tunas*: 017: H11, 022: H3, 063: NM;

Holguín: 036: H34, 05: H38, 063: NM, 022: H3, 017: H11, 04: H49, 07: H40; Guantánamo: 093: H2, 04: H49, 07: H40; Santiago de Cuba: 083: H45, 025: H3, 055: H46, 079: H43, 079: H43, 09: H2, 063: NM, 038: H8, 022: H3, 010: H41, 050: H11, Granma: 038: H8, 010: H41, 07: H40, 050: H11 (tabla).

Los serotipos que con mayor frecuencia fueron identificados correspondieron a 017: H11 (11 %), 023: H1a1c (8 %), 057: H3 (8 %), 011: H2 (7 %),

TABLA. Serotipos identificados en Cuba

Ag O	Ag H	Serotipo	No/%	Países/Aislamiento
17	11	017: H11 ( <i>Sh. sonnei</i> )	11	Alemania, Japón, Canadá
23	1a1c	023: H1a1c ( <i>Sh. boydii</i> 13)	8	Iraq
57	3	057: H3 ( <i>Sh. boydii</i> 9)	8	Japón
11	2	011: H2 ( <i>Sh. dysenteriae</i> 8)	7	Japón
50	11	050: H11	7	Japón, Bangladesh
22	3	022: H3 ( <i>Sh. dysenteriae</i> 7)	1	República checa
93	2	093: H2 ( <i>Sh. dysenteriae</i> 6)	2	Cuba
94	3	094: H3	1	Cuba
95	11	095: H11	2	Cuba
96	3	096: H3	2	Cuba
55	46	055: H46	4	China
35	11	035: H11	5	República checa
1	1a1b	01: H1a1b	3	Japón
8	3	08: H3	1	Bulgaria, Suecia
6	1a1b	06: H1a1b	1	Alemania, República checa
51	1a1b	051: H1a1b	2	Tailandia
2	1a1c	02: H1a1c	1	Canadá, Japón
7	40	07: H40	5	Japón, Alemania
10	41	010: H41	1	Japón
9	2	09: H2	1	India
3	2	03: H2	1	Suecia, Alemania
52	3	052: H3	1	Japón
4	49	04: H49	1	Iraq
58	2	058: H2	1	Japón
25	3	025: H3	1	Iraq
5	38	05: H38	2	Japón
83	45	083: H45	2	Alemania
19	2	019: H2	1	Japón, Iraq, Yugoslavia
12	NM	012: NM	1	Japón, Suecia, Iraq
63	NM	063: NM	5	Tailandia
26	1a1c	026: 1a1c	1	Iraq
38	8	038: H8	2	Iraq
36	34	036: H34	1	República checa
32	14	032: H14	1	Suecia, Iraq
42	2	042: H2	1	Japón
68	2	068: H2	1	Canadá, Japón
72	32	072: H32	1	Canadá
73	33	073: H33	1	Canadá
74	NM	074: NM	1	Canadá
79	43	079: H43	1	Canadá, Yugoslavia

los que presentaron reacción cruzada con algunos serotipos del género *Shigella*, y el 050: H11 (7 %) responsable del brote de transmisión digestiva en Santiago de Cuba y agente etiológico de la meningitis del neonato. Se identificaron en total 40 serotipos diferentes. Los serotipos 093, 094, 095, 096 fueron encontrados exclusivamente en Cuba en las provincias de Camagüey y Guantánamo. En las provincias de Holguín y Pinar del Río así como en Holguín y Guantánamo se identificaron los serotipos 022 y 04, simultáneamente.

Del total de cepas, 100 % resultó sensible al cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, cefalotina, cefotaxima y resistentes a la amikacina, ampicilina, colimicina, estreptomina, meticilina, novobiocina y kanamicina. El patrón de resistencia se encontró en la totalidad de las cepas: Amik, Amp, Coli, Estrepto, Meti, Novo, Kana.

En las 6 cepas procedentes del brote se demostró la presencia de toxina termoestable, al observarse redondeamiento celular en más de 50 % de la monocapa, no así en la monocapa sin inocular. En todas se identificó igual serotipo (050: H11) y todas presentaron el mismo patrón de resistencia antes mencionado.

