

El género *Shigella* (Familia: *Enterobacteriaceae*) está compuesto por cuatro especies: *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella dysenteriae*. Todas poseen capacidad patógena, causando enteritis invasora caracterizada por producir dolor abdominal cólico, diarrea y fiebre. La afectación colónica da lugar a una reacción inflamatoria intensa con moco y pus, pudiendo formarse úlceras sangrantes, por lo que las deposiciones son, característicamente, de pequeño volumen y pueden ir acompañadas de moco y sangre dando lugar, en conjunto, al cuadro denominado disentería bacilar. *S. dysenteriae* es la especie que suele producir cuadros clínicos más graves.

Las shigelas tienen como único reservorio al hombre y su dosis infectante mínima es pequeña, lo que permite su transmisión no sólo a través de los alimentos, sino también a través del agua y por contacto directo entre niños en las guarderías. Sin embargo, como todos los microorganismos de transmisión fecal-oral cuyo único reservorio es humano (shigelas y *Salmonella bioser Typhi*), pueden llegar a erradicarse con medidas de higiene personal y ambiental. De hecho, las tres especies autóctonas de nuestro país *S. sonnei*, *S. flexneri* y *S. boydii*, afortunadamente, se observan con muy poca frecuencia, llegando a resultar ya excepcionales en algunas zonas. Sin embargo, no es infrecuente detectar cualquiera de las cuatro especies como agente causal de diarrea del viajero o en inmigrantes de países donde la shigelosis es endémica.

Es interesante destacar que tanto *Shigella* como *Yersinia enterocolitica*, bacterias patógenas invasoras, han sido tomadas como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares de invasión, lo que ha permitido conocer los procesos que les inducen a atravesar activamente la mucosa intestinal intacta. Curiosamente, *Shigella*, el ejemplo de bacteria invasora, alcanza la submucosa del colon y es capaz de ulcerar esos tejidos, pero sólo produce bacteriemia en casos absolutamente excepcionales.

Para el estudio microbiológico, las heces deben recogerse, si es posible, en un volumen significativo (4-5 ml si son líquidas; una porción del tamaño de una nuez si son pastosas) mediante una cucharilla o espátula y depositarlas en un frasco limpio con cierre hermético. Si resulta imposible porque el paciente no puede producir muestra en un momento crítico, o no puede movilizarse, o por otra razón, se tomará una muestra mediante escobillado rectal, asegurándose que se recoge un mínimo de materia fecal.

Las shigelas, campilobacter, *C. difficile* y los trofozoítos de los protozoos son muy lábiles a diversos agentes físicos y químicos, por lo que las muestras de heces deben procesarse antes de dos horas o incorporarse a diversos medios de transporte, según los estudios a realizar. Los escobillones, para evitar la desecación, siempre deben incluirse en un medio de transporte, que generalmente incorporan. En la tabla 1 se propone un esquema para el transporte de las heces.

El examen directo (tinción de Gram) no aporta información adicional en las enteritis bacterianas, excepto en las causadas por campilobacterias, que pueden observarse en la mitad de los casos en que se recuperarán por cultivo. La observación de las heces en fresco, teñidas con azul de metileno o fijadas por la solución de mertiolato-yodo-formol (MIF), permite detectar la presencia de leucocitos y hematíes. Estos se observan en alrededor del 40-70% de las enteritis bacterianas invasoras (campilobacter, salmonela, shigela, yersinia, etc.). Tanto el examen directo, como el cultivo deben hacerse, preferentemente, a partir de fragmentos de heces con moco, pus o sangre, si existen.

No existen medios líquidos de enriquecimiento útiles para las shigelas, a pesar de que se ha recomendado el caldo para gramnegativos según Hajna. En nuestra experiencia no se ha demostrado eficaz.

Los diversos medios de cultivo utilizados para la siembra directa poseen diferente capacidad selectiva, e incluso un mismo medio puede variar según el fabricante e incluso el lote. Los medios más utilizados, para el aislamiento de enterobacterias enteropatógenas, de menos a más selectivos (inhibidores), son el agar eosina azul de metileno (EMB), el de Mac Conkey, el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), el de Hektoen, y el agar *Salmonella-Shigella* (SS). Los medios de XLD y Hektoen han sido recomendados específicamente por muchos microbiólogos para el aislamiento de las shigelas. Otros medios, con elevadas concentraciones de verde brillante no son adecuados para el aislamiento de las shigelas (Tabla 2). Por todo lo señalado es recomendable efectuar la siembra directa para el aislamiento de enterobacterias enteropatógenas en un medio poco inhibidor y otro más inhibidor. Nosotros utilizamos el XLD y el SS, pero quizás el factor más importante para conseguir el mayor rendimiento es la experiencia que posee cada bacteriólogo con el medio que utiliza.

