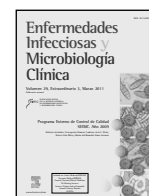




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Gastroenteritis invasivas, ¿algo nuevo?

M. Aurora Echeita Sarrionandia*, Silvia Herrera León y Cristina Simón Baamonde

Laboratorio de Enterobacterias, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

Palabras clave:

Salmonella
Variantes monofásicas
Línea clonal
Shigella
Escherichia coli
Enteroinvasividad

Keywords:

Salmonella
Monophasic-variant
Clonal-lineage
Shigella
Escherichia coli
Enteroinvasiveness

RESUMEN

Las gastroenteritis invasivas se caracterizan por manifestar fiebre y diarrea inflamatoria. A este grupo pertenecen, entre otros, *Salmonella* spp. de los serotipos no tifoideos y el grupo *Shigella-Escherichia coli* enteroinvasivo (ECEI). Esta revisión describe variantes emergentes monofásicas de *Salmonella enterica*, serotipo 1,4,[5],12:i:-, y la consideración evolutiva de *Shigella*-ECEI como un único patotipo.

En 1997 aparece en España una variante monofásica de *S. enterica* serotipo 1,4,5,12:i:-, fagotipo U302, multirresistente (ACGSSuTSxT), carente del operon *fljBA*, que constituye una línea clonal "española". Posteriormente se detectan en Italia cepas de *S. 4,[5],12:i:-* de diferentes fagotipos, con una nueva isla genómica de resistencia (ASSuT), que serían parte de una línea clonal probablemente europea. Finalmente se describe la línea clonal "americana", con una delección de *fljBA* diferente de la española. Por lo tanto, seguramente por convergencia evolutiva, han emergido en el mundo distintas líneas clonales de *Salmonella 4,[5],12:i:-*, que pueden transportar genes de resistencia en el cromosoma o en plásmidos, cuyo ancestro sería *Salmonella Typhimurium*.

Shigella pertenece a la especie *E. coli* y es la causa de disentería bacilar, considerándose clásicamente como género, a pesar de la inconsistencia biológica que supone. ECEI comparte con *Shigella* mecanismos de virulencia y cuadro clínico. Ambos carecen de algunos genes metabólicos y poseen plásmidos de invasión similares. *Shigella* spp. y ECEI han evolucionado desde líneas clonales independientes de *E. coli*, por adquisición horizontal de factores de virulencia formando un único patotipo. La detección del gen *ipaH* es una alternativa para atribuir a las cepas bioquímicamente compatibles con *Shigella* spp. pero no aglutinables, el correspondiente papel patógeno.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Invasive gastroenteritis, anything new?

ABSTRACT

Invasive gastroenteritis is characterized by fever and inflammatory diarrhea and can be caused by nontyphoidal *Salmonella* serotypes and *Shigella* spp.-enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), among other pathogens. This review describes emerging monophasic variants of *Salmonella enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- and provides an evolutionary consideration of *Shigella* spp.-EIEC as a single pathotype.

In 1997, a monophasic variant of *S. enterica* serotype 1,4,[5],12:i:-, phage-type U302, multidrug resistant (ACGSSuTSxT), lacking the *fljBA* operon, appeared in Spain constituting a "Spanish" clonal line. Subsequently, strains of *S. 4,[5],12:i:-*, of different phage types with a new resistance genomic island (ASSuT) were detected in Italy, forming part of a European clonal line. Finally, an "American" clonal line with a deletion of *fljBA* different from the Spanish clonal line appeared. Therefore, probably by convergent evolution, different clonal lines of *Salmonella 1,4,[5],12:i:-*, which can carry resistance genes on chromosomes or plasmids, with *Salmonella Typhimurium* as ancestor, have emerged in the world.

Although *Shigella* belongs to the *E. coli* species and despite the biological inconsistency involved, this genus has traditionally been considered to cause bacillary dysentery. The EIEC group shares virulence mechanisms and clinical manifestations with *Shigella*. Both lack some metabolic genes and harbor similar plasmids of invasion. *Shigella* spp. and EIEC evolved from independent clonal lines of *E. coli*, by horizontal acquisition of virulence factors, forming a single pathotype. *IpaH* gene detection is an alternative to attribute the corresponding pathogenic role to non-agglutinable strains that are biochemically compatible with *Shigella* spp.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aecheita@isci.es (M.A. Echeita Sarrionandia).

Introducción

Las infecciones entéricas causadas por bacterias, virus y parásitos son un importante problema de salud pública. La infección se transmite a través de los alimentos o del agua de bebida contaminados o por transmisión persona-persona, como resultado de la falta de medidas higiénicas adecuadas. La diarrea es el principal síntoma de las infecciones entéricas y es responsable de la muerte de unos 2 millones de niños cada año, situándose como la tercera causa de muerte por enfermedad infecciosa en el mundo (<http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>). Entre los principales enteropatógenos bacterianos estarían *Vibrio cholerae*, responsable del cólera, una gran variedad de serotipos de *Salmonella* spp., incluyendo *Salmonella enterica* serotipo Typhi (productora de fiebre tifoidea), *Shigella* spp., el agente causal de la disentería bacilar, *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli*, de varios grupos diarrea-génicos.

