

Serogrupos y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Shigella*

Serogroups and antimicrobial susceptibility in *Shigella* strains

Leonor Díaz Rigau,^I Luis Enrique Cabrera Rodríguez,^{II} Tania Fernández Núñez,^{III} Marisol Arias Vegas,^{IV} Gilda Scull Scull^V

^I Especialista de I Grado en Microbiología. Máster en Enfermedades Infecciosas. Centro Municipal de Higiene y Epidemiología. Güines (Provincia Habana), Cuba.

^{II} Especialista de I Grado en Microbiología. Máster en Bacteriología - Micología. Centro Municipal de Higiene y Epidemiología. Güines (Provincia Habana), Cuba.

^{III} Especialista de I Grado en Microbiología. Máster en Parasitología. Centro Municipal de Higiene y Epidemiología. Güines (Provincia Habana), Cuba.

^{IV} Especialista de I Grado en Epidemiología. Máster en Enfermedades Infecciosas. Filial de Ciencias Médicas de La Habana. Provincia Habana, Cuba.

^V Especialista de I Grado en Administración de Salud. Máster en Enfermedades Infecciosas. Filial de Ciencias Médicas de La Habana. Provincia Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. *Shigella* spp. es uno de los agentes causales más importantes de diarrea aguda en los niños. La presente investigación tuvo como objetivo conocer la frecuencia de serogrupos y la susceptibilidad antimicrobiana a los fármacos de elección y a los alternativos.

MÉTODOS. Se realizó un estudio descriptivo y retrospectivo entre enero de 2004 y diciembre de 2006 a partir de 34 cepas de *Shigella* spp. aisladas en heces de niños menores de 5 años ingresados en el Hospital «Aleida Fernández Chardiet» (Municipio Güines) a causa de enfermedad diarreica aguda.

RESULTADOS. Los serogrupos encontrados fueron *S. sonnei* (70,5 %) y *S. flexneri* (29,5 %). Ambos serogrupos mostraron altos niveles de resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol y a la ampicilina, además en las cepas de *S. sonnei* se encontró resistencia al ácido nalidíxico y en las de *S. flexneri* al cloranfenicol. Todas las cepas mostraron altos porcentajes de sensibilidad a la ceftriaxona, norfloxacin y ciprofloxacina. El 70 % de las cepas de *S. sonnei* fueron multirresistentes. El patrón de multirresistencia (ampicilina, trimetoprim-sulfametotetoxazol y ácido nalidíxico) se encontró en ambos serogrupos.

CONCLUSIONES. La determinación y vigilancia de los patrones de resistencia

facilita el control de la política de uso de antibióticos en la región estudiada y previene el surgimiento de cepas resistentes a fármacos de nueva generación.

Palabras clave: *Shigella* spp., enfermedad diarreica aguda, susceptibilidad antimicrobiana, serogrupos, patrones de multirresistencia.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Shigella* ssp. is one of the more important causal agents of acute diarrhea in children. Present research has as aim to know serogroups frequency and antimicrobial susceptibility to choice drugs, and to its alternatives.

METHODS: A descriptive retrospective study was carried out between January 2004 and December 2006 of 34 strains of *Shigella* isolated from children lower than 5 years admitted in "Aleida Fernández Chardiet" Hospital in Güines Municipality by acute diarrheic disease.

RESULTS: Serogroups included *S. sonnei* (70,5%), and *S. flexeneri* (29,5%). Both serogroups showed high levels of resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole and to Ampicillin and to in strains of *S. sonnei* there was resistance to nalidixic acid, and in that of *S. flexeneri*, to Chloramphenicol. All strains showed high percentages of sensibility to Cephtriaxone, Norphloxacin, and to Cyprophloxacin. The 70% of strains of *S. sonnei* were multi-resistant. Multiresistance pattern (Ampicillin, Trimetoprim-Sulfamethoxazole and nalidixic acid) was present in both serogroups.

CONCLUSIONS: Assessment and surveillance of resistance patterns allow control of policy on use of antibiotics in study region, and to foresee rise of strains resistant to new generation-drugs.

Key words: *Shigella* spp., acute diarrheic disease, antimicrobial susceptibility, serogroups, multiresistance patterns.