Los medios XLD y Hektoen, cuando funcionan correctamente, poseen un soberbio poder diferencial, pero no ha de olvidarse cuando se trabaja con medios con lactosa como sustrato diferencial (Mac Conkey, Hektoen y SS) que las colonias de *S. sonnei*, a las 24 o 48 horas, pueden aparecer como discretamente lactosa positivas y ofrecer al observador dos tipos morfológicos fruto de la segregación espontánea del plásmido de patogenicidad (medianas, prominentes, lisas, de borde regular o grandes aplanadas, estriadas, con bordes irregulares).

Es muy recomendable resembrar las colonias sospechosas simultáneamente en los medios de Kligler (KIA) y agar lisina hierro (LIA). Toda colonia que en estos medios fermenta la glucosa sin producir gas, no utiliza la lactosa, no produce SH<sub>2</sub>, es inmóvil, no descarboxila la lisina ni la desamina (ver LDA, en Tabla 3) es sospechosa de shigela, aunque también puede tratarse de una yersinia (éstas poseen un ureasa muy activa) o de cepas atípicas de *Escherichia coli* lisina negativa (son ONPG e indol positivas), de *Citrobacter diversus* agasógeno (positivo para el citrato de Simmons), de cepas de *Morganella* o *Providencia* atípicas que no

desaminan activamente la lisina ni producen gas (se diferencian por ser fenilalanina positiva), o bien de *Aeromonas caviae* (oxidasa positiva) (Tabla 3).

Según la estrategia adoptada, puede procederse primero a identificar metabólicamente la cepa mediante técnicas estándar (baterías de identificación comerciales o de elaboración propia), o bien aglutinarla directamente a partir del Kligler si la sospecha es elevada según los datos de la tabla 3.

Existen comercializadas mezclas de antisueros frente a las diferentes especies de *Shigella* (las cuales, en realidad, son bioserogrupos de una única geno-especie) debiendo empezarse la aglutinación con los más frecuentes: *S. sonnei*; *S. flexneri*; *S. boydii* y *S. dysenteriae*, por este orden, o según la propia noción epidemiológica. Si la shigela es ONPG positiva, hay que aglutinar con antisuero anti-*S. sonnei* (Tabla 3). Cuando la cepa aglutina con el primer suero utilizado debe vigilarse que no sea autoaglutinable (no debe producirse aglutinación con una gotita de una solución de NaCl al 2%). Si la sospecha de shigela es muy elevada o incluso ha sido confirmada metabólicamente y no aglutina con los antisueros específicos para las shigelas, debe practicarse una suspensión espesa de la bacteria en un tubo de centrifuga con 2-3 ml de suero fisiológico, llevar a baño maría a 100° C durante 15-30 minutos, centrifugar, decantar y aglutinar el sedimento. Si aglutina en estas condiciones, hay que controlar que la cepa no se ha vuelto autoaglutinable.

No existen sondas o métodos de amplificación comercializados (PCR u otros) para la detección de estos microorganismos, aunque si se han descrito procedimientos para desarrollarlos en el propio laboratorio. La mayoría de ellos se basan en la detección o amplificación del gen de virulencia *ial*, común a todas las shigelas y a *E. coli* enteroinvasora. El *locus* detectado se halla en el plásmido de patogenicidad, que puede perderse espontáneamente durante las resiembras, en particular en *S. sonnei*, por lo que este método no se utiliza para la identificación de las cepas de colección.

La aparición de resistencias no es infrecuente, en particular a sulfamidas, cotrimoxazol, ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas, cloranfenicol, ácido nalidíxico y otros, por lo que debe efectuarse siempre antibiograma. Cuando son activos, la amoxicilina, el cotrimoxazol, las fluoroquinolonas y la furazolidona suelen ser muy eficaces.

## BIBLIOGRAFÍA

Dupont H. *Shigella* species (Bacillary dysentery). En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and practice of Infectious Diseases. 4ª ed. Churchill Livingstone, New York 1995, pp 2033-2039.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 6ª ed.: ASM Press, Washington DC 1995.

Le Minor L, Véron M. Bactériologie Médicale. 2ª ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris 1989.

Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4ª ed. Elsevier Science Publishing Co., New York 1986.