Frente a esta variedad de microorganismos se observa que la respuesta del hospedador es a menudo común para un grupo de patógenos en lugar de específica de cada patógeno individual, lo que sugiere que algunos patógenos comparten importantes características básicas.

Las infecciones entéricas bacterianas, aunque pueden tener muchas causas, manifiestan alguno de los 3 síndromes clínicos principales: a) diarrea secretora sin fiebre ni leucocitos fecales, cuyo ejemplo clásico es la causada por *V. cholerae* productor de toxina colérica; b) fiebres entéricas con dolor abdominal y una inflamación intersticial similar a la producida por las infecciones virales, siendo las principales bacterias productoras de fiebres entéricas *Salmonella* serotipo Typhi, *Yersinia* spp. enteropatógena y *Brucella* spp., y c) las gastroenteritis invasivas con diarrea inflamatoria, fiebre y presencia de numerosos leucocitos, principalmente neutrófilos^{1,2}. En estos casos, los patógenos son altamente invasivos, siendo su principal factor de virulencia el sistema de secreción tipo III (TTSS), que permite a las bacterias secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera eucariótica. A este tercer grupo de bacterias pertenece *Salmonella* spp. de los serotipos no tifoideos, *Shigella* spp., *E. coli* enteroinvasivo (ECEI) y *Campylobacter jejuni*^{3,4}.

En la era genómica, la epidemiología molecular ha puesto al alcance de los microbiólogos la posibilidad de entender no sólo los mecanismos de patogenicidad, sino también de detectar, identificar y tipificar clones persistentes, más virulentos y/o emergentes y así elaborar estrategias de control encaminadas a disminuir la carga de estas enfermedades. Esta revisión se centra en algunos aspectos interesantes relacionados con 2 de los principales patógenos enteroinvasivos, *Salmonella* spp. y el grupo diarrea-génico formado por *Shigella* spp.-*E. coli* enteroinvasivo.

Variantes monofásicas de *Salmonella enterica*, serotipo 1,4,[5],12:i:-, un problema emergente global

A pesar del conocimiento que se tiene del poder patógeno de *Salmonella* spp., esta bacteria continúa siendo una importante causa de mortalidad y morbilidad en adultos y en niños en el mundo. En España, y en muchos otros países, *Salmonella* y *Campylobacter* son los 2 patógenos más importantes productores de toxiinfecciones alimentarias de origen bacteriano.

Según la clasificación actual⁵, el género *Salmonella* consta de 2 especies reconocidas, *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* se divide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtanae* (IV) e *indica* (VI)⁶. Las salmonellas de la subespecie I se aíslan principalmente del hombre, de animales de sangre caliente y de aves, mientras que las de las otras subespecies se encuentran más frecuentemente en animales de sangre fría y en el ambiente^{7,8}.

La serotipificación es el primer método de tipificación utilizado para comprender la epidemiología de esta bacteria. Las especies y

subespecies de *Salmonella* se pueden diferenciar en más de 2.500 serotipos, según el esquema de Kauffmann-White (K-W) (http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_en.pdf)⁹, basado en la caracterización de los antígenos somáticos "O" de la pared bacteriana, de los antígenos flagelares "H" y en algunos casos, como en el serotipo Typhi, del antígeno capsular de virulencia "Vi". La mayoría de las salmonellas son móviles por medio de 2 tipos diferentes de flagelos, denominados de fase 1 y fase 2, cuyas flagelinas vienen expresadas por los genes *fliC* y *fliB*, respectivamente. La expresión alternante en una misma bacteria de *fliC* y *fliB* se regula a través de un mecanismo de "cambio de fase"¹⁰. Sin embargo, algunos serotipos son monofásicos, es decir, sólo son capaces de expresar un tipo de flagelina, como por ejemplo *S. enterica*, serotipo Enteritidis, en adelante *S. Enteritidis* (1,9,12:gm:-) y unos pocos, como *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (1,9,12:-:-), son inmóviles.

La mayoría de los serotipos no son patógenos en su hospedador natural animal, siendo el hombre un hospedador accidental que se infecta de alimentos contaminados, desarrollando una enterocolitis. Sin embargo, algunos serotipos pueden causar enfermedad en animales domésticos y unos pocos son específicos de un determinado huésped, como el serotipo Typhi (9,12, [Vi]:d:-), que tiene su único reservorio en el hombre. Generalmente, en cada país se conocen los serotipos de *Salmonella* que se aíslan a lo largo de los años, tanto de muestras de origen humano como de alimentos, de animales y del ambiente. Así, por ejemplo, en muchos países Typhimurium y Enteritidis son los serotipos que con más frecuencia infectan al hombre, pero mientras que *S. Typhimurium* se encuentra sobre todo en ganado porcino y vacuno, *S. Enteritidis* se aísla principalmente de aves, huevos y derivados. Este conocimiento ha permitido establecer programas de control encaminados a la reducción de *Salmonella* en estos reservorios.

En 1997 se detectó en España un aumento significativo de cepas de *S. enterica* subespecie I, de un serotipo atípico, con la fórmula antigénica 1,4,5,12:i:-. Esta cepa, según el esquema de K-W, podía ser una variante monofásica del serotipo Typhimurium (1,4,[5],12:i:1,2), del serotipo Lagos (1,4,[5],12:i:1,5) o representar a un nuevo serotipo. En general, las cepas monofásicas pueden aparecer como evolución de cepas ancestrales que no adquirieron los genes responsables de la expresión de un segundo antígeno flagelar o del mecanismo de "cambio de fase", o como mutantes de cepas bifásicas que más recientemente, por diferentes eventos genéticos, han perdido los genes o la capacidad de expresión de alguno de los antígenos flagelares. De manera rutinaria, los laboratorios de microbiología identifican cada año un cierto número de estas variantes. La novedad del hallazgo de la variante monofásica 1,4,5,12:i:- de *Salmonella* estaba en que su incidencia creció rápidamente, llegando a ser durante el segundo semestre de 1997 el cuarto serotipo en frecuencia entre las cepas españolas¹¹. El ganado porcino y la carne de cerdo parecían ser los principales reservorios de esta cepa¹².

Desde entonces se han descrito en la bibliografía, con una frecuencia cada vez mayor, variantes monofásicas de *S. enterica* con la estructura 1,4,[5],12:i:-, ([5] indica expresión o no del antígeno O:5) y de diferentes fagotipos (U302, DT193, etc.), representando actualmente uno de los serotipos más importantes a nivel mundial. Las características de algunas de las principales "líneas clonales" de estas variantes se describen aquí.

Línea clonal española

Entre las principales características de estas cepas cabe destacar algunas evidencias que sugerían que se trataba de una variante monofásica del serotipo Typhimurium, como la posibilidad de que las cepas españolas de *S. 1,4,5,12:i:-* pudieron ser fagotipificadas con los bacteriófagos del serotipo Typhimurium, como fagotipo U302, y que en su genoma se detectaron secuencias específicas de Typhimurium^{13,14}.

La mayoría de las cepas de *S. 1,4,5,12:i:-*, fagotipo U302, tenía el mismo patrón de resistencias a ampicilina (A), cloranfenicol (C), gen-

tamicina (G), estreptomicina (S), sulfonamidas (Su), trimetoprim-sulfametoxazol (SxT) y tetraciclina (T), mediadas por plásmidos de gran tamaño (140 o 120 Kb) no autotransferibles. Además, los genes responsables de la resistencia a ampicilina (*bla_{TEM-1}*), cloranfenicol (*cmlA1*) y tetraciclina (*tetA*) eran diferentes de los encontrados en el clon epidémico internacional de *S. Typhimurium* fagotipo DT104 pentarresistente (ACSSuT). En este clon, los genes responsables de la pentarresistencia son *bla_{PSE-1}*, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tetG*, respectivamente, y están integrados en la isla genómica SGI-1 del cromosoma¹⁵⁻¹⁷.

En comparación con *S. Typhimurium* LT2, estas cepas emergentes habían sufrido al menos 6 eventos genéticos: 5 deleciones (regiones I a V) y 1 inserción (región VI). Entre las deleciones, la región V incluía al operon *fljAB*, que interviene en el mecanismo de “cambio de fase” y es responsable de la expresión de las flagelinas de segunda fase. La deleción de la región V había afectado a 16 genes completos; además, los genes flanqueantes *STM2757* y *STM2773* (*iroB*) estaban truncados y en su lugar se había insertado una secuencia IS26¹⁸. Más tarde se han determinado algunas pequeñas variaciones en la deleción de la región V, aunque la descrita por Garaizar et al¹⁸ es la mayoritaria.

Cuando se estudió el patrón de bandas del ADN total digerido con la enzima de restricción XbaI, obtenido por electroforesis en campo pulsado (PFGE-XbaI), en una selección de cepas de *Salmonella* 1,4,5,12:i:-, fagotipo U302, aisladas en España desde 1997 a 2007, se encontró un alto índice de similitud entre los tipos obtenidos, lo que sugería la clonalidad entre ellas^{14,19}.

En resumen, las cepas españolas de *S. enterica* serotipo 1,4,5,12:i:- fagotipo U302, con el patrón de resistencia a antimicrobianos ACGS-SuTSxT y una deleción característica del operon *fljBA*, forman parte de una única línea clonal “española” cuyo ancestro sería *S. Typhimurium* fagotipo U302.

Cepas italianas

Durante los últimos años se detecta en Italia la emergencia de cepas monofásicas de *Salmonella* 4,[5],12:i:-, con el patrón de resistencia frente a 4 antimicrobianos ASSuT, con o sin resistencias adicionales, pero sensibles a cloranfenicol²⁰. En 2006, el 5,4% de las cepas de *Salmonella* de origen humano estudiadas en Italia pertenecía a este serotipo emergente *Salmonella* 4,[5],12:i:-, fagotipo U302 o no fagotipificables y resistentes a ASSuT. Esta variante llegó a ser el tercer serotipo en frecuencia detrás de los serotipos *Typhimurium* y *Enteritidis*. Cuando las cepas se estudiaron por PFGE-XbaI, la mayoría (88,3%) pertenecía a un único tipo formando parte de la misma línea clonal.

El análisis conjunto de estas cepas, junto con otras de las mismas características aisladas en Dinamarca y Reino Unido, mostraba que todas ellas tenían el mismo patrón de restricción de PFGE-XbaI o patrones muy similares. Además, los genes responsables de la tetrarresistencia (ASSuT), genes *bla_{TEM-1}*, *strA-strB*, *sul2* y *tetB*, respectivamente, eran diferentes de los del clon español y de los identificados en la cepa epidémica de *S. Typhimurium* DT104, ACSSuT. Estos genes no se transferían horizontalmente, determinándose su localización cromosómica conjunta en un fragmento de aproximadamente 40 kb de una nueva isla de resistencia distinta de SGI-1²¹.

Como síntesis, las cepas de *Salmonella* 4,[5],12:i:-, de diferentes fagotipos y con una nueva isla genómica de resistencia que incluye los genes *bla_{TEM-1}*, *strA-strB*, *sul2* y *tetB* responsables del patrón de resistencia ASSuT, forman una línea clonal que está circulando al menos en Italia, Dinamarca y Reino Unido, y puede estar diseminándose a otros países europeos^{21,22}.

Cepas monofásicas americanas

En Estados Unidos, *Salmonella* 4,5,12:i:- fue el sexto serotipo más frecuente en 2006 entre las cepas de origen humano²³. Este serotipo

fue también responsable de brotes de salmonelosis en 2004 y 2007, y se aisló de diversos alimentos y animales²⁴.

Para entender la evolución, ecología y características genéticas de las cepas americanas de este serotipo, Soyer et al²⁵ llevaron a cabo un estudio comparativo entre cepas de los serotipos 4,5,12:i:- y *Typhimurium*, aisladas en Estados Unidos y España, utilizando las técnicas moleculares PFGE-XbaI¹⁹, MLST^{26,27}, y la caracterización por PCR de patrones de deleción¹³. Además, se compararon los datos de la hibridación genómica en *microarray* de las cepas españolas con la secuencia completa de una cepa americana de *Salmonella* 4,5,12:i:- (CVM23701) y la secuencia de la cepa de *S. Typhimurium* LT2 (GenBank NZ_ABAO00000000 y AE006468, respectivamente).

Entre las principales conclusiones cabe establecer que, al igual que en los casos anteriores, las cepas americanas de los serotipos 4,5,12:i:- y *Typhimurium* representaban un mismo grupo clonal y, por lo tanto, el ancestro más probable de *Salmonella* 4,5,12:i:- es *S. Typhimurium*. Asimismo, PFGE-XbaI tuvo una alta capacidad de discriminación entre estas cepas, mostrando una considerable diversidad dentro de cada serotipo y que las cepas españolas *S. 4,5,12:i:-* eran genéticamente distintas de la mayoría de las cepas americanas.

Con relación a las regiones delecionadas, las cepas *Salmonella* 4,5,12:i:- españolas y americanas tenían diferentes patrones de deleción/inserción. Las cepas americanas no habían perdido las regiones I y III, como ocurría en las cepas españolas, pero sí la región II. Las regiones IV y V (esta última responsable de la ausencia de expresión de las flagelinas de fase 2) también estaban ausentes en las cepas americanas, pero la deleción era mayor ya que incluía a la región intermedia entre IV y V, que sí aparecía en las cepas españolas, y en su lugar se encontraba un fragmento de inserción de unas 7 kb. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las cepas españolas y americanas representan 2 líneas clonales distintas: “el clon español” y la “línea clonal americana”.

Diversidad frente a clonalidad

A pesar de que la emergencia en España en 1998 de una cepa de *Salmonella* serotipo 4,5,12:i:-, “el clon español”, pudo hacernos pensar que nos encontrábamos ante un hecho casual, una variante monofásica de una cepa de *S. Typhimurium* multirresistente, que habría tenido éxito al colonizar a determinados reservorios, produciendo un aumento de casos de salmonelosis por este serotipo a partir de ese año, los ejemplos descritos aquí sobre la aparición de diferentes líneas clonales tienen que hacernos cambiar de opinión.