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades infecciosas, las producidas por bacterias constituyen un problema de salud creciente en el mundo.¹ La cifra anual de shigelosis en el mundo es de 164,7 millones, de los cuales 163,2 millones corresponden a los países en desarrollo y 1,5 millones de casos a los países industrializados. En total, el 69 % de todos los episodios y el 61 % de todas las defunciones afectan a menores de 5 años.^{2,3}

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) constituyen la segunda causa de atenciones médicas en Cuba. Según los resultados del sistema de vigilancia de la etiología de las EDA, las bacterias aisladas e identificadas según orden frecuencia son: *Shigella* spp., *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* no-O1 y *Escherichia coli*.⁴

Entre los marcadores fenotípicos el serotipaje es uno de los métodos clásicos de tipificación de cepas. Los diferentes serotipos de *Shigella* muestran una gran variación en cuanto al espectro de las manifestaciones clínicas que producen, las cuales van desde formas leves hasta cuadros clínicos muy graves, por lo que el conocimiento de cuál o cuáles serotipos circulan reviste gran importancia médica y epidemiológica.⁵

Los estudios internacionales y nacionales de vigilancia de la resistencia a los agentes antimicrobianos en cepas de *Shigella* realizados durante la última década han reportado un incremento de cepas resistentes a la ampicilina, el trimetoprim/sulfametoxazol, las tetraciclinas y el cloranfenicol, y han comenzado a surgir cepas resistentes al ácido nalidíxico.^{6,7}

La susceptibilidad antimicrobiana, además de guiar al médico hacia una terapia correcta y prevenir el uso indiscriminado de antibióticos, es uno de los métodos usados para la caracterización fenotípica de los microorganismos, pues permite la diferenciación o tipaje de cepas, así como brinda el conocimiento de los patrones de multirresistencia existentes en un país, región o continente.

Considerando lo antes expuesto, se decidió determinar la frecuencia de serogrupos y la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Shigella* spp. aisladas en niños menores de 5 años ingresados por enfermedad diarreica aguda.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo-retrospectivo. El universo y la muestra estuvieron constituidos por 34 cepas de *Shigella* spp., aisladas de heces de niños menores de 5 años ingresados con enfermedades diarreicas agudas en el Hospital General Docente «Aleida Fernández Chardiet», en Güines. Las cepas se conservaron en el Laboratorio de Microbiología Clínica que pertenece al Centro Municipal de Higiene y Epidemiología de Güines, Provincia La Habana, en el período comprendido entre enero del 2004 y diciembre del 2006.

Las 34 cepas mantenidas en medio de conservación se inocularon en caldo nutriente (OXOID, Inglaterra) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis. Posteriormente fueron sembradas por el método de agotamiento en placas de Agar SS (BIOCEN, Cuba) y Agar Mac Conkey (MERCK, Alemania) con el objetivo de obtener colonias aisladas. Se seleccionaron al menos 3 colonias no fermentadoras de la lactosa, las cuales fueron inoculadas por punción y estría en los medios de diferenciación primaria Agar hierro y dos azúcares de Kligler (MERCK, Alemania) y Agar hierro lisina (OXOID, Inglaterra) y se incubaron por 24 horas a 37 °C en aerobiosis, seleccionando las que presentaron el patrón bioquímico siguiente: utilización de la glucosa oxidativa y fermentativamente, no utilización de la lactosa, ausencia de gas, no producción de sulfídrico y no decarboxilación de la lisina.⁸

A continuación se realizó la prueba de la oxidasa por el método de Kovacs. Las cepas que no tuvieron codificación genética para la enzima citocromo oxidasa quedaron ubicadas en la familia *Enterobacteriaceae*. Posteriormente se realizó la identificación bioquímica complementaria para género y especies, que consistió en producción de indol, utilización de citrato, hidrólisis de la urea y motilidad.⁸

La serotipificación se realizó mediante la identificación de los antígenos somáticos (O). Las cepas fueron enfrentadas con los antisueros polivalentes de serogrupos, utilizando la técnica de aglutinación en lámina, según las recomendaciones de Edwards y Swing.⁹

Se determinó la susceptibilidad de las cepas a drogas antimicrobianas de elección: trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) y ampicilina (AMP) y alternativas: cloranfenicol (C), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR) y ceftriaxona (CRO), por el método de difusión en Agar (Kirby-Bauer).¹⁰ Para la lectura e interpretación de los halos de inhibición se utilizó el protocolo recomendado por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI), de los Estados Unidos de América (2005).¹¹

Para el procesamiento estadístico de la información se calcularon los porcentajes correspondientes. Los resultados se expresan en tablas.

RESULTADOS

De las 34 cepas serotipadas 24 (70,5 %) correspondieron a *S. sonnei* y 10 (29,5 %) a *S. flexneri*. No se aislaron *S. dysenteriae* ni *S. boydii*.

Se observó que el 95,8 % de las cepas *S. sonnei* presentaron resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol y a la ampicilina. En relación con la susceptibilidad a las drogas alternativas, se apreciaron valores de resistencia del 79 % para el ácido nalidíxico. El 100 % de las cepas resultaron sensibles a la ceftriaxona y el 95,8 % a la ciprofloxacina y norfloxacina, respectivamente.

El 70 % de las cepas de *S. flexneri* presentaron resistencia a la ampicilina y el 50 % al trimetoprim-sulfametoxazol. En cuanto a las drogas alternativas se apreciaron valores de resistencia del 60 % para el cloranfenicol. Se observaron valores de sensibilidad superior al 80 % para el ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina y ceftriaxona.

Resultaron multirresistentes (resistencia a 3 o más grupos de antimicrobianos) 19 cepas (70 %) de *S. sonnei* (tabla 1). El 20 % (2 cepas) de *S. flexneri* presentaron multirresistencia (tabla 2). El patrón de multirresistencia (ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y ácido nalidíxico) se encontró en ambos serogrupos.

Tabla 1. **Patrones de multirresistencia en cepas de *Shigella sonnei***

Patrones de multirresistencia	Número de cepas	%
AMP-, SXT-, NA-	15	78
AMP-, SXT-, NA-, C-	4	22

Tabla 2. **Patrones de multirresistencia en cepas de *Shigella flexneri***

Patrones de multirresistencia	Número de cepas	%
AMP-, SXT-, NA-	1	50

DISCUSIÓN

La estimación exacta del comportamiento de las infecciones por *Shigella* spp. es importante para determinar la magnitud de la morbilidad y mortalidad atribuibles a este patógeno y para conocer la distribución de los serogrupos en diferentes áreas geográficas.¹²

Cuando se revisa la literatura médica internacional se observa una relación entre los serogrupos de *Shigella* y el grado de desarrollo de los países. *S. dysenteriae* y *S. boydii* predominan en los países con condiciones higiénicas desfavorables. Las infecciones por *S. sonnei* son las que más se diagnostican en los países desarrollados, seguidas de las producidas por *S. flexneri*.^{13,14}

En investigaciones relacionadas con la frecuencia de serogrupos realizadas en el año 2005 por Lee y cols., por Alcoba-Florez y cols., y por Jain y cols., predominó *Shigella sonnei*.¹⁵⁻¹⁷ Nuestros resultados son similares a los encontrados por los autores antes mencionados. En artículos científicos realizados en países como Argentina, la India y Nigeria se reportan porcentajes de aislamientos de *S. flexneri* del 73 %, 100 %, 48 % respectivamente.¹⁸⁻²⁰

En Cuba, según Valdés-Dapena, el serogrupo más frecuente es *S. sonnei* fase I, seguido de *S. flexneri* fase II.¹ Sin embargo, Cabrera y cols. realizaron un estudio de serotipaje a 155 cepas de *Shigella*, donde *S. flexneri* se encontró en un 62,6 %, seguida de *S. sonnei* (29 %), *S. dysenteriae* (4,5 %) y *S. boydii* (3,9 %).²¹ En otra investigación realizada en el Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí» por Ramírez y cols., de 240 cepas de *Shigella* aisladas en niños, el 59 % correspondió a *S. flexneri*, el 32 % a *S. sonnei*, el 5 % a *S. dysenteriae* y el 4 % a *S. boydii*.²²

Al no existir trabajos publicados sobre esta temática en nuestro territorio, consideramos que esta investigación permite conocer por primera vez los serogrupos de *Shigella* circulantes en el Este de La Habana, lo cual contribuye al mejor conocimiento de la epidemiología de la EDA causada por *Shigella*, aunque se sugiere realizar estudios de serotipaje con mayor cantidad de cepas.

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos continúa siendo un serio y creciente problema de salud en el mundo, especialmente para los países en desarrollo, donde muchos factores contribuyen a engendrar, desarrollar y extender esta situación; donde los datos del comportamiento de la susceptibilidad a los antimicrobianos son escasos y no todos los países pueden monitorear este fenómeno.²³

En la actualidad, el principal problema asociado con el tratamiento de la shigelosis es la resistencia y multiresistencia a los fármacos de elección. Esta es una de las infecciones entéricas donde el uso de antimicrobianos está ampliamente recomendado y aceptado, el cual, teniendo en cuenta la terapia antimicrobiana adecuada, acorta la duración y gravedad del cuadro diarreico, reduce el tiempo de transmisibilidad del agente infeccioso y las complicaciones.²⁴