Mirelis B, Coll P, López P. Métodos de aislamiento y técnicas de identificación convencionales de las enterobacterias. Laboratorio 1986; 82:233-245.

Prats G, Mirelis B, Ausina V, Lite J, Coll P. Un medio nuevo para el estudio simultáneo de la beta-galactosidasa y la fenilalaninadesaminasa. Laboratorio 1980; 70:443-447.

Prats G, Mirelis B, Ausina V, Pericas R. Identificación presuntiva de bacterias enteropatógenas. Laboratorio 1980; 70:433-442.

Prats G (coordinador). Infecciones intestinales (Número monográfico). Med Integr 1998, 31:217-267.

Gascón J, Vila J, Valls ME, Ruíz L, Vidal J, Corachan M, et al. Etiology of travellers diarrhea in spanish travellers to developing countries. Eur J Epidemiol 1993; 93:217-223.

Schoolnik GK. PCR detection of *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. ASM Press, Washington 1993; pp. 277-281.

Prats G, Llovet T, Muñoz C, Solé R, Mirelis B, Izquierdo C et al. Etiología de las enteritis en un hospital general universitario en Barcelona (1992-1995). Enferm Infecc Microbiol Clin 1997; 15:349-356.

### Tabla 1. Toma de muestras.

#### ● Universal (bacteriología/parasitología/virología)

- Volumen:  
Heces pastosas: 4-6 gramos (tamaño de una nuez). Si son líquidas, 5-10 ml.
- Recipiente:  
Frasco de plástico, limpio, cerrado herméticamente.
- Transporte al laboratorio:  
Rápido. Menos de 2 horas desde la emisión, si se procesa dentro de este tiempo puede mantenerse a temperatura ambiente

Si no se puede transportar la muestra con la rapidez señalada (universal) o sólo se desea realizar un tipo de análisis:

● **Bacteriológico**

- Volumen:  
Heces pastosas: 1-2 gramos. Si son líquidas, 3-5 ml
- Recipiente:  
Frasco conteniendo medio de transporte tipo Cary-Blair modificado PRAS (pH 7,4-8,4)
- Conservación:  
Refrigeración 4-6°C.

Para el estudio de la toxina de *C. difficile* por técnicas inmunológicas, mantener las heces sin conservantes en la nevera, a 4-6°C

● **Parasitológico**

- Volumen:  
Heces pastosas: 1-2 gramos. Si son líquidas, 3-5 ml
- Recipientes:  
Frasco con solución MIF (mertiolato-yodo-formol, existe en el comercio)<sup>a</sup>; también, fijador de alcohol polivinílico (APV)<sup>a</sup>  
Frasco con formol al 10% para estudio de *Cryptosporidium*
- Conservación:  
Temperatura ambiente

● **Viroológico**

- Volumen:  
Heces pastosas 1-2 gramos. Si son líquidas 3-5 ml
- Recipientes:  
Frasco sin medio de transporte
- Conservación:  
Refrigeración 4-6°C

<sup>a</sup>El mertiolato-yodo-formol fija los protozoos y los colorea discretamente, facilitando su observación. El alcohol polivinílico no permite la observación en fresco y las heces fijadas deben teñirse con una tinción permanente.

**Tabla 2. Medios selectivos y de enriquecimiento para enterobacterias**

Medio	Sustancias selectivas	Sistema diferencial	Utilización
Medio con cisteína y lactosa, deficiente en electrolitos (CLED)	Ninguna	Lactosa Azul de bromotimol	Medio diferencial sin actividad selectiva. Permite el crecimiento de todas las enterobacterias. <i>Proteus</i> no invade. Se utiliza para aislamiento general de enterobacterias (orinas y otros productos).
Agar eosina-azul de metileno (EMB)	Eosina Azul de metileno	Lactosa Sacarosa Los colorantes son reveladores del sistema diferencial	Poco inhibidor. Permite el crecimiento de enterobacterias y enterococos. Diferencia <i>E. coli</i> de otras lactosa positivas. Posee gran carácter diferencial para <i>Candida</i> y actinomicetales aerobios.
Agar Mac Conkey	Sales biliares Cristal violeta	Lactosa Rojo neutro	Poco inhibidor. Permite el crecimiento de enterobacterias y enterococo.
Agar xilosa-lisina desoxicolato (XLD)	Desoxicolato sódico	Tiosulfato sódico Citrateo férrico amónico Lisina Xilosa, lactosa, sacarosa	Se utiliza para el aislamiento de shigelas y salmonelas. Posee buen carácter diferencial para estas enterobacterias.
Medio de Hektoen	Sales biliares Desoxicolato sódico	Citrato férrico amónico Tiosulfato sódico Lactosa, sacarosa, salicina Azul de bromotimol Indicador de Andrade	Permite el crecimiento de salmonelas y shigelas.

