

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK)
Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas



Susceptibilidad antimicrobiana y diversidad genética en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba

Tesis Presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas

Autora: Dra. María Margarita Ramírez Álvarez

Ciudad de La Habana

2007

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK)
Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas

**Susceptibilidad antimicrobiana y diversidad
genética en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba**

Tesis Presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas

Autora: Dra. María Margarita Ramírez Álvarez

Asesores: Prof. Alina Llop Hernández Dr. C.

Dra. Isabel Martínez Motas Dr. C.

Ciudad de La Habana

2007

AGRADECIMIENTOS

Hoy por fin he llegado a la culminación de la etapa más importante de mi vida como profesional, la obtención de un grado científico y por este motivo quiero agradecer a todos los que de una forma u otra me han ayudado a llegar hasta aquí.

En primer lugar le doy las más infinitas gracias a mis asesores las doctoras Alina Llop e Isabel Martínez, por su incondicional ayuda, por su infinita paciencia, por apoyarme en los momentos difíciles, por comportarse como verdaderas amigas.

Gracias también a dos amigas incondicionales Isis Tamargo y Clara Savón, con las que he compartido muchos momentos buenos y otros no tan buenos, que con su entusiasmo siempre han estado a mi lado brindándome cariño y confianza.

No encuentro palabras para expresar la gratitud a mis compañeros de trabajo de laboratorio de EDA, Laura Bravo, Anabel Fernández, Nelsideismy Castañeda, Yudith Ledo y Adalberto Aguila por su generosidad, amistad e inestimable ayuda. Gracias también a todo el colectivo del Departamento de Bacteriología- Micología en especial a Ana Margarita Obregón, Rafael Llanes y Miriam Pérez.

Muchas gracias a Carlos Fernández y Armando Martínez por la revisión de este trabajo y a todo el colectivo de la Subdirección de Docencia en especial a la Dra. Nereyda Cantelar, Dr. Erick Martínez y Lázaro González.

Gracias también a los oponentes de la primera y segunda etapa como fueron Eddy Caro, Ernesto Montoro, Licel Rodríguez y María Elena Sarmiento.

A mi familia, en primer lugar a mi hijo, mi mayor tesoro en la vida, motivo de mis sueños y desvelos, a mis padres que donde estén se sentirán orgullosos por ver logrados sus más anhelados deseos, y a mi esposo "El Chino" por todos estos años compartidos, por su infinito amor y ternura, por ser mi gran apoyo en la vida.

Finalmente, deseo expresar mi más infinita gratitud a la Revolución y su líder por haberme permitido encaminar mi vida en la ciencia y la medicina cubana.

A mi hijo y a mis padres

SÍNTESIS

El excesivo e inapropiado uso de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades diarreicas agudas, condujo al desarrollo de la resistencia bacteriana. La vigilancia sistemática realizada en Laboratorio Nacional de Referencia Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto “Pedro Kouri” entre 1990-2002, permitió seleccionar 3 350 cepas de *Shigella* procedentes de todo el país. Estas fueron caracterizadas mediante el serotipaje y susceptibilidad antimicrobiana. Se escogieron 60 cepas multirresistentes del año 2002 y se les realizó la caracterización molecular. El serotipo más frecuentemente hallado fue *S. flexneri* (59%), seguido de *S. sonnei* (32%), *S. dysenteriae* (5%) y *S. boydii* (4%). La resistencia antimicrobiana encontrada durante el período de estudio, fue elevada: ampicilina (90-37.5%), trimetoprim-sulfametoxazol (95-85%), tetraciclina (70-85%) y cloranfenicol (75-20%). El 91.7% demostró multirresistencia, el patrón más frecuentemente hallado fue: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol (42.5 %). En las cepas de *S. flexneri* se obtuvieron seis perfiles plasmídicos, mientras que en *S. sonnei* fueron ocho y en *S. boydii* cuatro. La técnica de electroforesis en campo pulsado fue la de mayor poder de discriminación, al detectar diferentes patrones, en cepas con idénticos perfiles plasmídicos y de multirresistencia. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demostraron la diversidad genética de las cepas de *Shigella* multirresistentes circulantes en Cuba.

TABLA DE CONTENIDO

“Pag”

I.	INTRODUCCION	1
I.1.	Introducción.....	1
I.2.	Hipótesis.....	4
I.3.	Objetivos.....	4
I.4.	Novedad Científica.....	4
I.5.	Valor Teórico.....	5
I.6.	Valor Práctico.....	6
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
II.1.	Antecedentes históricos.....	7
II.2.	Situación mundial de la prevalencia e incidencia de la shigelosis.....	9
II.2.1	Shigelosis en países desarrollados.....	10
II.2.2	Shigelosis en los países en vías de desarrollo.....	10
II.2.3	Shigelosis en Cuba.....	11
II.3.	Taxonomía.....	12
II.4.	Características microbiológicas del género <i>Shigella</i>	12
II.4.1	Estructura antigénica.....	13
II.5.	Patogenia de las infecciones por <i>Shigella</i>	14
II.5.1	Propiedades de superficie.....	14
II.5.2	Invasividad.....	14
II.5.3	Toxinas.....	15
II.5.4	Proteínas de membrana externa (PME).....	16
II.6.	Diagnóstico de la shigelosis.....	18
II.6.1	Diagnóstico clínico.....	18
II.6.2	Diagnóstico de laboratorio.....	18
II.7.	Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en <i>Shigella</i>	19
II.8.	Epidemiología de la resistencia antimicrobiana en cepas de <i>Shigella</i>	22
II.8.1	Tipificación bacteriana, métodos y valor epidemiológico	22
II.8.2	Criterios de evaluación de un método de tipificación.....	23
II.8.3	Métodos de tipificación.....	23
II.8.3.1	Marcadores fenotípicos.....	24
II.8.3.2	Biotipaje.....	24
II.8.3.3	Antibiograma.....	25
II.8.3.4	Serotipaje.....	27
II.8.3.5	Lisotipia.....	27
II.8.3.6	Tipificación por bacteriocina.....	28
II.8.4	Marcadores genotípicos.....	28
II.8.4.1	Análisis plasmídico.....	28
II.8.4.2	Análisis de enzimas de restricción (REA).....	29
II.8.4.3	Restricción de fragmentos de amplio polimorfismo.....	29
II.8.4.4	Reacción en cadena de la polimerasa.....	30
II.8.4.5	Electroforesis en gel de campo pulsado.....	31
II.8.4.6	Amplificación de fragmentos de amplio polimorfismo.....	32
II.8.4.7	Secuenciación de genes.....	32
II.8.4.8	Microarreglos de ADN.....	32
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33

III.1.	Universo de trabajo y número de cepas procesadas	33
III.2.	Caracterización fenotípica de cepas de <i>Shigella</i> spp.....	34
III. 2.1	Comprobación bioquímica y fisiológica.....	34
III. 2.2	Susceptibilidad antimicrobiana.....	35
III.2.2.1	Método de Kirby – Bauer.....	35
III.2.2.2	Procedimiento.....	36
III.2.3	Determinación de la CIM.....	38
III. 2. 3. 1	Método de Microdilución en caldo.....	38
III. 2 .3. 2	Procedimiento.....	38
III.3.	Caracterización genotípica de las cepas de <i>Shigella</i> spp.....	40
III.3.1	Extracción del ADN plasmídico de las cepas MDR de <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> y <i>S. boydii</i>	40
III.3.1.2	Procedimiento.....	40
III.3.2	Electroforesis submarina en gel de agarosa.....	41
III.3.3	Determinación de los perfiles de ADN mediante electroforesis en campo pulsado.....	42
III.3.3.1	Preparación del ADN cromosomal para ECP y digestión con endonucleasas de restricción.....	42
III.3.3.2	Electroforesis y visualización del ADN.....	43
III.4.	Análisis estadístico.....	44
IV.	RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	45
IV.1.	Distribución de los serogrupos de <i>Shigella</i>	45
IV.2.	Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana por serogrupos.....	48
IV.3.	Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana en los diferentes años de estudio.....	49
IV.4	Análisis de los resultados de susceptibilidad intermedia.....	66
IV.5.	Análisis de los patrones de multirresistencia de las cepas de <i>Shigella</i>	67
IV.6	Identificación de marcadores fenotípicos y genotípicos en aislamientos de <i>Shigella</i> . Año 2002.....	71
IV.6.1	Patrones de multirresistencia de los serogrupos de <i>Shigella</i> en el año 2002.....	71
IV.6.2	Análisis del perfil plasmídico de <i>S. flexneri</i>	71
IV.6.3	Análisis de los patrones de electroforesis en gel de campo pulsado de <i>S. flexneri</i>	72
IV.6.4	Análisis del perfil plasmídico de <i>S. sonnei</i>	72
IV.6.5	Análisis de los patrones de electroforesis en gel de campo pulsado de <i>S. sonnei</i>	74
IV.6.6	Análisis del perfil plasmídico de <i>S. boydii</i>	74
IV.6.7	Análisis de los patrones de de electroforesis en gel de campo pulsado de <i>S. boydii</i>	75
IV.6.8	Interpretación de los resultados de los perfiles plasmídicos y los perfiles de ECP de las cepas	76
IV.6.9.	Comparación entre los marcadores fenotípicos y genotípicos de las cepas de <i>Shigella</i> multirresistentes aisladas en el año 2002.....	85
V.	CONCLUSIONES.....	95
VI.	RECOMENDACIONES.....	96
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	97

VII.1 Referencias Bibliográficas.....	97
VII.2 Producción científica de la autora sobre el tema de la tesis.....	112
VII.3 Producción científica de la autora no relacionada con el tema de la tesis	113
VII.4. Presentación en eventos.....	115
VIII. ANEXOS.....	117

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Introducción

La alta incidencia de las enfermedades diarreicas agudas (EDA) en los países en vías de desarrollo, junto a sus elevados índices de morbimortalidad en determinados grupos poblacionales (niños y ancianos), hace de las EDA, una temática de especial interés para clínicos y microbiólogos. La variedad de microorganismos implicados en esta entidad clínica ascendió durante los últimos años debido, entre otros factores, al mejor conocimiento de la clasificación taxonómica de los diferentes agentes etiológicos y al desarrollo de métodos diagnósticos cada vez más sensibles (Lima y Lima, 1999; Bennish, 2001, Kalluri *et al.*, 2004).

La disentería bacilar o shigelosis, es una de las EDA sometida al sistema de declaración obligatoria. Esta entidad clínica es una infección bacteriana aguda autolimitada del intestino humano causada por bacterias del género *Shigella*, que afecta predominantemente al colon y recto, produciendo diarreas de aspecto mucopiosanguinolento (Chin, 2001).

La cifra anual de episodios de shigelosis en el mundo se calcula en alrededor de 164.7 millones, y de ellos, 163.2 millones ocurren en los países en vías de desarrollo, mientras que 1.5 millones de casos se presentan en los países industrializados. En total, 69% de todos los episodios y 61% de las defunciones atribuidas a las infecciones por *Shigella* afectan a los niños menores de cinco años. (Organización Panamericana de la Salud, 2003; World Health Organization, 2005^a).

Estudios realizados en Cuba, en las últimas décadas, comprobaron la circulación de *Shigella* en niños menores de cinco años (2-17%) y el predominio de los serogrupos *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* en diferentes regiones del país (Cabrera, 1997; Valdés, 2002).

Para el tratamiento de la shigelosis, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de antibióticos y quimioterápicos, luego de conocer el resultado de las pruebas de sensibilidad “*in vitro*”. El excesivo e inapropiado uso de los antimicrobianos en el tratamiento de las EDA, condujeron al desarrollo de la resistencia bacteriana, situación que actualmente constituye un problema emergente de salud en diversas regiones del mundo (World Health Organization, 2005^a)

En los últimos 50 años, *Shigella* demostró una extraordinaria capacidad para adquirir resistencia codificada por plásmidos a los antimicrobianos considerados útiles para el tratamiento de primera línea. Al principio, las sulfamidas, tetraciclina, ampicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol, fueron fármacos muy eficaces. Sin embargo, la actividad de los antimicrobianos ha disminuido ante el surgimiento de cepas multirresistentes (Yurdakok *et al.*, 2003; Ferguson, 2004).

Debido a la variabilidad genética a nivel plasmídico, se han empleado análisis cromosómicos para rastrear los marcadores más estables de identidad, utilizando métodos moleculares sensibles y reproducibles, tales como, ribotipaje, electroforesis en campo pulsado (ECP), (actualmente un método clave para separar fragmentos de ADN) y la amplificación de fragmentos de amplio polimorfismo (AFLP). Con la aplicación de estos métodos se han obtenido resultados satisfactorios en la caracterización genotípica de las enterobacterias (Tompkins, 2002; Kalluri *et al.*, 2004).

Recientemente, el acceso a las investigaciones del ADN bacteriano se emplea con éxito para la discriminación entre los aislamientos; la combinación del análisis del perfil plasmídico y el perfil de ADN cromosomal mediante ECP, resultan herramientas útiles en las investigación y la diferenciación a nivel molecular de los brotes de bacterias entéricas (Lee *et al.*, 2005; Talukder *et al.*, 2006).

La identificación de patrones nuevos o inusuales de resistencia a los antimicrobianos en cepas aisladas de diferentes pacientes, es a veces la primera señal de un brote epidémico y hace que la vigilancia de la variación de los perfiles de resistencia en los laboratorios de microbiología se convierta en una actividad sistemática de extraordinaria importancia. Los estudios moleculares de los microorganismos multirresistentes que circulan en una región o país y su comparación con los resultados obtenidos en otras regiones, pueden ayudar a dilucidar el origen, evolución y extensión del problema, así como tomar medidas por parte de las autoridades sanitarias para lograr su control (Pidal *et al.*, 2002; Rahal *et al.*, 2003; Na-Ubol *et al.*, 2006).

En los últimos años, se ha adquirido cada vez más conciencia de la enorme repercusión de *Shigella* como patógeno intestinal y de las devastadoras consecuencias que podrían derivarse del surgimiento de cepas multirresistentes, situación que pondría en crisis la disponibilidad de tratamientos antimicrobianos accesibles y eficaces (Chin, 2001; Ferguson, 2004).

Por lo anteriormente expuesto, nos propusimos realizar el estudio de la resistencia antimicrobiana y diversidad genética en los diferentes serogrupos de *Shigella* que circularon en Cuba durante el período comprendido entre 1990-2002 y que fueron remitidos desde las provincias al Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto “Pedro Kourí” (LNR/EDA/IPK).

I.2 Hipótesis

- La vigilancia microbiológica y el monitoreo de la resistencia a los antimicrobianos de cepas pertenecientes al género *Shigella*, mediante el empleo de diferentes métodos microbiológicos, permitirá evidenciar cambios en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos, así como la circulación en Cuba de cepas multirresistentes.

Para dar respuesta a esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

I.3 OBJETIVOS

General:

- Contribuir al conocimiento de la susceptibilidad a los antimicrobianos y los patrones genéticos de los serogrupos de *Shigella* aislados en Cuba.

Específicos:

1. Determinar los serogrupos de cepas de *Shigella* aisladas de casos esporádicos de EDA.
2. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana y conocer la distribución de los patrones de resistencia de las cepas de *Shigella* investigadas en este trabajo.
3. Identificar los patrones genéticos en los serogrupos de cepas de *Shigella* multirresistentes.
4. Analizar la correspondencia existente entre los marcadores fenotípicos y los patrones genéticos. Determinar la relación genética de las cepas de *Shigella* multirresistentes.

I.4 La novedad científica del presente trabajo consiste en los siguientes aspectos:

La resistencia antimicrobiana es uno de los problemas emergentes de salud a escala mundial y específicamente en cepas de *Shigella*, no están aún bien identificados los patrones que circulan en el mundo. Por estudios realizados en algunos países, se conoce del desarrollo de altos niveles de resistencia a los antimicrobianos empleados o recomendados como tratamiento de elección.

- Por primera vez en Cuba, se realizó una investigación que permitió conocer la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Shigella* aisladas en las 14 provincias del país durante un período de 13 años y se pudo determinar la circulación de diferentes patrones de multirresistencia.

- Se introdujeron procedimientos de laboratorio y técnicas novedosas que permitieron conocer la caracterización molecular y la diversidad genética de las cepas circulantes en el país.
- Se estableció una metodología que posibilitará seguir la diseminación de estos “clusters” a través del tiempo y comparar las cepas multirresistentes de *Shigella* que han circulado en Cuba en diferentes regiones y época.

I.5 Valor teórico

El valor teórico del presente trabajo radica en que se conoce por primera vez en Cuba, el comportamiento de las cepas circulantes de *Shigella*, lo cual trasciende a nivel nacional. Se realizó un estudio de las cepas recibidas en el LNR/EDA/IPK durante un período de 13 años consecutivos, observándose cambios en cuanto a la resistencia antimicrobiana en estas cepas. El trabajo realizado posibilita contar con un documento de valor científico que puede ser utilizado como referencia en investigaciones posteriores.

Los resultados obtenidos en esta tesis recibieron los siguientes reconocimientos: Mención en el XII Forum Provincial de Ciencia y Técnica (1997); Resultados Relevantes Institucionales (1990, 1991, 1994, 1995, 1997, 2001, 2005). Estos resultados están publicados en artículos en 18 revistas nacionales e internacionales, han sido presentados en 25 eventos científicos (nacionales e internacionales) y han servidos para la realización y tutoría de 10 Tesis de Maestría, Residencia en Microbiología y de grado de Facultad de Biología

I.6 Valor práctico

El presente estudio forma parte del sistema nacional vigilancia de la resistencia antimicrobiana que realiza el LNR/EDA/IPK. Además, los resultados obtenidos en esta investigación forman parte de los informes nacionales enviados al Viceministerio de Higiene y Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) y de los informes enviados a la Organización Panamericana de la Salud y

Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), como parte del Proyecto de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en América Latina, OPS/OMS, lo que contribuye al conocimiento y establecimiento de nuevas estrategias en el tratamiento de la shigelosis en Cuba. y en la región de las Américas La investigación realizada sobre los marcadores fenotípicos y los patrones genéticos permite establecer la vigilancia epidemiológica de la resistencia a los antimicrobianos útil para la toma de decisiones para una correcta política de uso de los antimicrobianos a los diferentes niveles del Sistema Nacional de Salud.

II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

II. 1 Antecedentes históricos

Aún cuando el término de disentería se utilizó por Hipócrates (Año I ANE), para indicar un trastorno caracterizado por la evacuación frecuente de deposiciones que pueden ir acompañadas de sangre, moco, pujos y defecación dolorosa, no fue hasta finales del siglo XIV, que se determinaron las causas de la amebiasis y disentería bacilar y fue posible separar con precisión las dos grandes formas de disentería. Muchos de los casos que aparecen notificados en los escritos más antiguos son considerados de origen bacilar (shigelosis) debido a la ausencia de complicaciones hepáticas (Heber y Dupont, 1997; Keush y Bennish, 2003).

El primer aislamiento del género *Shigella* se atribuye a Chantenesse y Widal en 1888. Posteriormente, en 1898, Kiyoshi Shiga durante una epidemia de disentería ocurrida en Japón, hizo una descripción más completa del género; por este trabajo clásico, el nombre de Shiga se honra en el género designado como *Shigella* y el organismo que se identificó y denominó "*Bacillus dysenteriae*" se conoce actualmente como *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Keush y Bennish, 2003).

En 1900, Flexner en las Filipinas y Kruse en Alemania, aislaron un "*Bacillus dysenteriae*", microorganismo que rápidamente se confirmó por Flexner y Castellani en Ceilán como "*Bacillus pseudodysenteriae flexner*", actualmente conocido como *Shigella flexneri* (Zwadyk, 1994).

En 1931, Boyd en la India, al estudiar 5 000 aislamientos de casos típicos de disentería bacilar detecta un grupo de microorganismos similares a *S. flexneri* que no aglutinaban con el antisuero específico y sí con antisueros homólogos, definiéndose así otra especie que recibió el nombre de "*Shigella boydii*" (Sonnenwirth, 1990; Zwadyk, 1994).

La cuarta especie, *Shigella sonnei* se describió por Krusse, Castellani y Duvall gracias a los trabajos realizados por Sonnei en 1915. Esta especie se definió como una variante fermentadora tardía de la lactosa y desde el punto de vista antigénico contiene un serotipo que puede variar en dos fases: fase 1 y 2 (Zwadyk, 1994).

En el último siglo se produjeron cambios en la prevalencia de las diferentes cepas de *Shigella*. Después que Kiyoshi Shiga describe a finales de la década de 1890 a *S. dysenteriae* tipo 1, durante el curso de una severa epidemia de disentería letal, esta especie desaparece virtualmente del globo terrestre después de la Primera Guerra Mundial y en su lugar aparece *S. flexneri* como el patógeno internacionalmente dominante. Con esta especie se presentaron menos epidemias y un espectro clásico más amplio de la enfermedad (desde casos muy severos a casos leves). Después de la Segunda Guerra Mundial, en los países desarrollados, *S. flexneri* fue reemplazada por *S. sonnei*, observándose una notable disminución de enfermos con disentería. En contraste, *S. flexneri* continuó como el principal microorganismo aislado en los países en vías de desarrollo, regiones donde la enfermedad clínica severa persiste como un problema de salud. En 1969, la mortalidad por disentería aumentó bruscamente en Guatemala con la reaparición de *S. dysenteriae* tipo 1 epidémica. Unos años después de la epidemia ocurrida en América Latina, este serotipo se hizo evidente en África y Asia y actualmente la infección se ha vuelto endémica en esas regiones (Romero Cabello, 1999; Dutta *et al.*, 2002; Cobra y Sack, 2003; Dougherty, 2006).

La infección severa por *S. flexneri* reapareció en Estados Unidos, sobre todo, en los adultos jóvenes de sexo masculino y relacionados con prácticas homosexuales. La shigelosis persistente y recurrente constituye un problema en los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). A partir de los años 90 y hasta la fecha, *S. boydii* ha estado limitada a la India, donde es capaz de

ocasionar enfermedades con un espectro clínico intermedio (Laughon, 1999; Chowdhury, 2001; Angulo y Swerdlow, 2005).

La interacción de las infecciones por *Shigella* y la epidemia ocasionada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ha tenido consecuencias graves. Tanto la diarrea crónica como la disentería son frecuentes en personas infectadas por el VIH. Aunque, no se sabe si el riesgo de adquirir shigelosis aumenta con la infección concomitante por el VIH; parece ser que la inmunodeficiencia asociada con este virus favorece las manifestaciones clínicas más graves, los pacientes pueden contraer infecciones persistentes o recurrentes aún con el tratamiento antibiótico adecuado, e igualmente están expuestos a un mayor riesgo de bacteriemia por *Shigella* que puede ser recurrente, grave e incluso mortal (Merino *et al.*, 2004; Angulo y Swerdlow, 2005).

II.2 Situación mundial de la prevalencia e incidencia de la shigelosis

La shigelosis tiene una distribución mundial y se calcula que causa unas 600 000 defunciones al año. Las 2/3 partes de los casos y defunciones se observan principalmente en los menores de 10 años. Pocas veces, la enfermedad afecta a los individuos por debajo de los seis meses de nacidos. Los índices de ataque secundario en los núcleos familiares pueden llegar hasta el 40%. Son comunes los brotes en hombres homosexuales, con hacinamiento y malas condiciones de higiene personal, en instituciones infantiles para niños sin amparo filial, centros de atención diurna y hospitales psiquiátricos, entre otros. La shigelosis es endémica en climas tropicales y templados; los casos notificados representan sólo una pequeña proporción del total de enfermos, incluso en las áreas desarrolladas (Carrión, 2000; Chin, 2001). Por lo regular, en una comunidad suelen estar presente más de un serotipo y pueden observarse infecciones mixtas en las que participan otros patógenos intestinales. La mayoría de las especies de *Shigella* aisladas en los países en vías de desarrollo son:

S. flexneri, *S. boydii* y *S. dysenteriae*, mientras que *S. sonnei* es más común en los países desarrollados y *S. dysenteriae*, es la especie menos frecuente (Koneman *et al.*, 1998; Clemens *et al.*, 2003).

II.2.1 Shigelosis en los países desarrollados

Aunque, las muertes causadas por shigelosis son infrecuentes en los países industrializados, la morbilidad puede ser elevada cuando se declaran brotes en los centros de custodia y guarderías, así como cuando la enfermedad afecta a los militares y viajeros (Bennish y Wojtyniak, 1997; Klotoff *et al.*, 2000). El mundo industrializado experimentó una reducción significativa de la morbimortalidad por diarrea cuando introdujo medidas sanitarias efectivas. Sin embargo, la incidencia de la shigelosis continúa elevada debido fundamentalmente al uso más frecuente de las guarderías para el cuidado de los niños preescolares, donde se reflejan las dificultades inherentes al control de la contaminación fecal en ambientes densamente poblados y la industrialización e internalización del abastecimiento de los alimentos (Bennish, 2001). A medida que mejora el nivel general de la higiene ambiental y personal en un país, aumentan los casos debidos a *S. sonnei* y disminuyen los de *S. flexneri*. *S. sonnei* es responsable del 60-80% de los casos notificados en Estados Unidos y es la causa más importante de disentería en la mayoría de los países desarrollados e industrializados (Mead *et al.*, 1999; Black, 2000; Saurina *et al.*, 2000; Kalluri *et al.*, 2004).

II.2.2 Shigelosis en los países en vías de desarrollo

En los países en vías de desarrollo se desconocen las tasas de incidencia de las infecciones causadas por *Shigella* spp., en la mayoría de estas regiones existen subregistros y muchos pacientes no acuden en busca de atención médica o ésta no existe. No obstante, se conoce que la disentería epidémica por *S. dysenteriae* 1, es la más dramática de las infecciones por *Shigella* en los países con este desarrollo económico (Bennish, 1999; World Health Organization, 2005^a).

Existen pocas opciones fiables para tratar las infecciones ocasionadas por cepas de *Shigella* multirresistentes, sobre todo en los países en vías de desarrollo, regiones donde el costo del tratamiento antimicrobiano se considera de extraordinaria importancia. Los mecanismos de transferencia de la resistencia a los antimicrobianos pueden estar mediados por plásmidos. La mayoría de éstos son conjugativos y pueden transferir copias a bacterias de las mismas o diferentes especies. Plásmidos con estas características circulan por todo el mundo y contribuyen a diseminar la multirresistencia a los antimicrobianos (Llop, 2001; Talukder *et al.*, 2006).

El serogrupo predominante de *Shigella* que circula en una comunidad, aparece relacionado con el nivel de desarrollo socioeconómico. En los países en vías de desarrollo, donde habita la mayoría de la población mundial, la incidencia de shigelosis permanece elevada, debido a una deficiente infraestructura de los sistemas de salud pública imperantes y a las malas condiciones higiénico-sanitarias existentes (Bennish, 1999; Bennish, 2001). Tanto *S. flexneri* como *S. sonnei* prevalecen en áreas endémicas; mientras que, *S. boydii* se aísla con menor frecuencia (Klotoff *et al.*, 2000; World Health Organization, 2005^a).