En primer lugar, en todos los casos estudiados, *S. 4,5,12:i:-* parece ser una variante monofásica del serotipo *Typhimurium* más que tratarse de un nuevo serotipo. El serotipo *Typhimurium* es un importante patógeno de distribución mundial que muestra una considerable diversidad genética intraserotipo⁷. La diversidad de *Typhimurium* también queda reflejada por el alto número de fagotipos identificados, aunque algunos son más prevalentes en unas regiones que en otras. Así, las cepas de *S. Typhimurium* serían el resultado evolutivo de varios ancestros, que no forman parte de un único clon, lo que es importante desde el punto de vista epidemiológico. Estas consideraciones estarían en concordancia con la identificación de al menos 3 líneas clonales “independientes” de *Salmonella* 4,[5],12:i:-, que procederían de 3 líneas clonales de *S. Typhimurium*.

Por otra parte, el mecanismo de variación de fase por el que muchos serotipos de *Salmonella* pueden expresar alternativamente 2 tipos diferentes de flagelinas, clásicamente se ha considerado como una ventaja para la bacteria, regulando el tipo de flagelina expresado e interviniendo también en algunos aspectos de la virulencia de este patógeno²⁸. Por lo tanto, cabría esperar que la pérdida de la capacidad de expresar las flagelinas H:1,2 de segunda fase de *Salmonella* 4,[5],12:i:- afectaría a la patogenicidad de estas bacterias. Sin embargo, esto no ha sido así, ya que diferentes clones de estas características han sido capaces de emerger, dispersarse, sobrevivir a lo largo del

tiempo y formar parte del grupo de serotipos de *Salmonella* que, con mayor prevalencia, causan salmonelosis.

Finalmente, en *Salmonella* se considera que el éxito de algunos tipos para emerger y persistir a lo largo del tiempo es favorecido por la adquisición de resistencias a múltiples antibióticos, cuyos determinantes se agrupan frecuentemente en estructuras denominadas "islas genómicas", que pueden incluir también genes involucrados en recombinación, replicación, conjugación y regulación, así como otros factores de virulencia. Esto podría explicar la dispersión de los clones español e italiano, pero no la de la línea clonal americana, donde la mayoría de las cepas estudiadas eran sensibles a un amplio espectro de antimicrobianos.

En conclusión, al menos 3 líneas clonales de *Salmonella* 4,[5],12:i:-, con diversos patrones de susceptibilidad frente a antimicrobianos que, cuando son resistentes, transportan distintos genes de resistencia localizados en el cromosoma o en plásmidos y cuyos orígenes serían cepas de *S. Typhimurium*, han llegado recientemente a formar parte de los serotipos más frecuentemente identificados en diferentes partes del mundo. La comprensión del proceso por el que estas variantes monofásicas, que deberían nombrarse como *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- han emergido, probablemente, como consecuencia de una convergencia evolutiva, se han dispersado y han persistido en los últimos años, necesita ser estudiada con más detalle.

***Shigella* spp.-*Escherichia coli* enteroinvasivo desde una perspectiva evolutiva**

Los genomas bacterianos son estructuras dinámicas que necesitan ser estudiadas en profundidad, ya que el análisis genético poblacional de algunos de estos patógenos ha revelado que, en algunos casos, el estatus taxonómico asignado a un grupo de organismos puede no ajustarse al concepto de género, especie o clon que históricamente se les ha atribuido.

E. coli y *Shigella* spp. son especies estrechamente relacionadas. Por su poder patógeno para el hombre y por sus características bioquímicas, *Shigella* ha sido históricamente considerada como un género aparte, aunque molecularmente ahora se sabe que las shigelas pertenecen en realidad a la extremadamente diversa especie *E. coli*, con especificidad por el hombre como hospedador natural y un particular modo de patogenicidad^{29,30}. Aun así, puesto que *Shigella* es la causa de un síndrome definido, se sigue considerando en microbiología clínica como género, a pesar de la inconsistencia biológica que esto supone.

Shigella es un patógeno muy bien conocido como responsable de la disentería bacilar³¹ y aunque la shigelosis es, sobre todo, una amenaza para la salud pública en países con condiciones sanitarias deficientes, esta gastroenteritis invasiva también afecta a países desarrollados^{32,33}. La baja dosis infectante suficiente para desarrollar la enfermedad (10 células) hace posible su fácil dispersión a través de los alimentos y agua contaminados, e incluso por contacto persona-persona.

Las cepas de este género se dividen clásicamente en las especies *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, también conocidas como serogrupos A, B, C y D, respectivamente, y éstos en serotipos. Entre los serotipos de *S. dysenteriae*, el serotipo 1 produce la forma más grave de disentería, asociándose con una mayor incidencia de complicaciones y mortalidad. Bioquímicamente, las cepas de *Shigella*, a diferencia de la mayoría de *E. coli*, no fermentan la lactosa ni otros azúcares, no descarboxilan la lisina y son inmóviles en los medios convencionales de laboratorio.

