

Nota corta

Resistencia a los antimicrobianos, perfil plasmídico y ribotipificación en cepas de *Shigella sonnei* aisladas en Cuba

R. Cabrera^{1,2}, A. Echeíta³, S. Herrera³, M.A. Usera³, M. Ramírez², L. Bravo² y A. Fernández²

¹Servicio de Microbiología, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, España;

²Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Habana, Cuba;

³Laboratorio Nacional de Referencia de Salmonella y Shigella, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

La shigellosis aún constituye un problema para la salud mundial (1), principalmente en los niños menores de 5 años de edad (2). Dentro del género *Shigella*, *S. sonnei* es el principal agente causal de esta enfermedad en Cuba (3). Este serogrupo no puede ser subdividido en serotipos, por lo que se han utilizado diferentes métodos fenotípicos para establecer un marcador epidemiológico (4); sin embargo, ninguno ha sido del todo satisfactorio. Nuevas técnicas genéticas de tipificación han emergido con variados resultados (5). Nuestro objetivo fue determinar la resistencia antimicrobiana en cepas de *S. sonnei* aisladas de casos esporádicos en Cuba para conocer los patrones de sensibilidad y utilizar la antibiogramación, la plasmidotipificación y la ribotipificación usando *HindIII* como enzima de restricción para establecer la utilidad de estas técnicas en estudios epidemiológicos en casos esporádicos de shigellosis. Treinta cepas de *S. sonnei* aisladas de heces de pacientes con enfermedad diarreica aguda en diez provincias de Cuba fueron estudiadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas en un periodo de seis meses. La sensibilidad a los antimicrobianos y la caracterización molecular se determinaron en el Instituto de Salud Carlos III. La sensibilidad se determinó por

el método de Kirby-Bauer (6) frente a 12 antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, sulfonamida, estreptomina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, cefotaxima, cefalotina y trimetoprima-sulfametoxazol. La interpretación de los resultados se determinó siguiendo los criterios del NCCLS (7). Se consideraron multirresistentes las cepas con resistencia a tres o más antimicrobianos no relacionados. El perfil plasmídico se realizó según Kado y Liu (8). La extracción de plásmidos se visualizó en una electroforesis horizontal en geles al 0,8% de agarosa. La talla de los plásmidos fue determinada por comparación con el marcador de peso molecular. Los perfiles plasmídicos se establecieron considerando el número y la talla de los plásmidos. En la ribotipificación el DNA fue extraído por el método del CTAB (3) y digerido con *HindIII*. Los fragmentos de DNA fueron separados en un gel de electroforesis unidireccional, a 40V, 24 horas, transferidos a una membrana de nailon y fijados a UV por dos minutos. La hibridación se llevó a cabo con una sonda obtenida de la PCR con DNA marcado con digoxigenina-11-dUTP (9). La sonda se detectó con anticuerpos antidigoxigenina, fosfatasa alcalina y el sustrato quimioluminiscente CSPD. Para detectar la señal quimioluminiscente, la membrana fue expuesta al *Lumi-film*, según el fabricante (Roche

Tabla 1. Datos y resultados de las cepas de *S. sonnei* estudiadas.

Nº de cepas	Provincias de Cuba	Perfil plasmídico (Kb)	Patrones de antibiograma	Ribotipo/ <i>Hind</i> III
6802	Las Tunas	A: 45; 8,5; 7,6; 6,2; 5,4; 2,6; 2,0	Ácido nalidíxico, estreptomina, sulfonamida, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina	1
6803	Las Tunas	“	Estreptomina, sulfonamida, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina	1
6804	Las Tunas	“	“	1
6807	Las Tunas	“	“	1
6808	Las Tunas	“	“	1
6809	Las Tunas	“	“	1
6810	Ciudad Habana	“	“	1
6811	Ciudad Habana	“	“	1
6812	Ciudad Habana	“	“	1
6784	Las Tunas	“	“	1
6789	Isla de la Juventud	“	“	1
6814	Matanzas	B: 53; 45; 8,5; 7,6; 5,4; 2,6; 2,0	“	1
6816	Matanzas	“	“	1
6817	Camagüey	“	“	1
6818	Camagüey	“	“	1
6782	Matanzas	“	“	1
6783	Matanzas	“	“	1
6805	Las Tunas	C: 53; 45; 7,6; 5,4; 2,6; 2,0	Estreptomina, sulfonamida	3
6806	Las Tunas	“	Estreptomina	1
6819	Camagüey	D: 45; 8,5; 6,2; 5,4; 2,6; 2,0	Estreptomina, sulfonamida, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina	1
6822	Pinar del Río	“	“	1
6824	Santi Spiritus	“	“	2
6825	Guantánamo	“	“	1
6826	Guantánamo	“	“	1
6827	Guantánamo	“	“	1
6813	Ciudad Habana	E: 45; 7,6; 6,2; 5,4; 2,6; 2,0	Estreptomina	1
6815	Matanzas	F: 53; 45; 5,4; 2,6; 2,0	Estreptomina	1
6820	Cienfuegos	G: 53; 45; 8,9; 7,6; 5,6; 2,6; 2,0	Estreptomina, sulfonamida, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina	1
6821	Granma	“	Trimetoprima-sulfametoxazol	1
6823	Pinar del Río	H: 53; 45; 10,9; 9,4; 5,4; 2,6; 2,0	Estreptomina, sulfonamida, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina	1

