



INFORME BREVE

## Brote de shigelosis en la ciudad de Luján, Argentina



Anabella Della Gaspera<sup>a</sup>, María I. Caffer<sup>a</sup>, Marcela Panagópulo<sup>a</sup>,  
María R. Viñas<sup>a</sup>, Hebe A. Barrios<sup>b</sup>, Silvia S. Viora<sup>b</sup> y Ricardo J. Anselmo<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio Enterobacterias INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán», Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 15 de octubre de 2014; aceptado el 13 de febrero de 2015

Disponible en Internet el 27 de mayo de 2015

### PALABRAS CLAVE

Shigelosis;  
*Shigella sonnei*;  
Brote

### KEYWORDS

Shigelosis;  
*Shigella sonnei*;  
Outbreak

**Resumen** El objetivo del estudio fue describir un brote por *Shigella sonnei* ocurrido en julio de 2012 en Luján, Buenos Aires, Argentina. Estuvieron afectadas 5 personas que asistieron a una reunión familiar, donde consumieron una rosca vienesa de elaboración artesanal adquirida en un comercio. Todos presentaron fiebre, dolores articulares, escalofríos y diarrea no sanguinolenta con mucus. Se realizaron coprocultivos en los afectados y análisis microbiológicos de los ingredientes. Se aisló y caracterizó *S. sonnei* de todos los pacientes y de la crema de almendras empleada en la preparación de la rosca vienesa. A los aislamientos se les determinó el perfil de sensibilidad a los antimicrobianos y el genético por electroforesis en campo pulsado. Los resultados demostraron la relación genética de los aislamientos, y esto confirmó la ocurrencia de los casos por exposición a una misma fuente de infección, la crema de almendras. Al ser un ingrediente industrial, de improbable contaminación inicial, la crema de almendras podría haber sufrido una contaminación durante la manipulación en la panadería.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Shigelosis outbreak in the city of Lujan, Argentina

**Abstract** The aim of this study was to describe an outbreak of *Shigella sonnei* that occurred in the city of Lujan, Buenos Aires, Argentina, in July 2012. Five individuals were affected after eating a handmade Viennese-style pastry at a family gathering. All of them presented with fever, joint pain, chills and non-bloody diarrhea containing mucus. Stool cultures were performed in all cases and the samples taken from the pastry ingredients were analyzed microbiologically. *S. sonnei* was isolated and identified in all the patients involved as well as in the almond cream filling. The isolates were analyzed for determining the antimicrobial susceptibility and genetic profiles by *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE). The results showed the

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [anselmoricardo@gmail.com](mailto:anselmoricardo@gmail.com) (R.J. Anselmo).

genetic relationship among the isolates, confirming that the cases occurred due to the patients' exposure to the same source of infection, i.e., the almond cream. Being the almond cream an industrially-manufactured ingredient, an initial contamination could have been unlikely; however contamination might have occurred as a result of manipulation in the bakery.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Las especies de *Shigella* son una de las mayores causas de diarrea y disentería a nivel mundial. También son responsables de una significativa morbilidad en los países en vías de desarrollo<sup>2,5</sup>.

La Organización Mundial de la Salud estimó que más de 5 millones de niños en países en vías de desarrollo mueren debido a enfermedades diarreicas y 1,1 millón de dichas muertes se deben a infecciones por *Shigella* spp.<sup>9,14</sup>. En la mayoría de los casos (69%), los episodios acontecen en niños menores de 5 años<sup>8</sup>. La gran diseminación de microorganismos como *Shigella* y otros patógenos entéricos se atribuye a condiciones deficientes de salubridad e higiene personal.

El género está constituido por 4 serogrupos: A o *S. dysenteriae*, que incluye 15 serotipos; B o *S. flexneri*, que incluye 8 serotipos; C o *S. boydii*, con 20 serotipos y D o *S. sonnei*, que contiene un único serotipo y que se puede presentar de 2 formas: la forma I (lisa) y la forma II (rugosa)<sup>4</sup>.