Por otra parte, desde los años cuarenta se empieza a describir una gran variedad de cepas identificadas como *E. coli*, que eran patógenos para el hombre o los animales. Los patotipos de *E. coli* productores de diarrea en el hombre incluyen a *E. coli* enteropatogénicos (ECEP), *E. coli* enterohemorrágicos (ECEH), *E. coli* enterotoxigénicos (ECET), *E. coli* enteroagregativos (ECEA), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* enteroinvasivos (ECEI). Cada uno de estos grupos utiliza dife-

rentes mecanismos para colonizar al huésped y producir diarrea (<http://www.lugo.usc.es/ecoli/>). Entre ellos, ECEI, aunque se clasifican bioquímicamente como *E. coli*, comparten con *Shigella* muchas propiedades, incluyendo mecanismos de virulencia y así causan una diarrea disintérica.

Shigella y ECEI carecen de muchos genes metabólicos como el gen *cadA*, responsable de la actividad descarboxilasa de la lisina, ausente como consecuencia de una delección genómica que ha favorecido el aumento de su virulencia³⁴ y poseen plásmidos similares de invasión de gran tamaño (210-230 kb), denominados pINV A y pINV B o un plásmido "híbrido" en el caso de *S. dysenteriae* 1. La adquisición por transferencia lateral de pINV A o pINV B por las cepas de *Shigella* y ECEI, que ha tenido gran importancia en el origen de estos patotipos, parece que ha ocurrido en procesos independientes y en diferentes momentos a lo largo del tiempo, o sea que *Shigella* y ECEI surgen de la convergencia evolutiva a partir de más de un ancestro³⁵⁻³⁷.

Los plásmidos pINV codifican el sistema Mxi-Spa de secreción tipo III y los antígenos Ipa que les confiere la habilidad de invadir las células eucariotas. Estos plásmidos también codifican la producción de la proteína de membrana externa IcsA que hace posible que la bacteria sea capaz de pasar de una célula a otra "in vivo", eludiendo al sistema inmune. Además, pueden transportar genes que expresan una o más enterotoxinas. Finalmente, y como caso aparte, el plásmido de virulencia de *S. dysenteriae* tipo 1 posee los genes para la producción de la toxina Shiga, que está asociada a la disentería epidémica.

Por todo ello, el diagnóstico microbiológico de los procesos diarreicos causados por ECEI puede resultar complicado al menos en 2 situaciones. Por una parte, algunas cepas de ECEI que fermentan la lactosa son difíciles de distinguir de otros *E. coli* diarreagénicos o comensales. En estos casos, sería necesario determinar la presencia o no de los factores de patogenicidad de los principales grupos diarreagénicos: ECEP, ECEH, ECET, ECEA, ECAD y ECEI. Para ello se han descrito diversas técnicas, sobre todo basadas en la amplificación selectiva por PCR de los correspondientes genes de virulencia^{38,39}. Por el contrario, otras cepas no fermentan la lactosa, no descarboxilan la lisina ni la ornitina y son inmóviles, aunque generalmente fermentan el manitol y son negativas por la prueba del indol y, por ello, son bioquímicamente indistinguibles de las especies de *Shigella* de los serogrupos A, B o C. Es en este tipo de cepas donde es más difícil distinguir si nos encontramos ante una nueva serovariedad de *Shigella*, no detectable con el juego de antisueros disponible, o si es un *E. coli* inactivo, parecido bioquímicamente a *Shigella* (*Shigella-like*), y en este último caso, si es un *E. coli* comensal o es el responsable del cuadro diarreico. En este momento surge la necesidad de disponer en el laboratorio de métodos de diferenciación entre *Shigella* spp. y ECEI o, al menos, asegurar que estamos ante un patógeno enteroinvasivo.

Diversos autores han desarrollado métodos moleculares encaminados a la detección de factores de virulencia específicos de *Shigella* y/o ECEI. Los más sencillos son los basados en PCR y, entre estos, los más sensibles son aquellos en los que detecta el gen *ipaH*, ya que este elemento genético se encuentra en múltiples copias en el plásmido de virulencia y en el cromosoma⁴⁰⁻⁴². Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ningún método que sea capaz de discriminar inequívocamente entre ambos microorganismos. La estrategia de Kingombe et al⁴² es la que ofrece un mayor nivel de diferenciación. En ella se propone la amplificación de 3 genes de virulencia: el gen *ipaH*, presente en el plásmido pINV de *Shigella* y ECEI; el gen *ial*, asociado a la invasión de las células intestinales, también localizado en el plásmido pINV y que se encuentra en el 38 y el 40% de las cepas de *Shigella* y ECEI, respectivamente, y el gen cromosómico *iuc*, involucrado en la producción de sideróforos (aerobactina), que está en todas las cepas de *Shigella* y en el 33% de las cepas de ECEI. La amplificación de estos 3 genes y posterior digestión del fragmento amplificado del gen *ial*, con la enzima de restricción AclI, genera un algoritmo que permi-