## DISCUSIÓN

Aunque algunos de los mecanismos sobre la enteropatogenicidad en *Plesiomonas shigelloides* son aún discutidos, las evidencias clínicas y epidemiológicas han demostrado que esta bacteria puede ser considerada como un agente enteropatógeno. La forma más común de la enfermedad diarrea aguda causada por este agente es la diarrea secretoria, muy parecida a la producida por *Vibrio cholerae* 01 y *E. coli*, con síntomas de deshidratación, vómitos, náuseas y dolores abdominales. A pesar de ser ésta una enfermedad autolimitada se ha reportado que 60 % de los casos afectados han requerido hospitalización y la terapia antimicrobiana ha acortado el desarrollo de la enfermedad diarrea.<sup>12</sup>

Tal vez los factores que hayan contribuido a la mortalidad por meningitis causada por *Plesiomonas shigelloides* en el neonato, fueron la inadecuada terapia antimicrobiana así como la prolongada ruptura de la membrana (según datos tomados de

la historia clínica). El hallazgo de *Plesiomonas shigelloides* por primera vez en Cuba como causa de meningitis del neonato está acorde con lo publicado en la literatura especializada.<sup>13</sup>

Desde los primeros estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana realizados en 1968 hasta la década de los años 90, *Plesiomonas shigelloides* ha permanecido susceptible a las drogas más comúnmente utilizadas en el tratamiento de las enfermedades diarreicas agudas (EDA): cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, y ha sido resistente a la penicilina y ampicilina.<sup>14</sup>

En relación con los patrones de sensibilidad de las cepas estudiadas, se puede decir que los resultados obtenidos coinciden con lo planteado por *de-Mondino* y otros en 1995, que demostraron altos porcentajes de sensibilidad *in vitro* para la cefotaxima, la cefalotina y el trimetoprim-sulfametoxazol.<sup>15</sup>

Dentro de las drogas a las que fueron más resistentes las cepas, se encuentran amikacina, kanamicina y estreptomycin. Resultados similares fueron obtenidos por *Marchall* y otros en 1996.<sup>16</sup>

Una gran variedad de métodos para el estudio de los mecanismos de enteropatogenicidad de *Plesiomonas shigelloides* han sido utilizados, entre los que se pueden mencionar: inoculación en células adrenales Y-1, prueba de Sereny y el asa ileal de conejo. La presencia de una toxina termoestable que causó redondeamiento en las células adrenales Y-1, ha sido demostrada por otros investigadores. Es de destacar que estos resultados en relación con las cepas del brote de enfermedad de transmisión digestiva coinciden con lo publicado por otros autores, al demostrarse en éstas la presencia de toxina termoestable.<sup>17</sup>

En la década de los años 70, *Shimada* y otros, describieron reacción cruzada de algunos serotipos de *Plesiomonas shigelloides* con algunos serotipos de *Shigella spp*, y en 1994 los mismos autores demuestran que el serotipo 057: H3 presenta reacción cruzada con *Shigella boydii* 9. El hallazgo en Cuba del serotipo 057: H3 y la reacción positiva a la aglutinación con *Shigella boydii* 9 coincide con los resultados de los autores antes mencionados.<sup>18</sup>

Se ha descrito que algunos serotipos han sido reportados en diferentes ecosistemas así como otros son privativos de determinadas áreas geográficas. Los serotipos 093, 094, 095, 096 fueron reportados como nuevos para Cuba y para el mundo por lo que el Comité de Expertos en Vibrionaceae decidió incluirlos en el Esquema de Serotipaje Internacional. Los resultados obtenidos en este estudio en relación con los serotipos más frecuentemente aislados están acorde con trabajos publicados en Asia, Europa y otras áreas geográficas de América.<sup>19</sup>

El serotipo 017: H11 resultó ser el serotipo ambiental con más frecuencia aislado en Europa del Este. El hallazgo de 11 % de aislamiento de este serotipo en este estudio coincide con lo reportado por *Aldová* en 1987.<sup>20</sup> El lipopolisacárido (LPS) común de *Shigella sonnei* y *Plesiomonas shigelloides* 017: H11 se demostró mediante la aglutinación de *Plesiomonas shigelloides* con antisueros de *Shigella sonnei*. La igualdad del LPS de las 2 especies permite utilizar el LPS de *Plesiomonas shigelloides* para determinar los anticuerpos anti-LPS de *Shigella sonnei* en el análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas.<sup>21</sup> Se puede plantear como conclusión que las cepas de *Plesiomonas shigelloides* serotipo 017: H11 se están estudiando como posibles candidatos vacunales contra la shigelosis.