II.2.3 Shigelosis en Cuba

La tasa de incidencia de EDA en Cuba, en el año 2005, fue de 7784.60 x 100 000 habitantes (Ministerio de Salud Pública, 2005) y actualmente, el género *Shigella*, representa uno de los agentes etiológicos más importantes asociados con las EDA. Los serogrupos aislados con más frecuencia en los pacientes con cuadro clínico de shigelosis son: *S. flexneri* y *S. sonnei* (Valdés-Dapena, 2001). Debido a la elevada virulencia de las cepas circulantes en Cuba, desde 1990 se realiza la vigilancia microbiológica y el monitoreo de la resistencia a los antimicrobianos (Llop, 2001).

II.3 Taxonomía

Según la Novena Edición del Manual de Bacteriología Sistemática, el género *Shigella* se ubica taxonómicamente en (Garrity *et al.*, 2003):

Reino: Procarionte

División I: Gracilicutes

Clase I: Bacterias

Familia: Enterobacteriaceae

Tribu: *Escherichiae*

Género: *Shigella*

Especies: *S. dysenteriae* (A) (14 serotipos)

S. flexneri (B) (8 serotipos)

S. boydii (C) (18 serotipos)

S. sonnei (D) (1 serotipo)

II.4 Características microbiológicas del género *Shigella*

Estos microorganismos son bacilos Gram-negativos pequeños, de 1.5 µm de longitud por 0.8 µm de diámetro, no esporulados y no móviles (Zwazdyk, 1994; Edwards y Ewing, 1999). En los medios de cultivos no diferenciales o no selectivos como el Agar Sangre, se desarrollan colonias húmedas, lisas y grises. Pueden también producirse variaciones de colonias lisas a rugosas; en los medios diferenciales para el aislamiento de *Shigella*, las colonias no fermentadoras de la lactosa, son convexas, circulares, transparentes y alcanzan un diámetro aproximado de 2 mm, en 24 horas de crecimiento (Romero Cabello, 1999).

Estos microorganismos son anaerobios facultativos, todas las especies utilizan la glucosa oxidativa y fermentativamente; la lactosa es fermentada solamente por *S. sonnei* después de un prolongado

período de incubación; *S. sonnei* fase II se aísla de portadores y convalecientes, no produce sulfuro de hidrógeno y no produce gas de la glucosa, con escasas excepciones (Biotipo Manchester y Newcastle de *S. flexneri* 6, *S. boydii* 13 y 14 y *S. dysenteriae* 3). Todas las especies de este género son oxidasa negativa, reducen los nitratos a nitritos, no producen lisina decarboxilasa, no utilizan acetato, ni citrato como fuente de carbono y no licúan el alginato (Koneman *et al.*, 1998; Mc Faddin, 2002).

II.4.1 Estructura antigénica

El género *Shigella* consta de 4 especies o grupos principales, que se agrupan serológicamente sobre la base de los antígenos somáticos O (unidades repetitivas de carbohidratos) componentes del lipopolisacárido (LPS). Hay gran sobreposición en la conducta serológica de las diferentes especies y la mayor parte de ellas comparten antígenos somáticos con otros bacilos intestinales (Sonnenwirth, 1990). La especificidad de los antígenos se mencionó anteriormente, pero es importante señalar que la misma no es absoluta. Son posibles reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) falsamente positivas debido a la reactividad cruzada, contienen antígenos O menores, que se tienen en cuenta para subagruparlos y se designan con números arábigos. Estos subgrupos son similares bioquímicamente, mientras que, el serogrupo D es diferente. Hasta el momento se han descrito 14 serotipos en el grupo A, 8 en el B, 18 en el C y 1 en el grupo D (World Health Organization, 2005^a).

Algunas cepas poseen antígeno capsular (K), que no es importante para el serotipaje, pero cuando está presente, puede interferir en las reacciones serológicas del antígeno O. Este antígeno K es termolábil y se elimina por ebullición de la suspensión celular, antes de la tipificación del microorganismo. En los serotipos del 1-5 del serogrupo B, se han demostrado fimbrias, todas estas estructuras son inmunológicamente idénticas. *Shigella* es inmóvil y carece de antígenos flagelares H. Los aislamientos sospechosos de *Shigella* deben confirmarse con sueros polivalentes para cada una de las cuatro especies. El antisuero para *S. sonnei* en esta etapa representa generalmente, una mezcla de

antígenos para las formas 1 y 2, si una suspensión no reacciona con uno u otro de los antisueros polivalentes mencionados, se someterá a ebullición durante 15 minutos, se enfriará y volverá a probar con los mismos antisueros (Mc Faddin, 2002; Niyogi, 2005).

II.5 Patogenia de las infecciones por *Shigella*

Los mecanismos implicados en la disentería bacilar son complejos y desde el punto de vista molecular no han podido ser completamente esclarecidos. Los microorganismos deben sobrevivir su paso a través del tracto gastrointestinal superior, unirse a las células del colon y penetrar en las células epiteliales. Una vez dentro de éstas, se multiplican y pasan de una célula a otra. La multiplicación bacteriana produce la inflamación y muerte de las células epiteliales, ulceración, deficiencia en la absorción de líquidos por el colon y evacuación de sangre, moco y pus (Quinteros, 2000; Yurdakok *et al.*, 2003).

II.5.1 Propiedades de superficie

La capacidad para sobrevivir a las defensas del huésped puede atribuirse a los antígenos O. La importancia de una estructura lisa (LPS), denominada tipo de colonia en fase I, se ha demostrado mejor con *S. sonnei* y *S. flexneri*. Estas bacterias poseen un gran plásmido de 120-140 Mda que codifica los polipéptidos que unen a los polisacáridos de las cadenas O-específicas, la pérdida de este plásmido, produce la formación de colonias rugosas y organismos no virulentos. (Quinteros, 2000; Valdés-Dapena, 2001).

II.5.2 Invasividad

Las cepas de *Shigella* virulentas penetran de forma irregular en la mucosa y células epiteliales del colon, y rara vez, lo hacen más allá de éstas hacia la lámina propia. La fijación de los microorganismos puede involucrar cationes divalentes como el calcio. El ingreso de las bacterias a las células epiteliales se produce como consecuencia de una endocitosis inducida, mediada por

receptores o por la producción de algún producto bacteriano que provoca una respuesta en la célula del huésped, es probable que sea una hemolisina de contacto codificada por plásmidos. Al principio, las bacterias están contenidas en los fagosomas, las virulentas rompen y escapan de la vacuola fagocítica, se multiplican y se propagan dentro del citoplasma de la célula epitelial, invaden a las células adyacentes, provocando la inflamación y muerte celular. Los microabscesos en la pared del intestino grueso y el íleon terminal, producen necrosis sobre la región ulcerada de la mucosa, úlceras superficiales, sangrado y la formación de una pseudomembrana, compuesta por fibrina, leucocitos, restos celulares, una mucosa necrosada y bacterias. Cuando el proceso cede, el tejido de granulación llena las úlceras y se forma tejido cicatrizal. Las infecciones por *Shigella* casi siempre se limitan al aparato gastrointestinal, la invasión al torrente sanguíneo es poco frecuente (Valdés-Dapena, 2001; López- Brea *et al.*, 2004).

II.5.3 Toxinas

Es probable que la muerte celular sea consecuencia de las propiedades citotóxicas de la toxina Shiga, la cual interfiere en la síntesis proteica; la toxina posee múltiples efectos: es neurotóxica, citotóxica y enterotóxica. La toxina Shiga intacta, tiene un peso molecular (PM) de 70 Kda y cada una consta de una subunidad A con un PM de 32 Kda y cinco subunidades B con PM de 6.5 Kda. La subunidad A, se subdivide en A1 y A2, la A1 es de 28 Kda, tiene actividad enzimática para la síntesis proteica e inactiva de manera irreversible a la subunidad ribosomal 60S. Las endotoxinas que se encuentran en la pared de las bacterias, en un LPS, producen necrosis focal del sitio que está colonizando la bacteria, de esta forma se producen los abscesos y después las úlceras del rectosigmoides (Castillo *et al.*, 1999; Keusch y Bennish, 2003).

La capacidad invasiva sólo se observa en las cepas virulentas y parece estar codificada en un plásmido de su genoma y cuando falta este gen, la bacteria es incapaz de colonizar el epitelio de la mucosa (Koneman *et al.*, 1998; Keusch y Bennish, 2003).

II.5.4 Proteínas de membrana externa (PME)

El citoplasma de las bacterias Gram-negativas está rodeado por una envoltura compleja, que consiste en una membrana citoplasmática, la capa de péptido glicano y la membrana externa. La membrana externa contiene proteínas, fosfolípidos y el LPS, como el mayor constituyente; en el caso de las enterobacterias, también comprende el antígeno común de enterobacterias (ECA), como constituyente menor. La zona de adhesión tiene sitios de contacto entre el citoplasma y la membrana externa, involucrada en la penetración del fago ADN, la biogénesis del LPS y las PME. Debido a su localización externa estas estructuras pueden ser consideradas como clásicas proteínas secretoras (Bush *et al.*, 1999; Valdés-Dapena, 2001).

La membrana externa de *E. coli* y otras enterobacterias como *Salmonella* y *Shigella* contienen un conjunto de proteínas mayores, que tienen un potencial de expresión de 100 000 copias por célula, ésta comprende alrededor del 80% del contenido de las PME. La proteína de membrana externa mayor (PMEM) puede ser subdividida en dos categorías: la primera, que se denomina OmPA, está integrada por proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana externa y de la lipoproteína (López Brea *et al.*, 2004); la segunda está compuesta por diferentes proteínas implicadas en la formación de los poros de difusión pasiva que facilitan la permeabilidad de las moléculas hidrofóbicas y son llamadas porinas: OmPC y OmPF. Las proteínas mayores OmPC y OmPF se expresan continuamente pero están sujetas a fluctuación en sus niveles relativos, dependiendo de las condiciones del crecimiento y la expresión de otras PME; por ejemplo, la expresión de la OmPC se favorece en medios con alta presión osmótica y la OmPF en medios con

niveles medios de presión osmótica (López-Brea *et al.*, 2004). Otra proteína que se expresa condicionalmente como porina mayor es la PhoE, semejante a la LamB y con cierto grado de especificidad como porina. Su función es de poro para el transporte de fosfato orgánico e inorgánico y se inducen en condiciones de limitación de los fosfatos. Estas porinas facilitan la permeabilidad de ciertas moléculas hidrofílicas que no pueden ser fácilmente difundidas a través de los poros generales formados por las OmPC y OmPF (López- Brea *et al.*, 2004).

En el género *Shigella* se han descrito múltiples proteínas y entre éstas se encuentran las de 120 Kda que promueven el movimiento intracelular en la bacteria y conduce a la infección de células adyacentes por la formación de protusiones; este movimiento envuelve la nucleación, polimerización y subsiguiente polarización de actina. Hay otra proteína de 30 Kda que es un factor regulador positivo de los niveles de transcripción para algunas de las proteínas asociadas con la virulencia. Existe otra proteína, la *MixD*, esencial para la secreción de los antígenos de invasión plasmídica (IPA) de *S. flexneri*. Se reporta otra de 76 Kda codificada por un fragmento cromosomal de *S. flexneri*, asociado con la virulencia y la producción de aerobactin y la síntesis del ión regulador del hierro. Las que tienen un peso molecular de 62, 44, 43, 30 y 21 Kda son comunes a todas las especies de *Shigella*, inclusive la proteína mayor de 36 Kda, interviene en el proceso de invasividad. Esta última constituye un factor regulador positivo de los niveles de transcripción para algunas proteínas asociadas a la virulencia. La de 17 Kda y que aparece también en otros géneros como: *Serratia*, *Klebsiella* y *E. coli*, juega un rol importante en la virulencia de estos microorganismos (Quinteros, 2000; López Brea *et al.*, 2004).

II.6 Diagnóstico de la shigelosis

II.6.1 Diagnóstico clínico

La shigelosis o disentería bacilar presenta un período de incubación que varía, desde menos de 12 horas hasta cuatro días. Comienza con fiebre, dolor abdominal y diarreas líquidas; en esos momentos, es difícil de distinguir de las diarreas producidas por cualquier otro patógeno entérico. Con posterioridad aparecen los característicos pujos, tenesmo y las heces mucopiosanguinolentas. A una mayor virulencia de la cepa, más evidente se hace el cuadro disentérico. En individuos bien nutridos el cuadro clínico desaparece sin tratamiento (7-10 días) después de su inicio; sin embargo, en los desnutridos puede evolucionar a las formas persistentes (Quinteros, 2000; Valdés-Dapena, 2001; Niyogi, 2005).

Las complicaciones que se pueden observar son: deshidratación en los niños muy pequeños y desnutridos, sepsis con coagulación intravascular diseminada en infecciones por *S. dysenteriae* 1 y algunos serotipos de *S. flexneri*, el síndrome urémico hemolítico y la púrpura trombocitopénica trombótica. Otras complicaciones menos frecuentes son: prolapso rectal, megacolon tóxico, colitis pseudomembranosa, hepatitis colestásica, conjuntivitis, iritis, úlceras corneales, artritis, síndrome de Reiter, cistitis, miocarditis y vaginitis (Romero Cabello, 1999; Niyogi, 2005).

II.6.2 Diagnóstico de laboratorio

Para certificar el diagnóstico etiológico, se requiere demostrar la presencia de *Shigella* en las heces, ya sea por las técnicas clásicas de cultivo o demostrando su material genético por métodos de biología molecular (Yurdakov *et al.*, 2003).

Las muestras de heces del paciente deben obtenerse al inicio de la enfermedad, antes de administrarse antimicrobianos. Una dificultad que se presenta habitualmente es la conservación de la muestra hasta su procesamiento, la demora de las técnicas de diagnóstico, pueden afectar la viabilidad

de *Shigella*. Para evitar este inconveniente, se dispone de medios de transporte como el de Cary–Blair, medio que posibilita conservar la muestra a la temperatura ambiente, aumentando las posibilidades del aislamiento (Edwards y Ewing, 1999; Valdés-Dapena, 2001).

El examen microscópico de las heces con la coloración de azul de metileno o Gram detecta la presencia de leucocitos polimorfonucleares; éstos sugieren infección por *Shigella*, aunque no es exclusivo de este microorganismo. En la shigelosis es frecuente observar abundantes polimorfonucleares (Valdés-Dapena, 2001; Mc Faddin, 2002).

Para el cultivo se utilizan diversos medios selectivos o diferenciales (Agar Salmonella-Shigella, Agar MacConkey y Agar Hektoen); para completar su caracterización, las colonias lactosa negativas se deben estudiar mediante pruebas bioquímicas y serológicas (antisueros específicos) (Edwards y Ewing, 1999; Mc Faddin, 2002). Se han utilizado diversas técnicas de biología molecular, sondas de ADN para detectar genes de virulencia (localizados en plásmido de 120 Mda), y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). La RCP puede detectar cantidades muy pequeñas de bacterias, sus desventajas radican en su complejidad y costos (Chin, 2001).

II.7 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en *Shigella*

Para el tratamiento de la shigelosis la OMS recomienda el uso de antibióticos y quimioterápicos, después de conocer el resultado de las pruebas de sensibilidad “in vitro”. El inapropiado y extenso uso de los antimicrobianos en el tratamiento de las EDA, ha traído como consecuencias el desarrollo de la resistencia bacteriana, situación que actualmente constituye un problema emergente de salud mundial (Romero Cabello, 1999; World Health Organization, 2005^a).

Las sulfamidas estuvieron disponibles comercialmente desde 1930 y a partir de ese momento fueron eficaces en la terapia de la disentería bacilar y otras infecciones. Sin embargo, debido a su eficacia, se

utilizó frecuentemente a partir de los años 40 y en este período de tiempo, el 90% de los aislamientos de *Shigella* comenzaron a presentar resistencia. La terapia contra la shigelosis cambió al surgir otros antimicrobianos como: cloranfenicol, tetraciclina, estreptomycin, que comenzaron a comercializarse en 1950. En pocos años el género se tornó resistente a uno o más antimicrobianos. A mediados de la década de los 60, la tercera parte de los aislamientos en Japón mostró una resistencia cuatro veces mayor, resistencia que era además transferible a otras bacterias. A comienzos de 1970, el trimetoprim-sulfametoxazol y la ampicilina se introdujeron en el tratamiento de la shigelosis y mostraron su efectividad y a mediados de los años 80, surgieron cepas resistentes y comenzó la circulación de factores R (mediadores de esta resistencia) (Tenover y Mc Gowan, 1996; Chin, 2001; Livermore, 2006).

La determinación y vigilancia de los patrones de resistencia a los diferentes antimicrobianos en una región o país, permite definir la existencia de zonas epidémicas con cepas multirresistentes. Además, la detección de cambios entre las mismas, facilita el control de la política de antibióticos de la región estudiada (Shieng *et al.*, 2001; Mever *et al.*, 2002; World Health Organization, 2005^b).

El origen genético de la resistencia de *Shigella* a los antimicrobianos se debe fundamentalmente a la adquisición de plásmidos y a mutaciones cromosómicas. En regiones de Europa, Asia y América se han realizado estudios con cepas multirresistentes y se ha demostrado la presencia de un plásmido conjugativo de 20 MDa, capaz de transferir frecuentemente la resistencia de una cepa a otra (Prado *et al.*, 1999; Marco y Jiménez de Anta, 2000; Prats *et al.*, 2000).

Los microorganismos del género *Shigella* pueden exhibir resistencia a los antimicrobianos por diversos mecanismos (Tenover *et al.*, 1999^a; Guerra *et al.*, 2002; Iverien *et al.*, 2005):

- Producción de enzimas que inactivan el fármaco, dentro de estas tenemos: β -lactamasas (penicilinas), cefalosporinasas (cefalosporinas), cloranfenicoltransferasas (cloranfenicol), acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas (aminoglucósidos).
- Dificultad en la captación del agente antimicrobiano: los betalactámicos no pueden cruzar con facilidad la membrana externa.
- Disminución en la acumulación celular del antimicrobiano: importante en la resistencia a la tetraciclina, producida por plásmidos, transposones y mutaciones en el cromosoma.

El fenómeno de la resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos puede tener un origen natural o genético. La de origen natural es la resistencia que ofrecen las bacterias de una misma cepa o especie frente a un determinado antibacteriano donde todos sus miembros tienen la misma característica. La resistencia de origen genético se debe a cambios en los genes y procesos subsiguientes de selección por las drogas. Estos a su vez, pueden ser de origen cromosómico (mutaciones) y extracromosómico, debido a elementos extracromosomales en las bacterias, plásmidos, integrones y transposones que pueden ser transferido de una bacteria a otra a través de los mecanismos de transducción, transformación, conjugación y transposición (Mayer *et al.*, 1997; Chambers y Sandel, 2002; Livermore, 2006).

La resistencia debida a los cambios cromosómicos se genera por mutaciones en los genes del microorganismo que controlan las estructuras o funciones sobre las que actúan los distintos antimicrobianos, modificando la susceptibilidad del microorganismo. La resistencia por mutación puede aparecer en una generación (resistencia en un sólo escalón) o en el transcurso de varias generaciones (resistencia en varios escalones). En el caso de la resistencia en un sólo escalón, el microorganismo que era inicialmente sensible a un determinado antimicrobiano se vuelve resistente en la próxima generación. En cambio, en el caso de la resistencia en varios escalones, la sensibilidad

disminuye progresivamente a medida que se forman nuevas generaciones y llega un momento en el que la bacteria se vuelve totalmente resistente (Livermore y Brown, 2001; Chambers y Sandel, 2002; Livermore, 2006).

La resistencia cromosómica se transfiere en sentido vertical por selección a las células hijas. Con mayor frecuencia, se adquiere por transferencia horizontal de los determinantes de resistencia de una célula donante a otra especie bacteriana por transformación, transducción o conjugación (Iverien *et al.*, 2005).

La resistencia extracromosomal mediada por plásmidos se caracteriza por la codificación de β -lactamasas y otras enzimas (cefalosporinasas, acetiltransferasas) (Schumacher *et al.*, 2002). La mayoría de los plásmidos son conjugativos y tienen la habilidad de transferir copias a otras bacterias de la misma o de diferentes especies, estos están codificados por los genes *tra* y algunos son incapaces de transferirse, pero pueden utilizar estos genes en función de plásmidos conjugativos, para asegurar su pase a otras bacterias (Livermore y Brown, 2001; Matsusmoto *et al.*, 2003).

II.8 Epidemiología de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Shigella*

II.8.1 Tipificación bacteriana, métodos y valor epidemiológico

Al abordar el estudio de un brote y de cepas aisladas de casos esporádicos, además de disponer de una identificación precisa y un antibiograma detallado, se necesita saber si se trata de una situación producida por una misma cepa o si, por el contrario, se trata de aislamientos similares de una misma especie. Por otro lado, es necesario estudiar la identidad o no entre las cepas aisladas de los enfermos y del sitio que se sospecha pueda ser el foco de la contaminación. Para ello, pueden emplearse métodos de caracterización fenotípica y técnicas de biología molecular, métodos de tipaje que

permitan una diferenciación más precisa entre cepas de la misma especie (Woodford y Jonson, 1998; Chin, 2001).

II.8.2 Criterios de evaluación de un método de tipificación

Varios criterios pueden ser considerados para realizar la evaluación de estos métodos (Tenover *et al.*, 1999^b; Swaminathan y Matar, 2001):

Tipabilidad: Es la capacidad de obtener un resultado positivo no ambiguo para cada cepa; las cepas no tipables son aquellas en que el tipaje no proporciona un resultado, o este no puede interpretarse.

Reproducibilidad: Es la capacidad que ofrecen los métodos empleados para brindar el mismo resultado, aunque la cepa sea probada muchas veces. Este criterio puede afectarse por variaciones de los resultados de un día a otro, o por variaciones en la estabilidad de las características bacterianas estudiadas.

Poder discriminante: Es la capacidad de diferenciar microorganismos no semejantes. Un método de tipaje ideal identificaría cada microorganismo como único y puede ser considerado útil, mientras exista la probabilidad de que dos gérmenes no aparentes, pertenezcan a un mismo tipo. Además, el poder discriminatorio aumentaría, si el método es capaz de detectar las variaciones mínimas o poco frecuentes. Dos microorganismos que pertenezcan a tipos diferentes, pueden ser considerados como no aparentes, por lo tanto, la conclusión que dos microorganismos pertenecen a un mismo clon, dependerá del poder de discriminación del método utilizado y de la diversidad genética de la población examinada (Tenover *et al.*, 1995; Swaminathan y Matar, 2001).

II.8.3 Métodos de tipificación

El problema de la clasificación de cepas similares está reconocido por la designación de tipos y subtipos, así como por la interpretación de los resultados obtenidos por muchos métodos de tipaje.

Un sistema ideal de tipaje debe ser estandarizado, aplicable a muchos organismos, rápido y fácilmente disponible. Sin embargo, no existe un método ideal y se deberá disponer de los recursos necesarios para aplicar varios métodos (Tenover *et al.*, 1999^b; Swaminathan y Matar, 2001). Estos pueden ser clasificados en:

- Marcadores fenotípicos: detectan características expresadas por los microorganismos.
- Marcadores genotípicos: se basan directamente en características del ADN cromosomal y extracromosomal.

II.8.3.1 Marcadores fenotípicos

Los métodos tradicionales para la diferenciación de cepas: serotipaje, biotipaje, antibiograma, lisotipia y tipaje por bacteriocinas, se basan en las diferencias fenotípicas (Swaminathan y Matar, 2001; Goering, 2004).

La ventaja del biotipaje y el antibiograma radican en su facilidad de ejecución y para ciertos microorganismos están estandarizados a escala internacional, esto permite comparar directamente los resultados provenientes de diferentes laboratorios (serotipia, lisotipia y bacteriocina). Mientras que, su desventaja se debe a la capacidad que tienen las bacterias de alterar de manera imprevisible la expresión de los caracteres estudiados (reproducibilidad). Los aislamientos independientes de la misma cepa pueden variar fenotípicamente, para ciertos métodos algunas cepas brindan resultados nulos (débil tipabilidad) y su poder de discriminación es igualmente débil (Tenover *et al.*, 1999^b; Swaminathan y Matar, 2001; Goering, 2004).

II.8.3.2 Biotipaje

Método útil para diferenciar cepas de una misma especie, se basa en las siguientes propiedades biológicas: aspectos morfológicos, reacciones bioquímicas, características frente al medio

(crecimiento a pH o temperaturas extremas). La ventaja de este método es que con los sistemas de identificación comerciales, un perfil bioquímico o biotipo es automáticamente generado por los procesos de identificación de rutina. Sin embargo, el biotipaje no es una propiedad estable y puede estar influenciado también por una variedad de factores técnicos y ambientales, así como por la ganancia o pérdida de un plásmido (Eiseintein, 2000; Swaminathan y Matar, 2001).

II.8.3 Antibiograma

Las pruebas de susceptibilidad deben realizarse en microorganismos asociados a infecciones cuando su sensibilidad no se pueda predecir a partir de su identificación, está indicada además cuando el microorganismo causal de la infección pertenezca a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Estas pruebas de determinación de la susceptibilidad son útiles también en los estudios de epidemiología de la resistencia y de nuevos agentes antimicrobianos (Bauer *et al.*, 1966; National Committee for Clinical Laboratory Standards, M2-A8, 2003^a).

Método de difusión (Kirby-Bauer): El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel) en contacto con la superficie del agar, sobre la cual se ha distribuido previamente el microorganismo en cuestión. Se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada, por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido (entre el disco y el crecimiento) dependerá, no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del grosor de la capa del medio del Agar Müller Hinton, su pH y composición, de la capacidad de difusión del antimicrobiano en ese medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, del tamaño del inóculo y la fase de crecimiento de la bacteria. Todas éstas, son las variables más importantes que afectan el resultado del antibiograma (Bauer *et al.*, 1966).

Los fundamentos para la interpretación de las pruebas de susceptibilidad son: para cada antimicrobiano se establecen “concentraciones críticas” o “puntos de corte”, que permiten separar a los microorganismos en tres categorías: sensible, resistente y con sensibilidad intermedia. Estas categorías se establecen para cada bacteria frente a cada agente antimicrobiano, comparando la concentración inhibitoria mínima (CIM) en cada caso con los puntos de corte establecidos (Bauer *et al.*, 1966; National Committee for Clinical Laboratory Standards, M2-A8, 2003^a).

- Sensible: un microorganismo se considera sensible a un antimicrobiano cuando se espera que la infección causada por el mismo, responda a dicho fármaco con la dosis recomendada.
- Resistente: este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antimicrobiano en cuestión, cualesquiera que sean las dosis empleadas y la localización de la infección.
- Sensibilidad intermedia: este término se aplica a dos situaciones diferentes: a) incluyen a cepas con sensibilidad disminuida frente a un antimicrobiano que puede utilizarse con éxito para el tratamiento si se emplean dosis más altas por ser este agente poco tóxico, o porque se concentra en el sitio de la infección; b) incluyen cepas con sensibilidad intermedia a los antimicrobianos que por ser más tóxicos no pueden usarse en dosis más elevadas, en este caso, la categoría de sensibilidad intermedia sirve como una zona de transición entre cepas sensibles y previene pequeños errores causados por factores técnicos.

Muchas veces un resultado intermedio requiere la definición de la sensibilidad mediante el uso de un método cuantitativo, como la CIM (National Committee for Clinical Laboratory Standards, M2-A8, 2003^a).

La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para una prueba de difusión es una decisión de cada laboratorio y se debe tener en cuenta: la eficacia clínica, la prevalencia de la resistencia, el costo, el consenso para los antimicrobianos de primera elección y sus alternativas, entre otras. En general, deberá incluir un solo representante de cada grupo de los antimicrobianos relacionados, que tengan una actividad e interpretación similar (Sack *et al.*, 1999; López Brea *et al.*, 2004).

En epidemiología, esta técnica tiene la ventaja que se basa en la detección de la sensibilidad o de la resistencia de un organismo frente a un grupo de antimicrobianos, el método resulta atractivo porque se realiza fácilmente en el laboratorio, no necesita de equipo sofisticado y los datos provienen directamente de los análisis de rutina; mientras que tiene las desventajas de tener un poder de discriminación débil y la variabilidad genética de la resistencia a los antimicrobianos, variabilidad determinada por la presencia o ausencia de plásmidos portadores de marcadores de resistencia. Muchos autores proponen la información que brinda un antibiograma obtenido por el método de Kirby-Bauer. Este método muestra una buena estabilidad y cuando se hace un empleo adecuado de los antimicrobianos, su calidad es comparable a los métodos moleculares (Bauer *et al.* 1966; National Committee for Clinical Laboratory Standards, M2-A8, 2003^a).

II.8.3.4 Serotipaje

Este método se basa en la presencia o ausencia de determinantes antigénicos somáticos, flagelares y capsulares, así como su reacción con los antisueros específicos. Es simple y fácil de aplicar, pero los antisueros específicos son costosos. Además, en aquellas especies que tienen un gran número de variantes antigénicas, es laborioso y consume mucho tiempo (Edwards y Ewing, 1999; Chin, 2001).

II.8.3.5 Lisotipia

La lisotipia se basa en la sensibilidad que tienen algunas cepas para ser lisadas por un gran espectro de bacteriófagos seleccionados y ofrece un máximo de discriminación entre los microorganismos de

una misma especie. Ha sido desarrollada para ciertos patógenos nosocomiales (*Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*) y sus desventajas principales son: la falta de estandarización, débil reproducibilidad, complejidad y las cepas fágicas son difíciles de obtener; solo se utilizan en los laboratorios de referencia (Woodford y Jonhson, 1998; Chin, 2001).

II.8.3.6 Tipaje por bacteriocina

El método se basa en la sensibilidad de ciertas cepas frente a los productos tóxicos elaborados por otros microorganismos de la misma especie. No es costoso y está normalizado para *Pseudomonas aeruginosa* (piocina). Esta técnica es relativamente compleja y tiene un bajo poder de discriminación (Chin, 2001).

II.8.4 Marcadores genotípicos

Debido a los problemas que se presentan en la mayoría de los métodos fenotípicos con su tipabilidad, reproducibilidad y poder discriminatorio, se han desarrollados nuevos sistemas genotípicos (no excluyentes), basados en la detección del polimorfismo a nivel del ADN (Liu *et al.*, 2000; Marco y Jiménez de Anta, 2000).

Estas técnicas de biología molecular o métodos de tipaje molecular y epidemiología molecular pueden aplicarse a la mayoría de las especies bacterianas y su poder de discriminación es muy elevado. Además, la relación costo eficiencia es otro criterio que ayuda en la decisión de emplearlas. En algunas situaciones se hace necesario el empleo de hasta dos ó tres técnicas para aumentar el grado de discriminación entre los aislamientos (Marco y Jiménez de Anta, 2000; Chin, 2001).

II.8.4.1 Análisis plasmídico

Es un método de biología molecular de gran aplicación y utilidad en epidemiología, es el primer método genotípico de tipificación a emplear para el estudio de un brote y por su mediana

complejidad puede realizarse en un laboratorio de investigaciones clínicas. La presencia de los plásmidos se conoce en un gran número de especies y puede variar entre las diferentes cepas. Su mayor desventaja radica en la inestabilidad de los plásmidos, situación que se presenta con frecuencia. En ausencia de una presión selectiva de los antimicrobianos, las células bacterianas tienen tendencia a perder rápidamente los plásmidos (David, 1999; Luque *et al.*, 1999; Swaminathan y Matar, 2001; Taneja *et al.*, 2005).

El análisis de los patrones plasmídicos es necesario para la caracterización de cepas epidémicas que albergan plásmidos, la identificación de los mismos es útil mientras exista una cantidad mínima de presión selectiva en el medio ambiente, la que puede provocar una ganancia, pérdida o cambio en el perfil plasmídico (Kaisar *et al.*, 2002; Iverien *et al.*, 2005).

II.8.4.2 Análisis de enzimas de restricción (REA)

Este método es universalmente aplicable a todas las especies bacterianas. Consiste en el empleo de enzimas denominadas endonucleasas de restricción, estas realizan cortes en el ADN que reconocen una secuencia nucleotídica para este propósito, sin requerimientos de ATP. Su aplicación da como resultado múltiples fragmentos de ADN de diferentes tamaños que pueden ser visualizados en una electroforesis. De acuerdo al número y localización de los sitios de restricción específicos para cada genotipo, se obtendrán diferentes patrones de restricción. El método es simple y rápido, aunque el número elevado de bandas generadas, hace que la interpretación de los resultados sea difícil (Ausubel *et al.*, 1991; Maslow *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2003).

II.8.4.3 Restricción de fragmentos de amplio polimorfismo (RFLP)

Con el empleo de esta técnica se pueden estudiar las relaciones genéticas. Comprende la extracción del ADN celular, su digestión con enzimas de restricción y la separación de los fragmentos mediante la electroforesis; seguidamente se transfieren dichos fragmentos a una membrana de nylon o

nitrocelulosa para posteriormente hibridar con una sonda específica del gen o secuencia a ser examinada. Este método evita el inconveniente de la multitud de bandas del REA debido a que la sonda pone en evidencia los fragmentos que contienen una secuencia complementaria a ella, facilitando así su interpretación. Esta sonda es un fragmento de ADN marcado de secuencia conocida o desconocida. El operón contiene los genes ribosómicos que serán utilizados como sonda (Eisenstein, 2000; Na-Ubol *et al.*, 2006).

La técnica denominada ribotipaje tiene la ventaja en la mayoría de los métodos fenotípicos que el tipaje de especies diferentes es posible con la misma sonda, por ejemplo: el operón ribosómico de *E. coli*, (la secuencia de genes ribosómicos es altamente conservada). La técnica del ribotipaje es una variación del RFLP y ha sido validada para un gran número de especies, da como resultado un pequeño número de bandas, lo cual simplifica su interpretación (Maslow *et al.*, 2001; Tompkins, 2002).

II.8.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)

Como método de tipaje puede ser utilizado de dos formas diferentes: a) analizando la secuencia amplificada por electroforesis después de una digestión, b) ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD-RCP), método que se basa en el uso de cebadores arbitrarios de secuencias cortas de aproximadamente 9-10 pb (pares de bases) de longitud los cuales tienen una baja especificidad de reconocimiento y se unen con afinidad a varios sitios del ADN cromosomal a bajas temperaturas de hibridación. Se generan numerosos fragmentos de longitudes que pueden analizarse a través de una electroforesis submarina en gel de agarosa. Las cepas difieren en los sitios de unión al ADN, con lo que se obtienen diferentes asociaciones de fragmentos, considerados como genotipos diferentes. Esta técnica amplifica el genoma completo y resulta en patrones de RCP más complejos, incrementando la habilidad de diferenciación entre cepas. Es de fácil implementación e

interpretación y un alto poder de discriminación. Requiere pocas cantidades de ADN, no se necesita información previa de la secuencia a amplificar y los mismos cebadores (oligonucleótidos) pueden ser usados en múltiples aplicaciones. Su mayor limitación es la elevada sensibilidad a las condiciones de la reacción. Esta técnica se ha empleado para el subtipaje de numerosas cepas incluyendo *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella*, *Campylobacter* spp., entre otras (Matsumoto *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005).

II.8.4.5 Electroforesis en Campo Pulsado (ECP)

Esta técnica se desarrolló recientemente y se basa en el empleo de enzimas de restricción con baja frecuencia de corte que originan patrones con un pequeño número de bandas (10-20). Posteriormente, el ADN genómico se somete a la electroforesis en un equipo donde la polaridad de la corriente se cambia con intervalos predeterminados; de esta forma permite una separación más nítida de dichas bandas, cuyos rangos de PM oscilan entre 10 y 1 000 pb. El método requiere de los siguientes pasos: preparación del ADN, corte del mismo con endonucleasas de restricción, separación de los fragmentos mediante la ECP y la visualización e interpretación de los patrones de bandas de ADN obtenidos. En microbiología la ECP se utiliza para comparar los aislamientos bacterianos epidemiológicamente relacionados, en la investigación de brotes, infecciones nosocomiales o infecciones en la comunidad. Por su alto poder discriminatorio, su buena reproducibilidad y resolución es de gran aplicación como método de tipificación molecular. Se puede aplicar a todas las bacterias y brinda perfiles de restricción reproducible y con buena nitidez, además cuando se compara con otros métodos genotípicos, la ECP se revela como uno de los más discriminatorios. Uno de los factores que limita su uso es el tiempo que requiere para completar su análisis (24 horas), situación que reduce la posibilidad de los laboratorios para procesar un mayor número de muestras (Schwartz y Cantor, 1984; Tenover *et al.*, 1999^b; Swaminathan *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2005).

II.8.4.6 Amplificación de fragmentos de amplio polimorfismo (AFLP)

Esta técnica ha sido desarrollada recientemente, y es capaz de generar complejos patrones de bandas, que pueden delinear relaciones genéticas intraespecíficas entre las bacterias. El análisis por AFLP pertenece a la categoría de las técnicas de amplificación de fragmentos de restricción selectivos. Para desarrollarla, primero se somete el ADN al corte con enzimas de restricción. Esta técnica está basada en el ligado de adaptadores a los fragmentos de restricción genómicos producidos por el corte de la enzima de restricción. Los adaptadores son diseñados sobre la base del corte que realiza la enzima y unidos por una ligasa, seguido de la RCP basado en la amplificación con cebadores específicos de los adaptadores que pueden ser selectivos y no selectivos. Las ventajas del mismo son: no requiere un conocimiento previo de las secuencias diana, RCP específica y reproducible y presentar una mejor resolución de los geles (Mendoza *et al.*, 1999 Tompkins, 2002; Berción *et al.*, 2006).

II.8.4.7 Secuenciación de genes

En los últimos años se emplean estudios de secuencias de varios genes, incluyendo genes estructurales y relacionados con la virulencia. Desde el punto de vista biológico, estos métodos ofrecen una explicación adecuada de la información genética y la relación existente entre diferentes poblaciones bacterianas. Su desventaja radica en la complejidad y alto costo (Milver *et al.*, 2002; Iverien *et al.*, 2005).

II.8.4.8 Microarreglos de ADN

Se basa en la hibridación de ADN amplificado frente a cientos o miles de oligonucleótidos de alta densidad organizados en un soporte de vidrio miniaturizado, que brinda la posibilidad de evaluar una gran cantidad de secuencias en un simple paso de hibridación (Suzuki *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Universo de trabajo y número de cepas procesadas

El universo de este trabajo lo constituyeron 7 800 cepas de *Shigella* spp., enviadas desde los 14 Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHE) de Cuba, durante un períodos de 13 años (1990-2002) al LNR/EDA/IPK. Las cepas procedían de aislamientos de niños menores de cinco años con un cuadro clínico de EDA. Del universo de cepas disponibles, se realizó en el LNR un muestreo simple aleatorio y se seleccionaron 3 350 aislamientos.

Para una mejor comprensión de los resultados, el número total de cepas seleccionadas (3 350) se distribuyó según fueron recibidas en dos quinquenios (1990-1994) y (1995-1999). Más un tercer grupo que incluyó aislamientos recibidos entre los años 2000-2002. El número de cepas investigadas en cada uno de los grupos diseñados para este trabajo, se muestra a continuación:

Distribución de las cepas de *Shigella*, por años

Años	No. cepas
1990-1994	1 350
1995-1999	1 450
2000-2002	550
TOTAL	3 350

Fuente: LNR/EDA/IPK.

Para un mejor análisis de la circulación de *Shigella* en Cuba, las cepas se distribuyeron en tres regiones: Occidental, (provincias: Pinar del Río, La Habana, Ciudad de la Habana, Matanzas), Central (Villa Clara, Cienfuegos, Sancti Spiritus, Ciego de Ávila y Camagüey) y Oriental (Las Tunas, Holguín, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo). Correspondiendo a: Región Occidental = 886 cepas; Región Central = 1 548 y Región Oriental = 916 respectivamente.

III. 2 Caracterización fenotípica de las cepas de *Shigella* spp

III. 2. 1 Comprobación bioquímica y fisiológica

Las cepas investigadas se almacenaron hasta su procesamiento a la temperatura del laboratorio (20-25 °C) en el medio de conservación para Enterobacterias (SANOFI, Pasteur). Todos los aislamientos viables fueron caracterizados en género y especie. Se emplearon las pruebas bioquímicas y serológicas descritas en la literatura (Koneman *et al.*, 1998; Mc Faddim, 2002).

Las cepas se inocularon en Caldo Nutriente (OXOID, Inglaterra), se incubaron 24 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis; y se sembraron por agotamiento en placas de Agar SS (BIOCEN, Cuba) y Agar MacConkey (MERCK, Alemania). Se seleccionaron al menos tres colonias características, no fermentadoras de la lactosa o transparentes, se inoculó por punción y estría en los medios de Agar hierro y dos azúcares de Kligler (MERCK, Alemania) y Agar Hierro Lisina (OXOID, Inglaterra), incubándose en aerobiosis durante 24 horas a 35 °C (Mc Faddim, 2002). Las cepas que mostraron las siguientes características fueron seleccionadas:

Características de las cepas de *Shigella* seleccionadas según las imágenes del Kligler y LIA

	Agar hierro y dos azúcares de Kligler	Agar hierro lisina (LIA)
Utilización de la glucosa	+	+
Utilización de la lactosa	-	
Producción de gas	-	-
Producción de SH ₂	-	-
Decarboxilación de la lisina		-

Fuente: Mc Faddim, 2002

Posteriormente, se les realizó prueba de oxidasa (según el Método de Kovacs) y aquellas que no tuvieron codificación genética para la enzima citocromo-oxidasa, se ubicaron en la familia Enterobacteriaceae. Se les realizó la identificación bioquímica complementaria correspondiente al género y la especie (Mc Faddim, 2002) (Anexo1).

Las cepas identificadas como *Shigella* se sembraron en cuñas de Agar Cerebro Corazón (OXOID), realizándose la serotipificación por aglutinación en lámina portaobjetos con los antisueros polivalentes de serogrupos (A-D) (Edwards y Ewing, 1999).

III. 2.2 Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer). A las cepas con sensibilidad intermedia o perfiles inusuales de resistencia, se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de microdilución en caldo. (NCCLS, M2-A8, 2003)

III. 2.2.1 Método de Kirby – Bauer

Este método se utilizó para investigar la susceptibilidad antimicrobiana de todas las cepas incluidas en el presente estudio (n= 3 350) (Bauer *et al.*, 1966; NCCLS, M2-A8, 2003; Perilla *et al.*, 2003).

Se investigó la susceptibilidad frente a nueve antimicrobianos (OXOID) recomendados por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos siguiendo la metodología descrita para Enterobacterias (Bauer *et al.*, 1966; NCCLS, M2-A8, 2003; Perilla *et al.*, 2003). Los antimicrobianos estudiados, así como el diámetro de la zona de inhibición y los valores de CIM correspondientes, se describen a continuación:

Antimicrobianos investigados, contenido del disco, diámetros de la zona de inhibición (según el método de Kirby- Bauer) y los valores de CIM

Agentes antimicrobianos	Contenido del disco (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			Valores de CIM	
		R	I	S	R	S
Ampicilina* (AMP)	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17	≥32	≤8
Ceftriaxona* (CRO)	30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21	≥64	≤8
Gentamicina*(GEN)	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥8	≤4
Tetraciclina* (TET)	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥16	≤4
Ciprofloxacina* (CIP)	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21	≥4	≤1
Ácido nalidíxico* (NAL)	30 µg	≤ 13	14-18	≥ 19	≥32	≤8
Trimetoprim/sulfametoxazol.* (SXT)	1.25/23.75 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	≥3/152	2≤38
Cloranfenicol* (CHL)	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18	≥32	≤8
Cefotaxima (CTX)	30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23	≥64	≤8

● Casa Comercial Oxoid y Biolife
Fuente: NCCLS, M2-A8, 2003*; Perilla et al., 2003

Se utilizaron las siguientes cepas controles, siguiendo las recomendaciones de NCCLS:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 35218
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

III. 2.2.2 Procedimiento

Preparación y estandarización del inóculo

A partir de un cultivo puro obtenido en placas de Agar Müller Hinton a pH=7.2-7.4 (MERCK) e incubado durante 18-24 horas a 35 °C, se tomaron 4-5 colonias aisladas y con igual morfología. Se resuspendieron en 3 mL de solución salina fisiológica y se ajustó directamente la suspensión bacteriana hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de MacFarland (1.5×10^6 UFC/mL).

Siembra de las placas

Después de la estandarización del inóculo (en un período no mayor de 15 minutos), se procedió a sembrar en placas de Agar Müller Hinton de 4 mm de grosor, con un hisopo estéril, garantizando una completa y homogénea distribución del inóculo en tres direcciones diferentes.

Colocación de los discos de antimicrobianos

Mediante una pinza estéril se colocaron los discos antimicrobianos seleccionados, sobre la superficie del agar. Por cada placa se colocaron 5 discos, conservándose las distancias recomendadas entre ellos (24 mm), así como la del borde de la placa al disco (14 mm).

Incubación de las placas

Antes que transcurrieran 15 minutos de haber colocado los discos de antimicrobianos, las placas se invirtieron e incubaron en aerobiosis a 35 °C durante 18-20 horas.

Lectura de las placas e interpretación de los resultados

Se examinó y verificó la pureza del inóculo, el crecimiento confluyente del cultivo y que las zonas de inhibición fueran uniformemente circulares. Posteriormente, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición para cada disco y se tuvo en cuenta que esta zona no mostrara desarrollo microbiano visible. Para la interpretación de la lectura se utilizaron los criterios de susceptibilidad descritos para Enterobacterias (NCCLS, M2-A8 2003^a). De acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición correspondientes a cada uno de los antimicrobianos, las cepas se clasificaron en: sensibles, con sensibilidad intermedia y resistente.

III. 2.3 Determinación de la CIM

III. 2. 3. 1 Método de microdilución en caldo

Se les realizó a las cepas (n=167) que mostraron susceptibilidad intermedia a los antimicrobianos ó para confirmar perfiles inusuales de resistencia en *Shigella* (resistencia a β-fluoroquinolonas). Los antimicrobianos a los cuales las cepas mostraron estos perfiles se muestran en la siguiente tabla (NCCLS, M7-A5, 2003^b):

Antimicrobianos utilizados y rangos seleccionados

Antimicrobianos *	Símbolo	Rangos utilizados
Ampicilina	AMP	0.12 –256 mg/mL
Acido nalidíxico	NAL	0.25- 0.128 mg/mL

*Casa comercial Sigma , Chemical Co, St Louis MO, USA .

III. 2 .3. 2 Procedimiento

Preparación de las soluciones de los antimicrobianos

Para la microdilución, cada solución de los agentes antimicrobianos empleados se preparó a una concentración doble (2X, solución madre). De esta forma, en cada pocillo se depositaron 50 µL de la solución y 50 µL del inóculo. Para calcular los antimicrobianos se empleó la siguiente fórmula NCCLS, M7-A5, 2003^b):

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{concentración (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potencia del antibiótico (}\mu\text{g/mg)}}$$

$$\text{Volumen en mL} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{potencia (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Concentración (}\mu\text{g/mL)}}$$

Preparación de las diluciones seriadas

Se prepararon diluciones seriadas dobles de los antimicrobianos en caldo Mueller Hinton y en tubos de 16 x 125 mm. Una vez preparada las diluciones homogenizadas y con la misma pipeta, se llenaron los compartimientos correspondientes del reservorio (microplacas plásticas estériles, de fondo plano) (Costar) con la pipeta multicanal, comenzando por la solución más diluida.

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó resuspendiendo las colonias directamente en caldo Mueller Hinton, hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland; posteriormente, se realizó una dilución 1/100 (0.1 mL de la suspensión y 9.9 mL de caldo Mueller Hinton) y de esta forma se obtuvo una concentración de 10^6 UFC/mL.

Siembra de las microplacas

Con una pipeta (50-200 μ L), se colocaron 50 μ L del inóculo ajustado (dilución 1/100) en los pozos del 1 al 10 y el 12. Se colocó un pocillo con un control de inóculo y otro como control de esterilidad, ambos con 100 μ L. El volumen final de cada pozo de la microplaca fue de 100 μ L.

Incubación

Se incubó por un período de 16 horas en ambiente aeróbico y a 35 °C.

Lectura e interpretación

Se consideró como CIM, la menor concentración del antimicrobiano, capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano. El punto final quedó definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo.

Para la lectura e interpretación se tuvieron en cuenta los criterios de (NCCLS, M7-A5, 2003^b).

Se consideraron como cepas de *Shigella* multirresistentes a los aislamientos donde se observó resistencia a tres o más clases de antimicrobianos (World Health Organization, 2005^b).

III.3. Caracterización genotípica de las cepas de *Shigella* spp.

III.3.1 Extracción del ADN plasmídico de las cepas multirresistentes de *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. boydii*.

La extracción del ADN plasmídico se realizó según el método descrito por Kado y Liu, (1981). De las cepas (n=190) que resultaron multirresistentes en el año 2002, se seleccionaron los patrones de resistencia cuyo número total de cepas fue menor de 10. En el caso de los patrones de resistencia con más de 10 cepas se seleccionó de forma aleatoria el 10%, distribuyéndose de la forma siguiente: *S. flexneri* = 30 cepas, *S. sonnei* = 20 cepas y *S. boydii* = 10 cepas.

III.3.1.2 Procedimiento

Se utilizó el método de lisis alcalina, para el cual se inocularon las cepas en placas de Agar LB (Luria Bertain, OXOID), incubándose toda la noche a 37 °C (Kado y Liu, 1981).

Se tomó una asada del cultivo y se resuspendió en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL con 100 µL de solución lisis (Tris HCl 1M, EDTA 0,5M pH 8, Glucosa 500 mM) más 8 µL de lisozima (50 mg/mL), se mezcló en agitador y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se le añadió 200 µL de solución alcalina de NaOH (0,2M) y SDS (1%) preparada al momento, se mezcló por inversión manual y se aseguró que toda la superficie del tubo se pusiera en contacto con la solución manteniéndose 5 minutos en hielo. Transcurrido este período de tiempo, se añadió 150 µL de solución de Acetato de Potasio (Acetato de Potasio 5M, Ácido Acético Glacial, H₂O), se mezcló por inversión manual durante 10 segundos, mezclando la solución con el lisado bacteriano, se mantuvo 5 minutos en hielo y se centrifugó a 12 000 r.p.m. por 5 minutos. Se recogieron 400 µL del sobrenadante, que fueron transferidos a un nuevo tubo de microcentrífuga, donde se purificó por la adición de 400 µL de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) saturado (Tris 10mM, pH 8, EDTA 1mM), se agitó manualmente por 10 segundos y se centrifugó en iguales condiciones. De la fase superior acuosa se transfirieron 300 µL a otro tubo y se le añadieron 18 µL de NaCl (5M) y 600 µL de etanol absoluto frío (-20 °C). Para precipitar el ADN plasmídico, se mezcló por inversión manual del tubo y se centrifugó 5

minutos a 12 000 r.p.m. El sedimento obtenido por centrifugación, se descartó el etanol y se secó al aire en incubadora, se resuspendió en 25 μ L de solución tampón TE (Tris HCl 1M, EDTA 1mM, pH 8) más RNasa (25 μ g/mL). El ADN plasmídico se conservó a -20°C (Kado y Liu, 1981).

III. 3. 2. Electroforesis submarina en gel de agarosa

La electroforesis se realizó en una cámara submarina (HOEFFER Scientific Instruments) usando un portagel de 20 x 25 cm. Como fuente de voltaje se utilizó un equipo modelo 200/20 (BIORAD). El gel se preparó con agarosa (Promega) al 0,8% en buffer TAE 1X (Tris acetato 0.04M, EDTA 0.001M) con Bromuro de Etidio al 5%, el cual se usó como solución de corrida para la electroforesis. En cada pocillo se aplicaron 25 μ L de muestra y 4 μ L de colorante Azul de Bromofenol. Se usó un marcador de peso molecular (Supercoiled DNA Ladder 2-16Kb, GIBCO BRL) para determinar la talla de los plásmidos. El gel se corrió en una solución tamponada, TAE 1X (Tris Acetato 0.04M, EDTA 0.001M) a 100 V durante 1 hora (Ausubel *et al.*, 1991).

Los plásmidos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Zenit con lente Nikon y película ORWO NP15, a través de un filtro amarillo Nikon 5L. El peso molecular de los plásmidos se determinó por el método de la curva logarítmica de regresión lineal (Ausubel *et al.*, 1991).

El perfil plasmídico se determinó teniendo en cuenta el número y talla de los plásmidos presentes. Para su análisis, se tuvieron en cuenta las bandas estables e intensas, las que no presentaron estas características, se consideraron formas relajadas o circulares del ADN plasmídico super-enrollado (Ausubel *et al.*, 1991).

III. 3.3 Determinación de los perfiles de ADN mediante electroforesis en campo pulsado

Las cepas de *S. flexneri* (n=30), *S. sonnei* (n=20) y *S. boydii* (n=10), que constituyeron los grupos principales o fenotipos mayores (según la distribución de serotipos/perfil de resistencia) detectados en las cepas seleccionadas en el año 2002, fueron analizados por ECP según el método descrito por Kauffman (1998).

III.3.3.1 Preparación del ADN cromosomal para ECP y digestión con endonucleasas de restricción

- * A partir de un cultivo de 18 horas de incubación de *Shigella* spp., se realizó una suspensión homogénea de varias colonias en tubos eppendorf estériles con 1 mL de tampón SE (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM). Se ajustó la densidad óptica entre 0.9-1.1 (420 nm), correspondiente a una concentración de 1.5×10^9 bacterias/mL.
- * Se transfirieron 100 μ L de la suspensión bacteriana a 1 mL de agarosa de bajo punto de fusión (MP *Boehringer Mannheim*) en agua bidestilada estéril al 1% y se mezcló vigorosamente. Con esta mezcla se llenaron las ranuras de un molde plástico que nos permitió obtener bloques de gel, al solidificar a la temperatura de 4 °C. Los bloques se transfirieron a tubos con 1 mL de solución tamponada ESP (EDTA 0.25M-pH 9, Lauryl Sarcosine (SIGMA), 0.5% proteinasa K (SIGMA)(1mg/mL) e incubados a 56 °C durante toda la noche, el buffer se cambió a las 24 horas. Al final de este paso, los bloques de agarosa- ADN se almacenaron a 4 °C hasta el siguiente procedimiento.
- * Cada bloque de agarosa se cortó en pequeñas barras (1 mm) y cinco barras por cepa se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se lavaron ocho veces durante 15 minutos con 1 mL de solución tamponada TE (Tris 50 mM, EDTA - pH 7.8) a una concentración final de 1 mM. Las pequeñas barras de agarosa - ADN se almacenaron en solución tamponada TE a 4 °C hasta la digestión con la enzima de restricción *XbaI* (Promega).

- * Se descartó la solución TE y las barras de agarosa- ADN se equilibraron con 100 µL de la solución tamponada 1X de la enzima de restricción *XbaI* a la temperatura ambiente, durante 4 horas.
- * Los bloques de agarosa-ADN se incubaron a 37 °C durante 24 horas, en presencia de 20U de enzima *XbaI*, en un volumen final de 100 µL de la solución tamponada de la enzima de restricción. Después de la digestión, se lavaron las barras con la solución TE y se ubicaron en la ranura o pozo del gel de corrida (agarosa para ECP, SIGMA), al 1.2% en la solución tampón 0.5 X TBE (Tris 45 mM, Acido Bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3). Finalmente, la ranura o pozo del gel, se selló con la solución de agarosa al 1% y se efectuó la corrida electroforética.

III. 3. 3. 2 Electroforesis y visualización del ADN

La electroforesis se realizó en un sistema de campo eléctrico (Chef- DRIII Pulsed Field Electrophoresis Systems), aplicando 6 voltios/cm, con el tampón de corrida a 12 °C. El tiempo de las pulsaciones fue de 1-50 segundos durante 26 horas, como control de peso molecular, se utilizaron bloques (*Salmonella Braenderup* H9812, CDC Atlanta). Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (SIGMA) a 10 µg/mL, se lavaron con agua bidestilada estéril.

- * La fotografía se realizó bajo iluminación ultravioleta con un sistema de imagen digital Bio Photonics Gel Print 2000 (BIO/CAN Scientific).
- * Los patrones de ADN por la técnica de ECP se compararon visualmente. La similitud entre los tipos se evaluó por el programa informático MVSP (Kovac Computing Service, 85 Nant-y Felin, Pentaeth, Anglesey LL75 8 UY Wales, Reino Unido) que realizó el análisis estadístico de multivariadas. Aislamientos con idénticas combinaciones de patrones de restricción, se agruparon en un “cluster”. Un solo evento genético es responsable de hasta tres diferencias, en los patrones de restricción obtenidos por el método de ECP y de haber ocurrido aislamientos con tres o

menos bandas de diferencia, se consideraron subtipos de la misma cepa y por consiguiente estrechamente relacionados a los aislamientos de “cluster” prototipo mientras que, las cepas con más de tres bandas de diferencias fueron consideradas como no relacionadas (Tenover *et al.*, 1995).

III. 4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó al aplicar la Dócima o prueba de Chi cuadrado (X^2) de independencia, la Dócima de comparación de las proporciones o prueba F de Fisher, las cuales permitieron establecer la asociación entre las variables analizadas, las diferencias entre las proporciones obtenidas, así como la relación entre ellas. El poder de discriminación para el análisis del perfil plasmídico se determinó por el índice de diversidad de Simpson (ID) (Hunter y Gastón, 1988).

$$D = 1 - \frac{1}{N \cdot (N - 1)} \cdot \sum_{j=1}^S n_j \cdot (n_j - 1) \quad \text{donde:}$$

N Número total de cepas de la muestra.

S Número total de patrones electroforéticos encontrados.

n_j Número de cepas que tienen el tipo j .

A medida que este índice tienda al valor 1, mejor será el poder de discriminación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. 1 Distribución de los serogrupos de *Shigella*.

Entre las 3 350 cepas de *Shigella* analizadas durante el período investigado (13 años), predominó *S. flexneri* con 1 976 aislamientos (59%); al comparar este porcentaje con el resto de los serogrupos identificados, se detectó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), estos serogrupos mostraron los siguientes porcentajes: *S. sonnei* (32%), *S. dysenteriae* (5%) y *S. boydii* (4%) (Fig. 1).

F = 30.45 ($p < 0.001$)

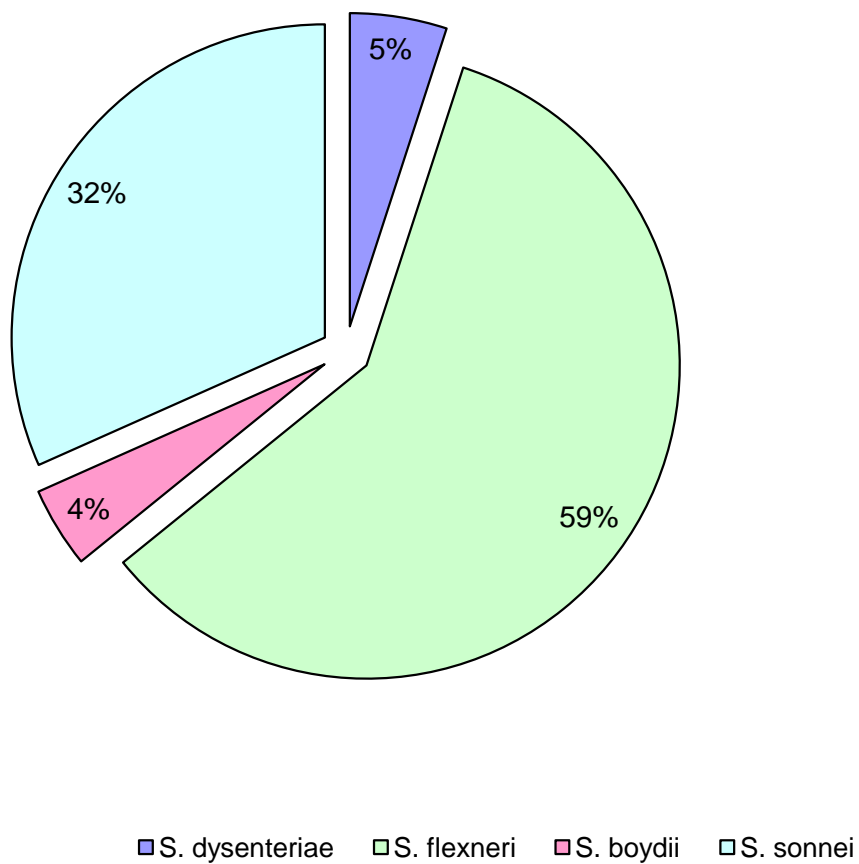


Fig 1. Distribución de los serogrupos de *Shigella* entre las cepas investigadas 1990-2002

Tabla 1. Serogrupos de *Shigella*, según su distribución por diferentes regiones de Cuba. 1990-2002

Serogrupos	Regiones		
	Occidental n=886 (%)	Central n=1548 (%)	Oriental n= 916 (%)
<i>S. dysenteriae</i>	2 (0.2)	162 (10.4)	4 (0.4)
<i>S. flexneri</i>	428 (48.3)	1248 (80.6)	290 (31.6)
<i>S. boydii</i>	0 (0)	14 (0,9)	130 (14.1)
<i>S. sonnei</i>	456 (51.4)	124 (8.01)	492 (53.7)

Chi – cuadrado = 16.24(p< 0.001) F= 153.60 (p< 0.001)

Fuente : LNR/EDA/IPK.

En la tabla 1 se describe la distribución de los serogrupos de *Shigella* según las diferentes regiones de Cuba, se detectó que el serogrupo *S. dysenteriae* (10.4%) circuló más frecuentemente en la región Central, *S. flexneri* (80.6%) se comportó de manera similar. Al comparar la circulación de *S. boydii* y *S. sonnei* se detectó diferencia estadísticamente significativa (p<0.001), el mayor porcentaje de ambos serogrupos se observó en la región Oriental.

El comportamiento de las infecciones por *Shigella* en los países desarrollados o en vías de desarrollo, tiene dos importantes dimensiones: una dimensión clínica, que proviene de la magnitud de la morbimortalidad atribuible a este patógeno y una dimensión biológica condicionada por la distribución de los serogrupos y serotipos en las diferentes áreas geográficas. Los principales serogrupos de *Shigella* que circulan en una comunidad están relacionados con el nivel socioeconómico. El 60% de los aislamientos de *Shigella* en los países en vías de desarrollo corresponden a *S. flexneri* y *S. sonnei* (Bennish, 2001; Organización Panamericana de la Salud, 2001; Torres *et al.*, 2001; Townes *et al.*, 2003).

La distribución de los serogrupos de este trabajo coincide con la reportada por otros investigadores en Cuba; Cabrera (1997) en un estudio de serotipaje de 155 cepas de *Shigella*, detectó *S. flexneri* (62%)

y *S. sonnei* (29%), mientras que *S. dysenteriae* y *S. boydii* fueron aisladas en 4.5% y 3.9%, respectivamente. Valdés (2002) en un estudio de 240 cepas de *Shigella* aisladas de niños con EDA, identificó *S. flexneri* (69%) y *S. sonnei* (29%) en los aislamientos investigados, informando niveles muy inferiores de *S. dysenteriae* y *S. boydii*.

Varios autores han demostrado que los serogrupos prevalecen según el desarrollo económico de una región o país. Al analizar los resultados de este trabajo vemos que se mantiene el mismo patrón de serogrupos que muestran los países en vías de desarrollo. Resultados similares se notifican en Brasil, Chile y Hong Kong. Sin embargo, en este estudio se encontró un mayor porcentaje de *S. sonnei* (Bogaert, 1999; Lima y Lima, 1999; Prado *et al.*, 1999; Houang *et al.*, 2000).

Entre los marcadores fenotípicos, el serotipaje es uno de los métodos clásicos de caracterización. Tiene gran importancia desde el punto de vista epidemiológico porque permite determinar la prevalencia de serovariedades en diferentes zonas geográficas, ya sea para el estudio de brotes o casos esporádicos. Los diferentes serotipos de *Shigella* muestran una gran variación en cuanto al espectro de las manifestaciones clínicas que producen, identificar cuál o cuáles serotipos o serogrupos circulan en una región o país, reviste también importancia médica (Sack *et al.*, 2003; Kalluri *et al.*, 2004; Niyogi, 2005).

Al analizar los hallazgos obtenidos en esta investigación, consideramos que resulta de gran importancia continuar la vigilancia de la circulación de cepas de *Shigella* en Cuba, esto contribuirá a conocer el comportamiento de las EDA y la prevalencia de los serogrupos y serotipos circulantes, con el fin de detectar precozmente el surgimiento de brotes o epidemias, así como la introducción de microorganismo exóticos.

IV. 2 Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana por serogrupos

Los resultados del estudio de la susceptibilidad antimicrobiana demostraron que el 94.7% de las cepas fueron resistentes frente a los antimicrobianos estudiados (3 174/3 350).

Los serogrupos *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. boydii*, independientemente de la frecuencia con que se encontraron en la muestra, fueron los que mostraron mayores porcentajes de resistencia. Sin embargo, *S. dysenteriae* no se comportó de forma similar. Este serogrupo mostró gran sensibilidad (tabla 2).

Al analizar la resistencia por serogrupos de *Shigella* en las diferentes regiones del país se observó que, de acuerdo a su distribución, las cepas de *S. flexneri* a pesar de estar distribuidas uniformemente, mostraron mayores porcentajes de resistencia en la región Oriental, mientras que en *S. sonnei*, se identificaron mayores porcentajes de resistencia en la región Occidental

Tabla 2. Resistencia antimicrobiana en los diferentes serogrupos de *Shigella*, según su distribución por las diferentes regiones de Cuba. (1990-2002)

Serogrupos	Occidental n= 886 (%)	Central n=1548 (%)	Oriental n=916 (%)
	Resistentes	Resistentes	Resistentes
<i>S. dysenteriae</i>	0 (0.0)	10 (0.6)	1 (0.11)
<i>S. flexneri</i>	463 (52.2)	792 (51.1)	528 (57.6)
<i>S. boydii</i>	0 (0.0)	20 (1.29)	6 (0.6)
<i>S. sonnei</i>	418 (47.1)	571 (36.8.)	365 (39.8)

Chi-cuadrado = (p< 0.001); F =153.60 (p< 0.001)

Fuente: LNR/EDA/IPK

La prevalencia de los serogrupos de *Shigella* con mayor resistencia en las diferentes regiones del país pudo estar determinada por factores sociales, ambientales y microbiológicos. Dentro de estos aspectos se incluyen: aumento de las poblaciones de hospederos susceptibles, viajes internacionales, el turismo y el comercio, entre otros (Sosa y Vila, 1999; Clemens *et al.*, 2003).

Los médicos deben estar informados acerca del aumento de la resistencia de *Shigella*, para hacer una selección adecuada de la terapia antimicrobiana, según el mecanismo de resistencia probable del germen correspondiente. La lectura interpretativa de los patrones de susceptibilidad permite el enfoque científico del conflicto de la resistencia y se convierte en una guía fundamental para el manejo de problemas específicos. Debido a la complejidad de los mecanismos de resistencia, es fundamental que el laboratorio pueda identificar los microorganismos hasta el nivel de especie. Además, se debe estudiar la susceptibilidad en un número razonable de antimicrobianos, recomendados en la terapéutica de las infecciones por *Shigella*. (Bonhoeffer *et al.*, 2001; Bhattacharya y Sur, 2003).

IV. 3 Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana en los diferentes años estudiados

En las cepas analizadas durante el quinquenio 1990-1994 (fig. 2) se identificó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en cuanto a los resultados de susceptibilidad antimicrobiana, se detectó que los mayores porcentajes de resistencia se observaron en: ampicilina (90 a 85%), trimetoprim/sulfametoxazol (95 a 66%) y cloranfenicol (75 a 73%). A su vez, estos porcentajes fueron significativamente diferentes ($p < 0.001$) a los obtenidos con el resto de los antimicrobianos.

La tetraciclina le siguió en orden de frecuencia (70 a 60%), aunque los resultados fueron diferentes al resto de los antimicrobianos investigados ($p < 0.01$). Para el ácido nalidíxico se observaron bajos porcentajes de resistencia (2 a 3.5%) y al realizar el análisis estadístico se comprobó que este resultado no mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó con los antimicrobianos a los cuales las cepas fueron totalmente sensibles (ceftriaxona y cefotaxima).

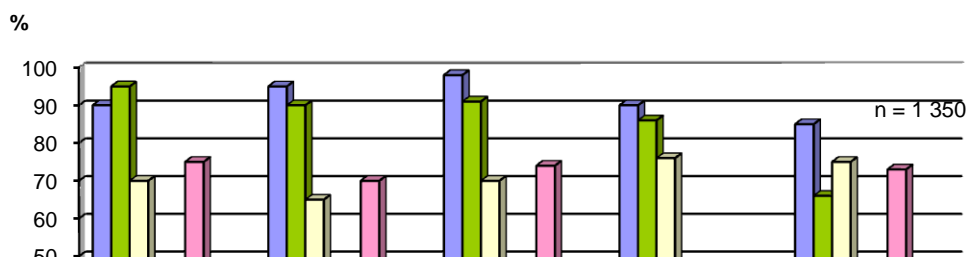


Fig 2. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella* aisladas en Cuba (1990-1994)

Un análisis similar pero a la inversa, se realizó para el comportamiento de la sensibilidad antimicrobiana de las cepas estudiadas. Los antimicrobianos con mayores porcentajes de sensibilidad fueron: ceftriaxona (100%), cefotaxima (100%) y gentamicina (90 a 95%). La sensibilidad de las cepas frente a estos fármacos, no fueron diferentes. Sin embargo, se constató diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), respecto al resto de los porcentajes.

Las cepas investigadas durante el quinquenio 1995-1999 (fig. 3) tuvieron altos niveles de resistencia: trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina. Se observó que en 1998 los porcentajes de resistencia fueron más elevados: ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol (ambos con 90%) y cloranfenicol (85%). Al compararse con los resultados de la resistencia obtenidos frente a los demás antimicrobianos, se constató una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

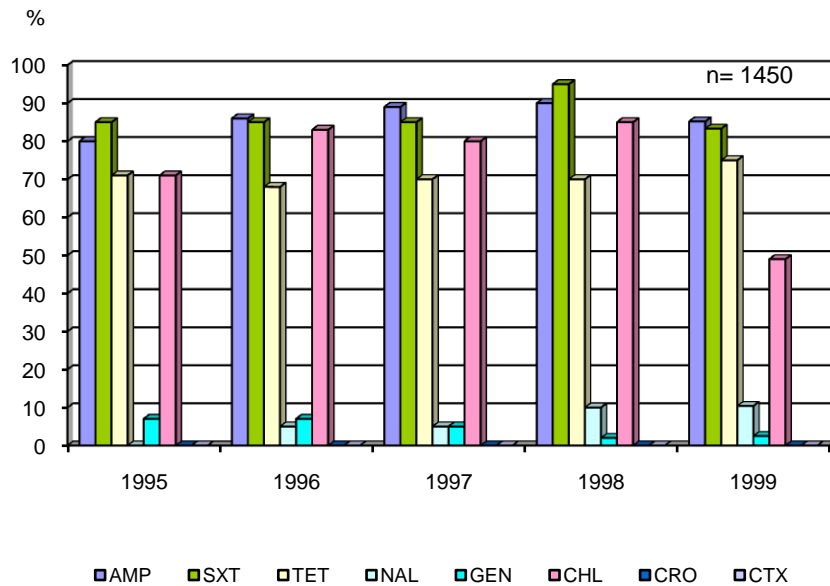


Fig 3. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella* aisladas en Cuba (1995-1999)

Según los datos mostrados en la fig. 3, al analizar la sensibilidad de las cepas investigadas, comprobamos que los antimicrobianos con mayores porcentajes de sensibilidad fueron: ácido nalidíxico, gentamicina, ceftriaxona y cefotaxima. Sin embargo, al comparar los resultados con los otros antimicrobianos se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Los resultados de la fig. 4 muestran que durante estos tres años, los porcentajes más elevados de resistencia fueron a la tetraciclina (85%) y el trimetoprim-sulfametoxazol (80 a 85%). En los años 2001 y 2002 se observó una disminución de la resistencia a la ampicilina (62 a 37%) y al cloranfenicol (48 a 20%). Al comparar los porcentajes de las cepas resistentes con las sensibles se constató una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Al igual que en años anteriores, no se observó resistencia a la ceftriaxona, cefotaxima y se constataron porcentajes muy bajos de cepas resistentes a la gentamicina (5 a 3%). Además, se

comprobó que la resistencia al ácido nalidíxico ha ido incrementándose lentamente, oscilando entre 3 a 6%.

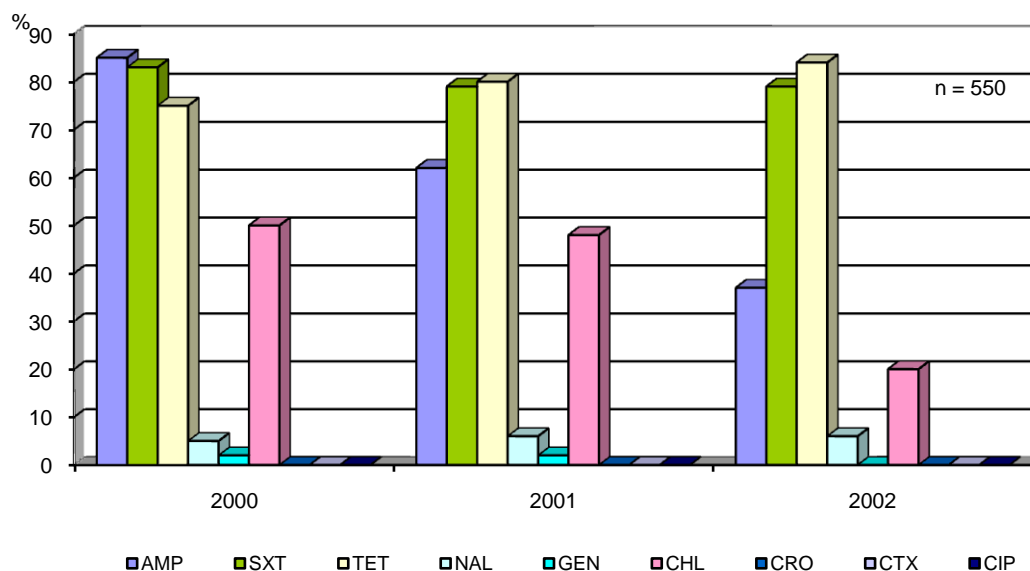


Fig. 4. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella* aisladas en Cuba (2000-2002)

La resistencia de diferentes microorganismos a los antimicrobianos constituye un serio y creciente problema de salud en todo el mundo, especialmente para los países en vías de desarrollo, donde diversos factores pueden contribuir al desarrollo y propagación de esta situación. No siempre es posible disponer de los datos relacionados con el comportamiento de la susceptibilidad a los antimicrobianos, éstos son escasos y no todos los países tienen la posibilidad de monitorearlos (Salvatierra y Benguini, 2000; Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Actualmente, el principal problema asociado a la shigelosis es el tratamiento, ya que esta entidad es una de las infecciones entéricas para la cual el uso de antimicrobianos está recomendado y aceptado, desde que se demostró que la terapia antimicrobiana adecuada, acorta la duración y severidad del cuadro diarreico, reduce el tiempo de transmisibilidad del agente infeccioso (excreción) y disminuye también las complicaciones, sobre todo en los niños y ancianos (Suárez *et al.*, 2000; World Health Organization, 2005^a).

La multirresistencia a los antimicrobianos tiene múltiples implicaciones: ecológicas, económicas, biológicas, culturales y sociales. Su desarrollo repercute en la economía de los países donde circulan estos microorganismos, ya que se emplean altas sumas de dinero para la adquisición de nuevos fármacos, las infecciones causadas por *Shigella* producen serias complicaciones que pueden ocasionar la muerte, sobre todo en los niños menores de cinco años y ancianos. Además de repercutir negativamente en el funcionamiento del Sistema de Salud Pública de los países afectados (Llop, 2001; Livermore y Brown, 2001).

La incidencia de la resistencia adquirida por las bacterias entéricas a los diferentes antimicrobianos se reporta por diferentes países y los patrones de sensibilidad varían según las regiones y el transcurso del tiempo. En un estudio realizado en el Chaim Sheba Medical Center de Israel entre los años 1997 y 2002, la resistencia de *Shigella* fue: ampicilina y tetraciclina (70%), trimetoprim-sulfametoxazol (88%), cloranfenicol (30%), mientras que al ácido nalidíxico fue solo 2.4% (Sack *et al.*, 2003). Resultados similares describen en Turquía con cepas pertenecientes al período comprendido entre 1999-2002. En ese estudio informaron resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol (66%), ampicilina (81%), ampicilina-sulbactam, cloranfenicol y gentamicina (más de 85%) (Akata *et al.*, 2003). En una investigación realizada en la India entre los años 1990-2000, informaron resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol (66%), ampicilina (90%), y más de 70% de resistencia a ampicilina-sulbactam (Rahal *et al.*, 2003). Mientras que, en Somalia los aislamientos de *Shigella* fueron resistentes a la doxiciclina (78%), sulfametoxazol (49%), ampicilina (54%) y no señalaron resistencia a la ciprofloxacina (Cobra y Sack, 2003). Otro estudio de evaluación de resistencia adquirida realizado en Kolkata, India, encontró cepas de *Shigella* resistentes a la ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina (77%, 83% y 71%), respectivamente (Dutta *et al.*, 2002). Mientras que, en Italia cepas de *S. sonnei*, fueron multidrogosresistentes a los antibióticos beta-lactámicos (Natassi *et al.*, 2000). Al revisar la literatura especializada en el tema, se constató que la resistencia de *Shigella* a los diferentes antimicrobianos se

ha incrementado en el tiempo y se ha diseminado a través de todos los continentes (Sack *et al.*, 1999; Ozmist *et al.*, 2005).

Resultados similares señalan que las cepas de *Shigella* han mantenido durante un largo período de tiempo (1990-2000), resistencia elevada a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones producidas por este microorganismo (Natassi *et al.*, 2000).

En el año 1996, la OPS/OMS creó un Programa de Vigilancia Regional de etiología de enfermedades entéricas y resistencia antimicrobiana en los géneros de *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrio cholerae*, para países de Latinoamérica con la participación de los Laboratorios de Referencia Nacionales de ocho países. El Laboratorio Central de Control de Enfermedades Infecciosas de Canadá (LCDC) realiza las pruebas de control de calidad externo, donde cada laboratorio recibe aislamientos de bacterias enteropatógenas a doble ciegas para realizarle la identificación, serotipaje y determinación de la sensibilidad antimicrobiana. Los resultados son evaluados y posteriormente informados con el consentimiento de los países participantes. En 1998, Cuba se incorporó a dicho programa y nuestros resultados han sido evaluados de forma satisfactoria y fueron también publicados para su conocimiento a nivel internacional (Salvatierra y Benguini, 2000). Este proyecto proporciona datos confiables sobre la prevalencia de la multirresistencia en los diferentes países, dados por la estandarización de las técnicas y el control de calidad realizado en los laboratorios. Diferentes hallazgos y recomendaciones fueron realizados como consecuencia de estos estudios, entre ellos se pueden mencionar: Conocimiento de la magnitud del problema en América, promoción de las actividades de vigilancia y la aplicación de medidas preventivas que faciliten el uso racional de los antibióticos en los humanos y en los animales (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Autores latinoamericanos incluidos en el proyecto citado anteriormente, encontraron a través del tiempo un ascenso de la resistencia antimicrobiana en *Shigella spp.*, entre ellos podemos citar: un

estudio realizado en Chile entre 1992 al 2002 que comprendió 1 550 cepas. Ese trabajo encontró cepas resistentes a la ampicilina (7%), cifra que ascendió a 54% en el 2002. Sin embargo, al cloranfenicol y la tetraciclina la resistencia fue mayor (70%), no encontrando aislamientos resistentes al ácido nalidíxico (Pidal *et al.*, 2002). Mientras que, en México, en el período entre 1998-2003 constataron un incremento de la resistencia (50%) a la ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol (Solórzano y Levine, 2003). En Argentina (2004), en un estudio realizado en 132 aislamientos de *Shigella* spp., se encontraron altos niveles de resistencia a: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, y ampicilina-sulbactam (Merino *et al.*, 2004).

En todos los países que proporcionan datos de la susceptibilidad antimicrobiana durante períodos de tiempo sucesivos, la resistencia de *Shigella* muestra una tendencia al ascenso. Aunque, existen diferencias entre los diferentes países. En Jamaica la resistencia de *Shigella* spp. a la ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol fue de 8%. Sin embargo, en Chile (2003) y Brasil (2004) las tasas de resistencia fueron muy elevadas (Homedes y Ugalde, 2005).

En Estados Unidos, en el año 2001 el Sistema de Información de los Laboratorios de Salud Pública (PHLIS), informó los resultados de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana de 379 cepas de *Shigella*; el 91% fueron resistentes a la ampicilina, 89% a la amoxicilina-ácido clavulánico y 29% al trimetoprim-sulfametoxazol (Public Health Laboratory Information System, 2001). Otro estudio realizado en ese mismo país entre 1999 y 2002, por el Sistema Nacional de Monitoreo de la Resistencia Antimicrobiana, señaló en 1 598 aislamientos de *Shigella* spp. los siguientes resultados: resistencia a la ampicilina (78%), trimetoprim- sulfametoxazol (46%), al ácido nalidíxico (1%) y una cepa fue resistente a la ciprofloxacina (Sumathi *et al.*, 2006).

Durante las últimas décadas, *Shigella* ha adquirido resistencia a la mayoría de los antibióticos más utilizados y de bajo costo. Las sulfonamidas, tetraciclina, ampicilina, trimetoprim/ sulfametoxazol,

cloranfenicol y el ácido nalidíxico han ido sucediéndose uno a uno a través de los años como antimicrobianos de elección para el tratamiento de la shigelosis en varias regiones del mundo (Public Health Laboratory Information System, 2001). En la actualidad la OMS recomienda que estos fármacos no deben ser usadas en el tratamiento de pacientes con shigelosis, siendo aprobados otros antimicrobianos como ciprofloxacina: fármaco de elección para todos los pacientes que presenten diarreas con sangre, independientemente de su edad. A pesar que las quinolonas habían sido señaladas como causa de artropatías en animales inmaduros, el riesgo de daños en los niños es mínimo y es altamente preponderante el valor del tratamiento con este medicamento, ante la amenaza de la vida por la enfermedad (World Health Organization, 2005^a).

Además de la ciprofloxacina y otras fluoroquinolonas, fármacos como pivmecilinam (adminocilina/pivoxil) y ceftriaxona son los únicos efectivos para el tratamiento de las infecciones por *Shigella* multirresistentes en todos los grupos de edades. El uso de antimicrobianos alternativos como la azitromicina y el pivmecilinam están limitados por su elevado costo y el desarrollo rápido de resistencia, además deben utilizarse cuando se conoce que las cepas circulantes son resistentes a la ciprofloxacina (World Health Organization, 2005^b).

Resistencia a la ampicilina

Durante la década de los 80, la ampicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol han sido los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones por *Shigella*. Su uso, se basó en estudios controlados que demostraron su eficacia, seguridad en los niños, el bajo costo y la actividad “*in vitro*” frente a la mayoría de las cepas de *Shigella* (Organización Panamericana de la Salud, 2003). El uso indiscriminado de estos antimicrobianos trajo como consecuencia la resistencia múltiple, por lo que el tratamiento se cambió a fármacos alternativos como el ácido nalidíxico y las cefalosporinas (Livermore, 2001; Schumacher *et al.*, 2002; Martín y Gudiol, 2003). Recientemente, la OMS informó

que la ampicilina, el trimetoprim-sulfametoxazol y el cloranfenicol, estaban entre los antimicrobianos que no deben utilizarse en el tratamiento de la shigelosis (World Health Organization, 2005^a).

Al analizar los resultados de este trabajo se observó que, durante el transcurso de estos 13 años, la ampicilina fue uno de los antimicrobianos para el cual *Shigella* mostró elevada resistencia con cifras que oscilaron entre 95% (1992) a 37% (2002); se reconoce que hubo una disminución de la resistencia. Esto puede deberse al empleo limitado de este fármaco para el tratamiento de la shigelosis en los hospitales pediátricos de Cuba (Llop, 2001).

Desde hace algunos años la emergencia de cepas de *Shigella* spp. resistentes a la ampicilina se notifica por diversos autores; comportamiento que alcanzó valores significativos en Chile (1999) entre 495 aislamientos de *S. flexneri*, serogrupo que mostró 87% de resistencia. Mientras que, en *S. sonnei* el porcentaje fue mayor (91%) (Pidal *et al.*, 2002). Sin embargo, en Brasil describieron durante el período comprendido entre el 2000 al 2003, 92% de *S. sonnei* resistente a la ampicilina (Homedes y Ugalde, 2005). Los resultados de esta investigación fueron similares a los notificados en Chile, así como por aquellos descritos en el Caribe y Centroamérica donde más del 81% de los aislamientos fueron resistentes a este antimicrobiano (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Estudios realizados en Irlanda desde 1988 hasta 2001 identificaron 900 cepas de *Shigella* y entre ellas 60% fueron resistentes a la ampicilina (De Lappe *et al.*, 2003). Aysev (2003) estudiaron los cambios en la susceptibilidad antimicrobiana de diferentes especies de *Shigella* entre 1997 y 2003 en Ankara, Turkía y observaron que la resistencia a este fármaco disminuyó del 81% (1997) al 32% (2003). Mientras que, en los trabajos publicados por Ashkenasi *et al.* (1999) en Israel y Chiou *et al.* (2005) en China, y que incluyeron los períodos de 1998-1999 y 2002-2004, respectivamente señalaron 70% de resistencia a este fármaco en *S. sonnei* y *S. flexneri*.

Los β -lactámicos son los compuestos más utilizados para el tratamiento de las infecciones adquiridas tanto en la comunidad como en el hospital. Sin embargo, la resistencia a estos antibióticos se ha incrementado paulatinamente, limitando su eficacia. La resistencia a los β -lactámicos en la familia *Enterobacteriaceae* se debe principalmente a la producción de β -lactamasas codificadas en el cromosoma o en plásmidos (Bush *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2002; Martín y Gudiol, 2003).

El estudio de un brote de *S. flexneri* en China, presentó porcentajes inferiores al nuestro; ya que se informó que en 40 casos confirmados en Taiwán durante el año 2000, 20% fueron resistentes a la ampicilina (Chiou *et al.*, 2001).

En la literatura aparecen descritas más de 300 enzimas β -lactamasas y es importante tratar de inferir la clase de enzima involucrada de acuerdo a los datos que ofrece el antibiograma y la identificación del microorganismos a nivel de especie (Livemore, 1999, Livermore y Brown, 2001, Schumacher *et al.*, 2002; Martín y Gudiol, 2003). En este aspecto las situaciones clínicas más relevantes sitúan: la identificación de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). De la misma manera, las BLEE (derivadas de las enzimas tipo A, *TEM* y *SHV*) tienden a ser inhibidas por clavulanato, sulbactam y tazobactam, comportamiento que ayuda en la caracterización de las mismas (Bush *et al.*, 1999; Lucet *et al.*, 2000; Livermore y Brown, 2001; Bhattacharya y Sur, 2003).

Algunas combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de los mismos muestran su eficacia (piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulanato, cefoperazona-sulbactam), pero dependen de la cantidad de enzima producida y sólo se recomiendan si se tienen datos confiables sobre la susceptibilidad. Los carbapenemes (imipenem y meropenem) presentan la mejor actividad contra estas enzimas y son una alternativa para el tratamiento de las infecciones en estos pacientes (Nordmann, 1999; Quinteros *et al.*, 2003).

Resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol

En nuestro trabajo las cepas de *Shigella* mostraron porcentajes de resistencia elevados al trimetoprim-sulfametoxazol; antimicrobiano que ocupa el segundo lugar de resistencia dentro de los fármacos analizados. En Cuba, este comportamiento ha ido en aumento, notificándose entre 66.5-90% de resistencia (Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, Informe de vigilancia, 2006). En América del Sur, países como: Brasil, Chile, Bolivia, Argentina y Colombia señalan elevados porcentajes de resistencia (45-93%) para este antimicrobiano (Glass *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2001; Homedes y Ugalde, 2005). Aysev (2003) estudió también los cambios de la susceptibilidad antimicrobiana entre diferentes especies de *Shigella* en el período de 1997 al 2003 en Ankara, Turkía, este estudio reveló que la resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol aumentó desde 27% (1997) al 66% (2003).

El trimetoprim-sulfametoxazol presenta una declinación gradual de su importancia clínica debido a su frecuente administración para el tratamiento y profilaxis de diversos procesos infecciosos, sobre todo los del tracto genitourinario y la prevención de infecciones por *Pneumocystis carinii*, patógeno oportunista capaz de causar neumonía en los pacientes portadores del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Esta situación ha ocasionado entre varios patógenos bacterianos un rápido desarrollo y difusión de la resistencia a este fármaco (Houvinen, 2001).

Los resultados de este trabajo muestran similitud con investigaciones realizadas durante la década del 90 en México, Nicaragua, Bolivia y Venezuela, países donde los porcentajes de resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol fueron del 90, 86, 93 y 85%, respectivamente (Salvatierra y Benguini, 2000). Mientras que, en Chile (2000) se notificó 74.7% de cepas de *S. flexneri* resistentes (Organización Panamericana de la Salud, 2003) y en ese mismo período, nuestros resultados

mostraron 83% de resistencia a este fármaco, manteniéndose las cifras elevadas en los años subsiguientes.

En África, la resistencia de *Shigella* al trimetoprim-sulfametoxazol ha sido significativa. (Naigk, 2006). Vila *et al.* (2003) describieron en Kenia, durante el período comprendido entre 1997-2001, la dispersión de un clon de *S. flexneri* aislado en Tanzania, así como su introducción en Europa a través de viajeros internacionales.

Se describen diferentes mecanismos capaces de conferir resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol y entre ellos, la presencia de la enzima dihidrofolato reductasa (*DHFR*) es el más difundido. En estos momentos están definidas más de 20 enzimas, la mayoría se encuentran en genes ubicados en los integrones y son capaces de diseminarse fácilmente de una cepa a otra a través de los transposones y plásmidos (Chang *et al.*, 2002).

El hallazgo que las cepas de *Shigella* aisladas en Cuba mantengan la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol durante varios años pudiera estar relacionado con este mecanismo de transmisión y con el uso indiscriminado de este antimicrobiano en el tratamiento de las infecciones humanas, así como con su aplicación en el campo de la veterinaria (Valdés, 2002).

Resistencia a la tetraciclina

La tetraciclina no figura entre los fármacos de elección contra las infecciones por *Shigella*, sin embargo puede ser un antibacteriano alternativo y ha estado presente en los informes de trabajos de susceptibilidad realizado por varios autores (Prado *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2001; White *et al.*, 2003).

En esta investigación, los mayores porcentajes de resistencia se observaron frente a la tetraciclina y en los estudios de vigilancia realizados en Cuba, se constató que existía una tendencia ascendente de la resistencia a este fármaco (Llop, 2001), conducta que pudiera estar relacionada con su uso

indiscriminado durante más de 20 años para el tratamiento de múltiples patologías infecciosas. México, Brasil y Chile, notifican también elevados porcentajes de cepas de *Shigella* spp. resistentes a la tetraciclina.(Calva *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2000; Ferreiro, 2001).

Después de analizar los resultados obtenidos con la tetraciclina, es válido plantear que en el ámbito internacional, *Shigella* spp. adquiere cada vez más altos niveles de resistencia a este fármaco. Informes provenientes de 10 países de la región de América, correspondientes al año 2003, pero que excluyeron a Estados Unidos y Canadá, indicaron 75% de resistencia a la tetraciclina entre 5 000 aislamientos de *Shigella* (Organización Panamericana de la Salud, 2003). Sin embargo, en Ifkara, Tanzania señalaron cepas de *S. flexneri* (91%) con cifras de resistencia a la tetraciclina más elevadas (CIM >256 µg/ml) (Vila *et al.*, 2003). Porcentajes similares a los de este trabajo se notificaron también en Burundi, Zaire y Djibouti (Cobra y Sack, 2003).

En algunas regiones de Europa se aíslan casos importados, razón por la que la resistencia a la tetraciclina alcanza niveles de consideración en los países desarrollados (De Lappe *et al.*, 2003).

Un alto nivel de resistencia a la tetraciclina también está presente en el sudeste Asiático y fue significativo en Taiwán; el estudio realizado entre 1996-2001 señaló 65% de cepas de *Shigella* resistentes. Una vez que la resistencia antimicrobiana se desarrolla en este microorganismo, puede perpetuarse de forma creciente, si los regímenes de tratamiento persisten inalterables (Chiou *et al.*, 2001).

Resistencia al cloranfenicol

Frente al cloranfenicol las cepas de esta investigación tuvieron porcentajes de resistencia elevados en los dos primeros quinquenios evaluados. Sin embargo, a partir del año 2000, este comportamiento comenzó a disminuir y mostró 20% de cepas resistentes. En Cuba, estudios realizados por Valdés

(2002) señalaron que la resistencia está disminuyendo debido al uso limitado del mismo. Una situación similar ha ocurrido con la ampicilina, (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Países como Nicaragua, Ecuador, Colombia, Brasil y Bolivia muestran resultados similares en cepas de *Shigella* investigadas entre 1999 al 2003 (López, 1999; Zurita *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2001; Townes *et al.*, 2003).

En Chile, la proporción de cepas resistentes al cloranfenicol durante el período entre 1995-2000 alcanzó 79% (1995), descendiendo al 20% (2000). Argentina y El Salvador, señalan también porcentajes elevados de resistencia en esa misma etapa (Salvatierra y Benguini, 2000; Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Cepas de *Shigella* aisladas en Jamaica tuvieron 8% de resistencia en el año 2003, mientras que en otros países del Caribe como: Bahamas, Barbado, Santa Lucía y Trinidad y Tobago las cifras de resistencia al cloranfenicol oscilaron entre 50 a 75% (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Resistencia a la gentamicina

Las cepas de nuestro trabajo se mostraron muy sensibles a este aminoglucósido. Algunos estudios sugieren que sí bien *Shigella* puede ser sensible “*in vitro*” a este fármaco y a otros aminoglucósidos, existe el riesgo de su ineficacia debido a que penetran de manera insuficiente la mucosa intestinal, lugar donde se alojan estas bacterias invasoras (Lee *et al.*, 2005).

En 1 956 aislamientos de *Shigella* spp. estudiadas en Argentina (2001), señalaron 0.6% de resistencia a la gentamicina, mientras que en Brasil, Chile y Colombia, no se detectaron cepas con estas características (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Resistencia a las quinolonas

La introducción del ácido nalidíxico en los años 80 fue seguida por un desarrollo rápido de resistencia cromosómica a este agente. La erradicación del estado de portador de *Shigella* mediante el uso de este fármaco, requiere más tiempo que la ampicilina. *Shigella* debe sufrir dos mutaciones en la enzima *GyrA* y adicionalmente una sola mutación en uno de los aminoácidos de la proteína *ParC*, para desarrollar resistencia a las quinolonas fluoradas (ciprofloxacina); mientras que, basta una sola sustitución de un aminoácido en la subunidad *GyrA* de la girasas de ADN, para que surjan cepas resistentes a las quinolonas no fluoradas (ácido nalidíxico). Por lo tanto, limitar el uso del ácido nalidíxico, ayudaría a preservar la actividad de las fluoroquinolonas y se podría mantener un potencial agente terapéutico para el tratamiento de la shigelosis multirresistente (Oliphant *et al.*, 2002; Leibovitz, 2006).

En este trabajo observamos baja resistencia y pocas cepas con sensibilidad intermedia al ácido nalidíxico, resultados que se correspondieron con los planteamientos de Bogaerts (1999) en Rwanda. Estos investigadores señalaron que posterior a la introducción de este fármaco para el tratamiento alternativo aparecieron cepas resistentes, aspecto que debemos resaltar por el papel que juega el ácido nalidíxico en el tratamiento de la shigelosis en Cuba. *S. flexneri* mantiene su sensibilidad al ácido nalidíxico, mientras que *S. sonnei* aportó casi la totalidad de las cepas resistentes.

Las fluoroquinolonas se introdujeron en la mitad de los años 80 para el tratamiento de la shigelosis; un estudio de vigilancia nacional realizado en el año 2003 por el Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades Infecciosas (CDC) de Atlanta, mostró que 2% de los aislamientos de *Shigella* spp. fueron resistentes al ácido nalidíxico. Mientras que, todas las cepas resultaron sensibles a la ciprofloxacina (Public Health Laboratory Information System, 2001). Esta investigación reveló valores similares.

Por su mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de ADN), parecía imposible que *Shigella* mostrara resistencia al ácido nalidíxico codificada por plásmidos. Rossi *et al.* (2001) se refiere al aislamiento de cepas de *E. coli* resistentes a este fármaco debido a este mecanismo, planteamiento descrito anteriormente en cepas de *S. dysenteriae* 1. A pesar de estas comunicaciones, la resistencia por plásmidos es rara y se han publicado muchos estudios sobre la resistencia cromosómica (mutaciones de topoisomerasa), incluso contra las quinolonas modernas, situación preocupante pues incluye cepas de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Campylobacter* (Soldati y Piffaretti, 2002; Taneja *et al.*, 2005). Además, estos autores señalaron que el mecanismo de resistencia de las cepas estuvo determinado por mutaciones en los genes *gjrA*, *parC* y *parE*.

Actualmente, la ciprofloxacina constituye un fármaco eficaz para el tratamiento de la shigelosis en los adultos, este estudio confirmó que todas las cepas fueron sensibles frente a este antimicrobiano. Se señala que las cepas con resistencia o sensibilidad intermedia al ácido nalidíxico, presentan para la ciprofloxacina, halos de inhibición mucho más pequeños que los que se observan en las cepas sensibles y se recomienda informar estos aislamientos como cepas de sensibilidad dudosa a la ciprofloxacina, ya que independientemente de la sensibilidad “*in vitro*”, se han confirmado fallos terapéuticos en estos casos (Sumathi *et al.*, 2006). La diseminación de la resistencia al ácido nalidíxico puede reducir la eficacia de la ciprofloxacina debido a su mecanismo de resistencia, en el cual los cambios cromosómicos se generan por mutaciones en los genes de enzimas girasas y topoisomerasas que se van transmitiendo progresivamente a medida que se forman nuevas generaciones (Leibovitz, 2006).

Desde el año 2000, fecha en que se incorporó la ciprofloxacina en los estudios de vigilancia de la resistencia de *Shigella* spp. en Cuba, hasta la actualidad no se han detectado cepas resistentes (Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, Informe de vigilancia,

2006). Este resultado es muy importante, ya que las fluoroquinolonas se han situado en la avanzada del tratamiento antimicrobiano de las enfermedades infecciosas y están consideradas actualmente dentro del grupo de antimicrobianos de elección para enfrentar la sepsis por gérmenes virulentos y resistentes como los del género *Shigella* (Sumathi *et al.*,2006).

Hasta el año 2005, países como Estados Unidos, Argentina, Chile, Ecuador, Costa Rica, Colombia, México, Uruguay y Venezuela, no habían identificado cepas resistentes a las quinolonas (Homedes y Ugalde, 2005). Sin embargo, la resistencia al ácido nalidíxico es común en el sur de Asia y frecuente en el este y el sureste de África (World Health Organization, 2005^b).

Resistencia a las cefalosporinas

En nuestro trabajo las cepas de *Shigella* no mostraron resistencia a las dos cefalosporinas de 3^a generación estudiadas (ceftriaxona y cefotaxima). Actualmente, resulta alarmante los recientes aislamientos de *S. flexneri* productoras de (BLEE). El mejor indicador de la presencia de BLEE, es el aislamiento de organismos resistentes a ceftazidima y cefotaxima (Sanders y Sanders, 1999; Quinteros *et al.*,2003). Cefalosporinas de 1^a y 2^{da} generación como: cefazolin, cefaclor, cefoxitina y cefalotina, no deben ser usadas en el tratamiento de la shigelosis debido a la pobre penetración de las mismas en la mucosa intestinal (Lucet *et al.*, 2000; Livermore y Brown, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2005).

En las cepas investigadas en este trabajo no se detectó la presencia de BLEE, resultados similares obtuvieron Rossi *et al.* (1999), en Córdoba y Merino *et al.*, (2004), en el nordeste de Argentina.

El no detectar resistencia significativa a las cefalosporinas, pudo estar relacionado con el hecho de que estos antimicrobianos son de nueva generación, y no se han empleado indiscriminadamente por la población. Dentro de las cefalosporinas, la ceftriaxona, constituye un antibacteriano eficaz,

actualmente, su empleo está muy difundido en el tratamiento de los pacientes con shigelosis multirresistente, complicadas en edades pediátricas (Bush *et al.*, 1999; Radice *et al.*, 2005; World Health Organization, 2005^b).

IV. 4 Análisis de los resultados de susceptibilidad intermedia

El 9.5% de las cepas estudiadas por Kirby Bauer tuvieron susceptibilidad intermedia frente a la ampicilina, pero al investigar estos aislamientos con el método de la CIM se constató que el 8% fue sensible (CIM entre 4-8 µg/mL). Mientras que, al ácido nalidíxico la susceptibilidad intermedia se identificó en 2.5% de las cepas analizadas y al comparar los resultados obtenidos entre ambos métodos, todas fueron sensibles (CIM 8µg/mL).

Los resultados obtenidos demostraron que, aunque el método de difusión por disco es lo suficientemente sensible y sencillo para realizar los estudios de vigilancia antimicrobiana en cepas de *Enterobacterias*; se debe identificar la CIM.

- Si existen perfiles inusuales de resistencia (resistencia a cefalosporinas de 3^a y 4^{ta}. generación y β-fluoroquinolonas), para confirmar el resultado.
- Si se necesita realizar una vigilancia cuantitativa de la resistencia a los antimicrobianos.
- Si se introducen nuevos antimicrobianos en el tratamiento.
- Si se desea orientar al médico sobre qué concentración del antibiótico se necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el desarrollo de los microorganismos infectantes (Solórzano y Levine, 2003).

IV. 5 Análisis de los patrones de multirresistencia de las cepas de *Shigella*

La multirresistencia se observó en 91.7% (3 073/3 350). Las cepas mostraron la resistencia combinada en seis patrones, éstos se comportaron de manera diferente, según el período de estudio fue extendiéndose. Para facilitar el análisis y comprensión de los resultados obtenidos durante los 13 años que integró este trabajo, las cepas se dividieron en tres intervalos de tiempo: en el primer período (1990-1994) el patrón con mayor representatividad fue: AMP, TET, SXT, CHL (42.4%), resultados similares (39.3%) se constataron en el período (1995-1999). Sin embargo, en el período correspondiente a los años 2000-2002, el patrón con mayor porcentaje (36.4%) fue: TET, SXT, AMP. En los tres períodos la resistencia de *Shigella* frente al ácido nalidíxico resultó muy baja (tabla 3).

Tabla 3. Patrones de multirresistencia de 3 350 cepas de *Shigella*. Cuba 1990-2002.

Patrones de Resistencia	1990-1994 n = 1350 (%)	1995-1999 n = 1450 (%)	2000-2002 n = 550 (%)	Total n = 3 350 (%)
AMP, TET, SXT, CHL (I)	573 (42.4)	571 (39.3)	73 (13.2)	1 271 (36.3)

TET, SXT, AMP (II)	280 (20.7)	432 (29.7)	200 (36.4)	912 (27.2)
CHL, TET, SXT (III)	152 (11.2)	164 (11.3)	23 (4.1)	339 (10.1)
AMP, TET, CHL (IV)	71 (9.5)	216 (14.9)	17 (3.0)	304 (9.0)
TET, NAL, SXT (V)	110 (8.1)	38 (2.6)	17(3.0)	165 (4.9)
AMP, NAL, TET, SXT, CHL (VI)	97 (7.1)	25 (1.7)	14(2.6)	136 (4.0)
Total	1 283 (95.0)	1 446 (99.7)	344 (62.5)	3 073 (91.7)

Leyenda: TET (Tetraciclina); SXT (Trimetoprim-sulfametoxazol); AMP (Ampicilina); CHL (Cloranfenicol); NAL (Acido nalidixico)

Fuente: LNR/EDA/IPK

El problema de la emergencia de la multirresistencia bacteriana se reconoce en todo el mundo, su magnitud y extensión involucra a países desarrollados y en vías de desarrollo (Llop, 2001). El primer factor de la diseminación de este fenómeno en la comunidad es el uso indiscriminado de los antimicrobianos, algo que se refirió anteriormente.

Para poder realizar un mejor control de la multirresistencia es esencial el conocimiento de cómo los patrones de resistencia bacteriana evolucionan a través del tiempo en una región o país (Leano *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2000; Talukder *et al.*, 2006).

En el estudio de vigilancia de la resistencia que comprendió nuestro trabajo (1990- 2002) se observó que la misma se mantuvo en los antimicrobianos que fueron de elección en el tratamiento de la shigelosis (ampicilina, trimetoprim.-sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina). Durante los primeros años de esta investigación, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) al comparar los patrones de multirresistencia. El predominio de los patrones cambió, principalmente en el último período (tabla 3).

La multirresistencia de *Shigella* spp. ha sido reportada por varios países, un estudio realizado por Cobra y Sack (2003) analizó esta situación en varias partes del mundo entre 1999-2002. En este mismo período, Aysev (2003) en Turquía, notificó la multirresistencia de *S. dysenteriae* 1 a los antimicrobianos que se utilizaban como tratamiento de elección de la shigelosis.

En Cuba, Valdés (2002), investigando 240 cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei* encontró que el patrón de resistencia SU, SXT, S, TET, representó el 95% de las cepas estudiadas. Además, no identificó resistencia al ácido nalidíxico, ni a la ampicilina. Aunque, los resultados de nuestro trabajo coinciden con los porcentajes elevados de multirresistencia descritos por Valdés, los patrones fueron diferentes.

En estudios recientes (2003-2006) realizados en el LNR/EDA/IPK, se demostró que los patrones de multirresistencia se mantienen similares a los detectados en el 2002 en esta investigación, destacándose que la resistencia al ácido nalidíxico sigue baja (6.5%) (Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, Informe de vigilancia, 2006).

La multirresistencia (49%) de *S. flexneri* y *S. sonnei* para la ampicilina, cotrimoxazol y cloranfenicol, descrita en Argentina durante el 2003, resultó inferior a la nuestra. Sin embargo, los resultados de esta investigación resultaron similares a los descritos en Brasil, Colombia, México, Chile y Bolivia (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

En 1969, ocurrió una epidemia de *S. dysenteriae* 1 multirresistente en México y Guatemala, que se extendió rápidamente al resto de Centroamérica y causó una alta tasa de mortalidad en los niños menores de cinco años. Posteriormente, se propagó a África y la India, regiones donde esta enfermedad es endémica (Prado *et al.*, 1999).

En cuanto al incremento de la resistencia en el tiempo, algunos trabajos demuestran resultados similares al nuestro. Estudios realizados en Europa, África y Norte América señalan porcentajes altos de cepas de *Shigella* resistente a varios antimicrobianos (Glass *et al.*, 1999; Siu *et al.*, 2000; Suárez *et al.*, 2000; Fluit y Schmitz, 2001; Sack *et al.*, 2003).

Jensen *et al.* (2004) detectaron como patrones de resistencia más frecuentes los integrados por: AMP, TET, CHL, SXT (56%), seguido de TET, SXT (34.6%) en 98 aislamientos de *Shigella* de niños con EDA, coincidiendo así con los patrones detectados en esta investigación.

Por otra parte, en un estudio multicéntrico de Mérida, Venezuela y desarrollado por Flores *et al.* (2000) con cepas de *Shigella* aisladas de pacientes con EDA, demostraron que el patrón de resistencia más frecuente (75%) fue: SXT, S, AMP, patrón que no se observó en nuestro estudio.

La variación de la resistencia frente a los diferentes antimicrobianos ha sido estudiada con relación al consumo de los mismos, en una región determinada y se ha visto que existe una relación directamente proporcional (Ferguson, 2004)

Se sugiere que la reducción de la resistencia puede lograrse con una adecuada educación a los pacientes sobre el consumo de los antibióticos y la importancia de no adquirirlos de forma indiscriminada, sobre todo en aquellos países donde éstos pueden obtenerse sin prescripción facultativa (Homedes y Ugalde, 2005).

Otro aspecto que indiscutiblemente puede ayudar a disminuir la resistencia, es conocer y divulgar los patrones de susceptibilidad de las cepas circulantes y realizar un análisis de cómo se puede disminuir el consumo de determinados antimicrobianos, los cuales deben ser siempre administrados por prescripción médica (Ferguson, 2004).

Por el grave problema que representa la multirresistencia en *Shigella*, antimicrobianos como la ciprofloxacina, cefalosporinas de 3ª de generación, azitromicina, y pivmecilinam deben ser empleados con restricción, solo se indicarán en los casos graves o con complicaciones (World Health Organization, 2005^a).

IV. 6 Identificación de marcadores fenotípicos y genotípicos en aislamientos de *Shigella*.

Año 2002

IV.6.1 Patrones de multirresistencia de los serogrupos de *Shigella* en el año 2002

Los fenotipos de resistencia se definieron como: fenotipo I (AMP, TET, SXT, CHL), fenotipo II (TET, SXT, AMP), fenotipo III (CHL, TET, SXT), fenotipo IV (AMP, TET, CHL), fenotipo V (TET, NAL, SXT) y fenotipo VI (AMP, NAL, TET, SXT, CHL (tabla 3).

IV. 6.2 Análisis del perfil plasmídico de *S. flexneri*

Entre las cepas de *S. flexneri* se obtuvieron seis perfiles plasmídicos diferentes (fig. 5); éstos se denominaron como: B-I, B-II, B-III, B-IV, B-V y B-VI. Los perfiles contenían entre dos y siete plásmidos con tallas en un rango de 2 a 45 Kb. Existió una alta variabilidad del perfil plasmídico (1-3 plásmidos) en el rango de 2 a 16 Kb. Los perfiles plasmídicos en su mayoría estuvieron presentes en más de una cepa, excepto en el perfil B-III, que tuvo una sola cepa. El índice de diversidad de Simpson (ID) para esta técnica fue de 0.85.

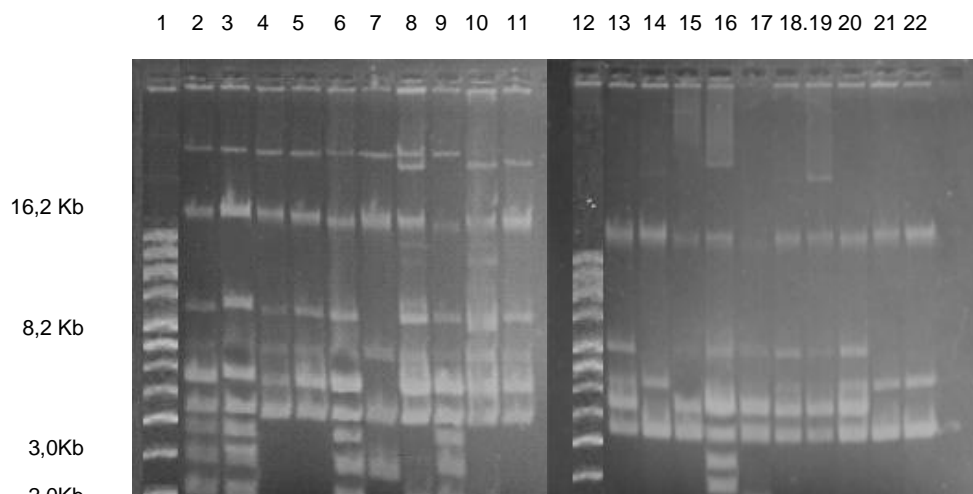


Fig 5. Perfiles plasmídicos de cepas de *S. flexneri*; Líneas 1 y 12: Marcador de peso molecular (Molecular weight supercoiled DNA marker); Líneas 2, 3, 6, 9 y 16: Perfil plasmídico B-I; Líneas 4, 5, 10, 11, 13 y 20: Perfil plasmídico B-II; Línea 7: Perfil plasmídico B-III; Líneas 8 y 17: Perfil plasmídico B-IV, Líneas 13, 21 y 22: Perfil plasmídico B-V. Líneas 15, 18 y 19: Perfil plasmídico B-VI.

IV.6.3 Análisis de los patrones de electroforesis en campo pulsado de *S. flexneri*

Los resultados de la técnica de ECP entre los aislamientos de *S. flexneri* se agruparon en ocho patrones diferentes, denominándose de PI a PVIII (tabla 4). Al utilizar la enzima *XbaI* se observaron entre 18 y 22 fragmentos de macrorrestricción (fig.8, 9), la diferencia entre las cepas fue de 3 a 7 bandas de ADN; el ID fue de 0.85. Se identificaron 6 “clusters” principales como se muestra en el dendograma (fig. 14); la mayoría de las cepas se agruparon en los “clusters” I: 8 cepas (26.6%) y V: 6 cepas (20%). Se evidenció la heterogeneidad genética de este serogrupo.

IV.6.4 Análisis del perfil plasmídico de *S. sonnei*

En *S. sonnei* se identificaron ocho perfiles plasmídicos diferentes (fig. 6) y éstos se denominaron como: D-I, D-II, D-III, D-IV, D-V, D-VI, D-VII y D-VIII; cada uno albergó entre dos y ocho plásmidos con tallas en un rango de 2 a 45 Kb. Se encontró una alta variabilidad del perfil plasmídico (de 1 a 3 plásmidos) en el rango de 2 a 16 Kb. Los perfiles plasmídicos estuvieron presentes en más de una cepa, exceptuando a los siguientes: D-III, VI, VII y VIII (representados por una sola cepa). El ID para esta técnica fue de 0.86.

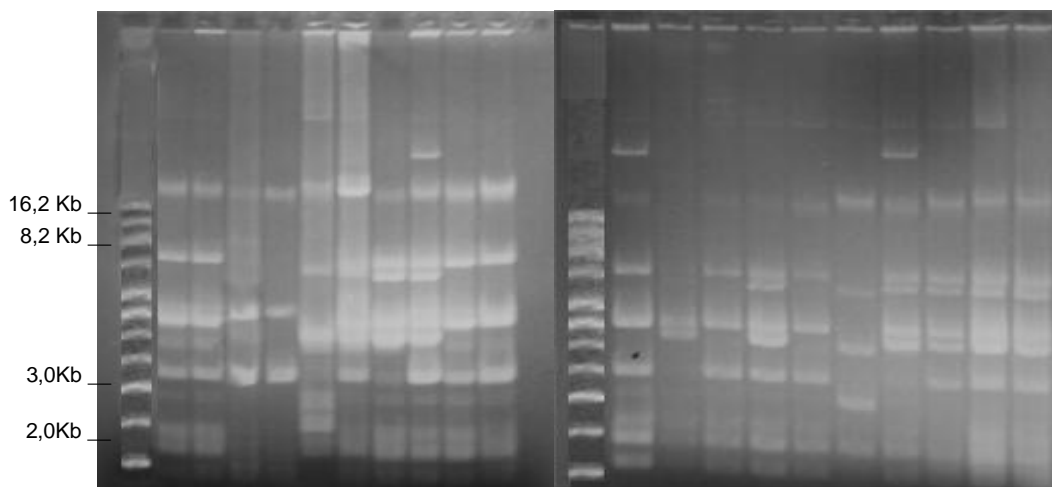


Fig. 6. Perfiles plasmídicos de cepas de *S. sonnei*. Líneas 1 y 12: Marcador de peso molecular (Molecular weight supercoiled DNA marker); Líneas 2, 3, 10, 11, 13, 15 y 17: Perfil plasmídico D-I; Líneas 4 y 5: Perfil plasmídico D-II; Línea 6: Perfil plasmídico D-III; Líneas 7, 9, 20, 21 y 22: Perfil plasmídico D-IV. Líneas 8 y 19: Perfil plasmídico D-V; Línea 14: Perfil plasmídico D-VI; Línea 16: Perfil plasmídico D-VII y Línea 18: Perfil plasmídico D-VIII

Al realizar el análisis de los perfiles plasmídicos (tabla 5), observamos que en D-I, D-IV y D-V, las cepas correspondieron a las regiones Occidental y Oriental. No sucedió así con los perfiles D-II y D-III, que pertenecieron a cepas de la región Occidental, mientras que los perfiles D-VI, D-VII y D-VIII, se identificaron en aislamientos de la región Oriental. Al relacionar los patrones de resistencia se encontró más de uno en cada perfil plasmídico. Predominó el fenotipo de resistencia II (13 cepas), identificándose en los aislamientos de las regiones Occidental y Oriental.

IV. 6.5 Análisis de los patrones de electroforesis en campo pulsado de *S. sonnei*

Los resultados de la técnica de ECP entre las cepas de *S. sonnei* mostraron cinco patrones diferentes, éstos se agruparon en: dos que se clasificaron como subtipos del perfil I, al diferir en una o dos bandas del patrón principal (fig. 10), evidenciándose tres “clusters” principales (PI, PIa, PIb). Hubo

una elevada homología entre las cepas, la mayoría tuvieron una distancia genética menor o igual a 20% (Coeficiente de Dice 0.8). Ello sugirió que las cepas estaban genéticamente relacionadas y su estructura clonal se demostró al analizar el dendograma (fig. 12).

IV. 6.6 Análisis del perfil plasmídico de *S. boydii*

El 100% de las cepas investigadas de *S. boydii* presentaron plásmidos. Se detectaron cuatro perfiles plasmídicos diferentes, éstos se denominaron como C-I, C-II, C-III y C-IV; cada uno albergó entre cuatro y cinco plásmidos con tallas en un rango de 2 a 45 Kb. Se identificó variabilidad del perfil plasmídico en el rango de 2 a 6 Kb. El ID para esta técnica fue de 0.79. Los patrones representativos se muestran en la fig. 7.

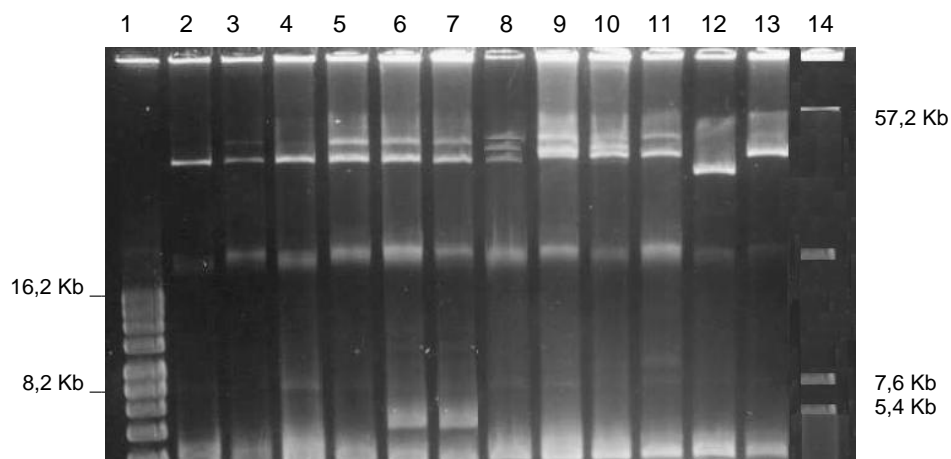


Fig. 7: Perfiles plasmídicos de cepas de *S. boydii*. Línea 1: Marcador de peso molecular (Molecular weight supercoiled DNA marker); Líneas 2, 3, 4, 5: Perfil plasmídico C-I; Líneas 6 y 7: Perfil plasmídico C-II; Líneas 8, 9, 10 y 12: Perfil plasmídico C-III; Líneas 11 y 13: Perfil plasmídico IV; Línea 14: Cepa control *E. coli* V157 con plásmidos con rango de PM entre 2.1 a 57.2 kb.

En la tabla 6 se muestra la relación de los perfiles plasmídicos encontrados en las cepas multirresistentes de *S. boydii* y su relación con los patrones de resistencia. Todas las cepas correspondieron a la región Central. Se encontraron 4 perfiles plasmídicos, éstos estuvieron representados por 3 cepas en C-I y C-III y 2 aislamientos en los perfiles C- II y C-IV. Al relacionar los patrones de resistencia se detectó que las 10 cepas analizadas presentaron 6 patrones distribuidos en los 4 perfiles y éstos no fueron excluyentes. El perfil C-I, predominó en la muestra y presentó 4 patrones de resistencia diferentes que no pudieron ser agrupados, independientemente de que correspondían a la misma región y al mismo serogrupo.

IV. 6.7 Análisis de los patrones de electroforesis en campo pulsado de *S. boydii*

Los resultados de la técnica de ECP, mostraron diferentes patrones entre los aislamientos de *S. boydii*, estos se agruparon en tres “clusters” diferentes, observándose un cluster principal (PI) y dos que se clasificaron como subtipos del perfil I (por diferir en una o dos bandas), denominándose PIa y PIb. Al utilizar la enzima *Xba*I se observaron entre 18 y 22 fragmentos de macrorrestricción (fig. 11); se evidenció alta homología entre las bandas de ADN de este serogrupo y ello sugirió que estaban genéticamente relacionadas como puede observarse en el dendograma correspondiente (fig. 13).

IV. 6.8 Interpretación de los resultados de los perfiles plasmídicos y los perfiles de electroforesis en campo pulsado de las cepas en estudio

La determinación del perfil plasmídico ha sido el método más utilizado para la investigación de cepas aisladas de casos esporádicos y brotes producidos por *Shigella* spp., Por otra parte es un método económico y rápido de realizar. Debido a que muchos plásmidos son inestables y pueden ganarse o perderse fácilmente, el empleo de esta técnica tiene limitaciones. *Shigella* spp. usualmente alberga una heterogénea población de plásmidos (entre 2 a 10) (Lee *et al.*, 2005; Taneja *et al.*, 2005).

En este trabajo, los perfiles plasmídicos obtenidos de los serogrupos de *Shigella*, fueron excluyentes. Resultados similares obtuvieron Flores *et al.* (2000), cuando caracterizaron y tipificaron 78 cepas de *S. flexneri* y 4 de *S. sonnei* aisladas en Mérida, Venezuela, notificando 8 y 2 perfiles plasmídicos, respectivamente. Además, sobre la base de la susceptibilidad antimicrobiana definieron 6 fenotipos de resistencia; los perfiles plasmídicos fueron excluyentes y no hubo correspondencia entre éstos y los fenotipos de resistencia encontrados.

En *S. flexneri*, detectamos 6 perfiles plasmídicos diferentes junto a una gran variabilidad de los patrones de resistencia asociados. Estos resultados son semejantes a los que obtuvo Valdés (2002). Esta investigadora estudió 20 cepas de *S. flexneri*, procedentes de 9 provincias del país, identificando 11 perfiles plasmídicos diferentes que no guardaron relación con los patrones de resistencia asociados. Resultados similares notificaron en China, Shieng *et al.* (2001) al analizar el perfil plasmídico de 26 cepas multirresistentes, demostrando gran variedad de patrones de resistencia en esa región. Otros estudios llevados a cabo por Na-Ubol *et al.* (2006) en Tailandia y Talukder *et al.* (2003) en el sur de Asia; coincidieron con los resultados de este trabajo, ellos señalaron para las cepas de *S. flexneri* una gran variedad de patrones de resistencia, que no se asociaron con la mayoría de los perfiles plasmídicos detectados.

Diferentes métodos fenotípicos como el biotipaje, fagotipaje y antibiotipaje, se utilizaron anteriormente. Ninguno resultó particularmente exitoso, debido a que estudiaban propiedades fenotípicas (Tacket y Cohen, 2000). Las nuevas técnicas genéticas de tipaje emergieron recientemente y algunas han sido empleadas para tipar las cepas de *S. sonnei* (perfil plasmídico, ribotipaje, RAPD-PCR) entre otras (Maslow *et al.*, 2001; Surdeanu *et al.*, 2002).

Estudios realizados en especies de *Shigella* aisladas en el sur de Taiwán señalaron que esta técnica tuvo una alta especificidad en cepas con diferentes perfiles plasmídicos, donde entre ocho aislamientos esporádicos de *S. sonnei*, seis mostraron distintos perfiles plasmídicos (Lee *et al.*, 2000). Mientras que, Litwin *et al.* (2000) en 90 aislamientos de *S. sonnei* identificaron 11 perfiles plasmídicos distintos y los patrones contenían de 4-10 plásmidos cada uno.

Los resultados descritos en este trabajo se corresponden con lo señalado en un estudio de perfil plasmídico de *S. sonnei* en Arizona (2001), donde al analizar 168 casos de shigelosis, 70 cepas se ubicaron en 7 perfiles diferentes (Litwin *et al.*, 2002). Ninguno de los estudios mencionados anteriormente mostró asociación con los perfiles de resistencia. Prado *et al.*(2000), determinaron el perfil plasmídico de cepas aisladas en México y Houston, Texas, encontrando que la mayoría tuvieron un idéntico o casi idéntico perfil plasmídico. Estos autores manifestaron que *S. sonnei*, con igual perfil plasmídico puede ser identificada en diferentes regiones geográficas. Los resultados de nuestro trabajo fueron similares a los obtenidos por estos autores, algunos de los perfiles detectados para *S. sonnei*, estuvieron distribuidos en las regiones Occidental y Oriental. Además, se demostró que *Shigella* tiene una heterogénea población plasmídica y estos hallazgos pueden utilizarse como marcadores epidemiológicos moleculares.



Fig 8. Electroforesis en campo pulsado de cepas de *Shigella flexneri*.

PM: Marcador de peso molecular (*Salmonella Braenderup*); I: cepas del patrón I; V: cepas agrupadas en el patrón V; III: cepas agrupadas en el patrón III; VIII: cepas agrupadas en el patrón VIII, IV: cepas agrupadas en el patrón IV; VI: agrupadas en el patrón VI.

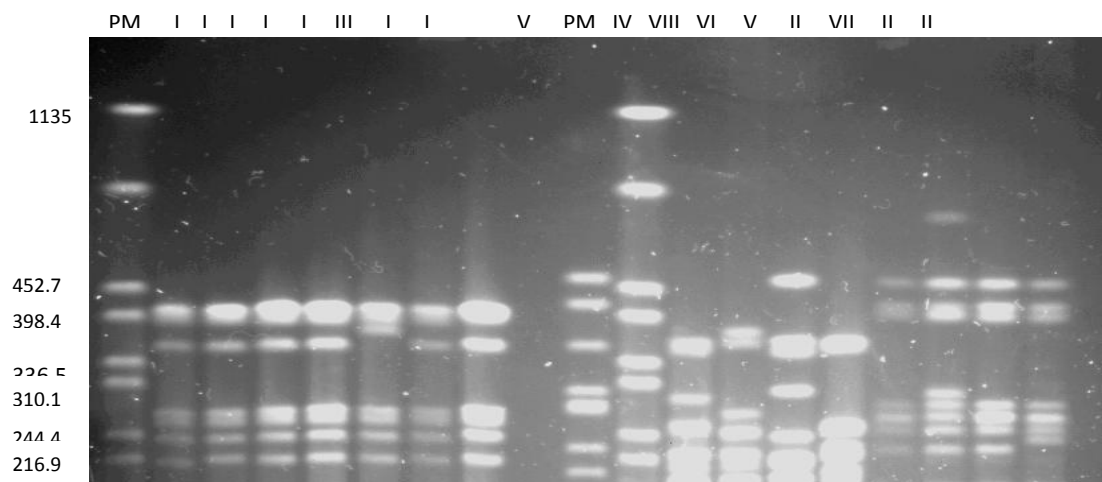
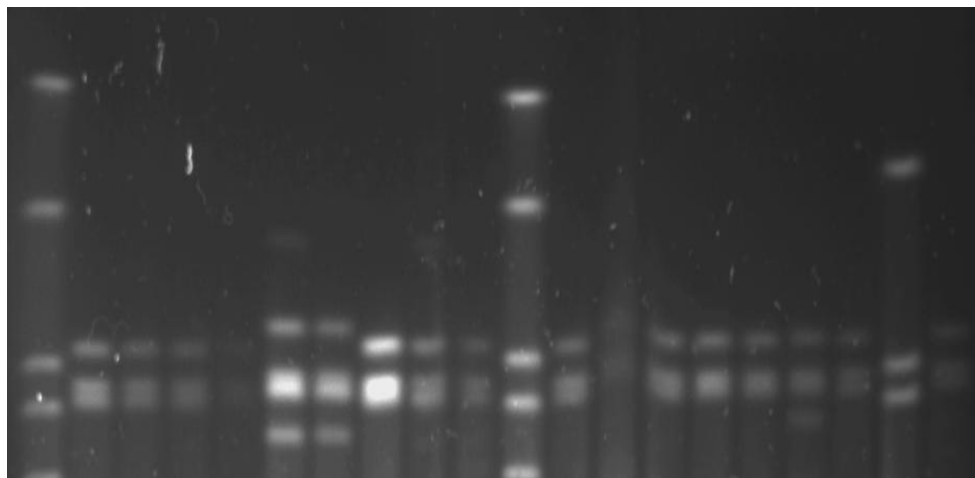


Fig 9. Patrones de Electroforesis en campo pulsado de cepas de *Shigella flexneri*. PM: Marcador de peso molecular. (*Salmonella Braenderup*). I: cepas agrupadas en el patrón I; II: cepas agrupadas en el patrón II; III: cepas agrupadas en el patrón III; IV cepas agrupadas en el patrón IV; V: cepas agrupadas en el patrón V; VI: cepa agrupadas en el patrón VI; VII: cepas agrupadas en el patrón VII; VIII: cepa agrupada en el patrón VIII.

PM Ia Ia Ia II II Ib Ib Ib PM Ia I I I I Ia I III Ia

1135



336.5

310.1

244.4
216.9

173.4

167.1

138.9

104.5

78.2

76.8

54.7

Fig 10. Patrones de Electroforesis en campo pulsado de cepas de *Shigella sonnei*. PM: Marcador de peso molecular (*Salmonella Braenderup* H9812). I: cepas agrupadas en el patrón I; Ia : cepas agrupadas en el patrón subtipo Ia; Ib: cepas agrupadas en el patrón Ib; II: cepas agrupadas en el patrón II, III: cepa del patrón III.

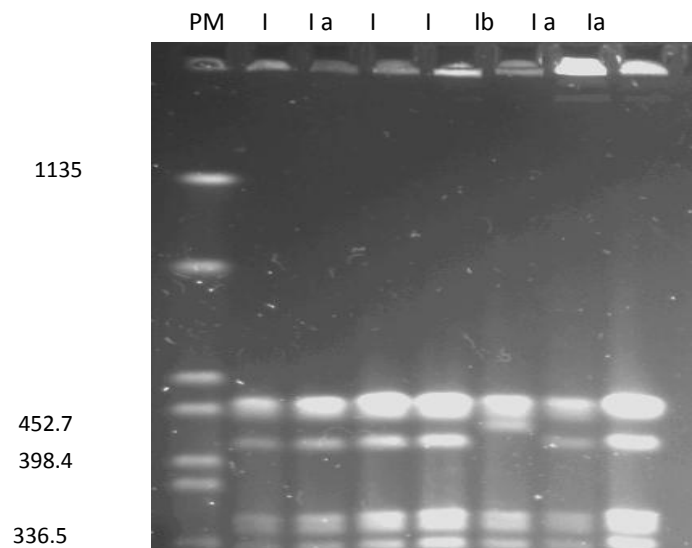
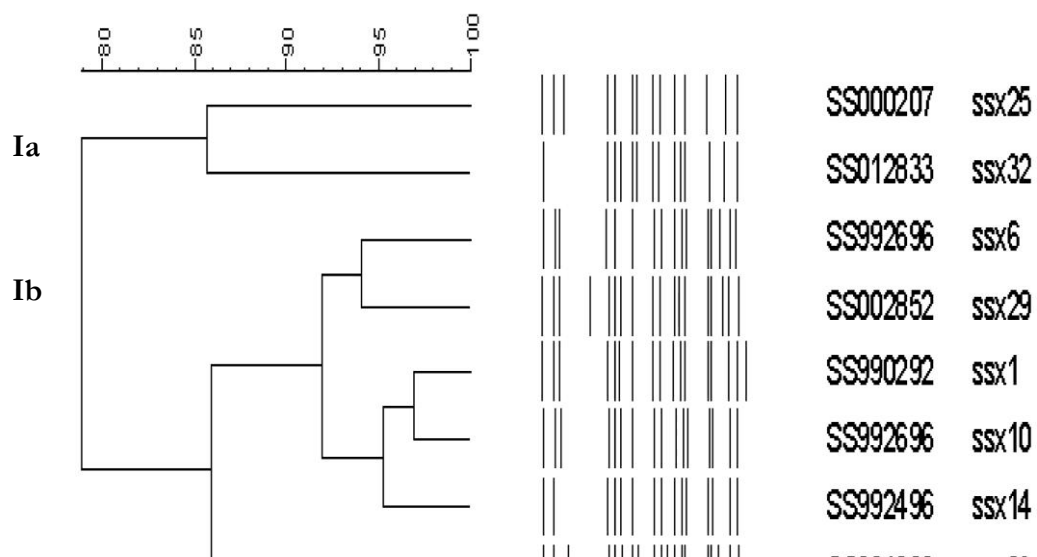


Fig 11. Patrones de electroforesis en gel de campo pulsado de *Shigella boydii*. PM: Marcador de peso molecular (*Salmonella Braenderup*). I: cepas agrupada en el patrón I; Ia: cepas agrupadas en subtipo Ia; Ib: cepa agrupadas en el subtipo Ib.



I

Ib

Ia

Fig 12. Relación clonal de las cepas de *S. sonnei* analizadas por el software MVSP Shareware. El dendograma ilustra el agrupamiento de los patrones (III), definidos por coeficientes de similitud 0.8.

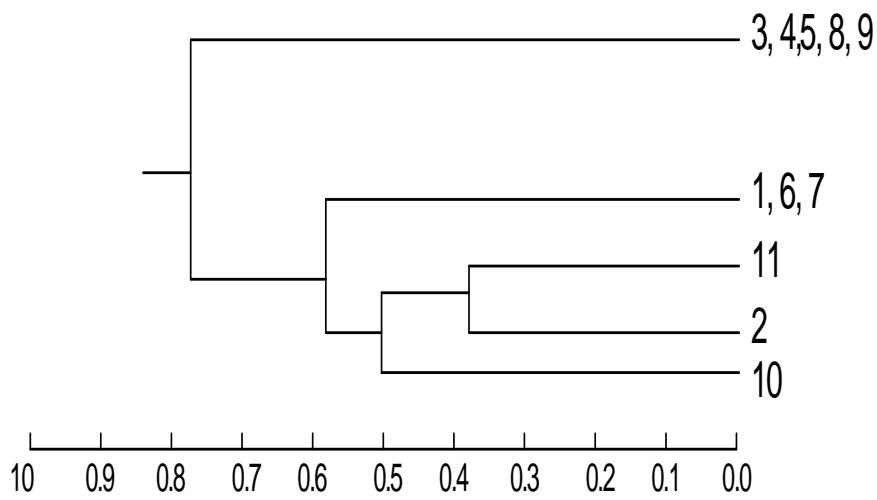
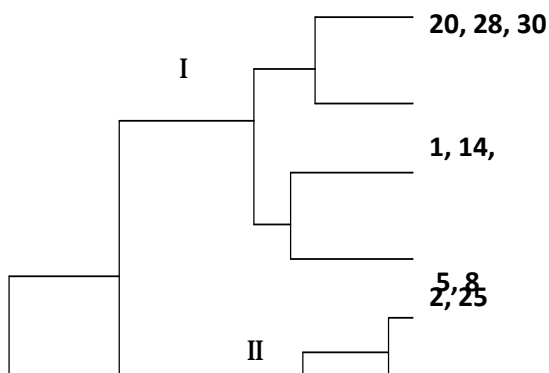


Fig 13. Relación clonal de las cepas de *S. boydii* analizadas por el software MVSP Shareware. El dendograma ilustra el agrupamiento de los patrones (III) definidos por coeficientes de similitud de Dice 0.80



VI

V

Fig 14. Relación clonal de las cepas de *S. flexneri* analizadas por el software MVSP Shareware. EL dendograma ilustra el agrupamiento de los patrones (VI) definidos por coeficientes de similitud 0.8

Dada la reproducibilidad del método de ECP, se propuso a nivel internacional como base de un esquema definitivo para el subtipaje genotípico de cepas de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *E. coli*, aisladas de brotes o casos esporádicos de EDA (Houang *et al.*, 2000; Swaminathan y Matar, 2001; Mc Dougal *et al.*, 2003).