Tabla 1Amplificación por PCR de genes de virulencia de *Shigella* y *Escherichia coli* enteroinvasivo. Patrones de restricción del gen *ial* amplificado por PCR (RFLP-*ial*)

Microorganismo	Gen <i>ipaH</i>	PCR múltiple <i>iuc-ipaH</i>		<i>ial</i>	RFLP- <i>ial</i>	
		<i>iuc'/ipaH</i> ⁺	<i>iuc'/ipaH</i> ⁺		<i>AclI</i> ⁻	<i>AclI</i> ⁺
<i>Shigella</i>	+	-	+	+ (38%)	43%	57%
ECEI	+	+ (67%)	+ (33%)	+ (40%)	100%	-
Otros <i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-

Basada en el trabajo de Kingombe et al⁴².

te estimar con un 90% de probabilidad si nos encontramos ante una *Shigella* o un ECEI (tabla 1).

Para la tipificación posterior de las cepas de *Shigella*-ECEI, se han desarrollado algunos métodos moleculares complementarios de las técnicas tradicionales empleadas en la mayoría de los laboratorios. Entre ellos, la electroforesis en campo pulsado (PFGE)¹⁹ es una buena técnica de referencia para la detección de clones e investigación de brotes^{43,44}, pero en nuestra experiencia no es capaz de formar agrupamientos o *clusters* capaces de separar sin excepciones cada una de las especies de *Shigella* entre sí, ni distinguir éstas de los ECEI, excepto en el caso de *S. sonnei* y *S. flexneri*, que forma 2 grupos bastante diferenciados (datos no mostrados).

El análisis de múltiples secuencias repetidas en tándem (MLVA) también se utiliza con éxito para la subtipificación de varias especies y serotipos de *Shigella*. La técnica consiste en la amplificación de fragmentos de ADN que están formados por una sucesión de secuencias cortas organizadas en tándem, cuyo número de repeticiones es variable entre diferentes aislamientos y la determinación del número de repeticiones encontradas en cada uno. Se han descrito diferentes protocolos, algunos específicos de una especie de *Shigella*^{45,46} y otros para todas en general y que, probablemente, también sean de aplicación en ECEI⁴⁷. Esta técnica es de gran utilidad para establecer relaciones clonales entre cepas y en el estudio de brotes pero, dado su alto poder de discriminación, que es superior al de PFGE, no es de utilidad en estudios filogenéticos. Lo contrario sucede con el análisis de las secuencias de múltiples genes estructurales (MLST) de baja variabilidad. Este método no subjetivo de caracterización de cepas tiene su utilidad en análisis filogenéticos para tratar de establecer la historia evolutiva de los organismos a lo largo del tiempo, pero no en el estudio de las relaciones epidemiológicas más recientes entre diferentes cepas. En el trabajo de Lan et al⁴⁸, el análisis de los tipos de secuencias obtenidos de 4 genes estructurales y 2 genes del plásmido pINV de *Shigella* y ECEI determinó que, con algunas excepciones, las cepas de ECEI se agrupaban en 4 *clusters*, mientras que las cepas de *Shigella* spp. se agrupaban en otros 2. La diversidad de tipos de secuencias encontrados también indicaba el origen evolutivo convergente, desde diferentes ancestros, de ECEI y *Shigella* spp.

En conclusión, *Shigella* spp. y ECEI han evolucionado independientemente y varias veces a partir de diferentes líneas clonales de *E. coli*, presumiblemente por adquisición horizontal de los factores de virulencia característicos de estas bacterias y, por lo tanto, ambos forman un único patotipo de *E. coli*. Las cepas con bioquímica compatible con *Shigella* de los serogrupos A, B o C, que no aglutinan frente a los antisueros específicos de estos serogrupos y que poseen el gen *ipaH*, sólo podrían ser informadas inequívocamente como *Shigella*-ECEI, atribuyéndoles el correspondiente papel patógeno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology*. 2009;136:1874-86.