## SUMMARY

The antigenic structure and antimicrobial susceptibility were studied in 99 strains isolated from patients with acute diarrhea (6 strains from an outbreak of digestive transmission disease in Santiago de Cuba) and a strain isolated from a patient who died from infectious neurological syndrome (INS, meningitis). Four new serotypes (093, 994, 095, 096), which had not been described in the world classification, were identified from the Cuban isolated strains and were included in the International Serotyping Scheme by the International Reference Center located in Prague, Czech Republic. For the first time in Cuba, the circulation of serotypes 017:H11, 011: H2, 023: H1a1c, 057: H3 which show cross reaction to *Shigella* species was proved. Those strains from the outbreak of digestive disease belonged to serotype 050: H11 and had a thermostable toxin. The first case of infectious neurologic syndrome with *Plesiomonas shigelloides* etiology reported in Cuba was described; the strain corresponded to serotype 050: H11. The worldwide reported pattern of antimicrobial resistance was demonstrated.

**Subject headings:** PLESIOMONAS/classification; SERO-TYPING; MICROBIAL SENSITIVITY TESTS.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Janda JM, Abbott SL, Carnahan AM. Aeromonas and Plesiomonas, En: Baron EJ, Faller MAP, Tenover C, Yolken RH, ed. Manual of clinical microbiology. 5<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology,1995:447-82.
2. Clark RB, Westby GR, Spector H, Soricelli RR, Young CL. Fatal *Plesiomonas shigelloides* septicemia in a splenectomised patient. J Infect 1991;23:89-92.
3. Holmberg SD, Wachsmuth K, Hickman-Brenner FW, Beake PA, Farmer JJ III. Plesiomonas enteric infections in the United States. Ann Intern Med 1986;105:690-4.
4. Albert S, Weher B, Schafer V. Six enteropathogens isolated from a case of acute gastroenteritis. Infect 1990;18:381-2.
5. Aldová E. Experiences with serology of *Plesiomonas shigelloides*. J Hyg Epidemiol Immunol 1987;31:76-81.
6. Thomas LV, Gross RJ, Cheasty T, Rowe B. Extended serogrouping scheme for motile mesophilic Aeromonas species. J Clin Microbiol 1990;28:980-4.
7. Ingram CW, Morrinson AJ, Levitz RE. Gastroenteritis sepsis and osteomyelitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in an immunocompetent host: case report and review of the literature. J Clin Microbiol 1987;25:1791-3.
8. Baumann P, Schubert RHW. Family II. Vibrionaceae Veron, 1965,5245. En: Krieg NR, Holt JG ed. Bergey's Manual of systematic bacteriology, vol 1. Baltimore: The Williams and Wilkins,1984;vol 1:516-7.
9. Aldová E. Comparison of Shimada and Sakazaki's and Aldova's antigenic schemes for *Plesiomonas shigelloides*. Syst Appl Microbiol 1992;15:70-5.
10. Bauer AW, Kirby WMM, Sherman TS, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Pathol 1996;45:494-5.
11. Donta ST, King M. Induction of steroidogenesis in tissue culture by cholera enterotoxin. Nature N Biol 1973;243:246-7.
12. Mc Neeley D, Ivy P, Craft JC, Cohen I. *Plesiomonas*: biology of the organism and disease in children. Pediatr Infect Dis 1984;3:176-81.
13. Clark RB, Janda JM. *Plesiomonas* and human disease. Clin Microbiol News 1991;13:49-52.
14. Cooper RG, Brown GW. *Plesiomonas shigelloides* in South Australia. J Clin Pathol 1968;21:715 8.
15. De Mondino SS, Numes MP, Ricciardi I. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city. Mem. Inst Oswaldo Cruz 1995;90:1-4.
16. Marshall DL, Kim JJ, Donnelly SD. Antimicrobial susceptibility and plasmid mediated streptomycin resistance of *Plesiomonas shigelloides* isolated from blue crab. J Appl Bacteriol 1996;81:195-200.
17. Sanyal SC, Saraswathi B, Sharma P. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. J Med Microbiol 1980;13:401.
18. Shimada T. New O and H antigens of *Plesiomonas shigelloides* and their O antigenic relationship to *Shigella boydii*. Curr Microbiol 1994;28:351-4.
19. Aldová E. New serovars of *Plesiomonas shigelloides*. Cent Eur J Publ Health 1997;5:21 3.
20. Aldová E. Serotyping of *Plesiomonas shigelloides* strains with our own antigenic scheme: an attempted epidemiological study. Zent Bakt Hyg 1987;265:253-62.
21. Verg I Van der. Age specific prevalence of serum antibodies to the invasion plasmid and lipopolysaccharide antigens of *Shigella* species in Chilean and North American population. J Infect Dis 1992;166:158 61.

Recibido: 10 de junio de 1999. Aprobado: 20 de diciembre de 1999.  
 Lic. Laura Bravo. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".  
 Apartado 601, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu