

Serotipos, perfil plasmídico y antibiotipos de cepas de *Shigella flexneri* aisladas de niños menores de 5 años con diarrea sanguinolenta usuarios de los servicios de Salud Pública

Dres. María Inés Mota*, Gustavo Varela†, Br. María del Pilar Gadea‡, Dra. María Inés Caffer¶, Lic. Alfredo Sirok*, Dr. Felipe Schelotto§

Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Servicio de Enterobacterias. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). Dr. Carlos G. Malbrán. Buenos Aires, Argentina

Resumen

Introducción: en niños menores de 5 años con diarrea sanguinolenta, *Shigella flexneri* es el agente bacteriano más frecuentemente recuperado en nuestro medio. La shigellosis es una de las enfermedades infecciosas en las cuales el tratamiento con antimicrobianos es efectivo. La elección empírica del antimicrobiano adecuado es problemática debido a la resistencia de *Shigella* a diversos antibióticos. Esta situación estimuló el interés en el desarrollo de vacunas para el control de esta enfermedad. Debido a que algunas vacunas están orientadas a promover la respuesta inmune serotipo específica, es importante establecer la distribución de los serotipos prevalentes en la población que interesa inmunizar. El objetivo de este estudio fue caracterizar 50 cepas de *Shigella flexneri* aisladas a partir de niños con diarrea sanguinolenta, recuperadas en cuatro encuestas etiológicas de gastroenteritis.

Método: a cada una se le realizó: serotipificación, estudio del patrón de lipopolisacárido, perfil plasmídico y estudio de sensibilidad a diferentes antimicrobianos.

Resultados: los serotipos prevalentes fueron 2a, 3c, 4, 6, y 1. Se identificaron diez antibiotipos diferentes. En los cultivos del serotipo 2a se hallaron tres patrones plasmídicos; el 5 fue el más frecuente, seguido por el 6 y el 7. El análisis de la evolución de los antibiotipos circulantes mostró una tendencia hacia la aparición de tipos con mayor espectro de resistencia.

Conclusiones: vista esta evolución, y de acuerdo a los resultados obtenidos, resulta de interés ensayar un inmunógeno que incluya los determinantes "O" específicos de los serotipos 2a, 1, 3c, 4, 6 y el de *Shigella sonnei*.

Palabras clave: SHIGELLA FLEXNERI - aislamiento e identificación.
DIARREA INFANTIL - microbiología.
SERTIPIFICACIÓN.

* Ayudante de clase. Departamento de Bacteriología y Virología y Residente de Laboratorio. Facultad de Medicina. Instituto de Higiene Arnoldo Berta. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

† Profesor Agregado. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Instituto de Higiene Arnoldo Berta. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

¶ Jefa del Servicio de Enterobacterias. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). Dr. Carlos G. Malbrán. Buenos Aires, Argentina.

§ Profesor Director. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Instituto de Higiene Arnoldo Berta. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

‡ Asistente del Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina, Universidad de la República

Correspondencia: Dr. Gustavo Varela
Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Alfredo Navarro 3051. CP 11600.

E-mail: bacvir@hc.edu.uy

Recibido: 8/3/04.

Aceptado: 28/12/04.

Introducción

La enfermedad diarreica es una causa importante de morbilidad en niños de los países menos desarrollados. A nivel mundial esta enfermedad es responsable de casi 25% del total de muertes que ocurren por año en niños menores de 5 años⁽¹⁾. El número anual de episodios de infección por *Shigella* en países en vía de desarrollo se ha estimado en 163 millones, con un millón de defunciones. Se considera que 70% de los casos reportados y 60% de las muertes ocurren en niños menores de 5 años⁽²⁾.

La shigellosis es una de las enfermedades infecciosas en las cuales el tratamiento con antimicrobianos es efectivo. El uso de antibióticos adecuados disminuye la severidad y duración de la enfermedad, reduce el período de excreción de los microorganismos y previene las complicaciones⁽³⁾. Sin embargo, la elección empírica del antimicrobiano es problemática debido fundamentalmente a la resistencia de *Shigella* a diversos antibióticos.

En general, el porcentaje de cepas resistentes a dos o más antimicrobianos es de 80%, y varía según las regiones analizadas⁽⁴⁻⁷⁾. El aumento en la prevalencia de cepas de *Shigella* resistentes estimuló nuevamente el interés en el desarrollo y uso de vacunas efectivas para prevenir esta enfermedad⁽²⁾.

Debido a que algunas de las vacunas en desarrollo están orientadas a la estimulación de la respuesta inmune contra los determinantes antigénicos serotipo específicos del polisacárido "O" del lipopolisacárido (LPS)⁽⁸⁻¹⁰⁾, es importante establecer la distribución de los serogrupos y los serotipos de *Shigella* prevalentes en la población a inmunizar^(11,12).