La relación genética entre los patrones de ECP de los diferentes serogrupos de *Shigella*, mediante la utilización de la enzima *XbaI* se diferenció en los dendogramas de las fig 12, 13 y 14; se pudo identificar las diferencias de clonalidad de los serogrupos estudiados.

Estudios de epidemiología molecular en *S. flexneri* realizados en Taiwán durante los años 2001-2003 por Lee *et al.* (2005), demostraron que en 38 cepas de *S. flexneri*, 20 pertenecieron al tipo 1a y 18 al 4a. Identificaron también en estos aislamientos, 8 pulsotipos diferentes en el serotipo 1a y 9 en el 4a. Estos subtipos aparecieron en tres años consecutivos y pudieron agruparse en cinco “clusters”. Se evidenció la diversidad genética de este serogrupo y la relación de los subtipos en el tiempo.

Estudios similares realizados en China, durante 1999-2001, identificaron en 139 cepas de *Shigella*, 47 patrones de ECP pertenecientes a un brote; en las 92 cepas restantes existieron 49 patrones diferentes, aunque entre ellos 15 estuvieron estrechamente relacionados con el brote. En estos aislamientos se encontraron diferentes subtipos, que se diferenciaron en una o dos bandas, indicando un evento genético de delección o ganancia de ADN. He aquí una de las ventajas del método para establecer la relación clonal en cepas estrechamente relacionadas, debido al alto poder de discriminación (Jiang Chen, 2003).

A los efectos de nuestro análisis de los pulsotipos obtenidos mediante ECP, si dos cepas tuvieron tres o menos bandas de ADN diferentes (coeficiente de Dice 0. 80), como se observó en *S. sonnei* y *S. boydii*, se designaron como subtipos; los cuales estaban genéticamente relacionados con el tipo principal. Este fenómeno puede ser explicado por la simple inserción o delección de sitios de restricción (Tenover *et al.*, 1999^b; Goering, 2004).

La clonalidad de algunos serogrupos (*S. sonnei*) ha sido documentada en la literatura especializada en el tema, Andrea *et al.* (2005) señalaron en 9 053 aislamientos de *S. sonnei* estudiadas durante 9 años en Argentina, cepas productoras de *BLEE*; al analizar los resultados de la ECP, el 45% fueron subtipos de un clon único.

En otra investigación realizada en brotes de EDA ocurridos en una comunidad de New York, aislaron *S. sonnei* y los estudios de ECP demostraron la estrecha relación clonal existentes entre las cepas aisladas del brote y las cepas de *Shigella*, aisladas de casos esporádicos de EDA que circulaban en esa región (Garret *et al.*, 2006).

Existen diferentes estudios donde se plantea la diversidad genética en otros serogrupos de *Shigella*, en una investigación realizada por Berción *et al.*(2006), entre 2003-2004 en África Central demostraron

en 145 casos de EDA, 19 aislamientos de *S. dysenteriae* 1, con dos clones diferentes, que revelaron la diversidad genética existente, entre cepas que procedían de un brote y las aisladas de casos esporádicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sustentar la hipótesis que en Cuba circulan serogrupos de *Shigella* multirresistentes con diferentes grados de diversidad genética.

IV.6.9. Comparación entre los marcadores fenotípicos y genotípicos de las cepas de *Shigella* multirresistentes analizadas en el año 2002

Al comparar los resultados de los marcadores fenotípicos (serogrupo, susceptibilidad antimicrobiana), con los marcadores genotípicos (perfil plasmídico y ECP) en *S. flexneri*; sólo se pudieron agrupar tres cepas de la región Oriental que tuvieron el perfil plasmídico V, el fenotipo de resistencia II y pulsotipo VI, el resto no se pudo agrupar en ningún “cluster”. En las cepas que mostraron un mismo perfil plasmídico se observaron pulsotipos diferentes, lo que demostró el alto poder de discriminación de esta técnica y la alta heterogeneidad genética de este serogrupo (tabla 4).

Tabla 4. Perfiles plasmídicos y patrones de ECP de cepas de *S. flexneri*, según su relación con los patrones de resistencia y la región de origen.

Perfil plasmídico	Total de cepas	n = 30	Región de origen	Fenotipo de Resistencia	Patrones de ECP
I	6	1	A	II	PIII
		14	B	III	PII
		5, 8	A	IV	PII, PI
		2, 25	A/C	VI	PII, PV
II	7	10	B	V	PI
		4, 9	A/C	VI	PI, PV
		3, 11	A/B	VI	PIII, PIV
		18, 22	C	V	PII, PIII

III	1	6	A	VI	PII
IV	3	7	A	II	PII
		15, 27	B/C	VI	PI, PV
V	7	23	C	I	PI
		12, 19	B/C	I	PII, PV
		20, 28-30	C	II	PVI
VI	6	13	C	V	PVII
		16, 17	B	II	PII, PVI
		26	C	I	PI, PIV
		21	C	II	PVIII
		24	C	II	PI

Leyenda: A: Región Occidental; B: Región Central; C: Región Oriental
Fuente: LNR/EDA/IPK

Al analizar los resultados de los agrupamientos realizados en las cepas de *S. sonnei* se establecieron tres “clusters” (tabla 5).

- Cluster I: basándonos en los perfiles de resistencia, plasmídico y patrones de ECP, se agruparon 7 cepas, microorganismos que circularon en la región Occidental y Oriental y pertenecían al perfil de resistencia II (TET, SXT, APM) (36.4%).
- Cluster Ia: subtipo del cluster I y en él se agruparon 2 cepas que circularon en la región Oriental. Estas pertenecían al perfil de resistencia V (9.5%).
- Cluster Ib: en el cual se agruparon 5 cepas aisladas en la región Occidental y pertenecían al patrón de resistencia II.

Tabla 5: Perfiles plasmídicos y de ECP de cepas de *S. sonnei*, según su relación con los patrones de resistencia y la región de origen.

Perfil plasmídico	Total de cepas	n = 20	Región de origen	Fenotipos de Resistencia	Patrones de ECP
I	7	31, 32, 39, 40, 41, 43, 45	A (4)/C (3)	II	PI
II	2	33, 34	A	III/V	PII, PI

III	1	35	A	V	PIb
IV	5	36, 38, 48, 49, 50	C	II	PIb
V	2	37, 47	A	V	PIa
VI	1	42	C	III	PIb
VII	1	44	C	II	PI
VIII	1	46	C	V	PIII

Leyenda : A. Región Occidental; C : Región Oriental
Fuente: LNR/EDA/IPK

Al analizar los marcadores fenotípicos y genotípicos entre las cepas del serogrupo *S. boydii* (tabla 6), no se pudo realizar ningún agrupamiento, pues a pesar que hubo 4 cepas de la misma región, y que tenían el mismo perfil de ECP y plasmídico, no mostraron el mismo patrón de resistencia; la combinación de los dos métodos de tipaje molecular ofreció un alto poder de discriminación.

Tabla 6. Perfiles plasmídicos y de ECP de cepas de *S. boydii*, según su relación con los patrones de resistencia y la región de origen.

Perfil plasmídico	Perfiles de ECP	n = 10	No. Cepas	Región de origen	Perfil de Resistencia
I	I	4	51	B	V
			56	B	VI
			57	B	IV
			58	B	III
II	Ia	2	52	B	VI
			53	B	II
III	Ib	2	54	B	V
			55	B	IV
IV	I	2	59	B	III

Leyenda: B: Región Central
Fuente: LNR/EDA/IPK

Por existir gran variabilidad genética a nivel plasmídico, se han empleado análisis cromosómicos para rastrear los marcadores más estables de identidad, utilizando métodos moleculares sensibles y reproducibles, tales como: ribotipaje, RFLP, AFLP, RAPD y ECP. Actualmente este último es clave para separar fragmentos de ADN (Goering, 2004). La AFLP, método utilizado en estudios taxonómicos y epidemiológicos de varios microorganismos, recientemente se ha empleado en la diferenciación entre serotipos de los géneros *Salmonella* y *Shigella* (Maslow *et al.*, 2001). Con la aplicación de estos nuevos métodos se han obtenido resultados satisfactorios en la caracterización genotípica de bacterias enteropatógenas (Lee *et al.*, 2000, 2003; Dutta *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2006).

El acceso a las investigaciones del ADN bacteriano se emplea para la discriminación entre aislamientos bacterianos, la combinación del análisis del perfil plasmídico y el perfil de ECP, constituyen herramientas muy útiles para la investigación y diferenciación molecular de brotes de bacterias enteropatógenas (Swaminathan y Matar, 2001). En el último quinquenio estas tecnologías se han utilizado para realizar diferentes investigaciones en el mundo, con el objetivo de analizar los brotes causados por estas bacterias (Swaminathan y Matar, 2001; Mc Dougal *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2005).

En este estudio, los perfiles plasmídicos y de ECP identificados en *S. flexneri*, mostraron gran variabilidad al asociarlos con los patrones de resistencia, se observó también poca relación con la procedencia geográfica de las cepas. Esto devino en un bajo porcentaje de agrupamiento de las mismas.

Los resultados planteados en esta investigación demostraron que los estudios moleculares fueron las herramientas más útiles para la caracterización microbiológica de *S. sonnei* y *S. flexneri*, superando la determinación del patrón de susceptibilidad antimicrobiana. Un método de tipaje ideal sería aquel que permite identificar cada cepa como única y establece la discriminación en la totalidad de las mismas, pero como todavía no existe, se utiliza la combinación de varias técnicas para su mejor conocimiento y diferenciación (Dutta *et al.*, 2002, Swaminathan *et al.*, 2003, Ahmed *et al.*, 2006).

En estudios realizados en diferentes partes del mundo se comparan varios métodos de tipaje molecular como son: perfil plasmídico, ECP y AFLP, entre otros. Estos métodos se emplean en diferentes microorganismos de importancia clínica y aportan resultados con grados de éxito variables (Martin y Gudiol, 2003; Kariuski *et al.*, 2004). Al calcular el ID, los métodos de tipaje utilizados en nuestro trabajo ofrecieron diferentes grados de diferenciación. Se observó que el de mayor utilidad fue la ECP, esta técnica se utilizó por primera vez en Cuba para estudiar cepas del género *Shigella* y su poder de discriminación estuvo por encima de los otros métodos empleados.

En un estudio realizado en cepas de *Shigella* aisladas de pacientes en Europa y Asia se compararon varios métodos moleculares (ECP, perfil plasmídico y REP-PCR.). En ese trabajo las cepas de *S. flexneri* se distribuyeron en cuatro “clusters” y *S. sonnei* en dos; tomando la ECP como técnica de referencia epidemiológica, cepas que tenían el mismo perfil plasmídico y de resistencia pertenecieron a grupos de ECP diferentes (Navia *et al.*, 2005). El presente estudio mostró resultados similares, podemos inferir que algún transposon portador de genes de resistencia, estuvo integrado en el cromosoma y pudo haber sido el causante de las diferencias encontradas.

Investigaciones realizadas con cepas de *S. dysenteriae 1* multirresistentes por Taneja *et al.* (2005) en la India y con resistencia añadida a la ciprofloxacina, observaron 14 aislamientos multirresistentes y 12

resistentes a la ciprofloxacina. Además, seis tuvieron un perfil plasmídico similar y se evidenció la emergencia de un clon ciprofloxacina resistente en el noreste de la India.

Recientemente, Talukder *et al.* (2004), también en la India, determinaron la relación clonal existente entre cepas de *S. dysenteriae* 1 resistentes a la ciprofloxacina, asociadas con las epidemias ocurridas en 1984, 1997 y 2000 en Asia. Se demostró que los perfiles plasmídicos de las cepas de la India, fueron similares a los de las epidemias de Asia. Sin embargo, al analizar los pulsotipos, observaron que las cepas tenían relación con las de las epidemias de 1984 y 1997, pero diferían de las del 2000, evidenciándose diferencias genéticas entre estos aislamientos.

Liu *et al.* (2000) al comparar los perfiles plasmídicos, los patrones de ECP y REP-PCR en el tipaje de 20 cepas de *S. sonnei* señalaron que los resultados mostrados por la técnica de ECP permitieron una mayor discriminación.

En un estudio de caracterización molecular de 183 aislamientos de *Shigella* spp. realizado en Tailandia (2000-2003), identificaron 16 perfiles plasmídicos y 15 pulsotipos diferentes; éstos pertenecieron a 11 “clusters”, demostrándose que en los estudios de diferenciación molecular de *Shigella* spp., el análisis de los perfiles plasmídicos y de ECP son armas poderosas con un alto poder de discriminación (Nabul *et al.*, 2006).

La combinación de los diferentes marcadores epidemiológicos referidos a lo largo de este trabajo permitió caracterizar genéticamente las cepas de *Shigella* circulantes en Cuba. La correlación de estos marcadores con las manifestaciones clínicas y determinados patrones de resistencia antimicrobiana, así como, conocer la distribución de los aislamientos y los cambios de sus características en diferentes áreas geográficas, posibilitan una mejor caracterización microbiológica de este

microorganismo (van Oosterhout y van der Hoek, 2004; Ansaruzzaman *et al.*, 2005; Pichel *et al.*, 2006).

Los métodos de tipaje molecular junto con los métodos fenotípicos han sido utilizados también en la descripción de nuevos serotipos de *Shigella*, así lo señalaron, Melito *et al.* (2005) en Canadá, al emplear las técnicas de ECP, PCR y RFLP para caracterizar seis cepas pertenecientes a un nuevo serovar de *S. dysenteriae*, que fueron indistinguibles genotípicamente y no se correspondían con ninguno de los serovares descritos anteriormente, denominándolo provisionalmente como BEDP02– 5104.

Al analizar los aislamientos de *S. sonnei*, según los marcadores fenotípicos y genotípicos, se pudieron hacer tres agrupamientos, mostrando que dos de ellos (I y Ib) estuvieron estrechamente relacionados y circularon en la misma región del país, fue significativo que en el “cluster” I se encontró el mayor porcentaje de cepas, estas circularon en dos regiones (Occidental y Oriental).

En un estudio de brotes de shigelosis ocurridos en China, entre noviembre de 1995 a enero del 96 y cinco brotes notificados posteriormente (enero 1998 - febrero 1999) se obtuvieron 55 aislamientos de *S. sonnei* que se discriminaron en dos tipos de perfiles antimicrobianos, tres perfiles plasmídicos y un patrón de ECP. Los hallazgos obtenidos indicaron que los casos estuvieron estrechamente relacionados y se sugirió que los aislamientos clínicos correspondientes (1998-1999), derivaron probablemente de las cepas del brote de 1995 (Ling *et al.*, 2001).

Estudios realizados en 86 cepas de *Shigella* spp. aisladas de niños con EDA en Tanzania, tuvieron una relación epidemiológica entre los perfiles de resistencia, plasmídicos y de ECP. Entre estos aislamientos, 78 cepas de *S. flexneri* se dividieron en dos “clusters” por ECP, cuatro cepas de

S. dysenteriae pertenecieron al mismo “clusters” y cuatro cepas de *S. sonnei* correspondieron a dos; el perfil de ECP, mostró una alta heterogeneidad en los aislamientos que pertenecieron al mismo perfil plasmídico, comprobándose que éste fue menos discriminativo (Navia *et al.*, 2003). Resultados similares obtuvimos en este trabajo.

Otros autores como Chiou *et al.* (2005), realizaron investigaciones de epidemiología molecular en 41 cepas de *S. flexneri* y no observaron correlación entre el perfil plasmídico y el de ECP en 22 cepas, mientras que, cuatro aislamientos mostraron un plásmido inestable.

En estudios realizados en Japón por Matsumoto *et al.* (2003) investigaron ocho brotes de *S. sonnei* ocurridos entre octubre del 2002 a junio del 2003 y al comparar 53 aislamientos de *Shigella*, utilizando diferentes métodos de subtipaje molecular (perfil plasmídico y ECP), se comprobó que cuatro cepas genéticamente relacionadas fueron las responsables de los brotes. Además, estudiando cepas aisladas de casos de viajeros con shigelosis en Asia indicaron que estaban estrechamente relacionadas. Se identificó que ese clon circulaba en Asia en este período y se expandió, debido al extenso movimiento de viajeros.

Las cepas de *S. sonnei* no pueden ser subdivididas por serotipaje, poseen un solo serovar y esto hace difícil establecer sus relaciones epidemiológicas. Se demostró que este serogrupo es muy clonal (Swaminathan *et al.*, 2003). Durante algún tiempo se consideró que el intercambio de material genético por recombinación entre poblaciones de microorganismos de estructura clonal, era raro y que las mutaciones puntuales constituían la mayor fuente de variación genética dentro de los genes más estables y determinantes en la estructura de la población (Natassi *et al.*, 2000). Esto ha variado y se plantea que el desequilibrio de relación entre alelos de este tipo de población puede estar más bien determinado por un factor geográfico o ecológico dentro de la misma, o por las características de la muestra empleada. (Hunter *et al.*, 2005).

Cepas con un mismo perfil plasmídico y patrón de ECP y diferentes perfiles de resistencia o viceversa estuvieron presentes en los agrupamientos de *Shigella* de esta investigación, esto puede indicar que aún cuando un aislamiento proviene de un mismo clon, la presión selectiva ejercida por los antibióticos pudo llevar a la aparición de nuevos patrones de resistencia debido a la incorporación de elementos extracromosomales transferibles (plásmidos y transposones) (Ahmed *et al.*, 2006).

Según los métodos de tipificación y subtipificación empleados en el presente trabajo se trató de identificar cepas endémicas, indistinguibles o estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético, pero debido a que se aislaron de pacientes temporalmente no asociados y correspondieron a áreas distantes, no fue posible demostrar o afirmar una relación epidemiológica directa o indirecta entre ellas.

Los resultados obtenidos en esta investigación son válidos para plantear que aislamientos de *Shigella* de distantes áreas geográficas, con fenotipo de resistencia y pulsotipos o subtipos idénticos, no tienen probablemente un origen común, pero podrían contribuir a la transmisión de la enfermedad, diseminación de la resistencia y determinación de los prototipos que pudieran utilizarse en la obtención de vacunas o estudios de patogenicidad de *Shigella*. Estas circunstancias, conjuntamente con la existencia de locus cromosomales estables portadores de genes R y la endemidad de la enfermedad, sugieren la circulación en Cuba de cepas resistentes con un alto grado de variabilidad genética.

Es cierto que innovaciones radicales en el tratamiento de la shigelosis en el ámbito mundial no han tenido todo el éxito esperado, al relacionarlos con el control de la enfermedad, pues el empleo de antimicrobianos efectivos ha estado disponible en períodos de ascenso y descenso de la incidencia. Además, el tratamiento efectivo constituye un componente clave en el control y ha requerido

cambios mayores con el desarrollo de la resistencia antimicrobiana en los últimos 50 años. Su eficacia se ha mantenido, pero a un precio no alcanzable por todas las naciones y constituye solamente un elemento más en el control de la shigelosis (Martín y Gudiol., 2003; Kaiser *et al.*, 2002).

Ningún tratamiento utilizado y recomendado es poco costoso, sin embargo el empleo de fármacos alternativos se impone. Debemos encaminarnos a garantizar el uso adecuado de los antimicrobianos y continuar con el trabajo de la vigilancia de la susceptibilidad, asegurando que los recursos se utilicen con eficacia, sin olvidar que con una adecuada infraestructura higiénico epidemiológica, se pueden disminuir las tasas de morbimortalidad causadas por EDA (Clemens *et al.*, 2003).

Finalmente, es oportuno considerar que con la introducción de métodos de caracterización genotípica para los estudios epidemiológicos de brotes o casos esporádicos de shigelosis y la continua y oportuna vigilancia de la resistencia a los agentes antimicrobianos, el LNR/EDA/IPK cuenta con herramientas útiles encaminadas a garantizar el diagnóstico y control de las EDA en Cuba.

V. CONCLUSIONES

1. Se pudo determinar que los serogrupos *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* fueron los más frecuentes en Cuba durante el período analizado, lo cual demuestra la importancia del incremento de la vigilancia de los serogrupos circulantes en el país.
2. El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana, permitió evidenciar cambios de los patrones de resistencia en las cepas de *Shigella* circulantes en Cuba. Los resultados obtenidos con el ácido nalidíxico nos permite sugerir que puede continuar administrándose como antimicrobiano de elección para el tratamiento de la shigelosis en nuestro país.
3. La circulación de distintos patrones genéticos de *Shigella* multirresistentes en las cepas circulantes, permitió conocer que entre las mismas, hubo una elevada transmisión de la resistencia antimicrobiana.
4. El empleo de distintas técnicas de tipaje molecular demostró la heterogeneidad genética de los serogrupos de *Shigella* multirresistentes estudiados.
5. La posibilidad de combinar los métodos fenotípicos y genotípicos para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de *Shigella*, brindó una mejor caracterización de las cepas aisladas en Cuba.
6. Con la introducción de la caracterización genotípica en las cepas de *Shigella* aisladas de brotes y/o casos esporádicos, así como la continua vigilancia de la resistencia antimicrobiana, el LNR/EDA/IPK, dispone de las herramientas útiles y necesarias para garantizar el diagnóstico y control de las enfermedades diarreicas en Cuba.

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar la vigilancia sistemática de la susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* frente a los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la shigelosis, mediante el diseño de métodos de muestreo que permitan monitorear cambios en las poblaciones de *Shigella* circulantes.
2. Continuar con el desarrollo de investigaciones de epidemiología molecular que permitan seguir la evolución y emergencia de clones de *Shigella* resistentes a las drogas antimicrobianas.
3. Diseñar nuevos estudios que permitan identificar los determinantes genéticos responsables de la emergencia y diseminación de niveles de resistencia antimicrobiana elevados en las cepas de *Shigella* circulantes en Cuba.

Bibliografía

- Ahmed AM, Furuta K, Shimomura K, Kasama Y, Shimamoto T. Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan. *Japan J Med Microbiol.* 2006;55:1685-91.
- Akata OM, Vahaboglu H, Tatman-Otkun M, Tugrul M, Dundar V. The Molecular Epidemiology of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance of *Shigella sonnei* in the Trakya region of Turkey. *New Microbiol.* 2003;20:227-31.
- Andrea P, Petroni A, Faccone D, Pasteran F, Melano R, Galas M. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamases in *Shigella sonnei* from Argentina first report to TOHO-1 outside Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25:501-7.
- Angulo FJ, Swerdlow DL. Bacterial enteric infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 2005;2:S84-93.
- Anzaruzzam M, Sultana M, Talukder KA, Alam K, Matsushita S, Safa A, *et al.* Isolation and characterization of provisional serovar *Shigella boydii* E16553 from diarrhoeal patients in Bangladesh. *J Med Microbiol.* 2005;54:447-80.
- Ashkenasi J, Karpela J, Karpanoja P, Siitonen A. Subtyping of *Shigella flexneri*, for tracing nosocomial transmission. *Epidemiol Infect.* 1999;116:127-35.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, *et al.* Molecular techniques for plasmids analysis. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1991;13:241-5.
- Aysev AD. Drug resistance of *Shigella* strains isolated in Ankara, Turkey, 1999-2002. *Scand J Infect Dis.* 2003;30:351-3.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Path.* 1966;45:493-6.
- Bennish ML, Wojtyniak BJ. Mortality due to shigellosis: community and hospital data. *Rev Infect Dis.* 1997;13:S245-51.
- Bennish ML. Tratamiento de diarrea infecciosa el papel de la terapéutica antimicrobiana. *Enferm Infecc Microbiol.* 1999;17:179-86.
- Bennish ML. Potentially lethal complication of shigellosis. *Rev Infect Dis.* 2001;13: S319-24.
- Bercion R, Demarti M, Recio C, Massamba PM, Frank T, Escriba JM, *et al.* Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 causing dysentery outbreaks in Central Africa Republic, 2003-2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;13:55-60.

- Bhattacharya SK, Sur D. An evaluation of current shigelosis treatment. *Expert Opin Pharmacother.* 2003;4:1315-20.
- Bhattacharya SK, Tzouveleki LS, Tzlepi E, Tassios PT, Laegakis NJ. CTX-M-type beta-lactamase: an emerging group of extended-spectrum enzymes *Int J Antimicrob Agents.* 2005;14:137-42.
- Black RE. Epidemiology of traveler's diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev Infect Dis.* 2000;12:S73-9.
- Bogaert J. Antimicrobial resistance and serotypes of *Shigella* isolates in Kigali, Rwanda (1983-1993): increasing frequency of multiple resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;28:165-71.
- Bonhoeffer S, Lipsitch M, Levin BR. Evaluating treatment protocols to prevent antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;94:12106-11.
- Bush K, Jacob G A, Medeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structures. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 39:1211-33.
- Cabrera OR. Serotipaje de los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* y *Shigella*. [trabajo de diploma]. Ciudad de la Habana: Instituto Pedro Kourí; 1997.
- Calva JJ, Sifuentes Osornio J, Ceron C. Antimicrobial resistance in fecal flora: longitudinal community-based surveillance of children for urban México. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;40:1699-702.
- Carrión EQ. Síndrome diarreico. En: Ferreras P, Rozman C, editores. *Medicina interna.* 14 ed. España: Harcourt; 2000. p.213-22.
- Castillo FJ, Carranza E, Clavel A, Rubio MC, Gómez L. Epidemiología de la shigelosis y colicinetipia de *Shigella sonnei*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1999;9:530-6.
- Chambers HF, Sande MA. Fármacos antimicrobianos: consideraciones generales. En: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman A, editores. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* 9^{na} ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002. p.1095-8.
- Chang LL, Chen HL, Chang CY, Chang SF. Characterization of trimethoprim resistance in *Shigella*. *Gaox Yi Xue Ke Xue Za Zhi.* 2002;9:676-83.
- Chin J. El control de las enfermedades transmisibles. 17a ed. Washington, DC.: PAHO; 2001.