Aunque en países del primer mundo la shigelosis se observa de manera esporádica y habitualmente resulta de la transmisión fecal-oral de persona a persona, a través de las manos y asociada a la mala higiene personal, se han registrado brotes ocasionales relacionados con la ingestión de agua o alimentos contaminados en instituciones cerradas, como geriátricos, psiquiátricos o guarderías infantiles<sup>6,10</sup>.

En Latinoamérica, la shigelosis es responsable del 8 al 12% de los episodios de diarrea y del 50% de los casos de diarrea disintérica que requieren hospitalización<sup>6</sup>. De esta patología endémica en Latinoamérica se han descrito numerosos brotes en esta parte del continente<sup>6,7</sup>.

El objetivo de este trabajo es describir un brote de gastroenteritis por *S. sonnei* ocurrido en julio de 2012 en la ciudad de Luján, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Este brote tuvo lugar tras una reunión familiar a la que concurren 5 personas (edades entre 50 y 70 años), que consumieron una rosca vienesa de fabricación artesanal elaborada en una panadería de dicha localidad, acompañándola exclusivamente por una infusión de té negro.

Todos los afectados manifestaron los siguientes síntomas: fiebre, dolores articulares, escalofríos y diarrea no sanguinolenta con mucus; en 2 de los pacientes los síntomas se presentaron al cabo de 12 h de la ingesta; en el resto, a las 72 h.

Se utilizó un hisopo estéril de algodón para recoger el material mucoso de las heces en el período agudo de la enfermedad, y las muestras se procesaron dentro de las 2 h de haber sido tomadas<sup>13</sup>.

Fueron inoculadas en placas de agar MacConkey e incubadas a 37 °C durante 18 a 24 h, en condiciones aeróbicas. Toda colonia sospechosa de ser *Shigella* spp. se identificó mediante coloración de Gram; prueba de oxidasa; cultivo en agar hierro 3 azúcares (TSI), agar lisina hierro (LIA) y medio SIM; y pruebas de rojo de metilo, Voges-Proskauer, citrato de Simmons y urea.

Los bacilos gram negativos; oxidasa negativos; TSI-K/A, LIA-K/A y sulfuro de hidrógeno negativos; inmóviles; rojo de metilo positivos; Voges-Proskauer negativos; citrato de Simmons negativos e hidrólisis de urea negativos se sometieron a pruebas bioquímicas complementarias: acetato de sodio, mucato de sodio, medios con arginina, ornitina y control y ensayo de  $\beta$ -galactosidasa (ONPG)<sup>13</sup>. Se seleccionaron los cultivos acetato, mucato y arginina deshidrolasa negativos, ornitina descarboxilasa y ONPG positivos o negativos.

Simultáneamente se estudió la presencia del microorganismo causal en muestras de la crema de almendras y la pasta de cobertura (*fondant*) utilizadas como ingredientes de la rosca vienesa artesanal, que había sido elaborada en una panadería de la ciudad de Luján. Las muestras fueron provistas por los propietarios de dicho comercio a las 72 h de haber ocurrido el brote y fueron procesadas dentro de las 2 h. No fue posible investigar la presencia del organismo causal en el producto final, por carecerse de muestra.

Se realizaron enriquecimientos de 25 g de las muestras en 225 ml de caldo *Shigella* con 0,5  $\mu$ g/ml de novobiocina y aislamiento en agar MacConkey, agar xilosa-lisina-desoxicolato y agar Hektoen. Se procedió a la identificación bioquímica de las colonias morfológicamente compatibles con *Shigella* spp.<sup>3</sup>.

Paralelamente se efectuaron aislamientos por agotamiento a partir de la dilución 1/10 de las muestras (25 g/225 ml de agua peptonada al 0,1%) en placas de Petri de 15 x 150 mm que contenían 60 ml de agar tripticosa de soja complementado con 5 g/l de extracto de levadura. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Toda colonia desarrollada tanto a las 24 h como a las 48 h se replicó a medio SIM. Este medio diferencial se incubó a 37 °C durante 24 h. Todas las colonias inmóviles se reaislaron en agar MacConkey, y las que fueron lactosa negativas se identificaron mediante las pruebas bioquímicas ya mencionadas.

El perfil de sensibilidad a los antimicrobianos se determinó mediante el método de difusión en agar con discos, según las normas CLSI, en la totalidad de los aislamientos que por sus características bioquímicas se correspondían con *Shigella* spp. Los antibióticos ensayados fueron

Dice (Opt: 1,50%) (Tol 1,5%-1,5%) (H > 0,0% S > 0,0%) [0,0%-100,0%]  
PFGE PFGE-XbaI



**Figura 1** Dendrograma de relación genética correspondiente a los aislamientos de *Shigella sonnei* de origen humano y alimento corridos con *XbaI*.

ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), furazolidona (50 µg), cefotaxima (30 µg) y trimetoprima-sulfametoxazol (25 µg).

Los aislamientos obtenidos se remitieron al Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán» (Buenos Aires, Argentina) para su identificación antigénica y el estudio de su perfil genético por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, *pulsed field gel electrophoresis*). Luego estos perfiles se compararon con los existentes en la Base de Datos Nacional (BDN). Se utilizó el protocolo estandarizado de PulseNet para *S. sonnei*<sup>12</sup>. La BDN se creó utilizando dicho protocolo con el uso de un estándar universal (*Salmonella enterica* serovar Braenderup) para la normalización de geles en el marco de la Red PulseNet. Brevemente, el ADN bacteriano fue incrustado en *plugs* de agarosa y digerido con la enzima de digestión primaria *XbaI*, los fragmentos generados se separaron por electroforesis con pulsos de 2,54 a 54s. La relación genética entre los aislamientos que mostraron 100% de similitud por PFGE se confirmó con una segunda enzima, *BlnI*. Los resultados se analizaron utilizando el programa BioNumerics (Applied Maths) y los dendrogramas se construyeron aplicando el coeficiente DICE y UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), con una tolerancia de posición de banda de 1,5% establecida por PulseNet.

Los 7 aislamientos recuperados (5 de enfermos y 2 de la crema de almendras) se identificaron como *S. sonnei*.

Como ya se indicó, no fue posible investigar la presencia de esta enterobacteria mediante la metodología estandarizada a partir del alimento consumido, pero mediante el

plaqueo en agar tripticasa de soja-extracto de levadura, de 20 colonias repicadas a medio SIM, 3 correspondieron a *S. sonnei*.

La totalidad de los aislamientos presentaron un perfil de sensibilidad a los antimicrobianos idéntico; todos resultaron ser sensibles a los siguientes antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, furazolidona y cefotaxima. Asimismo, mostraron resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol.

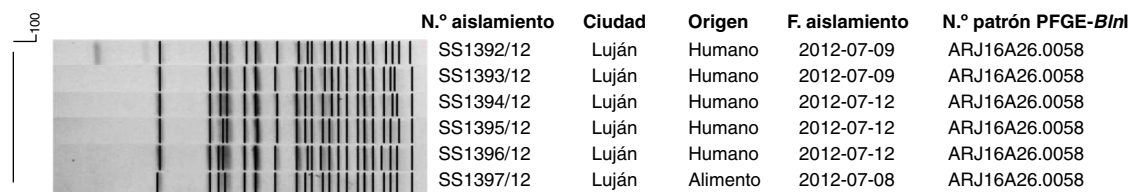
Para establecer la relación genética entre los aislamientos obtenidos de los afectados y de la crema de almendras, se realizó el estudio por PFGE con las enzimas *XbaI* y *BlnI*.

En el análisis con la enzima primaria *XbaI* se observó un único subtipo genético predominante: el patrón ARJ16X01.0370, que incluyó todos los aislamientos, es decir, tanto los humanos como los provenientes del ingrediente contaminado (fig. 1).

El análisis con la enzima secundaria *BlnI* confirmó los resultados obtenidos con *XbaI*, ya que también se observó un único subtipo genético con dicha enzima, al que se denominó patrón ARJ16A26.0058 y que incluyó todos los aislamientos, esto es, tanto los recuperados de los pacientes como los provenientes del ingrediente contaminado (fig. 2).

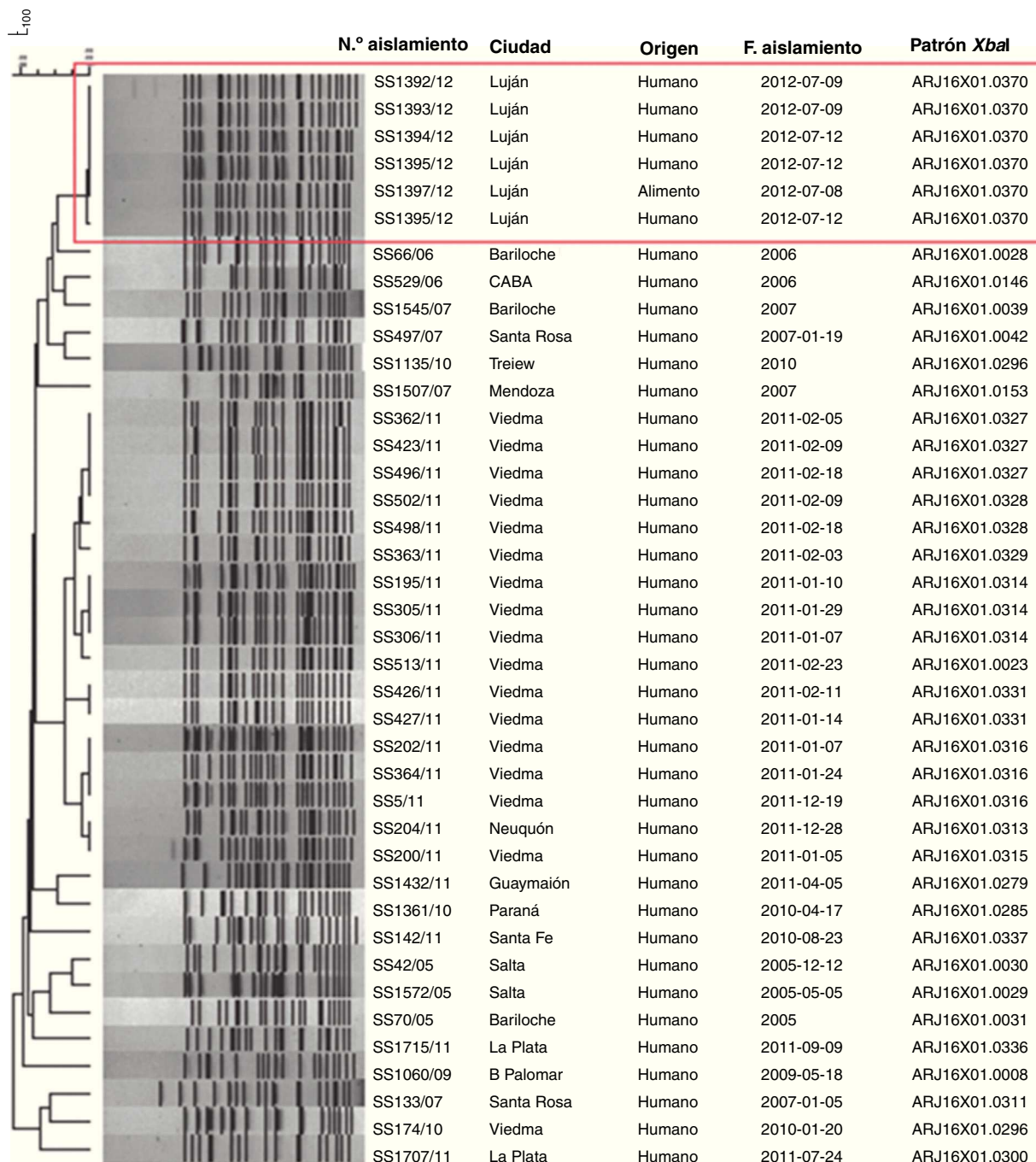
Los patrones de PFGE-*XbaI* de los aislamientos del brote estudiado en la ciudad de Luján fueron comparados con los correspondientes a aislamientos de *S. sonnei* ingresados en la BDN del Laboratorio Nacional de Referencia. Estos provienen de casos esporádicos y de brotes ocurridos en el país, con un total de 823 aislamientos de *S. sonnei* ingresados y 369 perfiles genéticos determinados con esta enzima primaria. El subtipo genético del brote estudiado no mostró

Dice (Opt: 1,50%) (Tol 1,5%-1,5%) (H > 0,0% S > 0,0%) [0,0%-100,0%]  
PFGE PFGE-BlnI



**Figura 2** Dendrograma de relación genética correspondiente a los aislamientos de *Shigella sonnei* de origen humano y del alimento corridos con *BlnI*.

Dice (Opt: 1,50%) (Tol 1,5%-1,5%) (H > 0,0% S > 0,0%) [0,0%-100,0%]  
 PFGE-XbaI PFGE-XbaI



**Figura 3** Dendrograma de relación genética de aislamientos de *Shigella sonnei* recuperados en diferentes provincias de Argentina, 2002-2012. PFGE con XbaI. Aislamientos de *S. sonnei* de Luján en la BDR.

relación genética con aislamientos previamente identificados en la BDN, de modo que corresponde a un nuevo patrón ingresado a dicha base (fig. 3).

Diversas investigaciones han demostrado que la shigelosis es única entre las enfermedades causadas por enteropatógenos bacterianos, en el sentido de que menos de 200 células viables producen fácilmente la enfermedad<sup>14</sup>. Esta baja dosis infectiva de microorganismos necesarios para

producir enfermedad explica la frecuencia de la transmisión persona a persona<sup>6,10</sup>.

El modo de transmisión de *Shigella* spp. es frecuentemente a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados, así como el contacto persona a persona<sup>15</sup>. En este caso particular, no fue posible la recuperación del patógeno a través de la norma ISO. Esto puede deberse a que cuando se cultivan en los medios de cultivo convencionales,



que son diseñados mayormente para muestras clínicas, un gran número de células microbianas ambientales permanece en un estado viable pero no cultivable. Esto significa que aunque las células están viables, no pueden crecer ni multiplicarse en los medios de cultivo tradicionales, pero serán capaces de desarrollarse cuando se introduzcan en el intestino humano<sup>11</sup>.

Tanto *Salmonella enterica* serovar Enteritidis como *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enteropatógena pueden hallarse en un estado viable pero no cultivable, causado por factores ambientales o de procesamiento<sup>1</sup>. Por este motivo, una gran proporción de células no se recuperará en los medios de cultivo selectivos habitualmente utilizados. Dando condiciones de crecimiento más favorables y utilizando medios de cultivo ricos o no selectivos se facilitaría el desarrollo de una gran parte de esta población viable pero no cultivable. Este concepto fue corroborado mediante el resultado de recuperación de *S. sonnei*, obtenido a través del plaqueo directo en agar tripticasa de soja-extracto de levadura, y aunque esta metodología sería más laboriosa, con ella se llegaría a lograr el objetivo buscado.

Además, una de las diferencias entre una muestra alimenticia o ambiental y un espécimen fecal de un enfermo de shigelosis es la carga inicial del agente causal. En las muestras de origen alimentario o ambiental predominan los microorganismos competitivos (por ejemplo, los coliformes, *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp., entre otros) sobre el agente patógeno, que es más lábil en estos tipos de muestras por las condiciones a las que ha sido sometido el producto. En los especímenes clínicos ocurre lo contrario; por lo tanto, al realizarse el habitual aislamiento por agotamiento en los medios selectivos y diferenciales en estos tipos de muestra seguramente se aislará *Shigella* spp. En cambio, en las muestras alimentarias, al ser *Shigella* spp. la que se encuentra en menor número y más injuriada, resulta más difícil recuperarla por los métodos estandarizados.

Cabe destacar que en este estudio, al no contar con el alimento sospechado (por haber sido consumido en su totalidad), se buscó la presencia de esta enterobacteria en los productos utilizados para su elaboración, que fueron provistos por el establecimiento elaborador.