Diagnostic S.L., España). Se determinó el índice discriminatorio de Simpson (ID) en cada técnica. Las cepas presentaron altos porcentajes de resistencia a la estreptomina (96,6%), trimetoprima-sulfametoxazol (86,6%), sulfonamida (86,6%) y tetraciclina (83,2%). Se encontró un 83% de multiresistencia. Todas las cepas fueron sensibles a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacino, cefotaxima, cefalotina y kanamicina. El patrón de resistencia más frecuente fue a estreptomina, sulfonamida, trimetoprima-sulfametoxazol y tetraciclina (Tabla 1), lo que sugiere la amplia distribución de un clon resistente y que trimetoprima-sulfametoxazol no debe ser considerado un tratamien-

to apropiado para la shigellosis en Cuba. Ya se han encontrado altos porcentajes de resistencia a los antimicrobianos de primera línea (10). Se detectaron ocho perfiles plasmídicos diferentes. Cada perfil portaba entre cuatro y siete plásmidos (Fig. 1, Tabla 1). El ID fue de 0,80, demostrando que es una técnica útil para ser utilizada como marcador epidemiológico, aunque debemos tener en cuenta que los plásmidos pueden ser perdidos o adquiridos por las bacterias. Las *Shigellas* son conocidas por portar muchos plásmidos, y varios estudios indican que hasta el 73% son transferibles (11). La ribotipificación mostró tres perfiles diferentes, con un pobre poder de discriminación (Fig. 2, Tabla

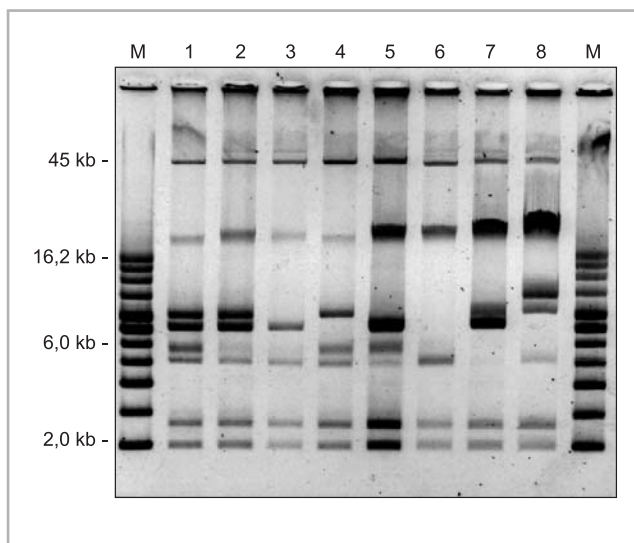


Figura 1. Perfil plasmídico de las cepas de *S. sonnei*. Línea M: marcador de peso molecular, *Supercoiled DNA ladder* (GIBCO-BRL, Invitrogen, España). Líneas 1-8: perfiles plasmídicos.