En nuestro país, y para niños con edades comprendidas entre 1 y 4 años, la mortalidad por diarrea de presunta causa infecciosa se ubicó en el año 2001 en el cuarto lugar de frecuencia, con una tasa específica de 0,5 por 100.000 habitantes⁽¹³⁾. En niños con diarrea sanguinolenta y usuarios de los servicios de Salud Pública, *Shigella flexneri* y *S. sonnei* son los agentes bacterianos más frecuentemente recuperados, seguidos por *Campylobacter jejuni*; *Escherichia coli* productor de toxinas tipo Shiga (STEC); *Salmonella* y *Escherichia coli* enteroinvasor (EIEC)⁽¹⁴⁾.

El objetivo de este estudio fue caracterizar un conjunto de cepas de *Shigella flexneri* aisladas a partir de niños con diarrea sanguinolenta atendidos en centros de Salud Pública, para avanzar con más fundamento en el manejo terapéutico y en la prevención de estas infecciones.

Material y método

Cepas bacterianas

Se estudiaron 50 cepas de *Shigella flexneri* recuperadas

en Montevideo entre 1989 y 2003 a partir de muestras de materias fecales de niños menores de 5 años con diarrea sanguinolenta. Las muestras procedían de cuatro encuestas etiológicas distintas de gastroenteritis infantiles, realizadas en 1989-1990; 1990-1994; 1999 y 2001-2003, respectivamente, con muestras tomadas en el Centro Hospitalario Pereira Rossell, principal centro pediátrico público del país. Las cepas se identificaron por pruebas bioquímicas estándar⁽¹⁵⁾. El serogrupo se determinó por la técnica de aglutinación en lámina utilizando antisueros policlonales comerciales (Difco Laboratories, Detroit, USA). La serotipificación de las cepas se realizó con sueros absorbidos serotipo-específicos de la colección de nuestro laboratorio⁽¹⁵⁾. Para validar los procedimientos, varios cultivos fueron enviados al laboratorio de enterobacterias del instituto Carlos Malbrán, donde se confirmaron los resultados obtenidos.

Análisis del lipopolisacárido

El estudio del patrón de LPS se realizó según el procedimiento de extracción descrito por Hictchok, con separación por el sistema discontinuo de Laemmli en geles de poliácridamida a 12% sin SDS, y luego tinción con nitrato de plata^(16,17).

Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

Los ensayos se realizaron por la técnica de disco difusión en agar Müller-Hinton, siguiendo las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)⁽¹⁸⁾. Los antibióticos probados fueron los siguientes: tetraciclina (Tet), ceftriaxona (Ctx), ciprofloxacina (Cip), cefoxitina (Fox), ampicilina (Amp), trimetoprim-sulfametoxazol (Stx), cloranfenicol (Cm), ácido nalidíxico (Na), gentamicina (Gm) y nitrofurantoina (Fu) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England, UK).

Se utilizaron como cepas control *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Perfil plasmídico

Las cepas se sembraron en caldo Luria Bertani (Sigma Chemical Co.; St. Louis) y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación. El ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico se extrajo según el procedimiento de lisis alcalina⁽¹⁹⁾. Los plásmidos obtenidos fueron analizados y visualizados por electroforesis en geles de agarosa a 0,7% con TBE 0,5X y tinción con bromuro de etidio.

Resultados

Se recuperaron durante los cuatro períodos mencionados,

además de las 50 cepas de *Shigella flexneri* estudiadas en este trabajo, 25 cepas de *Shigella sonnei*, dos cepas de *Shigella dysenteriae* (ambas del serotipo 2) y una cepa de *S. boydii*.

Dentro del serogrupo B la distribución general por serotipos fue la siguiente: 34 cepas eran del serotipo 2a