En el presente trabajo se apreció que *S. sonnei* presentó altos niveles de resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol, a la ampicilina y al ácido nalidíxico. Cuando se revisa la literatura médica internacional, es posible constatar que investigadores del

comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Shigella* spp. han encontrado, en el período del 2000 al 2005 en los Estados Unidos de América, Nigeria y Pakistán, un incremento de cepas de *S. sonnei* resistentes a las drogas antes expuestas.²⁵⁻²⁷

Estudios en cepas de *S. sonnei* realizados en Cuba por Llop y cols. y Ramírez y cols. han obtenido niveles de resistencia entre el 66,5 % y 90 % para el trimetoprim-sulfametoxazol y la ampicilina.^{7,22} En un trabajo de susceptibilidad antimicrobiana y perfil plasmídico, los autores encontraron buena sensibilidad al ácido nalidíxico.⁵ En esta investigación los resultados obtenidos para el trimetoprim-sulfametoxazol y la ampicilina están acordes con los de los autores antes citados, pero no ocurre así con el ácido nalidíxico.

Consideramos que la alta resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol, la ampicilina y el ácido nalidíxico encontrada en este estudio pudiera deberse en gran medida al uso frecuente de estos antimicrobianos en las infecciones del tracto genitourinario, al poco estudio de la etiología de la EDA y a la indicación empírica del tratamiento con antimicrobianos, por lo que es necesario mantener una vigilancia estricta de este fenómeno a nivel local.

Estudios de vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana realizados en diferentes países de los continentes americano y africano han encontrado cepas de *S. sonnei* con buena sensibilidad al cloranfenicol, ciprofloxacina, norfloxacina y ceftriaxona.^{20,28} Resultados semejantes han sido obtenidos en nuestra investigación.

En la actualidad, la ceftriaxona constituye un recurso eficaz para el tratamiento de la shigelosis causada por cepas resistentes y multirresistentes.¹⁴

Los laboratorios de microbiología desempeñan una importante función en la determinación de los patrones de susceptibilidad de las bacterias en un país, región o continente. Por ello se hace necesario mantener una vigilancia estricta del comportamiento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos de elección, utilizando pruebas fidedignas que proporcionen datos comparables, y así la información microbiológica disponible ayudará al médico de asistencia a seleccionar el agente antimicrobiano más apropiado para tratar cada infección y disminuir la resistencia.

Los patrones de multirresistencia (AMP^r, SXT^r, NA^r y AMP^r, SXT^r, NA^r, C^r) encontrados en la presente investigación en cepas de *S. sonnei* coincide con los encontrados por Lee y por Farshad en diferentes países.^{15,29}

La diferencia de patrón de multirresistencia pudiera estar atribuida a la situación geográfica de nuestro país, al escaso número de cepas estudiadas en comparación con los trabajos revisados y a la realización de este trabajo en cepas circulantes de 6 municipios de la provincia de La Habana.

Es necesario continuar una vigilancia estricta de la susceptibilidad antimicrobiana a las drogas de elección en estos microorganismos, para detectar cambios en los patrones de resistencia en las cepas circulantes en las diferentes provincias y regiones del país y para sugerir a las autoridades sanitarias los posibles cambios en la política de uso de un antibiótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdés-Dapena Vivanco MM. Enterobacterias. En: Llop Hernández A, Valdés-Dapena Vivanco MM, eds. Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001. p. 265.
2. Kotloff K, Winichoff J, Ivanoff B, Clements J, Swerdelow D. Carga mundial de infecciones por *Shigella*: implicaciones para el desarrollo de vacunas y la aplicación de estrategias de control. [en línea] Disponible en: <http://who.int/boletín/2000/RA2000/2/55-70spa.pdf> Consultado: 12 de marzo 2007.
3. Alvarado L, Guzmán Y, Guzmán M, Betancourt J. *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. asociados con síndrome diarreico agudo en niños menores de seis años de edad. Kasmera.2005;33(2):132-41.
4. Unidad Nacional de Salud Ambiental. Cuba, Informe anual. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2003.
5. Valdés de Calzadilla N. Susceptibilidad antimicrobiana y perfil plasmídico en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba. [Trabajo para optar por el título de especialista de primer grado en microbiología]. La Habana: IPK; 2003.
6. Tenover FC, McGowan JE. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. J Med Sci. 1996;311:9-16.
7. Llop A, Tamargo I, Pérez M, Toraño G, Ramírez M, Bravo L, et al. Antimicrobial resistance and microbiological surveillance in Cuba. En: Salvatierra González R, Benguigui Y, eds. Antimicrobial resistance in the Americas: magnitude and containment of problem. Washington DC.: PAHO; 2000. Pp.111-8.
8. Koneman E, Allen S, Janda W. Diagnóstico microbiológico. 5ta. ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1999. P. 2400.
9. Edwards PR, Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae. La Habana: Edición Revolucionaria; 1971. Pp. 322-71.
10. Bauer AW, Kirhy WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45:493-6.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. NCCLS Document M100-S15. Wayne; 2005.
12. Klotoff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL. Global burden of *Shigella* infection: Implication for vaccine development and implementation. Bull WHO.1999;77(8):651- 66.
13. Hirose K, Terajima J, Izumiya H, Tamura K, Arakawa E, Takai N, et al. Antimicrobial susceptibility of *Shigella sonnei* isolates in Japan and molecular analysis of *S. sonnei* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(3):1203-5.