Los aislamientos obtenidos tanto de enfermos como de la crema de almendras correspondieron a *S. sonnei*. Además, la totalidad presentó idénticos perfiles genéticos y de sensibilidad a los antimicrobianos, lo que pone en evidencia a la crema de almendras como la fuente de infección por el microorganismo.

Los resultados obtenidos en el estudio por PFGE demostraron la relación genética de los aislamientos de *S. sonnei* (de origen humano y del proveniente del alimento sospechoso) asociados al brote familiar en estudio, y confirman la ocurrencia de los casos por la exposición de los pacientes a una misma fuente de infección que, en este caso, fue la crema de almendras.

El ingrediente alimentario contaminado, la crema de almendras, era de elaboración industrial, por lo que es muy improbable que se hallara inicialmente contaminado con *S. sonnei*, ya que estaba en un envase herméticamente cerrado y, debido a su baja actividad acuosa, sería muy rara una subsistencia prolongada de esta enterobacteria, tan lábil a condiciones adversas. De modo que lo más probable es que la contaminación haya tenido

lugar durante la manipulación de este ingrediente en la panadería.

Cabe destacar la importancia de una correcta higiene de manos, así como un tratamiento térmico suficiente para destruir al organismo causal. Esta última premisa se sustenta en lo referido por las personas involucradas en el brote, quienes acotaron que se trataba de una rosca rellena con pasta de almendras y que resultaba evidente la falta de cocción del ingrediente en cuestión.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Luján y al Departamento de Ciencias Básicas, por el apoyo recibido para la ejecución del proyecto. A todos los integrantes del Servicio Enterobacterias, Departamento Bacteriología, del INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán», por su valiosa contribución en la realización de este trabajo.

## Bibliografía

- Adesioye FA, Ogunjobi AA. Comparative study of persistence of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Shigella* sp. in different water samples stored under various storage conditions. *World Appl Sci J.* 2013;26:181–8.
- Ahmed J, Kundu M. Molecular characterization of SHV-11  $\beta$ -lactamase of *Shigella dysenteriae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2081–3.
- BS EN ISO 21567: 2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Shigella* spp. ISBN 0580448037.
- Coimbra RS, Lenormand P, Grimont F, Bouvet P, Matsushita S, Grimont PAD. Molecular and phenotypic characterization of potentially new *Shigella dysenteriae* serotype. *J Clin Microbiol.* 2001;39:618–21.
- Fortineuu N, Nass T, Gaillot O, Nordmann P. SHV-type extended spectrum  $\beta$ -lactamase in a *Shigella flexneri* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47:685–8.
- Gutiérrez Castellón P, Polanco Allué I, Salazar Lindo E. Manejo de la gastroenteritis aguda en menores de 5 años: un enfoque basado en la evidencia. *Guía de práctica clínica ibero-latinoamericana.* *An Pediatr (Barc).* 2010;72:220, e1-220.e20.
- Hernández Cortez C, Aguilera Arreola MG, Castro Escarpulli G. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol.* 2011;31:137–51.

8. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ. Global burden of *Shigella* infections: Implications for vaccine development and implementation of control strategies. *WHO Bulletin*. 1999;77:651–66.
9. Mengistu G, Mulugeta G, Lema T, Aseffa A. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella* serovars and *Shigella* species. *J Microb Biochem Technol*. 2014;52:006, <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.S2-006>.
10. Merino LA, Hrenuk GE, Ronconi MC, Alonso JM. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp. en el nordeste argentino. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;15:219–24.
11. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*. 2005;43:93–100.
12. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3:59–67.
13. Terragno R, Caffer MI, Binsztein N. Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Shigella* spp. Departamento Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur; 2007.
14. World Health Organization. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2005 [Online; consultado 9 Sep 2014]. Disponible en: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241592330.pdf>.
15. Wose Kinge C, Mbewe M. Characterization of *Shigella* species isolated from catchments in the North West Province of South Africa. *S Afr J Sci*. 2010;106:1–4.