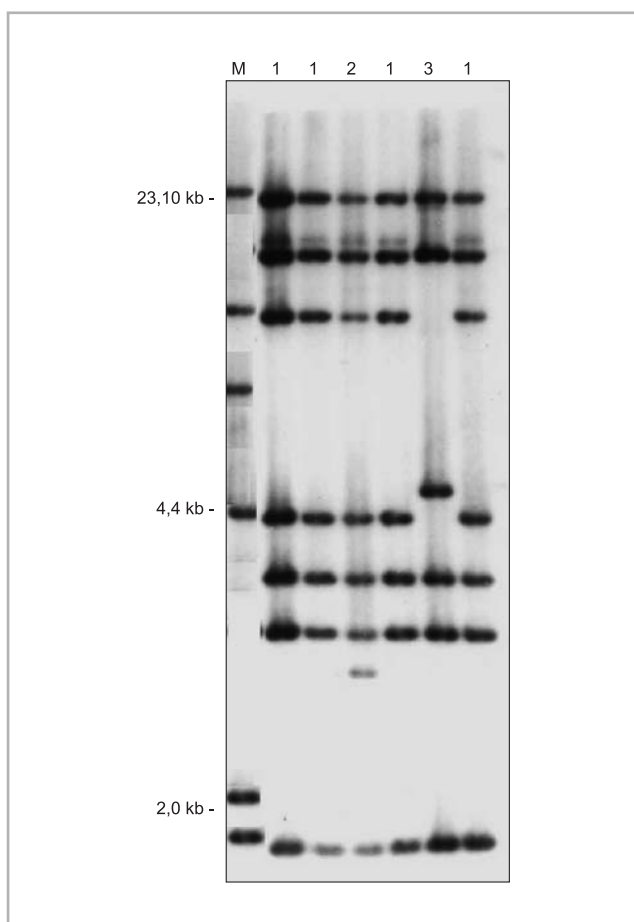


Figura 2. Patrones ribosómicos en *S. sonnei* utilizando *HindIII*. Línea M: marcador de peso molecular con DNA cortado con *HindIII* y marcado con digoxigenina (Roche Diagnostic S.L., España). Líneas 1, 2 y 3: ribotipos/*HindIII*.

1). El ID para esta técnica fue de 0,13, similar al de otros estudios que exponen las limitaciones de la ribotipificación (3). Según nuestros resultados, concluimos que la combinación de varios métodos permite una mejor caracterización de las cepas, y en futuros estudios con *S. sonnei* recomendamos el uso de AFLP o PFGE.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella*, Servicio de Bacteriología, Instituto de Salud Carlos III, y al Dr. Joaquim Ruiz del Centro de Salud Internacional, Hospital Clínic, Barcelona.

Correspondencia: Roberto Cabrera, Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, España. Tel.: +34 93 227 55 22. Fax: +34 93 227 93 72. E-mail: rccabreraortega@yahoo.es

BIBLIOGRAFÍA

- Litwin, C.M., Leonard, R.B., Carroll, K.C., Drummond, W.K., Pavia, A.T. *Characterization of endemic strains of Shigella sonnei* by use of plasmid DNA analysis and pulsed-field gel electrophoresis to detect patterns of transmission. *J Infect Dis* 1997; 175: 864-870.
- Navia, M.M., Capitano L., Ruiz, J. y cols. *Typing and characterization of mechanisms of resistance of Shigella spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3113-3117.
- Herrera, S., Cabrera, R., Ramírez, M.M., Usera, M.A., Echeíta, M. *Use of AFLP, plasmid typing and phenotyping in a comparative study to asses genetic diversity of Shigella flexneri strains*. *Epidemiol Infect* 2002; 129: 445-450.
- Gericke, B., Liesegang, A., Reissbrodt, R. *Analysis of a foodborne Shigella sonnei outbreak in Northern Europe by conventional and molecular methods*. *Med Microbiol Lett* 1995; 4: 165-172.
- Mendoza, M.C., Martín, M.C., González-Hevia, M.A. *Usefulness of ribotyping in a molecular epidemiology study of shigellosis*. *Epidemiol Infect* 1996; 116: 127-135.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris J.C., Turck, M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-496.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Approved standard M100-S13, 9th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne (PA) 2003.
- Kado, C.I., Liu, S.T. *Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids*. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365-1373.
- Hermans, P.W., Sluijter, M., Hoogenboezem, T., Heersma, H., Van-Belkum, A., De Groot, R. *Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of Streptococcus pneumoniae strains*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1606-1612.
- Replogle, M.L., Fleming, D.W., Cieslak, P.R. *Emergence of antimicrobial-resistant shigellosis in Oregon*. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 515-519.
- Lima, A.A., Sidrim, J.J., Lima, N.L., Titlow, W., Evans, M.E., Greenberg, R.N. *Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant Shigella flexneri in Fortaleza, Brazil*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1061-1065.