14. Dromigny JA, Macondo EA, Juergens-Behr A, Siby T, Perrier-Gros-Claude JD. The distribution and antibiotic susceptibility of *Shigella* isolates in Dakar, Senegal (2000-2002). *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24(3):307-8.
15. Lee JC, Oh JY, Kim KS, Jeong YW, Cho JW, Park JC, et al. Antimicrobial resistance of *Shigella sonnei* in Korea during the last two decades. *APMIS*. 2005;109(3):228-34.
16. Alcoba-Florez J, Perz-Roth E, Gonzalez-Linares S, Mendez-Alvarez S. Outbreak of *Shigella sonnei* in a rural hotel in La Gomera, Canary Islands, Spain. *Int Microbiol*. 2005;8(2):133-6.
17. Jain SK, Gupta A, Glanz B, Dick J, Siberry GK. Antimicrobial-resistant *Shigella sonnei* limited antimicrobial treatment options for children and challenges of interpreting in vitro azithromycin susceptibility. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(6):494-7.
18. Merino LA, Hrenuk GE, Alonso JM, Ronconi MC. Value of antibiotype and bacteriocinotype for differentiating *Shigella* strains isolated in Argentina. *Bull Soc Pathol Exot*. 2000;93(5):307-10.
19. Pazhani GP, Ramamurthy T, Mitra U, Bhattacharya SK, Niyogi SK. Species diversity and antimicrobial resistance of *Shigella* spp. isolated between 2001 and 2004 from hospitalized children with diarrhea in Kolkata (Calcutta), India. *Epidemiol Infect*. 2005;133(6):1089-95.
20. Egah DZ, Banwat EB, Audu ES, Allanana JA, Danung ML, Damen JG, et al. Multiple drug resistant strains of *Shigella* isolated in Jos, central Nigeria. *Postgrad Med J*. 2003;10(3):154.
21. Cabrera OR. Serotipaje de los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* y *Shigella*. [Trabajo de Diploma] La Habana: IPK; 2001.
22. Ramírez MM, Bravo L, García B, Monté R. Estudio de la susceptibilidad de cepas de *Shigella* aisladas en niños con enfermedad diarreica aguda. *Enferm Inf Microbiol*. 2003;16(2):112-5.
23. Sosa A. Infectious disease management in Latin America: a Project report. *APUA Newsletter*. 1999;17(2):15-21.
24. Pidal P, Prado V, Truco O, Valdivieso FI. Overview of antimicrobial resistance by *Shigella* spp. in 10 Chilean hospitals: The Pronares Project. *Rev Panam Infect*. 1999;(Suppl 1):18-25.
25. Replogle ML, Fleming DW, Cieslak PR. Emergence of antimicrobial-resistant shigelosis in Oregon. *Clin Infect Dis*. 2000;30(3):515-9.
26. Iwalokun BA, Gbenle GO, Smith SI, Ogunledun A, Akinsinde KA. Epidemiology of shigelosis in Lagos, Nigeria: trends in antimicrobial resistance. *J Health Popul Nutr*. 2001;19(3):183-90.
27. Zafar A, Sabir N, Bhutta ZA. Frequency of isolation of *Shigella* serogroups/serotypes and their antimicrobial susceptibility pattern in children from slum areas in Karachi. *J Pak Med Assoc*. 2005;55(5):184-8.

28. Oplustil CP, Núñez R, Méndez C. Resistent Group Multicenter evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. Infect Dis. 2001;5(1):8-12.

29. Farshad S, Sheikhi R, Japoni A, Basiri E, Alborzi A. Characterization of *Shigella* strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. J Clin Microbiol. 2006;44(8):2879-83.

Recibido: 26 de noviembre de 2008.

Aprobado: 16 de diciembre de 2008.

Leonor Díaz Rigau. Centro Municipal de Higiene y Epidemiología. Güines (Provincia Habana), Cuba.

Correo electrónico: luisec@mshmtz.sld.cu