Agar salmonela-shigela (SS)	Sales biliares Verde brillante Citrato sódico	Tiosulfato sódico Citrato férrico Lactosa, rojo neutro	Permite el crecimiento selectivo de salmonelas, shigelas y yersinias
Agar Verde Brillante	Verde brillante	Lactosa, sacarosa Rojo fenol	Permite el crecimiento de salmonelas.
Medio de Wilson Blair	Verde brillante Sulfito de bismuto	Sulfito ferroso	Está indicado para el aislamiento de <i>S. typhi</i>
Agar cefsulodin-irgasan Novobiocina (CIN)	Desoxicolato Cefsulodin Irgasan Novobiocina Cristal violeta	Manitol Rojo neutro	Es altamente selectivo para <i>Yersinia</i> y <i>Aeromonas</i> .
Caldo selenito (Medio de enriquecimiento)	Selenito sódico		Enriquecimiento de salmonelas.
Caldo tetrionato (Medio de enriquecimiento)	Sales biliares Tetrionato sódico		Enriquecimiento de salmonelas.

**Tabla 3. Identificación presuntiva de las shigelas**

	KIA				LIA		Pruebas complementarias					
	Gluc/gas	Movil	SH <sub>2</sub>	Lactosa	LDC	LDA <sup>(1)</sup>	Ureasa	FDA	Indol	ONPG	Simmons	Oxidasa <sup>(2)</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i> <sup>(3)</sup>	+/-	-a	-	-	-	-	+	-	±	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i> Otras shigelas	+/- +/-4	-	-	-	-	-	-	-	±	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> <sup>(3,5)</sup>	+ / -a	-a	-	-a	-a	-	-	-	+	+	-	-
<i>Citrobacter diversus</i> <sup>(3,6)</sup>	+ / -a	-a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Morganella</i> <sup>(3)</sup> <i>Providencia</i> <sup>(3)</sup>	+ / -a +/-	-a -a	-	-	-	-a -a	+	+	+	-	-	-
<i>Aeromonas caviae</i> <sup>(3)</sup>	+/-	-a	-	-	-	-	-	-	+	±	-	+

KIA: Agar hierro de Kligler. LIA: Agar lisina hierro. Gluc/gas: fermentación de la glucosa/producción de gas. Movil: movilidad. LDC: Lisina descarboxilasa. LDA: Lisina desaminasa. FDA: fenilalanina desaminasa. ONPG: ↓ -galactosidasa.

a: Carácter atípico o variante metabólica, el resto de caracteres son los típicos.

1. Cuando la lisina es desaminada, el pico de flauta del medio LIA vira a rojo teja y cuando no es deaminada permanece violeta.
2. No practicar la reacción de colonias obtenidas a partir de medios con sangre o azúcar, no utilizar asa de nicrom (usar un palillo).
3. Comprobar la movilidad entre porta y cubre a partir de un cultivo en medio líquido incubado a temperatura óptima (*Yersinia* 22°C, resto 37°C) durante 6 horas. Determinar la producción de gas en un tubo de Durham (caldo glucosa con campana invertida incubado 18-24 h). Con estos métodos más sensibles algunas cepas aparentemente inmóviles y agasógenas se detectarán como móviles o productoras de gas, lo que excluye las shigelas. Las pruebas rápidas para el estudio de la fenilalanina (5min) y ureasa (20 min) permiten descartar a *Y. enterocolitica*, *Morganella* y *Providencia*. Las cepas que son simultáneamente ONPG e indol positivos no son shigelas (*E. coli* o *Citrobacter*). Las aeromonas son oxidasa positiva.
4. Excepcionalmente, los serotipos exóticos *S. flexneri* 6, *S. boydii* 13 y 14, y *S. dysenteriae* 3 son gasógenos.
5. Algunas cepas de *E. coli* son enteroinvasoras como las shigelas y pueden ser agasógenas y LDC negativas e incluso presentar reacciones serológicas cruzadas con las shigelas. Su identificación en centros no especializados es difícil; se hace mediante la prueba de Sèreny, o el estudio de la invasión de las células Hela o mediante marcadores genéticos (PCR del locus *ia*).
6. Muchas cepas producen olor fétido, semejante al de *Citrobacter freundii*