2. Tsolis RM, Young GM, Solnick JV, Baumler AJ. From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:883-92.
3. Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;252:11-8.
4. Parsot C. *Shigella* type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes? *Curr Opin Microbiol*. 2009;12:110-6.
5. JCI CSP. The type species of the genus *Salmonella* lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:519-20.
6. Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:521-4.
7. Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol*. 2009;9:996-1005.
8. Katrube E, Bogomolnaya LM, Wingert H, Andrews-Polymeris H. Subspecies IIIa and IIIb *Salmonellae* are defective for colonization of murine models of salmonellosis compared to *Salmonella enterica* subsp. I serovar typhimurium. *J Bacteriol*. 2009;191:2843-50.
9. Grimont PAD, Weill F-X. Antigenic Formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th ed. Paris: Institut Pasteur; 2007.
10. Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J Bacteriol*. 2003;185:3567-74.
11. Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA. Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3425.
12. De la Torre E, Zapata D, Tello M, Mejía W, Frías N, García Pena FJ, et al. Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2395-400.
13. Echeita MA, Herrera S, Usera MA. Atypical, fljB-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2981-3.
14. Guerra B, Laconcha I, Soto SM, González-Hevia MA, Mendoza MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;190:341-7.
15. Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR, Rowe B. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella typhimurium* DT 104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet Rec*. 1994;134:577.
16. Briggs CE, Fratamico PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:846-9.
17. Guerra B, Soto SM, Arguelles JM, Mendoza MC. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1305-8.
18. Garazár J, Porwollik S, Echeita A, Rementería A, Herrera S, Wong RM, et al. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella* serovar. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2074-8.
19. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. 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.
20. Busani L, Graziani C, Battisti A, Franco A, Ricci A, Vio D, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiol Infect*. 2004;132:245-51.
21. Lucarelli C, Dionisi AM, Torpdahl M, Villa L, Graziani C, Hopkins K, et al. Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of *Salmonella typhimurium* and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark and United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2103-9.
22. Havlickova H, Hradecka H, Bernadyova I, Rychlik I. Distribution of integrons and SG11 among antibiotic-resistant *Salmonella enterica* isolates of animal origin. *Vet Microbiol*. 2009;133:193-8.
23. CDC. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC; 2008.
24. Agasan A, Kornblum J, Williams G, Pratt CC, Fleckenstein P, Wong M, et al. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1924-9.
25. Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, et al. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3546-56.

26. Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su WL, Hof J, Craver MP, et al. DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3688-98.
27. Alcaine SD, Soyer Y, Warnick LD, Su WL, Sukhnanand S, Richards J, et al. Multilocus sequence typing supports the hypothesis that cow- and human-associated *Salmonella* isolates represent distinct and overlapping populations. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:7575-85.
28. Ikeda JS, Schmitt CK, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, et al. Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. *Infect Immun.* 2001;69:3021-30.
29. Brenner DJ, Fanning GR, Johnson KE, Citarella RV, Falkow S. Polynucleotide sequence relationships among members of Enterobacteriaceae. *J Bacteriol.* 1969;98:637-50.
30. Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. Sequence variation in *Shigella sonnei* (Sonnei), a pathogenic clone of *Escherichia coli*, over four continents and 41 years. *J Clin Microbiol.* 1994;32:796-802.
31. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:134-56.
32. Gupta A, Polyak CS, Bishop RD, Sobel J, Mintz ED. Laboratory-confirmed shigellosis in the United States, 1989-2002: epidemiologic trends and patterns. *Clin Infect Dis.* 2004;38:1372-7.
33. Van Pelt W, De Wit MA, Wannet WJ, Ligtvoet EJ, Widdowson MA, Van Duynhoven YT. Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in The Netherlands, 1991-2001. *Epidemiol Infect.* 2003;130:431-41.
34. Maurelli AT, Fernández RE, Bloch CA, Rode CK, Fasano A. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:3943-8.
35. Pupo GM, Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect Immun.* 1997;65:2685-92.
36. Pupo GM, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:10567-72.
37. Lan R, Lumb B, Ryan D, Reeves PR. Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2001;69:6303-9.
38. Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5362-5.
39. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1752-7.
40. Dutta S, Chatterjee A, Dutta P, Rajendran K, Roy S, Pramanik KC, et al. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J Med Microbiol.* 2001;50:667-74.
41. Hsu BM, Wu SF, Huang SW, Tseng YJ, Ji DD, Chen JS, et al. Differentiation and identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. *Water Res.* 2010;44:949-55.
42. Kingombe CI, Cerqueira-Campos ML, Farber JM. Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Food Prot.* 2005;68:239-45.
43. Ranjbar R, Mammia C, Pourshafie MR, Soltan-Dallal MM. Characterization of endemic *Shigella boydii* strains isolated in Iran by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profile, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *BMC Res Notes.* 2008;1:74.
44. Al-Nimri S, Miller WA, Byrne BA, Guibert G, Chen L. A unified approach to molecular epidemiology investigations: tools and patterns in California as a case study for endemic shigellosis. *BMC Infect Dis.* 2009;9:184.
45. Chiou CS, Watanabe H, Wang YW, Wang WL, Terajima J, Thong KL, et al. Utility of multilocus variable-number tandem-repeat analysis as a molecular tool for phylogenetic analysis of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1149-54.
46. Wang YW, Watanabe H, Phung DC, Tung SK, Lee YS, Terajima J, et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of *Shigella flexneri*. *BMC Microbiol.* 2009;9:278.
47. Gorge O, López S, Hilaire V, Lisanti O, Ramisse V, Vergnaud G. Selection and validation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis panel for typing *Shigella* spp. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1026-36.
48. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martínez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun.* 2004;72:5080-8.