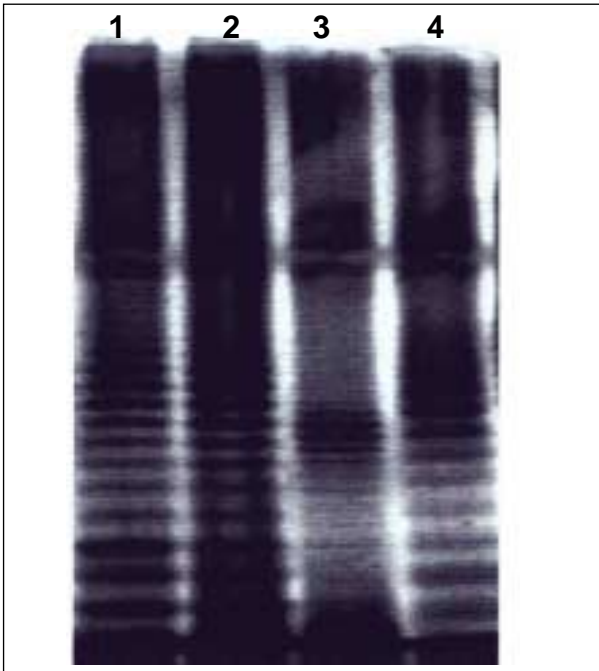


Figura 1. Patrón de LPS de algunos serotipos de *Shigella flexneri*, por SDS-PAGE teñido con nitrato de plata. Carril 1, *Shigella flexneri* serotipo 2a (cepa IH1); carril 2, *Shigella flexneri* serotipo 2a (cepa IH24); carril 3 *Shigella flexneri* serotipo 6 (cepa IH7); carril 4, *Shigella flexneri* serotipo 3c (cepa IH3)

(68%); nueve del serotipo 3c (18%); dos del serotipo 4 (4%); dos del serotipo 6 (4%); dos del serotipo 1 (4%) y una no tipificable.

Todas las cepas del serotipo 2a mostraron el mismo patrón de LPS, a su vez diferente a los patrones de los otros serotipos ensayados. La figura 1 muestra algunos resultados representativos. Se observan las bandas características, correspondientes a moléculas de LPS liso que difieren de tamaño entre sí en una unidad repetitiva del antígeno polisacárido O. La ubicación de la densidad máxima de bandas y la separación entre las mismas varía para cada serotipo.

La distribución de los serotipos de *Shigella flexneri* en los diferentes períodos de estudio se muestra en la figura 2. En todos los lapsos considerados fue predominante el serotipo 2a; en 1989-1990 se presentaban minoritariamente el 3c y el 6; en 1990-1994 el 4, el 1, y especialmente el 3c; en 1999 ninguno y en 2001-2003 nuevamente el 3c y el 1.

De acuerdo con los resultados de los ensayos de sensibilidad para ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, se identificaron 10 antibiogramas diferentes que se designaron según su fecha de aparición: tipo A (sensible a Amp, Cm, Tet, Sxt) 17 cepas; tipo B (Cm, Sxt, Tet)^R dos cepas; tipo C (Sxt, Amp, Tet)^R una cepa; tipo D (Amp)^R dos cepas; tipo E (Sxt)^R una cepa; tipo F (Sxt, Amp)^R una cepa; tipo G (Cm, Sxt; Amp, Tet)^R 11 cepas; tipo H (Cm, Amp, Tet)^R 11 cepas; tipo I (Cm, Sxt, Amp)^R dos cepas y tipo J (Amp, Tet)^R dos cepas.

Ninguna de las cepas de *S. flexneri* estudiadas mostró resistencia para ácido nalidíxico, ciprofloxacina, nitrofurantoína, gentamicina, cefoxitina o ceftriaxona.

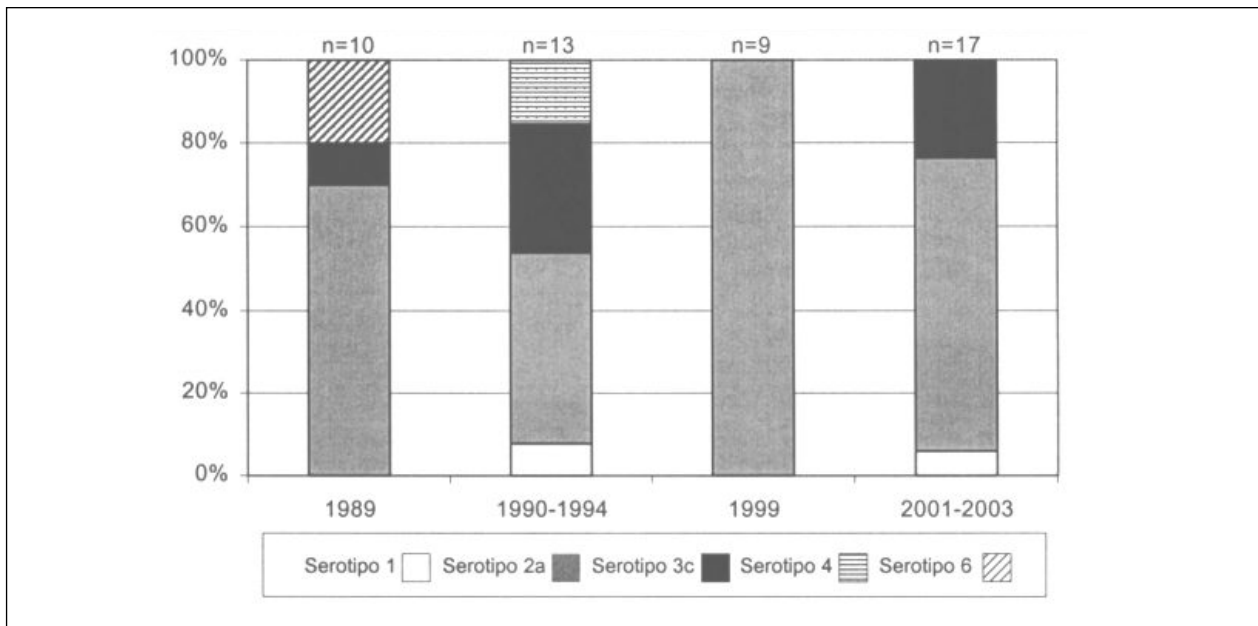


Figura 2. Distribución de los distintos serotipos de *Shigella flexneri* en los diferentes períodos de estudio

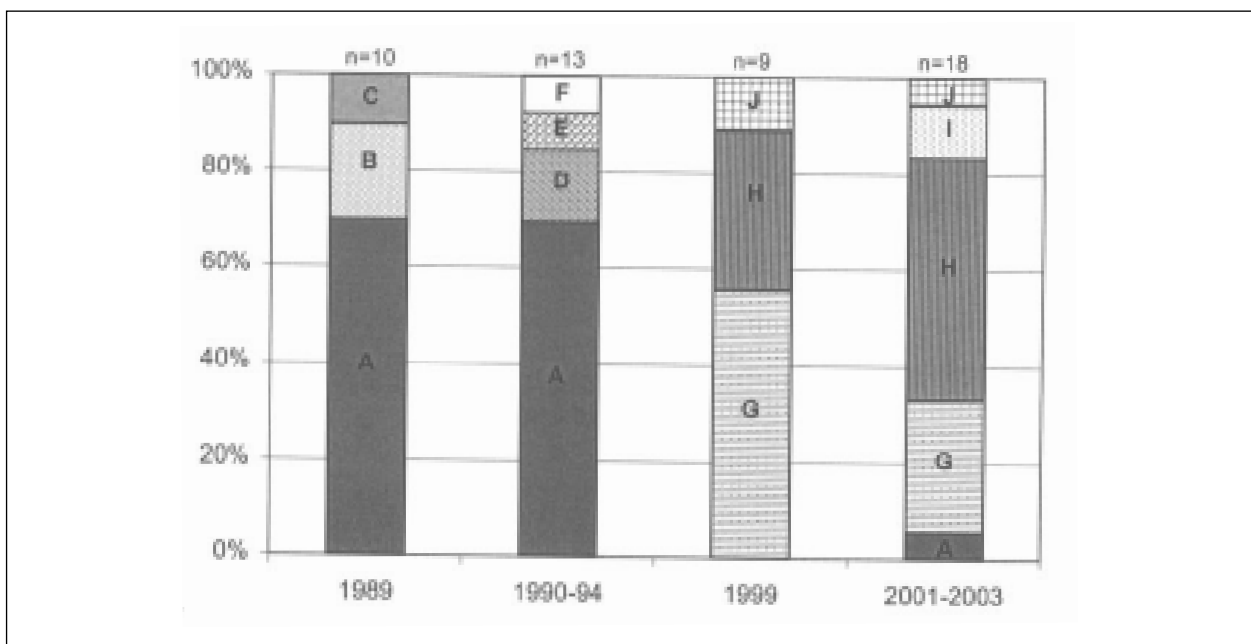


Figura 3. Distribución de los distintos antibiotipos de *Shigella flexneri* encontrados en los diferentes períodos de estudio. n: número de cepas. A, (sensible a Amp, Cm, Tet, Sxt)^S; B, (Cm, Sxt, Tet)^R; C, (Sxt, Amp, Te)^R; D, (Amp)^R; E, (Sxt)^R; F, (Sxt, Amp)^R; G, (Cm, Sxt; Amp, Tet)^R; H, (Cm, Amp, Tet)^R; I, (Cm, Sxt, Amp)^R; J, (Amp, Tet)^R. Amp, ampicilina; Sxt, trimetoprim-sulfametoxazol; Cm, cloramfenicol; Tet, tetraciclina.