- Chiou CS, Hsu WB, Wei HL, Chen JH. Molecular epidemiology of *Shigella flexneri* outbreak in mountainous township in Taiwan, Republic of China. J Clin Microbiol. 2001;39:1048-56.
- Chiou CJ, Huang I, Cheng-Hun C, Wang M. Outbreak of dysentery associated with ceftriaxone resistant *Shigella sonnei*. First report of plasmid mediated CMY2 type AmpC β -Lactamase resistance in *Shigella sonnei*. J Clin Microbiol. 2005;43:2608-12.
- Chowdhury HR. Is acute watery diarrhea an important cause of morbidity and mortality among rural Bangladeshi children? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;85:128-30.
- Clemens J, Kotloff K, Kay B. Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhea and dysenteric mortality. Bull World Health Organ. 2003;9:55-69.
- Cobra C, Sack DA. The control of epidemic dysentery in Africa: overview, recommendations and checklist 2003. Africa: Office of Sustainable Development; 2003. Technical paper n° 37.
- David J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science. 1999;264:375-8.
- De Lappe N, O'Halloran F, Fanning S, Fonney C, Chensty T, Cornican M. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* from western Ireland, an area of low incidence of infection. J Clin Microbiol. 2003;41:1919-24.
- Dougherty MJ. Evaluation of an extended blood culture protocol to isolated fastidious organism from patients with AIDS. J Clin Microbiol. 2006;34:2444-7.
- Dutta S, Rajendran K, Roy S, Chatterjee A, Dutta P, Nair GB, *et al.* Shifting serotypes, plasmid profile analysis and antimicrobial resistance pattern of *Shigella* strains isolated from Kolkata, India, during 1995-2000. Epidemiol Infect. 2002;129:235-9.
- Dutta S, Rajendran K, Roy S, Chatterjee A, Dutta P, Nair GB, *et al.* Newly emerged multiple-antibiotic-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains in around Kolkata, India, are clonal. J Clin Microb. 2003;41:5833-4
- Edwards PR, Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. La Habana: Edición Revolucionaria; 1999.p. 25-100.
- Eisenstein BI. Molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious disease. J Infect Dis. 2000;161:595-602.
- Ferreiro C. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infection in a poor perurban setting in Santiago, Chile. Am J Epidemiol. 2001;134:614-27
- Ferguson J. Antibiotic prescribing: how can emergence of antibiotic resistance be delayed? Aust Prescr. 2004;27:39-42.

- Flores A, Araque M, Vizcaya L. Multiresistant *Shigella* species isolated from pediatric patients with acute diarrheal disease. *Am J Med Sci*. 2000;316:379-84.
- Fluit AC, Schmitz FJ. Clase 1 integrons, gene cassette, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;18:761-70.
- Garret V, Benschlengel K, Lange D, Reddy V, Kornstein L, Kournblum J, *et al*. A recurring outbreak of *Shigella sonnei* among traditionally observant Jewish children in New York City: the risk of day care and household transmission. *Epidemiol Infect*. 2006;20:1-6.
- Garrity GM, Bell JA, Librum TG. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^{da} ed. Release 4.0, oct 2003 [citado el 18 de enero 2005]. Disponible en URL: <http://d4.doi.org/10.007brgeysSputline200310>.
- Glass RI, Lew JF, Gangarosa RE, Le Baron CW, Ho MS. Estimates of morbidity and mortality rates for diarrhea diseases in American children. *J Pediatr*. 1999;118:S27-33.
- Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;14:595-600.
- Guerra B, Soto S, Cal S, Mendoza M. Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among *Salmonella* serotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;44:2166-9.
- Heber L, DuPont A. Especies de *Shigella*. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Enfermedades infecciosas: principios y prácticas*. 4^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1997. p. 2276-81.
- Homedes N, Ugalde A. Multisource drug policies in Latin America: survey of 10 countries. *Bull World Health Organ*. 2005;83:64-70.
- Houang ET, Chu YW, Ng TK, Chen FB. Study of the relatedness of isolates of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* obtained in 1986 and 1987 and in 1994 and 1995 from Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2000;36:2404-7.
- Houvinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinic Infect Dis*. 2001; 32:1608-14.
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*. 1988;26:2465-6.

- Hunter SB, Vauterin P, Lambert M, Van Duyne S, Kutoba A, Ribot E, *et al.* Establishment of universal size standard strain for use with the Pulse Net standardized Pulse Field Electrophoresis protocols: converting the national database to new size standard. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1045-50.
- Iverien J, Sandvang D, Srijan A, Cam PD, Dalsgard A. Characterization of antimicrobial resistance plasmids and gene cassettes in *Shigella* spp., from patients in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;50:39-44
- Jensen G, Wandall DA, Gaarslev K, Panavas S, Gutschilk E. Antibiotic resistance in *Shigella* in a region of Lithuania. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;15:872-3.
- Jian Chen N. Serotype prevalence and antibiotics susceptibility of *Shigella* strains isolated in Malaysia during 1999-2001. *J Diarrh Dis Res.* 2003;2:102-4.
- Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* 1981;145:1365-73.
- Kaisar A, Talukder KA, Islam M, Dutta D, Hassam F, Sack D, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of serologically atypical strains of *Shigella flexneri* type 4 isolated in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2490-7.
- Kalluri P, Cumming KC, Abbot GB, Hutchenson K, Beall A, Malcolm GB, *et al.* Epidemiological features of a newly described serotype of *Shigella boydii*. *Epidemiol Infect.* 2004;132:579-83.
- Kariuski S, Muttotho N, Kimari J, Waiyaki P, Hart CA, Gilks CF. Molecular typing of multi-drug resistant *Shigella dysenteriae* type 1 by plasmid analysis and pulse -field gel electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;6:712-4
- Kauffmann ME. Pulse field gel electrophoresis. En: Woodford N, Johnson AP, editores. *Molecular bacteriology protocols and clinical application.* New Jersey: Humans Press; 1998. p. 25- 40.
- Keusch GT, Bennish ML. Shigellosis: recent progress, persisting problems and research issues. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;8:713-9.
- Klotoff KL, Winickoff JP , Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, *et al.* Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implantation of control strategies . *Bull World Health Organ.* 2000;77:651-66.
- Koneman EW, Allen SD, Dowel VR, Janda MW, Sommers HM, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico.* 3^{ra} ed. México. Editorial Médica Panamericana; 1998.

- Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas. Informe de Vigilancia. La Habana: IPK; 2006.
- Laughon BE. Prevalence of enteric pathogens in homosexual men with and without acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology*. 1999;94:984-93.
- Leano FT, Saniel MC, Monzon OT. Prevalent serovars and antimicrobial susceptibility of *Shigella* strains in Metro Manila, 1982-1988. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health*. 1999;21:207-13.
- Lee TM, Chang CY, Chang LL, Chen WM, Wang TK, Chang SF, *et al*. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2000;45:373-81.
- Lee TM, Chang LL, Chang GY, Wang JC, Pan TM, Wang TK. Molecular analysis of *Shigella sonnei* isolated from three well-documented outbreaks in school children. *J Med Microbiol*. 2003;49:355-60
- Lee YS, Liu MC, Ko CF, Lu CH, Tseng YH. Molecular epidemiology of *Shigella flexneri* in a long-stay psychiatric nursing center during 2001-2003. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1353-60.
- Leibovitz E. The use of flouoroquinolones in children. *Curr Opin Pediatr*. 2006;10:54-70.
- Lima A, Lima N. Epidemiology, therapy, and prevention of infection with *Shigella* organism and *Clostridium difficile*. *Curr Opin Microbiol Infect Dis*. 1999;6:63-71.
- Lima AA, Lima N, Pinho M, Barros E, Texeira M. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline isolates from patients with shigellosis in Northeastern Brazil during the period 1988-1993. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;39:256-9.
- Lima AA, Sidrim JJ, Lima NL, Titlow W, Evans ME, Greenberg RN. Molecular Epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2001;35:1061-5.
- Ling JM, Shaw PC, Kam KM, Cheng F, French GL. Molecular studies of plasmids of multiply-resistant *Shigella* spp., in Hong Kong. *Epidemiol Infect*. 2001;110:437-46.
- Litwin CM, Leonard RB, Carrol KC, Drummond WK, Pavia AT. Characterization of endemic strains of *Shigella sonnei* by use of plasmid DNA and Pulse-field gel electrophoresis to detect pattern of transmission. *J Infect Dis*. 2000;175:864-70.

- Litwin CM, Ryan KJ, Chipowsky S, Storm A, McCombie S. Molecular epidemiology of *Shigella sonnei* in Pima County, Arizona: evidence for a Mexico-related plasmid. J Infect Dis. 2002;161:797-800.
- Liu PY, Lau Y, Hu B, Shyr J. Analysis of clonal relationship among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. J Clin Microbiol. 2000;49:1779-83.
- Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1999; 21: 557-84.
- Livermore DM, Brown DF. Detection of β -lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother. 2001;48:29-34.
- Livermore DM. Bacterial resistance: origin, epidemiology and impact. Curr Opin Pediatr. 2006;26:S14-21.
- Llop A. La epidemia del siglo XXI. Resistencia antimicrobiana. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Suazo JL, editores. Microbiología y Parasitología Médicas. Ciudad de la Habana: Ciencias Médicas; 2001. p. 91-9.
- López-Brea M, Sanz JC, Usera MA, Reina J, Cardeñoso L, Vasallo F. Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxiinfecciones alimentarias. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España: SEIMC; 2004. p. 455-66.
- López Cruz SR. Susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* en Nicaragua: incremento significativo de resistencia a sulfametoxazol-trimetoprima y ampicilina. Bol Med. 1999; 18:10-2.
- Lucet JC, Chevret S, Decre D. Outbreak of multiply resistant Enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. Clin Infect Dis. 2000;22:430-6.
- Luque A, Moriñigo MA, Rodríguez Avial C, Picaso J, Borrego J. Resistencia a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes orígenes. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1999;12:187-92.
- Marco F, Jiménez de Anta MT. Métodos de tipificación: análisis de plásmidos: ventajas e inconvenientes. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2000;11:97-101.
- Martín JM, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21:42-5.

- Maslow J, Mulligan M, Arbeit R. Molecular epidemiology application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 2001;17:153–64.
- Matsumoto M, Suzuki Y, Saito M, Ishikawa N, Ohta M. Epidemiologic study of *Shigella sonnei* from sequential outbreaks and sporadic cases using different typing techniques. *Microbiol Immunol.* 2003;42:259-64.
- Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. *Enfermedades Infecciosas Principios y Prácticas.* 4^{ta} ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1997. p. 236-49.
- Mc Dougal L, Steward G, Kilgore JM, McAllister K, Tenover FC. Pulse-field gel electrophoresis typing of *Shigella* isolates from United States establishing a national data base. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5113-20.
- Mc Faddin JF. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* Baltimore: William and Wilkins; 2002.
- Mead PS, Slutker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:607-25.
- Melito PL, Woodward DL, Munro J, Walsh J, Foster R, Ng LK, et al. A novel *Shigella dysenteriae* serovar isolated in Canadá. *J Clin Microbiol.* 2005;43:740-4
- Melder CJ, White PA, Jones T, Karagiannis J, Harners D, Marriott D, et al. Epidemics strains of *Shigella sonnei* biotype carrying integrons. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1538-40.
- Mendoza MC, Martín MC, González-Evia MA. Subtyping of ribotyping in a molecular study of Shigellosis. *Epidemiol Infect.* 1999;116:127-35.
- Merino LA, Hrenk GE, Ronconi MC, Alonso JM. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Shigella* spp., in northeastern Argentina. *Pan Am J Public Health.* 2004; 15:219-24.
- Ministerio de Salud Pública. *Enfermedades diarreicas agudas.* En: Cuba. Unidad de Análisis y Tendencias de Salud, editor. Anuario estadístico. La Habana: MINSAP; 2005. p. 88-99.
- Naigk DG. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of *Shigella* species in Asmara, Eritrea northeast África. *J Microbiol Inmunol Infect.* 2006;39:392-5.
- Natassi A, Pignato S, Mammina C, Giammaco G. RNA gene restriction patterns and biotype of multiresistant *Shigella sonnei* . *Epidemiol Infect.* 2000;110:23-30.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eight Informational Supplement. 2003^a (M2-A8). p. 14-21
- National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically .2003^b Fifth Edition Approved Standard (M7- A5). Wayne, PA, USA.
- Na-Ubol M , Samosorsuk S, Von Seidlein L, Tapchaisri P, Ali M, Clemens JD, *et al.* Molecular characteristics of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhea in a new industrialized area of Thailand. Epidemiol Infect. 2006;26:1-7.
- Navia MM, Gascón J, Vila J. Genetic diversity of *Shigella* species from different intercontinental sources. Infect Genet Evol. 2003;4:349-53.
- Navia MM, Gascón J, Vila J. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. Infect Genetic Evol. 2005; 10: 433-8.
- Niyogi SK. Shigelosis. J Clin Microbiol. 2005;43:133-43.
- Nordmann, P. Trends in β -lactamase resistance in Enterobacteriaceae. Clin Infect Dis. 1999;27:S100-6.
- Oliphant CM, Reploge ML, Fleming DW, Cieslak PR. Emergence of antimicrobial- resistant shigellosis in Oregon. Clin Infect Dis. 2002;30:515-9.
- Organización Panamericana de la Salud. El control de las enfermedades transmisibles. OPS/DPC/CD 201/02. Washington, DC.: OPS; 2001.
- Organización Panamericana de la Salud. Informe anual de la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos. Washington, DC.: OPS; 2003.
- Ozmist EN, Gortuk B, Yurdakor K, Yalcin SS, Gur D. *Shigella* antibiotic in central Turkey comparison of the years 1987- 1994 and 1995-2002. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005;40:359-62.
- Perilla M, Ajello G, BoppCh, Elliot J, Fackalm R, Knapp J, *et al.* Técnicas y procedimientos modernos de susceptibilidad antimicrobiana. CDC/ WHO/CRS/RMD/2003.2
- Pichel M, González-Fraga S, Terragno R, Kremer C, Mola AM , Binztein N . Analysis of clonal relationship among *Shigella sonnei* circulating in Argentina. Epidemiol Infect. 2006;26:1-7.
- Pidal P, Prado V, Trucco O, Valdivieso F. Overview of antimicrobial resistance by *Shigella* spp. In 10 Chilean hospital: The Pronares Project. Rev Panam Infectol. 2002; 1:18-25.

- Prado V, Pidal P, Arrellano C, Lagos R, San Martín O, Levine M. Antimicrobial multiresistance of *Shigella* spp strains in a semi rural community of northern Santiago. Rev Med Chil. 1999;126:1464-71.
- Prado D, Murray BE, Cleary TG, Pickering LK. Limitations of using the plasmid pattern as an epidemiological tool for clinical isolates of *Shigella sonnei*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;42:114-5.
- Prats G, Mirelis B, Llovet T, Muñoz C, Miro E, Navarro F. Antibiotics resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:1140-5.
- Public Health Laboratory Information System (PHLIS). *Shigella* annual summaries. 2001.[citado el 15 de Julio de 2005]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbnb/phlisdata/Shigella.htm>.
- Quintero E. Síndrome diarreico. En: Farreras P, Rozman C, editores. Medicina Interna 14 ed. España: Harcourt; 2000. p. 213-22
- Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodríguez MM, Costa N, Korbefeld D, *et al.* Extended-spectrum β -lactamase in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:2864-7.
- Radice A, Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, *et al.* Genetics analysis of antibiotics resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. Epidemiol Infect. 2005;133:81-6.
- Rahal K, Wang F, Schindler J, Rowe B, Cookson B, Houvinen P, *et al.* Reports on surveillance of antimicrobial resistance in individual countries. Clin Infect Dis. 2003;24:169-75.
- Romero-Cabello R. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. 2^{da} ed. México: Editorial Médica Panamericana; 1999.
- Rossi A, Tokumoto M, Galas M, Soloage R, Corso A. Red Nacional de Laboratorios del Programa WHONET. Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en Argentina. Programa WHONET 1995-1996. Pan Am J Public Health. 1999;6:234-41.
- Rossi A, Galas M, Tokumoto L, Guelfand H, Grupo Colaborativo WHONET-Argentina. Actividad in vitro de trovafloxacin, otras fluoroquinolonas y antimicrobianos no relacionados frente a aislamientos clínicos. Medicina. 2001;59:8-16.

- Sack RB, Rahaman, M., Yunus, M. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal diseases. Clin Infect Dis. 1999;24:S102-5.
- Sack DA, Lyke C, McLaughlin C, Suwanvanichkij V. Antimicrobial resistance in shigelosis, cholera and campylobacteriosis. Geneva: WHO; 2003.
- Salvatierra RG, Benguini Y. Antimicrobial resistance in the Américas: magnitude and containment of the problem En: Yadón Z, Schmunis G, editores. Sensitivity of Salmonella, Shigella and *Vibrio cholerae* to antimicrobial in the Américas. Washington, DC., Pan American Health Organization; 2000. p.112-5.
- Sanders CC, Sanders WE. β -lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin Infect Dis. 1999;4:39-41
- Saurina G, Quale JM, Manikal VM. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. J Antimicrob Chemother. 2000;45:895-8.
- Schwart DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984;37:67-70.
- Schumacher H, Nir M, Mansa B, Grassy A. β -Lactamases in *Shigella*. APMIS 2002;100: 954-6.
- Shieng SL, Wang TK, Tsai JL, Ho Su-I, Lee CL. Molecular subtyping of *Shigella flexneri* by plasmid profile analysis and pulse-field gel electrophoresis. J Microbiol Immunol Infect. 2001;34:103-8.
- Siu KL, Lo JY, Yuen KY, Chau PY, NgMh, Ho PL. β -lactamase in *Shigella flexneri* isolates from Hong Kong and Shanghai and novel OXA-1-like β -lactamase, OXA-30. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2034-8.
- Soldati L, Piffareti JC. Molecular typing of *Shigella* strains using Pulsed-field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. Res Microbiol. 2002; 42:489-98.
- Solórzano A, Levine MM. Antimicrobial therapy for infectious diarrhoea. Rev Infect Dis. 2003;8:207-15.
- Sonnenwirth AC. Bacilos entéricos y bacteroides. En: Dulbecco R, Davis BD, Eisen HN, Ginisberg HS, editores. Tratado de microbiología. 3^{ra} ed. México: Salvat; 1990. p. 529-51.

- Sosa A, Vila J. Infectious disease management in Latin America: a project report. APUA Newsletter. 1999;17:45-9
- Suárez ME, Carvajal L, Culasso C, Paredes M. Resistencia de *Shigella* spp., a los antimicrobianos en Córdoba, durante el período 1990-1997. Pan Am J Public Health. 2000;7:113-7.
- Sumathi S, Nelson JM, Joyce K, Hocktsra M, Angulo FJ, Mintz E. High prevalence of antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the United States tested by the national antimicrobial resistance monitoring system from 1999 to 2002. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:44-59.
- Surdeanu M, Pencu E, Tonciu M, Mihai I, Claudin L. Differentiation of *Shigella* strains by plasmid profile analysis, serotyping and phagotyping. Roum Arch Microbiol Immunol. 2002;59:103-17.
- Susuki T, Yosshikawa Y, Ashida H, Iwai H. *Shigella* species identification and ciprofloxacin resistance testing with high-density DNA probes arrays. J Immunol. 2006;177:4709-17.
- Swaminathan B, Matar GM. Molecular typing methods: definition, applications, and advantages. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington, DC: America Society for Microbiology; 2001. p. 26-50.
- Swaminathan B, Barret TJ, Hunter R, Tauxe V. PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance. Emerg Infect Dis. 2003;7:382-9.
- Tacket E, Cohen ML. Shigellosis in day-care centers: use of plasmid analysis to assess control measures Pediatr Infect Dis. 2000;2:127-30.
- Talukder KA, Islam Z, Islam MA, Dutta DK, Safa A, Sack DA, et al. Phenotypic and genotypic characterization of provisional serotype *Shigella flexneri* 1c and clonal relationship with 1a and 1b strains isolated in Bangaldesh. J Clin Microbiol. 2003;41: 110-3.
- Talukder KA, Khajanchi BK, Islam MA, Dutta DK, Islam Z, Safa A, et al. Genetic relatedness of ciprofloxacin-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains isolated in south Asia. J Antimicrob Agents Chemother. 2004;54:730-4.
- Talukder KA, Islam Z, Islam MA, Dutta DK, Safa A, Sack DA, et al. Antibiotic resistant and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolated from patient with diarrhoea between 1999- 2003 in Bangladesh. J Med Microbiol. 2006;55:1257-63.

- Taneja N, Lyngdoh V, Vermani A, Mohan B, Rao P, Singh M. Re-emergence of multi-drug resistant *Shigella dysenteriae* with added resistance to ciprofloxacin in north India & their plasmid profiles. Indian J Med Res. 2005;4:348-54.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33:2233-9.
- Tenover FC, McGowan JE. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. Am J Med Sci. 1996;311:9-16.
- Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum β -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. J Clin Microbiol. 1999^a;37:4065-70.
- Tenover FC, Robert D, Arbeit MD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol 1999^b;5:426-39.
- Tompkins LS. The use of molecular methods in infectious disease. New Engl J Med. 2002;327:1290-6.
- Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V. Etiology of children diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogenesis and unusual isolates. J Clin Microbiol. 2001;39:2134-9.
- Townes JM, Quick R, Gonzales OY, Linares M, Damiani E. Etiology of bloody diarrhea in Bolivian children: implication for empiric therapy. J Infect Dis. 2003;175:1527-30.
- van Oosterhout JJ, van der Hoek W. Infection with HIV, a risk factor for epidemic dysentery? A case –control study from Zambia [letter]. AIDS 2004;8:1512-3.
- Valdés-Dapena MM. Enterobacterias. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Suazo JL, editores. Microbiología y parasitología médicas. Ciudad Habana: Ciencias Médicas; 2001. p. 251-80.
- Valdés N. Resistencia antimicrobiana y perfiles plasmídicos en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba [tesis de Especialista de Primer Grado en Microbiología]. Ciudad de La Habana: Instituto Pedro Kourí; 2002.
- Vila J, Navia MM, Capitano L, Joaquin R, Vargas M. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from faeces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. J Clin Microbiol. 2003;37:3113-7.

- White PA, Mever CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassette in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;45:2658-61.
- Woodford N, Johnson A. *Molecular bacteriology: protocols and clinical applications*. New Jersey: Humana Press; 1998.
- World Health Organization. Guidelines for the control of shigelosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. Geneva: WHO; 2005^a.
- World Health Organization. The treatment of diarrhea: a manual for physicians and other senior health workers. 4th revision. Geneva: WHO; 2005^b.
- Yurdakok K, Sahin N, Osmert E, Berkman E. *Shigella* gastroenteritis: clinical and epidemiological aspects, and antibiotic susceptibility. *Acta Paediatr Jpn* 2003;39:681-4.
- Zurita J, Espinosa Y, Ayabaca J, Vásquez C. Resistencia bacteriana en Ecuador. *Rev Panam Infectol*. 1999;1:S41-4.
- Zwadyk P. Enterobacteriaceae: *Salmonella* y *Shigella* patógenos intestinales. En: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM, editores. *Zinsser Microbiología*. 20^{va} ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1994. p. 759-71.

ANEXO 1.

Pruebas bioquímicas características del género y especies de *Shigella*

Pruebas bioquímicas	Resultados
Producción de Indol (OXOID)	-
Motilidad (Difco)	-
Hidrólisis de Urea (BIOCEN)	-
Utilización de Citrato de Simmon´s (BIOCEN)	-
Decarboxilación de Ornitina (MERCK)	+/-
Utilización de Acetato (MERCK)	-
Fermentación de Manitol (OXOID)	+/-

Fuente: Mac, Faddim, 2002; MOP, 2004

ANEXO 2.

Solventes y diluentes para la preparación de antimicrobianos. NCCLS M7- A5, 2003^b.

Agentes antimicrobianos	Solvente	Diluyente
Ampicilina (AMP)	Solución fosfato pH 6,0 0.1 mol/L	Solución fosfato pH 6,0 0.1 mol/L
Acido nalidíxico (NAL)	Etanol 95 %	Solución fosfato pH 6.0 , 0.1 mol/L

ANEXO 3.

Reactivos empleados en la extracción de plásmidos (Kado y Liu, 1981)

1. - Buffer lisis.

- ◆ Tris HCL (pH = 8.0) 2.5 mM
- ◆ EDTA (pH= 8.0) 10mM
- ◆ Glucosa 50 mM

2. Acetato de potasio

- ◆ KCOOH 5 M 60 mL
- ◆ Acido acético 11.5 mL
- ◆ H₂O milliQ – 28.5 mL

3. Buffer TE (Tris- EDTA)

- ◆ Tris HCL (pH = 8.0)
- ◆ EDTA 1 mM

4. TE saturado Fenol/ Cloroformo.

Preparación:

- ◆ Mezclar partes iguales de Buffer TE y Fenol y dejar reposar hasta separación de ambas fases, luego mezclar una parte de (fase de Fenol) y una parte de Cloroformo- alcohol isoamílico (24:1).

ANEXO 4

Soluciones empleadas en la electroforesis submarina (Ausubel *et al.*, 1991)

1. Buffer TAE 1X

- ◆ Tris- acetato 0.04M
- ◆ EDTA 0.001M)

2. Composición del Gel de Agarosa 0.7%

- ◆ Agarosa DNA/RNA 0.7 g
- ◆ Buffer TAE 1X 100 mL

3. Composición del Tris de la cámara de electroforesis.

- ◆ Buffer TAE 1X - 40mL
- ◆ Bromuro de Etidio - 10 μ L
- ◆ H₂O milliQ_{cps} - 200 mL

4. Solución de suspensión de los plásmidos:

- ◆ Tris – HCL 1M
- ◆ EDTA 1mM
- ◆ RNasa (25 μ g/mL)

ANEXO 5.

Reactivos para la preparación de los bloques de ADN de *Shigella* spp (Kauffman, 1998)

1. Solución de lavado:

- ◆ Tris- HCL 0,1 M
- ◆ EDTA 0. 1 M
- ◆ Cl Na 0,15 M pH= 7,5

2. Solución de proteolisis

- ◆ EDTA 0, 5 M
- ◆ Lauril sarcosil 1 % (p/v) pH= 9,5

3. Proteínasa K

- ◆ Se disuelve en agua destilada a una concentración de 50 mg/mL y se guarda en alícuotas de 200 μ L.

4. Solución Tris -- EDTA

- ◆ Tris – HCL 10 mM
- ◆ EDTA 1 mM pH= 8

Se debe preparar a una concentración 10X

5. Solución de la enzima *Xba*I

- ◆ Tris – HCL 20 mM pH= 7,4
- ◆ Cl Mg 5 mM
- ◆ ClK 50 mM.

6. Solución TBE:

- ◆ Tris- borato 0,1 % pH= 8,3
- ◆ EDTA 2 mM.

7. Solución salina fosfato (PBS):

- ◆ Fosfato dihidrogenado de sodio 7.0 g
 - ◆ Fosfato hidrógeno disódico 7.0 g
 - ◆ Agua destilada 1000 mL
- pH= 7.2

8. Mezcla de digestión:

- ◆ 10 – 15 unidades de la enzima en 150 μ L de solución de 1X de la enzima.
- ◆ Enzima *Xba*I 2 μ L
- ◆ BSA 0.5 μ L
- ◆ Solución de la enzima 10X 10 μ L
- ◆ H₂O 137.5 μ L