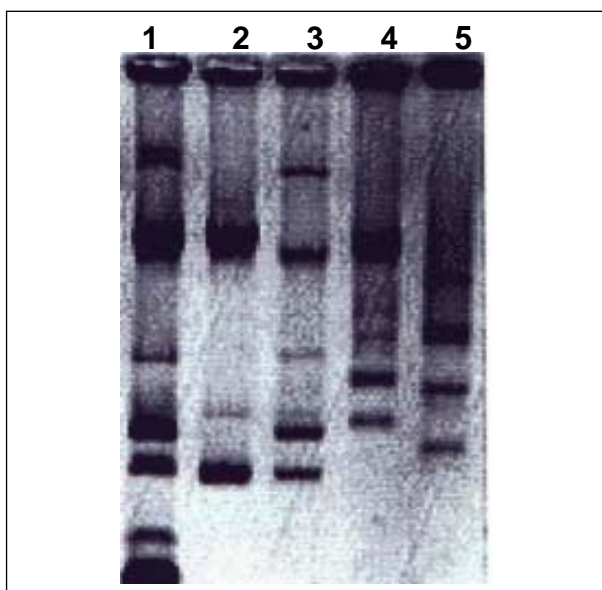


Figura 4. Perfiles plasmídicos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa a 0,7% y teñido con bromuro de etidio. Carril 1, serotipo 2a (cepa IH1); carril 2, serotipo 2a (cepa IH24); carril 3, serotipo 2a (cepa IH18); carril 4, serotipo 3c (cepa IH12); carril 5, serotipo 1 (cepa IH43)

La distribución de los distintos antibiotipos encontrados en los diferentes períodos de estudio se muestra en la figura 3. Se observa la predominancia inicial del tipo A, que era sensible a todos los antibióticos ensayados, y su progresiva desaparición posterior, con prevalencia creciente de los tipos G y H, de resistencia múltiple.

Se encontraron siete patrones de perfil plasmídico. En las cepas de los serotipos 6, 1 y 3c se encontró en cada tipo un patrón predominante, designados 1, 2 y 5, respectivamente. En los cultivos del serotipo 2a, el patrón 5 fue el más frecuente (31 aislamientos) seguido por el 6 (dos cepas) y el 7 (un aislamiento) (tabla 1). La figura 4 muestra resultados característicos de separación electroforética de plásmidos en gel de agarosa. Se observan tres perfiles diferentes del serotipo 2a, el patrón predominante de corrida del tipo antigénico 3c y el único observado en el serotipo 1.

Discusión

Las infecciones por *Shigella* aparecen como un problema importante para los servicios de Salud Pública en Uruguay, como sucede en otras regiones del mundo⁽²⁾. En nuestro medio este germen sigue siendo el agente bacteriano más frecuentemente recuperado a partir de casos de diarrea con sangre en niños menores de 5 años y usuarios de los servicios de Salud Pública; se recupera en aproximadamente 20%-25% de los niños con esta enfermedad⁽²⁰⁾. En el período 1990-2000 se aislaron de niños atendidos en el Centro Hospitalario Pereira Rossell, 213 cepas de *Shigella*⁽²¹⁾. La mayoría correspondían a *S. flexneri* y la situación parece ser diferente en niños usuarios de salud privada, en los cuales se han informado frecuencias de recuperación de 4%⁽²²⁾.

Como ocurre en otras regiones poco desarrolladas del

Tabla 1. Características de las cepas de *Shigella flexneri* aisladas de niños con diarrea sanguinolenta en Montevideo-Uruguay

Serotipo	Antibiotipo*	Perfil plasmídico	Número de cepas
2a	A	5	8
2a	A	6	2
2a	C	5	1
2a	D	5	1
2a	E	7	1
2a	G	5	9
2a	H	5	10
2a	I	5	1
2a	J	5	1
3c	A	4	4
3c	A	5	1
3c	F	4	1
3c	H	5	1
3c	I	5	1
3c	J	3	1
6	B	1	2
4	A	5	1
4	A	6	1
1	D	2	1
1	G	2	1

* De acuerdo con los resultados obtenidos por la técnica de disco difusión: A (Amp, Cm, Tet, Sxt)^S; B (Cm, Sxt, Tet)^R; C (Sxt, Amp, Tet)^R; D (Amp)^R; E (Sxt)^R; F (Sxt, Amp)^R; G (Cm, Sxt; Amp, Tet)^R; H (Cm, Amp, Tet)^R; I (Cm, Sxt, Amp)^R; J (Amp, Tet)^R.
 Amp, ampicilina; Sxt, trimetoprim-sulfametoxazol; Cm, cloramfenicol; Tet, tetraciclina.
 † Según los patrones de bandas obtenidos por electroforesis en geles de agarosa a 0,7%.

mundo, *S. flexneri* (grupo B) es el serogrupo predominante, seguido por *S. sonnei* y *S. boydii*.

Durante todo el período de estudio se recuperaron en el Departamento de Bacteriología y Virología solamente dos cepas de *Shigella dysenteriae*, que fueron del serotipo 2^(14,20). En otras regiones pobres, este serogrupo es más común, y el serotipo predominante suele ser el 1⁽²⁾.

Dentro del serogrupo B, el serotipo mayoritario y aislado en todos los períodos que incluye el estudio fue el 2a. Si bien estos hallazgos coinciden con resultados encontrados en otras partes del mundo⁽¹¹⁾ y en zonas definidas de países de la región⁽¹²⁾, existen diferencias importantes con respecto a la frecuencia relativa hallada para los serotipos distintos del 2a.

Como sucede en otras regiones, los resultados obtenidos en esta población de niños sugieren una relativa estabilidad en la distribución de los serotipos a lo largo del tiempo (figura 2).

Estas dos observaciones (estabilidad y predominancia del tipo 2a) tendrían importancia, como discutiremos más abajo, para definir qué determinantes antigénicos debería incluir una vacuna para uso en este grupo de niños.

El estudio del perfil plasmídico mostró pocas diferencias dentro del conjunto de cepas del serotipo 2a (tres patrones distintos con un patrón predominante, el 5, como se muestra en la tabla 1). En los otros serotipos recuperados se encontró también una correspondencia importante entre tipo antigénico y perfil plasmídico. Aunque debemos tener en cuenta que el número de cepas estudiadas es bajo para estos serotipos, los resultados sugieren, en general, una cierta uniformidad en la distribución de los cultivos según el marcador plasmídico; el antibiograma indica sin embargo, una diversidad importante dentro de los diferentes serotipos (tabla 1). Es necesario complementar los resultados de análisis plasmídico con técnicas de mayor poder discriminatorio que permitan establecer similitudes o diferencias, o ambas, a nivel genético entre cepas del mismo serotipo, para definir líneas celulares prevalentes. Esto puede ser importante si se considera la posibilidad de seleccionar las mismas en una estrategia de prevención con cultivos atenuados.

Los estudios de sensibilidad in vitro mostraron globalmente una elevada resistencia de *S. flexneri* a los antimicrobianos más comúnmente utilizados en el tratamiento de la shigelosis. Del total de las cepas estudiadas, 60% fueron resistentes a ampicilina y 36% a trimetoprim-sulfametoxazol. En el período 2001-2003 el porcentaje de resistencia para ampicilina fue de 94% y para trimetoprim-sulfametoxazol 44%, cifras claramente más altas que las registradas en el año 1989: 10% y 30%, respectivamente.

El intercambio de material genético entre cepas y la presión de selección pueden explicar estos hechos. La combinación de sulfametoxazol y trimetoprim ha sido muy usada en nuestro medio para el tratamiento de infecciones pediátricas. Actualmente los antimicrobianos más frecuentemente indicados en el Centro Hospitalario Pereira Rossell son los betalactámicos, en orden, cefradina, aminopenicilinas, ceftriaxona y cefuroxime⁽²³⁾.

Como era de esperar, el análisis de la evolución en el tiempo de los antibiogramas circulantes mostró una clara tendencia hacia la aparición de tipos con mayor espectro de resistencia (G, H, I, con resistencia para cuatro y tres antibióticos respectivamente, véase figura 3). Actualmente circularían tres serotipos de *S. flexneri*: 2a el más frecuente, seguido por 3c y 1, y cinco antibiogramas diferentes: G (Cm, Sxt, Amp, Tet)^R, H (Cm, Amp, Tet)^R, I (Cm, Sxt, Amp)^R, J (Amp, Te)^R y A (sensible a Amp, Cm, Tet, Sxt), con predominio de los primeros. Quedarían como recursos para el tratamiento de las infecciones por estas cepas de *S. flexneri* el ácido nalidíxico, la furazolidona o la ceftriaxona. Sin embargo, en lugares donde se utiliza el

ácido nalidíxico es frecuente la aparición de cepas resistentes⁽⁶⁾. En el caso de ceftriaxona, sólo se dispone de la preparación de uso parenteral y no existe en el mercado local furazolidona para uso en seres humanos.

El caso de *Shigella sonnei* sería diferente del de *S. flexneri*. Como sucede en África y Asia⁽⁶⁾, durante el período 2001-2003 sólo se recuperaron dos antibiogramas: (Amp)^R cuatro cepas y (Amp)^S cinco cepas. Estos resultados llaman la atención, teniendo en cuenta la frecuente variación en el tiempo de los diferentes antibiogramas de *S. flexneri*, y considerando también que varios elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones) hallados en cepas de *Shigella* son importantes en la diseminación de resistencia^(24,25). *S. sonnei* podría estar expuesta a menor presión de selección porque circula menos en el medio, los procesos que origina son menos severos y las consultas con tratamiento instituido menos frecuentes.

Un aporte útil de este estudio es la información que ofrece para la formulación de vacunas de aplicación en niños usuarios de Salud Pública. De acuerdo con las características del LPS se reconocen actualmente 47 serotipos dentro del género *Shigella*; por lo tanto parece poco práctico construir y luego utilizar una vacuna multivalente que los contenga a todos: es fundamental seleccionar los prevalentes.

El LPS de *Shigella* es importante como factor de virulencia y como inmunógeno potencial. Niveles críticos de IgG sérica e IgA mucosa contra el dominio "O" específico (O-SP) de este antígeno conferirían inmunidad serotipo específica para la shigelosis^(26,27). Estudios en seres humanos mostraron que la inmunización con O-SP conjugado con diferentes proteínas determinó aumentos significativos en el nivel de anticuerpos (IgG) anti LPS⁽⁸⁾. Teniendo en cuenta las reacciones cruzadas que ocurren dentro de los serotipos incluidos en el serogrupo B (con la excepción del 6), y los datos de ensayos clínicos que apoyan o sugieren algún grado de protección cruzada⁽⁹⁾, el inmunógeno a ensayar para uso local debería incluir los O-SP de los serotipos 2a, 1, 3c, 4, 6 y también el de *Shigella sonnei*. En caso de ser 100% efectivo, este inmunógeno protegería a estos niños de la mayoría de las infecciones por *Shigella*.

Agradecimientos

Al doctor Juan Alfonso Ayala Serrano (Universidad Autónoma de Madrid, España) por la lectura crítica del manuscrito.

Summary

Background: *Shigella flexneri* is the most frequent bacterial agent in infants under 5 years old with bloody diar-

rhea. Shigellosis is an infectious disease successfully treated with antibiotics. Empirical choice of the adequate antibiotic is difficult due to *Shigella*-resistant antibiotics. This situation promoted the interest to develop vaccines able to control the disease. Since many vaccines tend to promote specific serotype immune response, it is important to categorise prevalent serotypes in the population study. The aim of the study was to categorise 50 isolated *Shigella flexneri* strains in infants with bloody diarrhea, collected in four etiologic surveys of gastroenteritis.

Methods: serotyping, lipopolysaccharide patterns, plasmid profile and sensitivity to different antibiotics were carried out in each strain.

Results: prevalent serotypes were 2a, 3c, 4, 6, y 1. Ten different antibiogramas were identified. In serotype 2a, 3 plasmidic patterns were found; 5 was the most frequent, followed by 6 and 7. Analyse of present antibiogramas showed a trend to an enlargement of the resistance range.

Conclusions: according to results, immunogen should include specific "O" determinants for 2a, 1, 3c, 4, 6 and *Shigella sonnei* serotypes.

Résumé

Introduction: chez des enfants de moins de 5 ans avec diarrhée sanglante, *Shigella flexneri* est l'agent bactérien le plus fréquemment repéré dans notre pays. La shigellose est une des maladies infectieuses où le traitement avec antimicrobiens est effectif. Le choix empirique de l'antimicrobien adéquat est problématique étant donné la résistance de *Shigella* à plusieurs antibiotiques. De là l'intérêt pour le développement de vaccins pour contrôler cette maladie. Certains vaccins visent à promouvoir la réponse immune sérotype spécifique; il est donc important d'établir la distribution de sérotypes prévalents dans la population à immuniser. Le but de cette étude est de caractériser 50 souches de *Shigella flexneri* isolées à partir d'enfants avec diarrhée sanglante, récupérées à quatre enquêtes étiologiques de gastroentérite.

Méthodologie: on a réalisé pour chacune sérotypification, étude du code de lipopolysaccharide, profil plasmidique et étude de sensibilité à de différents antimicrobiens.

Résultats: les sérotypes prévalents ont été 2a, 3c, 4, 6 et 1. On a identifié 10 antibiogramas différents. Dans les cultures du sérotype 2a on a trouvé 3 patrons plasmidiques; le 5 en est le plus fréquent et après le 6 et le 7. L'analyse de l'évolution des antibiogramas circulants a montré une tendance vers l'apparition de types à plus grand spectre de résistance.

Conclusions: il en résulte l'intérêt à essayer un immunogène qui inclut les déterminants "O" spécifiques des sérotypes 2a, 1, 3c, 4, 6 et celui de *Shigella sonnei*.

Bibliografía

1. **Sack RB, Rahman M, Yunus M, Khan EH.** Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Suppl 1): S102-5.
2. **Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al.** Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 1999; 77(8): 651-66.
3. **Salam MA, Bennish ML.** Antimicrobial therapy for shigellosis. *Rev Infect Dis* 1991; 13(Suppl 4): S332-41.
4. **Lima AA, Sidrim JJ, Lima NL, Titlow W, Evans ME, Greenberg RN.** Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brasil. *J Clin Microbiol* 1997; 35(5): 1061-5.
5. **Lima AA, Lima NL, Pinho MC, Barros Junior EA, Teixeira MJ, Martins MC, et al.** High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(1): 256-9.
6. **Chu YW, Houang ET, Lyon DJ, Ling JM, Tak-Keung NG, Cheng AF.** Antimicrobial resistance in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Hong Kong, 1986 to 1995. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(2): 440-3.
7. **Navia MM, Capitano L, Ruiz J, Vargas M, Urassa H, Schelleberg D, et al.** 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(10): 3113-7.
8. **Passwell JH, Harlev E, Ashkenazi S, Chu C, Miron D, Ramón R, et al.** Safety and immunogenicity of improved *Shigella* O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines in adults in Israel. *Infect Immun* 2001; 69(3): 1351-7.
9. **Noriega FR, Liao FM, Maneval DR, Ren S, Formal SB, Levine MM.** Strategy for cross-protection among *Shigella flexneri* serotypes. *Infect Immun* 1999; 67(2): 782-8.
10. **Fries LF, Montemarano AD, Mallett CP, Taylor DN, Hale TL, Lowell GH.** Safety and immunogenicity of a proteosome-*Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. *Infect Immun* 2001; 69(7): 4545-53.
11. **Rasolofoa-Razanamparany V, Cassel-Beraud AM, Roux J, Sansonetti PJ, Phalipon A.** Predominance of serotype-specific mucosal antibody response in *Shigella flexneri*-infected humans living in an area of endemicity. *Infect Immun* 2001; 69(9): 5230-4.
12. **Prado V, Lagos R, Nataro JP, San Martín O, Arellano C, Wang, JY, et al.** Population based study of the incidence of *Shigella* diarrhea and causative serotypes in Santiago, Chile. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18(6): 500-5.
13. **Uruguay. Ministerio de Salud Pública. Departamento de Estadística.** Boletín Oficial 2002: 13.
14. **Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, et al.** Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2134-9.
15. **Ewing WH.** Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York: Elsevier, 1980: 137-72.
16. **Hitchcock PJ, Brown TM.** Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* 1983; 154(1): 269-77.
17. **Varela G, Schelotto F, di Conza J, Ayala JA.** Analysis of the O-antigen chain length distribution during extracellular and intracellular growth of *Shigella flexneri*. *Microb Pathog* 2001; 31(1): 21-7.
18. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard. NCCLS Document M2-A7. 7th ed. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
19. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989: 25-32.
20. **Varela G, Schelotto F, Pais T, Pérez MC, Dell'Acqua L, Zanetta E.** Diarrea con sangre y síndrome urémico hemolítico en Montevideo, Uruguay. Congreso Latinoamericano de Microbiología, 11. Buenos Aires, 1991.
21. **Montano A, Torres ME, Pérez MC, Algorta G, Schelotto F.** *Shigella*: evolución de la resistencia antimicrobiana e implicancias terapéuticas. Encuentro Nacional de Microbiólogos, 6. Montevideo, 2003.
22. **Ramírez Del Puerto YG, Pastorini Correa JC, Russi Cahill JC, Ferrari Castilla AM.** Enfermedad diarreica aguda: características de la población asistida en el CASMU. Abril 1997 - Abril 1998. *Arch Pediatr Urug* 2001; 72(2): 110-5.
23. **Giachetto G, Camacho G, Speranza N, Telechea H, Olmos I, Kegel S, et al.** Análisis de la prescripción de antibióticos en el hospital pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR). Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica, 10. Montevideo, 2003.
24. **Hall RM, Collis CM.** Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updates* 1998; 1: 109-19.
25. **Oh JY, Yu HS, Kim SK, Seol SY, Cho DT, Lee JC.** Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from southwestern Korea during epidemic periods. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 421-3.
26. **Cohen D, Ashkenazi S, Green MS, Gdalevich M, Robin G, Slepon R, et al.** Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet* 1997; 349(9046): 155-9.
27. **Sansonetti P, Phalipon A.** Shigellosis: from molecular pathogenesis of infection to protective immunity and vaccine development. *Res Immunol* 1996; 147(8-9): 595-602.